



Uso de inoculantes bacterianos como
herramienta para la restauración de
Arthrocnemum macrostachyum en hábitats
bajo estrés salino
(TRABAJO FIN DE MÁSTER)



Marta de Jesús Gutiérrez Barranco
Tutora: María Zunzunegui González
Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Ecología)

Contenido

Índice.....	1
1. Resumen.....	2
2. Abstract	2
3. Introducción	4
4. Objetivos	7
5. Metodología	8
5.1 Material vegetal.....	8
5.2 Diseño experimental.....	9
5.3 Análisis de crecimiento	11
5.4 Análisis del rendimiento fotosintético.....	11
5.5 Análisis del estado hídrico	12
5.6 Análisis de la estructura de la hoja.....	12
5.7 Análisis estadístico.....	13
6. Resultados	13
6.1 Efecto de la salinidad, inoculación bacteriana y sustrato sobre la actividad fotosintética de <i>A. macrostachyum</i>	13
6.2 Efecto de la salinidad, inoculación bacteriana y sustrato sobre el estado hídrico de <i>A. macrostachyum</i>	16
6.3 Efecto de la salinidad, inoculación bacteriana y sustrato sobre la biomasa y crecimiento aéreo y enraizamiento de <i>A. macrostachyum</i>	18
7. Discusión.....	26
8. Conclusión.....	28
9. Bibliografía	29

1. Resumen

La restauración de ambientes salinos, ya sean humedales o marismas, es de vital importancia, pues de ellos obtenemos beneficios ecológicos, culturales y económicos. Actualmente, gran parte de ellos se encuentra degradados y de los estudios que se realizan sobre ellos depende su supervivencia. *Athrocneum macrostachyum* (Moric.), es una halófito dominante de las marismas, por lo que es una especie potencial para la restauración de estos ecosistemas. Estudios previos han demostrado que la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento (PGPB) podrían ser una solución viable para la restauración de los ambientes salinos. En el presente estudio, se realizó un experimento en el invernadero en esquejes de *A. macrostachyum* con el fin de determinar el efecto de dos consorcios de bacterias PGP combinándolos con tres tipos de sustratos (perlita, fibra de coco y mantillo) y dos tratamientos de salinidad (0 mM y 171 mM). Tras 3 meses de cultivo en macetas en el invernadero, se midieron distintas variables relacionadas con el crecimiento (biomasa, longitud tallo y raíces) y el estado fisiológico (tasa fotosintética, eficiencia fotoquímica, conductancia estomática, eficiencia uso del agua, contenido hídrico). Se observó un efecto positivo de la inoculación en perlita en condiciones de salinidad cuando se analizaron los resultados obtenidos de las variables de crecimiento y rendimiento fotosintético. Los resultados de este estudio demuestran la importancia de la utilización de un sustrato y de unas condiciones de salinidad adecuadas para la multiplicación por esquejes de *A. macrostachyum*, y, sobre todo, del importante papel que realizan las PGPB.

2. Abstract

Restoration of saline environments, whether wetlands or salt marshes, is of vital importance as we obtain ecological, cultural, and economic benefits from them. Currently, a large portion of these environments is degraded, and their survival depends on the studies conducted on them. *Athrocneum macrostachyum* (Moric.) is a dominant halophyte in salt marshes, making it a potential species for the restoration of these ecosystems. Previous studies, have shown that inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) could be a viable solution for the restoration of saline environments. In this study, an experiment was conducted in the greenhouse using *A. macrostachyum* cuttings to determine the effect of two PGPB bacterial consortia combined with three types of substrates (perlite, coconut fiber and mulch) and two levels of salinity (0 mM and 171 mM). After three months of cultivation in pots in the greenhouse, various variables related to growth (biomass, stem and root length) and physiological status

(photosynthetic rate, photochemical efficiency, stomatal conductance, water use efficiency, water content) were measured. A positive effect of inoculation with perlite under saline conditions was observed when analyzing the results obtained for growth variables and photosynthetic performance. The results of this study demonstrate the importance of using a suitable substrate and appropriate salinity conditions for the multiplication of *A. macrostachyum* cuttings, and above all, the important role played by PGPB.

3. Introducción

Los humedales costeros, como las marismas, ocupan entre un 3-5% de la superficie terrestre, siendo de los ecosistemas más abundantes, con mayor aporte servicio ecosistémico y más productivo de la Tierra (Zedler y Kercher, 2005; Billah *et al.*, 2022). Son importantes sumideros de CO₂ atmosférico debido a sus altas tasas de producción primaria (producción de raíces, brotes y hojas), tienen la capacidad de mejorar la calidad del agua, retienen nutrientes, protegen los ambientes costeros estabilizando los sedimentos y, además, albergan numerosas especies de animales y plantas de gran interés (Billah *et al.*, 2022). A lo largo del siglo XX, más del 50% de los humedales han sido degradados debido a la actividad humana, por lo que, en respuesta, se están realizando esfuerzos de restauración para rehabilitar las marismas en muchas áreas del mundo y así mitigar la pérdida de biodiversidad a nivel mundial (Millennium Ecosystem Assessment, 2005; Curado *et al.*, 2014).

Las marismas mareales son las únicas zonas donde se pueden establecer una gran variedad de halófitas en todo el litoral andaluz. Sin la protección y conservación de los de estos espacios marismeños, la superficie se vería seriamente reducida. La firma del convenio de RAMSAR por el Estado español y la inclusión de las marismas del Odiel como zona húmeda a proteger, resalta la relevancia internacional de esta área (IAAP, s.f.). Estas marismas se localizan entre las desembocaduras de los ríos Odiel y Tinto (Huelva), y comprenden una superficie de 7158 hectáreas (Imagen 1). Están consideradas como reserva de la Biosfera por la UNESCO, y declaradas por la Unión Europea como zona de especial protección de aves (ZEPA) (IAAP, s.f.).

En este enclave de marismas del Odiel podemos encontrar especies animales y vegetales adaptadas a condiciones de inundaciones periódicas y de alta salinidad que pueden sobrevivir en estas condiciones extremas y que, además, condicionan la respuesta de la vegetación. Esta zona de marismas se caracteriza por ser altamente eutróficas, debido a la carga de nutrientes provenientes de escorrentías urbanas y agrícolas y de procesos industriales de la zona de Huelva (Davy *et al.*, 2009; Curado *et al.*, 2014).

Espacios Naturales Protegidos



Imagen 1. Mapa Marismas del Odiel y alrededores. Rosa: Reserva natural concertada, Naranja: Paraje Natural, Rojo: Reserva Natural. Imagen modificada con QGIS (Geographic Information System).

En este contexto de reducción de humedales y, en concreto, en el entorno de marismas del Odiel, se vuelve fundamental recurrir a estrategias de restauración efectivas que contribuyan al éxito de implantación de las especies halófitas. En este sentido, una de las estrategias más prometedoras para la restauración de estos ecosistemas es el uso de bacterias promotoras del crecimiento (PGP).

En la rizosfera encontramos una comunidad bacteriana que puede tener interacciones importantes con las plantas, principalmente, con aquellas involucradas en la mineralización de nutrientes o en la competencia por los mismos (Van Der Heijden et al., 2008; Camacho *et al.*, 2020). Además, puede brindar protección contra hongos patógenos (Heydari y Pessaraki, 2010; Camacho *et al.*, 2020), promover el crecimiento de las raíces o mejorar la tolerancia a compuestos tóxicos (Morgan *et al.*, 2005; Camacho *et al.*, 2020).

Por otro lado, cuando las plantas se encuentran en condiciones extremas, estas pueden cambiar las condiciones microclimáticas bajo su dosel, modificando, por ejemplo, la humedad y/o los nutrientes del suelo (Jing *et al.*, 2019; Camacho *et al.*, 2020), afectando así, a las comunidades microbianas asociadas (Hortal *et al.*, 2013; Iwaoka *et al.*, 2018; Camacho *et al.*, 2020), las cuales, como hemos mencionado anteriormente, son

de gran importancia para el desarrollo de las plantas. Las bacterias capaces de promover el crecimiento de plantas han sido aisladas a partir de diversas fuentes y ambientes naturales. Los ambientes más frecuentes explorados han sido los nódulos de la leguminosa, la rizosfera que rodea las plantas o de sus propios tejidos. Sin embargo, también podrían obtenerse a partir del suelo (Onofre-Lemus *et al.*, 2009).

Por ello, el uso de inoculantes con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) es una estrategia potencial para reducir el estrés en las plantas y estimular su crecimiento, con la finalidad de poder utilizarse en la restauración en ambientes bajo estrés salino. A través de mecanismos como la producción de hormonas, fijación de N atmosférico o la mejora en la absorción de nutrientes se mejora el desarrollo de las plantas mediante interacciones mutualistas (Zaidi *et al.*, 2009; Mesa-Marín *et al.*, 2019). Estudios recientes, demuestran que el uso de PGPB mejora el enraizamiento (Barcia-Piedras *et al.*, 2023) y el rendimiento fotosintético (Mateos-Naranjo *et al.*, 2020) de halófitas cuando estas se encuentran sometidas a diversos estreses, como, por ejemplo, la salinidad.

La salinidad, es un factor ambiental que influye en las plantas que viven en ambientes costeros o con periodos largos de sequía, algunos de los efectos que podemos observar es la reducción en la absorción de agua y la disminución en el crecimiento (Munns, 2002; Reyes Pérez *et al.*, 2013). Cuando la concentración de sales es mayor en el exterior, en las células se produce sequía osmótica, toxicidad por absorción excesiva de Na y Cl, así como un desequilibrio nutricional (Karimi *et al.*, 2005; Reyes Pérez *et al.*, 2013). La tolerancia a la salinidad es incompatible con variables cuantitativas, es decir, con tener gran tasa de crecimiento o producción de biomasa, por lo que se han realizado investigaciones en las que se evalúan variedades en condiciones de salinidad (Grieve *et al.*, 1999; Reyes Pérez *et al.*, 2013).

En la zona de las marismas del Odiel encontramos numerosas especies vegetales de restringida distribución, como es *Athrocneum macrostachyum* (Morici.), que es una de las halófitas dominantes en estas marismas (Rubio-Casal *et al.*, 2001). Es un arbusto C3 de la familia *Amaranthaceae* (Valdés *et al.*, 1987). Se le considera un colonizador primario de las salinas, teniendo un óptimo de salinidad del suelo que va desde 171 a 510 mM NaCl (Redondo-Gómez *et al.*, 2010). Tradicionalmente, se había descrito que la familia *Amaranthaceae* interactuaba poco con los microorganismos del suelo (Camacho *et al.*, 2020), por lo que, durante mucho tiempo, no se ha considerado el potencial de las interacciones mutualistas de los microorganismos benéficos del suelo con *A.*

macrostachyum. Sin embargo, estudios recientes han desvelado que *A. macrostachyum* puede establecer asociaciones con hongos y bacterias endófitas (Camacho *et al.*, 2020) y, que, en común con otras halófitas, su rizosfera puede tener una comunidad bacteriana distintiva (Mora-Ruiz *et al.*, 2016; Camacho *et al.*, 2020), de la cual se han descrito recientemente varias especies de bacterias (Camacho *et al.*, 2016a, 2016b, 2017). Todo esto apunta a la posible existencia de mecanismos fisiológicos en estas halófitas que podrían permitirles establecer mutualismo con su microbioma para sobrevivir en ambientes hostiles con contaminantes del suelo (Navarro-Torre *et al.*, 2016). Apoyando esta idea, se han identificado varias bacterias endofíticas en *A. macrostachyum* con un papel potencial en la tolerancia a la alta salinidad (Mora-Ruiz *et al.*, 2016; Navarro Torre *et al.*, 2017).

La comprensión de cómo las bacterias promotoras del crecimiento (PGP) pueden influir en el enraizamiento y el crecimiento de las plantas halófitas en un entorno de alta salinidad es fundamental para diseñar estrategias de restauración efectivas. Además, el estudio de las PGP en este contexto no solo beneficia a *A. macrostachyum*, sino que podrían aplicarse en la restauración de otros hábitats sometidos a condiciones de salinidad. Esta investigación proporciona conocimiento científico, para la conservación y restauración de los ecosistemas de marisma en todo el mundo.

4. Objetivos

Objetivo General:

Evaluar la eficacia de diferentes tipos de inoculantes bacterianos y sustratos en la reproducción a partir de esquejes de *Arthrocnemum*, con el fin de poder desarrollar un protocolo óptimo para la restauración de marismas y humedales salinos.

Objetivos Específicos:

1. Evaluar el efecto de los consorcios bacterianos inoculados en el crecimiento y desarrollo de los esquejes y determinar si existen diferencias entre los dos tipos de consorcios utilizados.
2. Investigar cómo diferentes tipos de sustratos afectan al crecimiento y supervivencia de los esquejes de *Arthrocnemum*.
3. Determinar si la salinidad altera el posible efecto positivo de los consorcios bacterianos inoculados en el crecimiento y desarrollo de los esquejes

4. Estudiar la respuesta fisiológica de *Arthrocnemum* en plantas en desarrollo sometidas a diferentes condiciones de salinidad y con distintos sustratos para identificar aquellos que optimizan la reproducción por esquejes de *Arthrocnemum*.

5. Metodología

5.1 Material vegetal

A principios del mes de febrero de 2023, se recolectaron tallos adultos de *Athorcneum macrostachyum* en las proximidades de las marismas del Odiel, concretamente, en las marismas del Rio Piedra (37° 15'N, 7° 11' O), donde pudimos encontrar una población bastante bien establecida. Una vez recolectadas, fueron trasladadas al invernadero del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) para su posterior trasplante.

Se utilizaron macetas individuales con un volumen de 0,6 L para cada individuo. Utilizamos 3 sustratos distintos: perlita, fibra de coco y mantillo. Antes de trasplantarse cada esqueje se realizó una criba, eliminando aquellos que no superasen los 20 cm de longitud, después se eliminaron las hojas de los 5 primeros nudos, empezando desde abajo, ya que esta iba a ser la parte que se iba a enterrar (Imagen 2). Todas las macetas se colocaron en bandejas de 20 en 20 y se las diferenció por el tipo de tratamiento de sal y de inóculo. Durante todo el experimento las bandejas permanecieron en el invernadero del CITIUS con una temperatura que oscilaba entre los 21° a 25°, con una humedad relativa entre el 40% y 60% y luz natural.



Imagen 2. Ejemplar de *Athrocneum macrostachyum*. Imagen tomada en el invernadero del CITIUS.

Para que los efectos de las condiciones ambientales fueran más homogéneos con nuestra especie, se cambiaban las bandejas de posición periódicamente.

5.2 Diseño experimental

Se dispusieron 18 tratamientos diferentes (n=20 por tratamiento), los cuales se combinaron con 3 sustratos distintos (perlita, fibra de coco y mantillo), 2 tratamientos de salinidad (0 mM y 171 mM de NaCl) y tres tratamientos de inoculación con bacterias PGPB (inoculo 1, inoculo 2 y sin inocular), es decir, un total de 360 individuos sometidos a 3 sustratos x 2 de salinidad x 3 de inoculación (Figura 1).

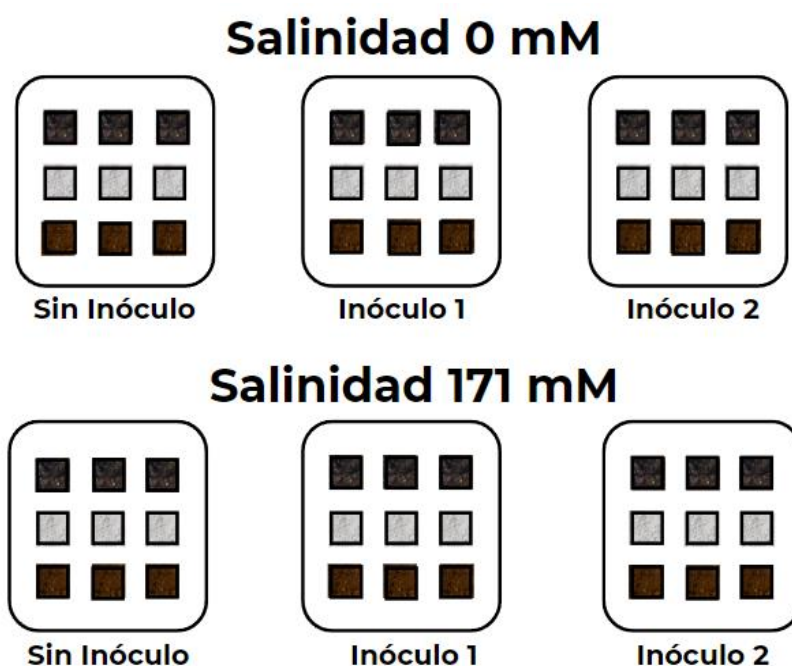


Figura 1. Esquema del experimento realizado con *A. macrostachyum*. 18 tratamientos (n=20 por tratamiento). Combinación con tres tipos de sustrato (diferenciados por colores: mantillo (1° fila), perlita (2° fila) y fibra de coco (3° fila)), dos niveles de salinidad (0 mM y 171 mM) y tres niveles de inoculación (sin inóculo, inóculo 1, inóculo 2).

Una vez colocadas todas las macetas en las bandejas se les añadió 3 litro de agua y se marcó el nivel para mantenerse ese óptimo de riego durante todo el experimento.

Haciendo referencia a los sustratos utilizados, se eligieron por ser los más comunes en los viveros, estableciéndose 120 macetas por cada uno y dividiéndose entre 6 bandejas al azar.

Pasados dos días de crecimiento, se empezó la inoculación bacteriana. De las 120 macetas de cada sustrato, 2 bandejas iban a ser inoculadas con el inóculo 1, otras dos con el inóculo 2 y las dos restantes iban a ser sin inóculo. Los inóculos utilizados fueron diseñados en estudios previos con endófitos y rizobacterias de la rizosfera y de tejidos de

Mesembryanthemum crystallium (Pajuelo *et al.*, 2023; Flores-Duarte *et al.*, 2023). El primer consorcio bacteriano estaba formado por S3, R5 y H17(Inóculo 1), mientras que el segundo consorcio estaba formado por MR4, MS2 y MH3 (Inóculo 2). (Pajuelo *et al.*, 2023; Flores-Duarte *et al.*, 2023) (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades PGP y actividad enzimática del inóculo 1 (S3, R5 y H17) y del inóculo 2 (MR4, MS2 y MH3).

Propiedades PGP	S3	R5	H17	MS2	MR4	MH3
Solubilización de fosfato	+	-	+	+	-	+
Producción de sideróforos	+	-	+	+	-	-
Producción de IAA	+	+	+	+	-	+
Fijación de nitrógeno	+	+	+	+	+	-
Solubilización de potasio	-	-	+	-	-	+
Formación de biofilm	+	-	-	+	+	+
Actividad ACC deaminasa	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Actividad enzimática						
ADNasa	-	+	-	+	+	-
Amilasa	-	+	+	-	+	+
Celulasa	+	+	-	+	+	+
Lipasa	-	-	-	-	-	-
Pectinasa	-	+	-	-	+	-
Proteasa	-	+	+	-	+	+
Quitinasa	-	-	-	-	-	-

Leyenda. +: presencia de propiedad; -: ausencia de propiedad; n.d.: no determinado. (Por propiedad intelectual solo se incluyen los códigos de las bacterias).

La disolución de cada inóculo se preparó con un 2% de cada inóculo y agua del grifo, después se añadiría 50 ml de esa disolución bacteriana correspondiente a cada maceta. Con respecto al control, es decir, el tratamiento sin inóculo solo se añadió 50 ml de agua del grifo. Este proceso se realizó cada 15 días hasta finalizar la parte experimental.

Pasadas 6 semanas desde el inicio del experimento, marzo de 2023, se dio comienzo al tratamiento con salinidad, ya que nuestros esquejes ya tendrían bien desarrollados sus sistemas radiculares. Se estableció que una fuera una bandeja por cada combinación de tratamiento. A partir de este momento, se regaron las bandejas con 3 litro

de agua combinándose con la concentración de NaCl correspondiente (0mM y 171mM de NaCl).

Con el fin de evitar cualquier déficit de nutrientes, a mediados del experimento se regaron las bandejas con solución Hoagland al 20% (Hoagland & Arnon, 1938).

5.3 Análisis de crecimiento

Una vez finalizado el experimento, en mayo de 2023, se cosecharon las plantas separándose, cuidadosamente, la raíz del sustrato. Primero, se registró el número de plantas enraizadas y luego, se calculó el porcentaje de éxito de cada tratamiento.

Por cada planta enraizada, se midió y se registró la altura y la longitud máxima de la raíz (n=10-20 por tratamiento). Posteriormente, se separaron en biomasa aérea y subterránea, se secaron en la estufa a 60 °C durante 72 horas, y se pesaron para obtener el peso seco.

Se determinó la longitud específica de la raíz (SRL, Specific Root Length) mediante la fórmula:

$$SRL = LR/B_{sub} \text{ (m/g)}$$

donde, LR es la longitud máxima de la raíz en metros y B_{sub} la biomasa seca subterránea en gramos (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013).

5.4 Análisis del rendimiento fotosintético

Pasados 3 meses desde el inicio del experimento, se midió el rendimiento fotosintético de manera individual para conocer el efecto de los diferentes tratamientos. El intercambio gaseoso se midió utilizando un analizador de gases infrarrojo (LI-6400-XT, Li-COR Inc., NE., EE. UU.). Se seleccionó una hoja madura y sana por planta. Se midió la fotosíntesis neta (A_n , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la conductancia estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a una concentración de CO_2 de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ de aire, una humedad relativa del 50% y $1000 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en 7 hojas por tratamiento. A las hojas medidas se les midió el área foliar (AF) con un software a partir de imágenes digitalizadas (Easy Leaf Area Free ver. 2.0, Healeson) y se ajustó la A_n y g_s de cada hoja a su área foliar.

Además, se calculó la eficiencia en el uso del agua (iWUE) como:

$$iWUE (\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}) = A_n / g_s$$

Para estimar el estado del fotosistema II se realizaron medidas de fluorescencia de la clorofila *a* con un fluorímetro portátil modulable (FMS-2, Hansatech Instruments Ltd, Reino Unido). Se escogieron 12 plantas por tratamiento y se colocó en una hoja madura de cada. Primero, se adaptaron a oscuridad durante 20 minutos utilizando pinzas diseñadas para ello. Posteriormente, mediante un pulso de luz actínica saturada de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de 0,8 segundos, se determinó el máximo de eficiencia cuántica del fotosistema II (PSII) (F_v/F_m) (González *et al.*, 2008). De forma que F_v/F_m presenta un valor óptimo alrededor de 0,8 y valores más bajos indican estrés en la planta (González *et al.*, 2008).

5.5 Análisis del estado hídrico

Para analizar el estado hídrico se determinó el contenido hídrico relativo (CHR). Para ello se pesaron las 7 hojas utilizadas para las medidas de intercambio gaseoso ($n=7$ por tratamiento), con una báscula de alta precisión (Cobos Precision S.L.) (0,0000 g), para registrar su peso fresco (PF). A continuación, para determinar su peso saturado (PSat), se introdujeron en bolsas individuales humedecidas con agua destilada, y tras 24 horas a 5°C, se secaron con papel secante y se pesaron. Por último, se secaron en la estufa a 60°C durante 24 horas y se determinó su peso seco (PS).

Conociendo los valores de peso fresco, peso turgente y peso seco, se obtuvo el CHR mediante la siguiente fórmula (Saura-Mas & Lloret, 2007).

$$\text{CHR (\%)} = 100 \times (\text{PF (g)} - \text{PS (g)}) / (\text{PSat (g)} - \text{PS (g)})$$

Por lo que, a mayor CHR mejor estado hídrico de la planta.

5.6 Análisis de la estructura de la hoja

Para analizar la estructura de la hoja se determinó el peso específico foliar (PEF) calculado como:

$$\text{PEF (g cm}^{-2}\text{)} = \text{PS/AF}$$

El valor de PEF está relacionado con la resistencia de la hoja, la tasa fotosintética y el crecimiento. De manera que, cuanto mayor es el valor de PEF mayor resistencia física, menor tasa fotosintética y crecimiento más lento (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013).

5.7 Análisis estadístico

Para determinar cómo los diferentes tratamientos (tipos de sustratos, niveles de salinidad e inoculación) afectaban de manera combinada al crecimiento, la actividad fotosintética y el estado hídrico de las plantas de *Arthrocnemum macrostachium* se realizaron MANOVAS de tres vías con sustrato, inoculo y salinidad como factores independientes. Para determinar de manera individual como interaccionaban la salinidad y el tipo de inóculos se utilizaron ANOVAs de dos vías para cada sustrato. Se utilizaron Post-hoc de Tukey para comprobar las diferencias entre grupos para cada variable.

La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Kolmogorov Smirnov. En el caso de que una variable no presentase una distribución normal (como las variables de crecimiento), se aplicó una transformación logarítmica para normalizarlos.

Todos los datos se analizaron estadísticamente con el programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

6. Resultados

6.1 Efecto de la salinidad, inoculación bacteriana y sustrato sobre la actividad fotosintética de *A. macrostachyum*.

Los resultados de la actividad fotosintética indicaron la existencia de diferencias significativas entre los sustratos utilizados, la salinidad del agua y la inoculación, así como interacción entre los tres factores, para la tasa fotosintética, la conductancia estomática y la eficiencia fotoquímica máxima del PSII.

La inoculación incrementó significativamente la tasa fotosintética (A_n) en el caso de la fibra de coco para ambas salinidades ($p < 0,0001$, Figura 2). En cambio, en mantillo las tasas fotosintéticas más elevadas se debieron a la salinidad de 171 mM. Cabe destacar que las mayores tasas fotosintéticas en las macetas sin inocular para ambas salinidades se midieron en perlita.

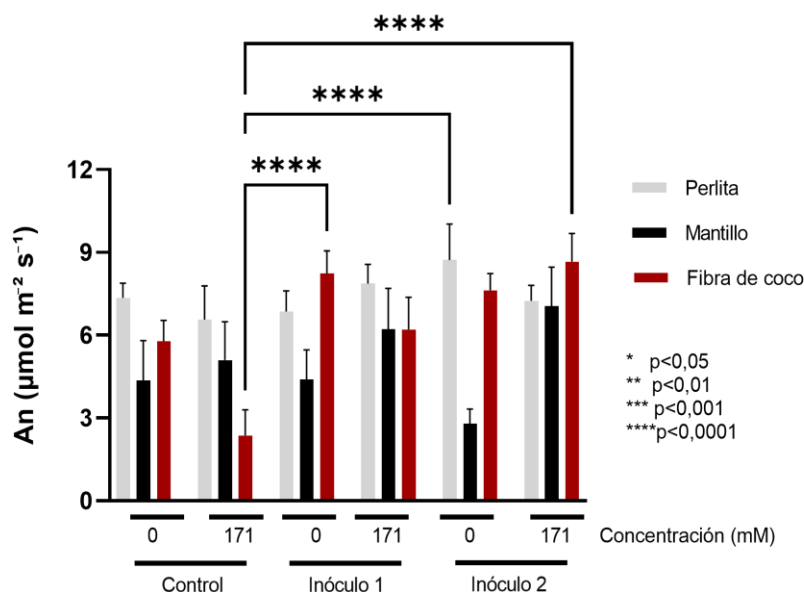


Figura 2. Respuesta de la fotosíntesis neta (An) a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 5$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Con respecto a la conductancia estomática (g_s) ($p < 0,01$, Figura 3), se puede observar como en el sustrato de perlita, se obtuvo unos valores más altos en condiciones de no salinidad, independientemente de la inoculación. Los resultados de fibra de coco fueron los más bajos, aunque la inoculación en condiciones de salinidad la incrementó significativamente. En el caso del mantillo, la salinidad interaccionó con el tipo de inóculo mostrando efectos opuestos en los inóculos 1 y 2.

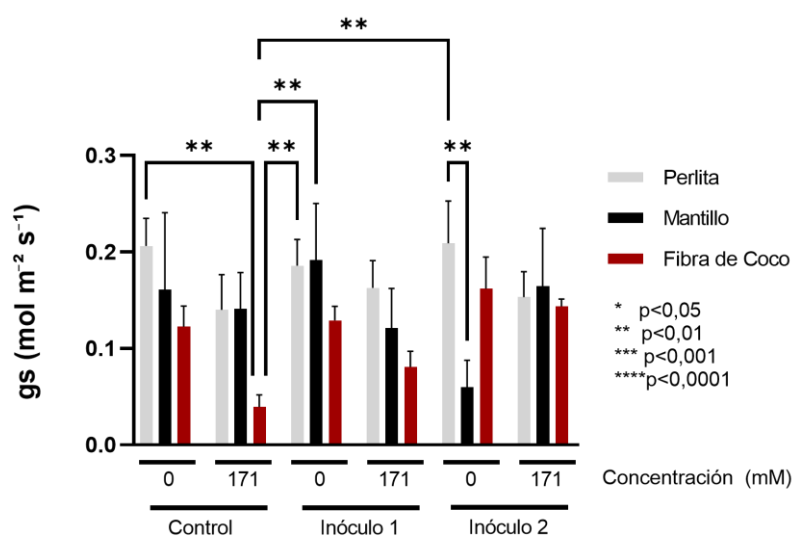


Figura 3. Respuesta de la conductancia estomática (g_s) a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 5$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Con respecto a los resultados de la eficiencia fotoquímica máxima del PSII (F_v/F_m) ($p < 0,001$, Figura 4), los datos indicaron la existencia de diferencias significativas entre los distintos sustratos. Fibra de coco presentando las eficiencias más elevadas en condiciones 0 mM de salinidad, aunque no se observó un efecto positivo de los inóculos. Tampoco en el caso de los sustratos perlita y mantillo las inoculaciones incrementaron la eficiencia fotoquímica. En el caso del mantillo si se observó incremento significativo de la eficiencia en respuesta a la salinidad.

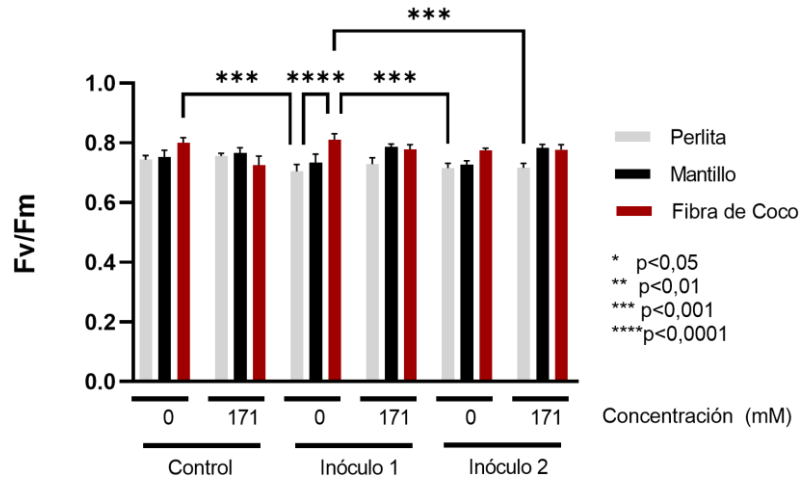


Figura 4. Respuesta de la eficiencia potencial del PSII (F_v/F_m) a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 12$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)).

6.2 Efecto de la salinidad, inoculación bacteriana y sustrato sobre el estado hídrico de *A. macrostachyum*.

Con respecto al contenido hídrico (CHR) ($p < 0,0001$, Figura 5) de *A. macrostachyum*, los datos obtenidos muestran diferencias significativas entre los tres sustratos y la inoculación. Los mayores contenidos hídricos se registraron en el tratamiento de salinidad 171 mM.

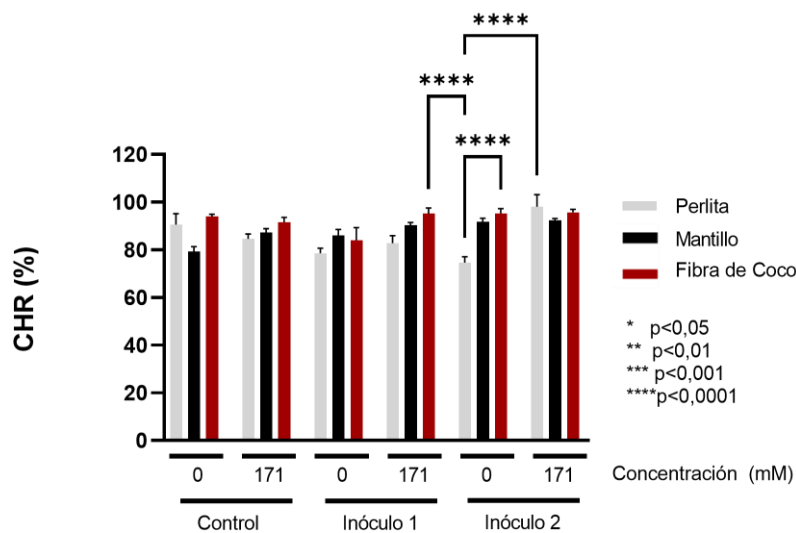


Figura 5. Respuesta del contenido relativo hídrico (CHR) a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 6$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

La eficiencia intrínseca del uso del agua (iWUE) ($p < 0,05$, Figura 6) incrementó con la inoculación en los sustratos de mantillo y fibra de coco., mientras que en la perlita se mantuvieron o, incluso, disminuyeron. Destacando el sustrato de perlita, donde la influencia de la salinidad de 171 mM incremento iWUE, independientemente de la inoculación. Los mayores valores de iWUE se registraron, en fibra de coco con el inoculo 1 y 171 mM de NaCl y en mantillo con inoculo 2 y 0 mM de NaCl.

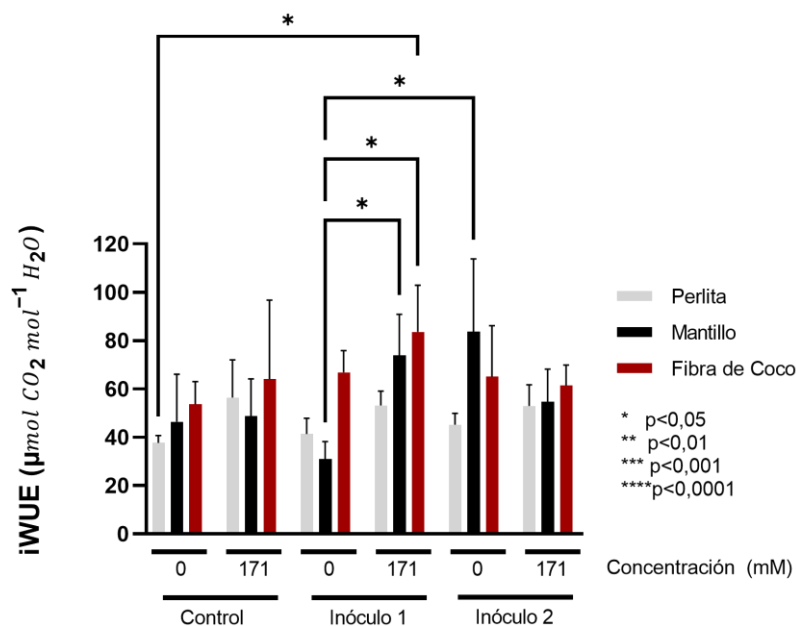


Figura 6. Respuesta de la eficiencia intrínseca del agua (iWUE) a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 5$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)).

6.3 Efecto de la salinidad, inoculación bacteriana y sustrato sobre la biomasa y crecimiento aéreo y enraizamiento de *A. macrostachyum*.

El porcentaje de enraizamiento de los esquejes obtuvo unos resultados bastante homogéneos entre los tres sustratos, aunque los mayores valores de enraizamiento se obtuvieron siempre en las plantas que crecieron en perlita, con salinidad 0 mM (control, 80% de enraizamiento e inóculo 2 con 70% de enraizamiento) y con salinidad 171 mM (70% inóculo 1) (Tabla2).

Tabla 2. Tabla del porcentaje de enraizamiento de la especie *A. macrostachyum* sometida a dos tratamientos de salinidad (0 y 171 mM de NaCl) y dos de inoculación en tres sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco).

Enraizamiento (%)						
	0 mM Control	171 mM Control	0 mM Ino1	171 mM Ino1	0 mM Ino2	171 mM Ino2
Perlita	80	60	40	70	70	35
Mantillo	45	60	65	65	55	60
Fibra de coco	55	55	45	45	70	55

Los efectos de la inoculación sobre el crecimiento de *A. macrostachyum*, fueron significativos en las diferentes variables analizadas, biomasa, altura, longitud de la raíz, longitud específica de la raíz y peso específico foliar (Figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13). En la biomasa aérea ($p < 0,0001$, Figura 7), pudimos observar diferencias significativas entre perlita y mantillo. El sustrato fibra de coco destacó en la salinidad a 0 mM cuando se había sometido a la inoculación. El mantillo obtuvo valores similares en todos los tratamientos, mientras que en perlita se observó un claro incremento de la biomasa aérea con el inóculo 1 y concentración de sal a 171 mM.

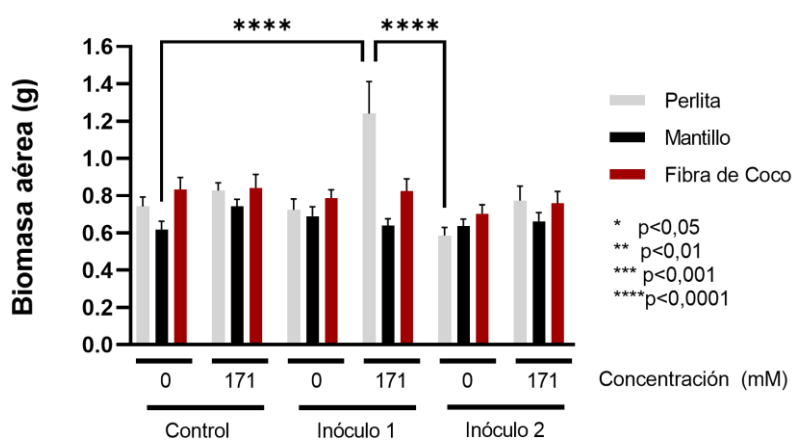


Figura 7. Respuesta de la biomasa aérea a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 5-20$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)).

En cuanto a la altura ($p < 0,0001$, Figura 8), se observó de forma generalizada un incremento significativo con la inoculación, destacando el sustrato de fibra de coco. La perlita se ve favorecida en aquellas condiciones donde la salinidad es más alta, al igual que el mantillo.

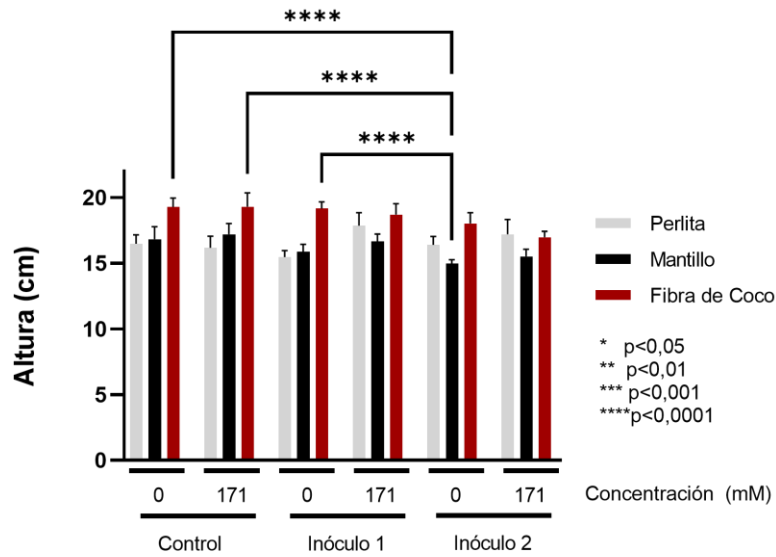


Figura 8. Respuesta de la altura a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 20$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)).

En relación con el desarrollo radicular, se observaron resultados significativos en los tres sustratos al analizar la biomasa subterránea ($p < 0,001$, Figura 9). Destacamos la fibra de coco, que fue la que obtuvo los resultados más elevados en general. Tanto en perlita, como en fibra de coco, podemos observar que la inoculación 1 y la salinidad de 171mM son las que más favorecieron el aumento de biomasa subterránea.

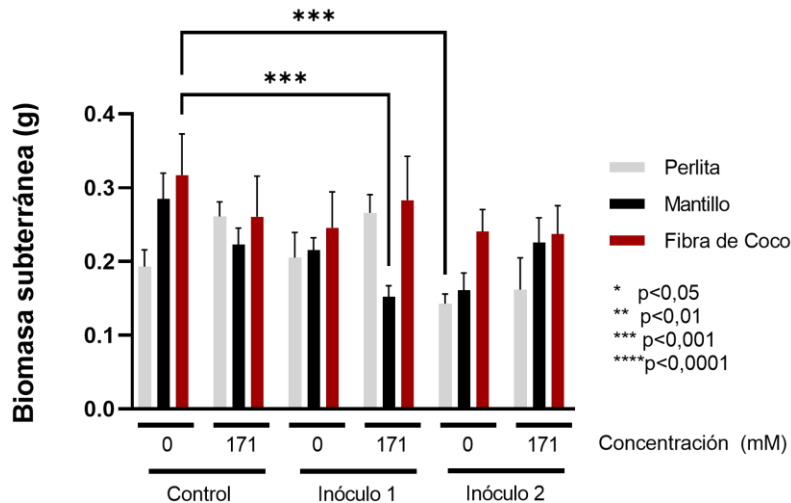


Figura 9. Respuesta de la biomasa subterránea a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 20$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Con respecto a la longitud de la raíz ($p < 0,0001$, Figura 10), el sustrato de mantillo fue el que registró las menores longitudes de raíz. En contraste, en el sustrato de perlita, pudimos observar cómo la inoculación 1 y la salinidad de 171mM favorecieron el crecimiento en longitud de las raíces, como ya se ha comentado anteriormente en biomasa aérea y biomasa subterránea. La fibra de coco también presentó valores altos de longitud de raíces en condiciones de salinidad 0 mM cuando era inoculada (inóculo 1 e inóculo 2) y en condiciones de salinidad general.

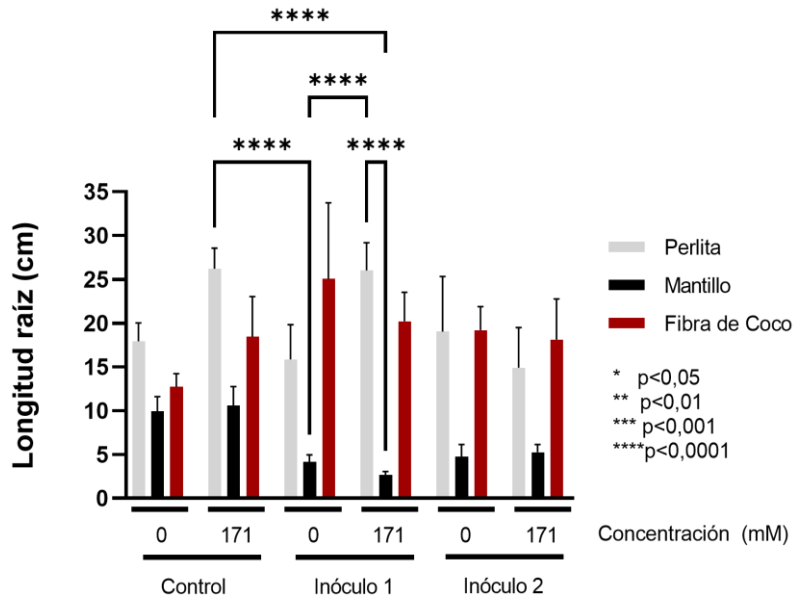


Figura 10. Respuesta de la longitud de la raíz a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 5-16$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)).

En cuanto a la longitud específica de la raíz (SRL) ($p < 0,0001$, Figura 11), se vio influenciada de manera significativa por la inoculación en los sustratos de perlita y fibra de coco, sobre todo. En perlita se observaron los resultados más altos en el tratamiento de salinidad de 171mM. Por el contrario, en el sustrato mantillo los tratamientos controles presentaron los valores más altos de SRL, por lo que la inoculación tuvo como efecto un aumento del grosor de las raíces de los esquejes creciendo en este sustrato.

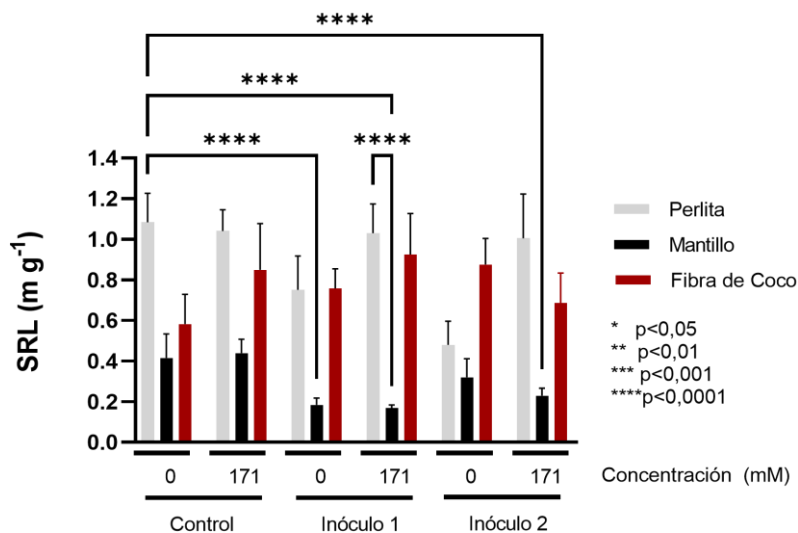


Figura 11. Respuesta de la longitud específica de la raíz (SRL) a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 5-16$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Con respecto a la biomasa total ($p < 0,0001$, Figura 12), podemos resaltar que los mayores valores en los tres sustratos se produjeron en la concentración de sal más alta. La inoculación no tuvo como resultado general un incremento de la biomasa total. Solo las plantas tratadas con el inóculo 1 que crecieron en salinidad 171 en perlita presentaron mayor biomasa que las no inoculadas. Indicando que la combinación de los dos factores, salinidad y el inóculo 1 potenciaron el crecimiento de la especie.

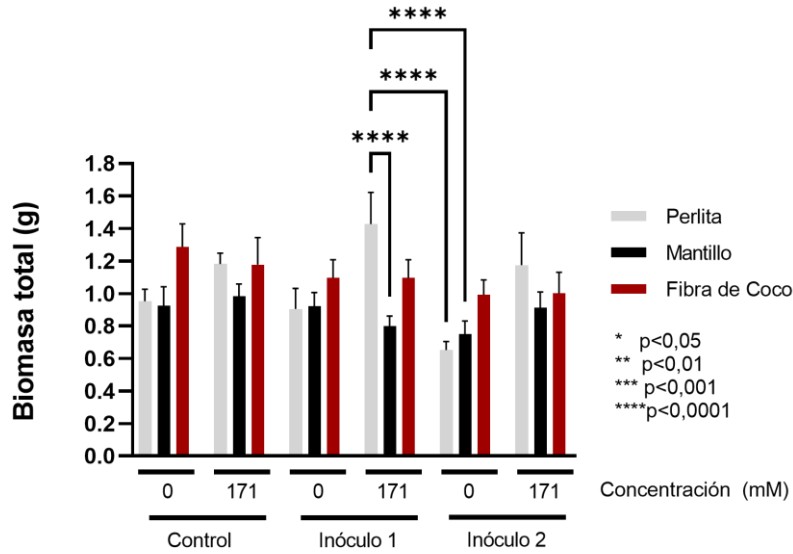


Figura 12. Respuesta de la biomasa total a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n=5-20$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)).

Por último, al analizar el peso específico foliar (PEF) ($p < 0,05$, Figura 13), encontramos diferencias significativas entre los tres sustratos. Fibra de coco produjo el valor más alto de PEF con la inoculación 2 a 0 mM de NaCl. En el sustrato perlita, los mayores PEF se midieron con el inóculo 2 a ambas salinidades.

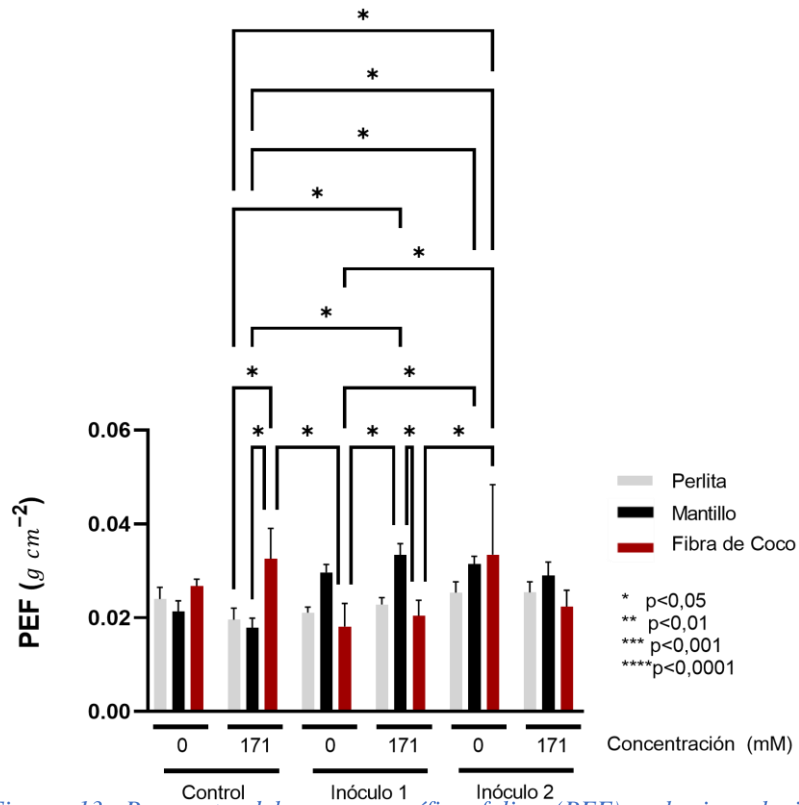


Figura 13. Respuesta del peso específico foliar (PEF) a la inoculación bacteriana en combinación con diferentes sustratos (perlita, mantillo y fibra de coco) y salinidades (0 y 171 mM) en esquejes de la especie *A. macrostachyum* tras 3 meses de crecimiento. Los valores del eje x representan la media \pm error estándar ($n = 20$). En el eje de ordenadas se representa los controles y las combinaciones de consorcios bacterianos con los dos tratamientos de salinidad. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre los distintos tratamientos (ANOVA de dos vías (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$)).

7. Discusión

La restauración de los humedales es necesaria no solo por los beneficios ecológicos que nos ofrecen, sino también por los servicios culturales, económicos y de apoyo a la biodiversidad de su entorno (Mitsch 2010). Tras el análisis de nuestros resultados, podemos demostrar que la utilización de bacterias promotoras del crecimiento en nuestra especie de estudio obtuvo unos resultados positivos en el enraizamiento y crecimiento de *A. macrostachyum*. al combinarse con distintos sustratos y distintas concentraciones de sal.

Con respecto a las condiciones de salinidad, los inóculos se vieron claramente favorecidos con la concentración de sal más alta, ya que la especie de estudio tiene su óptimo de crecimiento entre los 171-510 mM (Redondo-Gómez *et al.*, 2010), por lo que la salinidad es la que juega un papel estructural en las comunidades bacterianas (Camacho *et al.*, 2020). Las cepas utilizadas para el estudio provienen de ambientes salinos extremos, por lo que han desarrollado un mecanismo que las hace resistentes a la salinidad (kataoka *et al.*, 2021). Deteniéndonos en los sustratos, la perlita presentó los mejores resultados de enraizamiento y crecimiento.

Durante el estudio hemos podido apreciar que los distintos tipos de sustrato tienen una relevancia importante para el desarrollo de los esquejes de *A. macrostachyum*, además de para los dos consorcios bacterianos utilizados. Algo a destacar de la especie es que, en presencia de sal, sin inoculación, la planta presenta una tasa fotosintética y biomasa similar a las plantas inoculadas en condiciones de no salinidad, esto es debido a su condición de halófito estricta. Puesto que los inóculos promueven el crecimiento en condiciones estresantes, en muchos de nuestros resultados cuando la planta se encuentra en su concentración de sal óptima, 171 mM, y la inoculamos encontramos valores más bajos o similares a los de la concentración de 0 mM (Barcia-Piedras *et al.*, 2023).

Los resultados mostraron que el sustrato de perlita es el que mejor respuesta ha dado, tanto en los parámetros fisiológicos, como en los de biomasa. Esto puede deberse a que la perlita es un sustrato con una composición porosa, por lo que permite una mayor oxigenación y crecimiento radicular (Rubio-Asencio *et al.*, 2019).

En cuanto al efecto de la inoculación en el rendimiento fotosintético de la especie, podemos decir que los sustratos tratados con inóculos presentaron tasas fotosintéticas superiores a los controles. Esto podría relacionarse con la capacidad de fijación del

nitrógeno que tienen las bacterias utilizadas, ya que el nitrógeno es esencial para la proteína RuBisCo y esta es importante para la capacidad fotosintética (Pérez-Romero *et al.*, 2018), además de que la especie aumenta su superficie fotosintética, es decir, su biomasa aérea, a partir de 171 mM de NaCl (Barcia-Piedras *et al.*, 2023).

Por el contrario, la longitud de la raíz de las plantas inoculadas solo fue superior a los controles en el sustrato de fibra de coco. Incluso, en el sustrato mantillo las mayores longitudes de raíz se midieron en los controles que en las plantas inoculadas. Esto puede relacionarse con la iWUE, ya que en el sustrato de fibra de coco se observaron valores significativamente más elevados de iWUE en las plantas inoculadas que en los controles.

El CHR que se observó tanto en los controles, como en las inoculadas fueron elevadas, esto puede deberse a la capacidad que tiene la especie de adaptarse a las condiciones salinas (Redondo-Gómez *et al.*, 2007).

Con respecto a la biomasa, como se mencionó anteriormente, *A. macrostachyum* aumenta su superficie fotosintética (biomasa y altura) en condiciones de salinidad a partir de los 171 mM de NaCl, por lo que los resultados de la biomasa aérea y de la altura fueron similares entre las plantas en condiciones de salinidad y las que no (Barcia-Piedras *et al.*, 2023). Los consorcios creados están compuestos por cepas que tienen una alta capacidad para promover el crecimiento apical y radicular gracias a la producción de ácido indolacético (IAA) (Calio *et al.*, 2006), esto lo podemos observar en la altura, pero en la longitud de la raíz no ha sido tan efectiva. Como veremos a continuación y como ya se comentó en otro estudio que la misma especie, las bacterias de la rizosfera no tenían efectos significativos sobre la elongación de la raíz (Flores-Duarte *et al.*, 2023). La biomasa subterránea también se vio favorecida cuando se inocularon los distintos sustratos, con sal o sin sal, sobre todo se pueden apreciar una homogeneización de los resultados en la fibra de coco. En la longitud de la raíz, los resultados en mantillo fueron pocos concluyentes, mientras que en fibra de coco fueron bastante favorables, sobre todo en los que fueron inoculados con una salinidad de 0 mM, por otro lado, en perlita se obtuvieron los valores más altos con la salinidad de 171 mM en el control y con el inóculo 1.

Como era de esperar, la longitud específica de la raíz (SRL) en mantillo fue baja, ya que la longitud de la raíz fue también baja. Por otro lado, en fibra de coco los valores

fueron homogéneos y, por último, la perlita cuyos valores más altos se obtuvieron de la concentración de sal más alta, con o sin inóculo.

La biomasa total en los tres sustratos es un resumen de lo ya comentado, por lo que empezando por perlita podemos decir que su biomasa total obtuvo los valores más altos para la concentración de salinidad a 171 mM, con o sin inóculo. Para el mantillo los valores, dentro de que fueron más bajos si los comparamos con la perlita y la fibra de coco, fueron bastantes homogéneos entre los distintos tratamientos. Por último, la fibra de coco también obtuvo unos valores homogéneos, pero cabe destacar que las inoculaciones con NaCl a 171 mM obtuvo unos valores más altos.

El peso específico foliar (PEF) se encuentra relacionado con la resistencia de la hoja, la tasa fotosintética y el crecimiento (Pérez-Harguindeguy et al., 2013). Cuanto mayor sea el PEF, menor será la tasa fotosintética y el crecimiento, por lo que, en nuestro estudio se observó que el PEF en perlita fue bajo, en comparación con los otros dos sustratos, y por ello los valores tanto de tasa fotosintética, como el crecimiento en altura o biomasa aérea fueron mayores.

8. Conclusión

Los resultados de la inoculación en los distintos sustratos obtenidos en esta especie, *A. macrostachyum*, permiten destacar el gran potencial que tiene los inóculos de PGPB para la restauración de ambientes salinos de nuestra especie. Además, la utilización de dichos inóculos favoreció el crecimiento y la actividad fotosintética no solo en ambientes salinos óptimos para la especie, sino también en aquellos donde la salinidad es nula o prácticamente nula, por lo que la inoculación incrementaría el éxito de enraizamiento y supervivencia. Aunque los resultados más destacables han sido en el sustrato de perlita, podemos también destacar la fibra de coco, pues ha sido el sustrato donde la inoculación ha incrementado la actividad fotosintética y crecimiento. Para concluir, sería interesante comprobar en otras especies de ambientes salinos la inoculación con PGPB para poder promover la restauración de las zonas de marismas con otras especies, favoreciendo una mayor biodiversidad del ecosistema.

9. Bibliografía

- Barcia-Piedras, J. M., Pérez-Romero, J. A., Mateos-Naranjo, E., Parra, R., Rodríguez-Llorente, I. D., Camacho, M. & Redondo-Gómez, S. 2023. Stimulation of PGP bacteria on the development of seeds, plants and cuttings of the obligate halophyte *Arthrocaulon (Arthrocnemum) macrostachyum (morici.) piirainen & G. kadereit*. *Plants*, 12(7) doi:10.3390/plants12071436
- Billah, M., Bhuiyan, M.A., Islam, M.A., Das J., & Hoque R. 2022. Salt marsh restoration: an overview of techniques and success indicators. *Environ Sci Pollut Res* 29, 15347–15363. doi: 10.1007/s11356-021-18305-5
- Camacho, M., Montero-Calasanz, M.C., Redondo-Gomez, S., Rodriguez-Llorente, I., Schumann, P. & Klenk, H.P. 2016a. *Microbulbifer rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1844–1850. doi: 10.1099/ijsem.0.000955.
- Camacho, M., Redondo-Gomez, S., Rodriguez-Llorente, I., Rohde, M., Sproer, C., Schumann, P., Klenk, H.P. & Montero-Calasanz, M.C. 2016b. *Labrenzia salina* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 5173–5180. doi: 10.1099/ijsem.0.001492.
- Camacho, M., Redondo-Gomez, S., Rodriguez-Llorente, I., Rohde, M., Sproer, C., Schumann, P., Klenk, H.P. & Montero-Calasanz, M.C. 2017. *Kocuria salina* sp. nov., an actinobacterium isolated from the rhizosphere of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* and emended description of *Kocuria turfanesis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 5006–5012.
- Camacho-Sanchez, M., Barcia-Piedras, J.M., Redondo-Gómez, S. & Camacho, M. Mediterranean seasonality and the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* determine the bacterial community in salt marsh soils in Southwest Spain, *Applied Soil Ecology*, Volume 151, 2020, 103532, ISSN 0929-1393. doi:10.1016/j.apsoil.2020.103532.
- Calio, J., Tarn, Y. Y., & Normanly, J. (2006). Chapter twelve auxin biology and biosynthesis doi:10.1016/S0079-9920(06)80046-8
- Curado, G., Grewell, B.J. & Figueroa, E. 2014. Effectiveness of the Aquatic Halophyte *Sarcocornia perennis* spp. *perennis* as a Biotool for Ecological Restoration of Salt Marshes. *Water Air Soil Pollut* 225, 2108. doi: 10.1007/s11270-014-2108-5.
- Flores-Duarte, N. J., Pajuelo, E., Mateos-Naranjo, E., Navarro-Torre, S., Rodríguez-Llorente, I. D., Redondo-Gómez, S. & Carrasco López, J. A. 2023. A Culturomics-Based Bacterial Synthetic Community for Improving Resilience towards Arsenic and Heavy Metals in the Nutraceutical Plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7003. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms24087003.
- González, M., Perales, H. & Salcedo, M.O. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129.

- Grieve, M. C., Guzy, M. R., Poss, J. A. & Shannon, M. C. 1999. Screening Eucalyptus clones for salt tolerance. *HortScience* 34:867-870.
- Herranz, J.M., Ferrandis, P., Copete, M.A. & Martínez-Sánchez J.J. 2002. Influencia de la temperatura de incubación sobre la germinación de 23 endemismos vegetales ibéricos o iberoafricanos. *Inv Agr Prod Prot Veg* 17(2), 229-245.
- Herranz, J.M., Ferrandis, P. & Copete, M. 2008. Germinación de tres halófitos amenazados en Castilla-La Mancha en condiciones de estrés salino. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, ISSN 1131-7965, Vol. 13, Nº 2, 2004, pags. 357-368. 13.
- Heydari, A. & Pessarakli, M., 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *J. Biol. Sci.* 10, 273–290.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *California agricultural experiment station*, 347, 32.
- Hortal, S., Bastida, F., Armas, C., Lozano, Y.M., Moreno, J.L., Garcia, C. & Pugnaire, F.I., 2013. Soil microbial community under a nurse-plant species changes in composition, biomass and activity as the nurse grows. *Soil Biol. Biochem.* 64, 139–146. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.04.018.
- Instituto Andaluz de Administración Pública (IAAP). s.f. *Reserva de la Biosfera 'Marismas del Odiel'*. <https://ws168.juntadeandalucia.es/iaap/revista/2022/06/30/reserva-de-la-biosfera-marismas-del-odiel/>
- Iwaoka, C., Imada, S., Taniguchi, T., Du, S., Yamanaka, N. & Tateno, R., 2018. The impacts of soil fertility and salinity on soil nitrogen dynamics mediated by the soil microbial community beneath the halophytic shrub tamarisk. *Microb. Ecol.* 75, 985–996. doi: 10.1007/s00248-017-1090-z.
- Jing, C., Xu, Z., Zou, Z., Tang, Q., Li, Y., You, X. & Zhang, C., 2019. Coastal halophytes alter properties and microbial community structure of the saline soils in the Yellow River Delta, China. *Appl. Soil Ecol.* 134, 1–7. Doi: 10.1016/j.apsoil.2018.10.009.
- Karimi, G., Ghorbani, M., Heidari, H., Khavari, R. & Assareh, M. 2005. The effects of NaCl on growth, water relations, osmolytes and ion content in *Kochia*. *Environ* 28:239-250.
- Kataoka, R., Akashi, M., Taniguchi, T., Kinose, Y., Yaprak, A. E., & Turgay, O. C. 2021. Metabolomics analyses reveal metabolites affected by plant growth-promoting endophytic bacteria in roots of the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21) doi:10.3390/ijms222111813
- Mateos-Naranjo, E., Jurado, J. L., Redondo-Gómez, S., Pérez-Romero, J. A., Glick, B. R., Rodríguez-Llorente, I. D., Pajuelo, E., Echegoyan, A. & Mesa-Marín, J. 2020. Uncovering PGPB *Vibrio spartinae* inoculation-triggered physiological mechanisms involved in the tolerance of *Halimione portulacoides* to NaCl excess. *Plant Physiology and Biochemistry*, 154, 151-159. doi:10.1016/j.plaphy.2020.05.034
- Mesa-Marín, J., Pérez-Romero, J. A., Mateos-Naranjo, E., Bernabeu-Meana, M., Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D. & Redondo-Gómez, S. 2019. Effect of plant growth-

promoting rhizobacteria on *Salicornia ramosissima* seed germination under salinity, CO₂ and temperature stress. *Agronomy*, 9(10) doi:10.3390/agronomy9100655

- Millennium Ecosystem Assessment (2005). *Ecosystems and Human Well-being: Synthesis*. Island Press, Washington, DC.
- Mitsch, W. J. 2010. Conservation, restoration and creation of wetlands: a global perspective. In F. A. Comín (Ed.), *Ecological restoration: a global challenge* (pp. 175–187). Cambridge: Cambridge University Press.
- Mora-Ruiz, M.R., Font-Verdera, F., Orfila, A., Rita, J. & Rossello-Mora, R. 2016. Endophytic microbial diversity of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* across plant compartments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, 1–10.
- Morgan, J.A.W., Bending, G.D. & White, P.J., 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56, 1729–1739. doi: 10.1093/jxb/eri205.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Prostrate. Biol. Plant* 49:301-304.
- Navarro-Torre, S., Mateos-Naranjo, E., Caviedes, M.A., Pajuelo, E. & Rodríguez-Llorente, I.D., 2016. Isolation of plant-growth-promoting and metal-resistant cultivable bacteria from *Arthrocnemum macrostachyum* in the Odiel marshes with potential use in phytoremediation. *Mar. Pollut. Bull.* 110, 133–142. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.070.
- Navarro-Torre, S., Barcia-Piedras, J.M., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gomez, S., Camacho, M., Caviedes, M.A., Pajuelo, E. & Rodríguez-Llorente, I.D., 2017. Assessing the role of endophytic bacteria in the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* salt tolerance. *Plant Biol.* 19, 249–256. doi: 10.1111/plb.12521.
- Onofres Lemus, J., Hernandez Lucas, I. Girard, L. & Caballero Mellado, J. 2009. *Application Environment Microbiological.* 75: 6581-90.
- Pajuelo, E., Flores-Duarte, N.F., Navarro-Torre, S., Mateos Naranjo, E., Redondo-Gómez, S. & Rodríguez-Llorente, I.D. *Culturomics and circular agronomy: Two sides of the same coin for the design of a tailored biofertilizer for the pharmaceuticals-producing halophyte Mesembryanthemum crystallinum.* Submitted.
- Pérez-Romero, J. A., Idaszkin, Y. L., Duarte, B., Baeta, A., Marques, J. C., Redondo-Gómez, S., Caçador, I., & Mateos-Naranjo, E. (2018). Atmospheric CO₂ enrichment effect on the Cu-tolerance of the C₄ cordgrass *Spartina densiflora*. *Journal of Plant Physiology*, 220, 155-166. doi:10.1016/j.jplph.2017.11.005
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P. & Cornelissen, J. H. C. 2013. *New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide.* *Australian Journal of Botany*, 61(3), 167-234. doi:10.1071/BT12225.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A. J., Fernández-Muñoz, F., Castellanos, E. M., Luque, T., & Figueroa, M. E. (2007). Growth and photosynthetic responses

- to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany*, 100(3), 555-563. doi:10.1093/aob/mcm119
- Redondo-Gomez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M.E. & Davy, A.J., 2010. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biol.* 12, 79–87. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00207.x
- Reyes Pérez, J., Amador, B., Nieto Garibay, A., Troyo Dieguez, E., Reynaldo Escobar, I. & Rueda Puente, E. 2013. Germination and seedling traits of basil varieties (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. 4. 869-880.
- Rubio-Asensio, J. S., Parra, M., & Intrigliolo, D. S. (2019). Open field hydroponics in fruit crops: Developments and challenges. *Fruit crops: Diagnosis and management of nutrient constraints* (pp. 419-430) doi:10.1016/B978-0-12-818732-6.00030-7
- Rubio-Casal, A.E., Castillo, J.M., Luque, C.J. & Figueroa, M.E., 2001. Nucleation and facilitation in salt pans in Mediterranean salt marshes. *J. Veg. Sci.* 12, 761–770. doi: 10.2307/3236863.
- Saura-Mas, S., & Lloret, F. 2007. Leaf and shoot water content and leaf dry matter content of mediterranean woody species with different post-fire regenerative strategies. *Annals of Botany*, 99(3), 545-554. doi:10.1093/aob/mcl284.
- Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. & Van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11, 296–310. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x.
- Valdés, B., Talavera, S. & Fernandez-Galiano, E., 1987. *Flora vascular de Andalucía occidental*. Ketres Editora S.A, Barcelona 4-85256-63-8.
- Zaidi, A., Khan, M. S., Ahemad, M., Oves, M., & Wani, P. A. 2009. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. *Microbial strategies for crop improvement* (pp. 23-50) doi:10.1007/978-3-642-01979-1_2
- Zedler, J.B. & Kercher, S. (2005) *Wetland Resources: Status, Trends, Ecosystem Services, and Restorability*. *Annual Review of Environmental Resources*, 30, 39-74. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.energy.30.050504.144248>