



Programa de Doctorado “Recursos Naturales y Medio Ambiente”

Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola

**AVANCES EN LA UTILIZACIÓN DE ESQUEJES DE *Halimione portulacoides* (L.) Aellen  
EN ESTRATEGIAS DE FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS  
POR METALES PESADOS**

Memoria que presenta el  
Licenciado ANTONIO PUERTO MARCHENA  
para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla

**Sevilla, 2017**



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Facultad de Biología**

Dpto. Biología Vegetal y Ecología

---



D. MANUEL ENRIQUE FIGUEROA CLEMENTE, Catedrático del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Sevilla,

**CERTIFICA:** Que la Tesis Doctoral “*Avances en la utilización de esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen en estrategias de fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados*”, ha sido realizada por el Ldo. D. ANTONIO PUERTO MARCHENA en el Programa de Doctorado “Recursos Naturales y Medio Ambiente” bajo su dirección, y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, firma el presente certificado en Sevilla, 12 de Mayo de 2017.

Fdo. D. Manuel Enrique Figueroa Clemente

Director de la Tesis



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Facultad de Biología**

Dpto. Biología Vegetal y Ecología

---



D. JESÚS CAMBROLLÉ SILVA, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Sevilla,

**CERTIFICA:** Que la Tesis Doctoral “*Avances en la utilización de esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen en estrategias de fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados*”, ha sido realizada por el Ldo. D. ANTONIO PUERTO MARCHENA en el Programa de Doctorado “Recursos Naturales y Medio Ambiente” bajo su dirección, y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, firma el presente certificado en Sevilla, 12 de Mayo de 2017.

Fdo. D. Jesús Cambrollé Silva

Director de la Tesis



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrícola**

Dpto. Ciencias Agroforestales

---



D. JUAN MANUEL MANCILLA LEYTÓN, Investigador Posdoctoral del Departamento de Ciencias Agroforestales de la Universidad de Sevilla,

**CERTIFICA:** Que la Tesis Doctoral “*Avances en la utilización de esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen en estrategias de fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados*” ha sido realizada por el Ldo. D. ANTONIO PUERTO MARCHENA en el Programa de Doctorado “Recursos Naturales y Medio Ambiente” bajo su dirección, y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, firma el presente certificado en Sevilla, 12 de mayo de 2017.

Fdo. D. Juan Manuel Mancilla Leytón

Director de la Tesis







**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Facultad de Química**

Dpto. Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola

---

Dña. MARÍA ELENA FERNÁNDEZ BOY, Profesor Titular del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla,

**CERTIFICA:** Que la Tesis Doctoral “*Avances en la utilización de esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen en estrategias de fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados*”, ha sido realizada por el Ldo. D. ANTONIO PUERTO MARCHENA en el Programa de Doctorado “Recursos Naturales y Medio Ambiente” bajo su tutorización, y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, firma el presente certificado en Sevilla, 12 de mayo de 2017.

Fdo. Dña. María Elena Fernández Boy

Tutor de la Tesis



# ÍNDICE

## *Resumen*

<b>CAPÍTULO 1.- <i>Introducción</i></b>	<b>15</b>
<i>Objetivos</i>	23
<i>Estructura de la Tesis</i>	24
<b>CAPÍTULO 2.- <i>Supervivencia, crecimiento y respuesta fisiológica de esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen en diferentes tipos de sustrato</i></b>	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 3.- <i>Determinación de las características biométricas de esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen para ser utilizados en proyectos de revegetación</i></b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO 4.- <i>Respuesta de los esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen a la salinidad</i></b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO 5.- <i>Tolerancia y acumulación de Zinc en esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen</i></b>	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO 6.- <i>Efectos del estrés por cobre en esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen</i></b>	<b>117</b>
<b>CAPÍTULO 7.- <i>Discusión general</i></b>	<b>139</b>
<b>CAPÍTULO 8.- <i>Conclusiones</i></b>	<b>153</b>
<b><i>Agradecimientos</i></b>	<b>157</b>



---

## RESUMEN

La creciente preocupación por la degradación de las zonas costeras ha derivado en un gran interés por el desarrollo de técnicas eficientes de restauración en estos ecosistemas. El potencial que poseen ciertas plantas para ser multiplicadas mediante esquejes puede suponer una herramienta efectiva en proyectos de revegetación y restauración. Entre las especies usadas para la revegetación de ecosistemas costeros con capacidad para propagarse de manera vegetativa se encuentra *Halimione portulacoides* (L.) Aellen, una planta costera ampliamente distribuida con aplicaciones en fitorremediación. La presente Tesis Doctoral persigue avanzar en el conocimiento de la capacidad de implantación y desarrollo de *H. portulacoides* a partir de esquejes bajo diferentes condiciones, con el fin último de evaluar la aplicabilidad de esta técnica en la restauración de ecosistemas degradados. Para ello, se determinaron las características biométricas óptimas de los esquejes de *H. portulacoides*, así como la capacidad de los mismos para desarrollarse en diferentes tipos de sustrato y concentraciones salinas. Asimismo, se evaluó la tolerancia de los esquejes frente a distintas concentraciones experimentales de dos metales altamente contaminantes en las zonas costeras (zinc y cobre). Los resultados de la presente Tesis Doctoral indican que el suelo arenoso es el más adecuado para el desarrollo de esquejes de *H. portulacoides*, y que el enterramiento de yemas en la plantación tiene un efecto positivo en la supervivencia y establecimiento de los mismos. Los resultados mostraron que los esquejes son capaces de enraizar bajo un amplio rango de concentraciones salinas, desde agua dulce hasta concentraciones hipersalinas, y que el tamaño intermedio (con cuatro nudos desarrollados) presenta una respuesta de crecimiento ligeramente superior al resto de tamaños estudiados. En cuanto a la respuesta de los esquejes en medios contaminados por metales pesados, este trabajo mostró que los esquejes de *H. portulacoides* son capaces de establecerse bajo concentraciones de hasta  $130 \text{ mmol l}^{-1}$  de Zn y  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu, concentraciones tóxicas, e incluso letales, para la mayoría de especies vegetales. Los resultados presentados suponen un avance en el conocimiento de la biología de *H. portulacoides* y demuestran el potencial del uso de técnicas de propagación vegetativa mediante esquejes como herramienta en proyectos de revegetación de ecosistemas costeros, así como en la recuperación de suelos altamente contaminados por metales pesados.



# 1

## *Introducción general*





## INTRODUCCIÓN GENERAL

Las primeras razones para el asentamiento alrededor de las marismas y estuarios se relacionaron con su alta productividad, dada la riqueza de los suelos en estas áreas y la abundante biota natural. Posteriormente, el hombre fue capaz de detectar las ventajas logísticas que presentaban estas áreas para establecer puertos e industrias, junto a los ríos como vías de comunicación, que hicieron más atractivas estas regiones (French, 1997). Este desarrollo tiene su coste; el crecimiento de los asentamientos humanos y el aumento de los usos provocaron presiones y demandas intensas sobre los recursos naturales, afectando a la biodiversidad y causando graves efectos sobre las aguas costeras, ampliamente contaminadas y sometidas a una grave degradación ambiental. La contaminación química promueve cambios en el sistema natural como resultado de las actividades humanas, reduciendo la capacidad de los individuos, poblaciones, especies o comunidades para sobrevivir (McLusky y Elliott, 2004). Dentro de los contaminantes químicos, los metales pesados han recibido un interés particular en las últimas décadas, debido a sus graves efectos sobre la biota. Los metales pesados se acumulan en los sedimentos, pudiendo llegar a transformar las marismas y estuarios en "sumideros metálicos" (Caçador *et al.*, 1996a, b).

Las marismas y estuarios costeros son ecosistemas complejos, de elevado valor ecológico, que se desarrollan en latitudes medias y altas en todo el mundo; se caracterizan por estar sometidas a condiciones ambientales duras, incluyendo inundaciones por las mareas, sedimentación, alta salinidad y anoxia (Milliman y Emery 1968; Montes *et al.*, 2007). Estas condiciones imponen ciertos límites a los organismos que viven en tales hábitats. La vegetación está compuesta principalmente por especies tolerantes a la sal, especialmente adaptadas a este ambiente (halófitos). La zonación y distribución de la vegetación se ven afectadas por factores como la frecuencia y duración de la inundación, la concentración de sulfuros y la composición del sustrato (Ibáñez *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2014).

---

Esta vegetación juega un papel importante en la retención de sedimentos (cuyos insumos provienen no sólo de los ríos, sino también de las inundaciones de las mareas), aumentando las tasas de acreción (Pethick, 1981). Como se ha señalado anteriormente, en zonas degradadas, los sedimentos actúan como sumideros de contaminantes, cuya acumulación en algunos casos puede llegar a derivar en graves efectos para la biota existente. Así, ciertos organismos han desarrollado mecanismos y/o estrategias con el fin de evitar la toxicidad de estos contaminantes y prevenir o minimizar el deterioro de sus funciones vitales. Por ejemplo, las plantas han desarrollado diferentes estrategias para evitar el exceso de metales pesados. La mayoría de las especies vegetales son básicamente excluyentes de metales y evitan el transporte de estos a los tejidos fotosintéticos, por ejemplo, mediante su secuestro en vacuolas y en las paredes celulares de las raíces (Ernst *et al.*, 2000; Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Otras especies se han adaptado a vivir en entornos enriquecidos con metales, y tienen la capacidad de acumular grandes cantidades en los tejidos superficiales (Weis y Weis, 2004; Hanikenne y Nouet, 2011). Estudios recientes demuestran que algunas plantas costeras presentan una tolerancia innata frente a los metales pesados (McCabe *et al.*, 2001; Pedro *et al.*, 2015; Sghaier *et al.*, 2016).

La creciente preocupación por la degradación de los ecosistemas ha derivado en un gran interés por el desarrollo de técnicas eficientes de restauración. Desde finales del siglo XX se hace patente la necesidad de desarrollar un marco teórico y práctico para abordar la restauración ecológica en todas sus perspectivas. Uno de los objetivos prioritarios que persigue la Estrategia Europea de Biodiversidad es restaurar al menos un 15% de los ecosistemas europeos degradados para el año 2020 (Objetivo 2 de la Estrategia, Comisión Europea 2011). La restauración ecológica se puede definir como la actividad intencionada que inicia o acelera la recuperación de un ecosistema con respecto a su salud, integridad y sostenibilidad. Ello incluye las actividades encaminadas al restablecimiento de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido

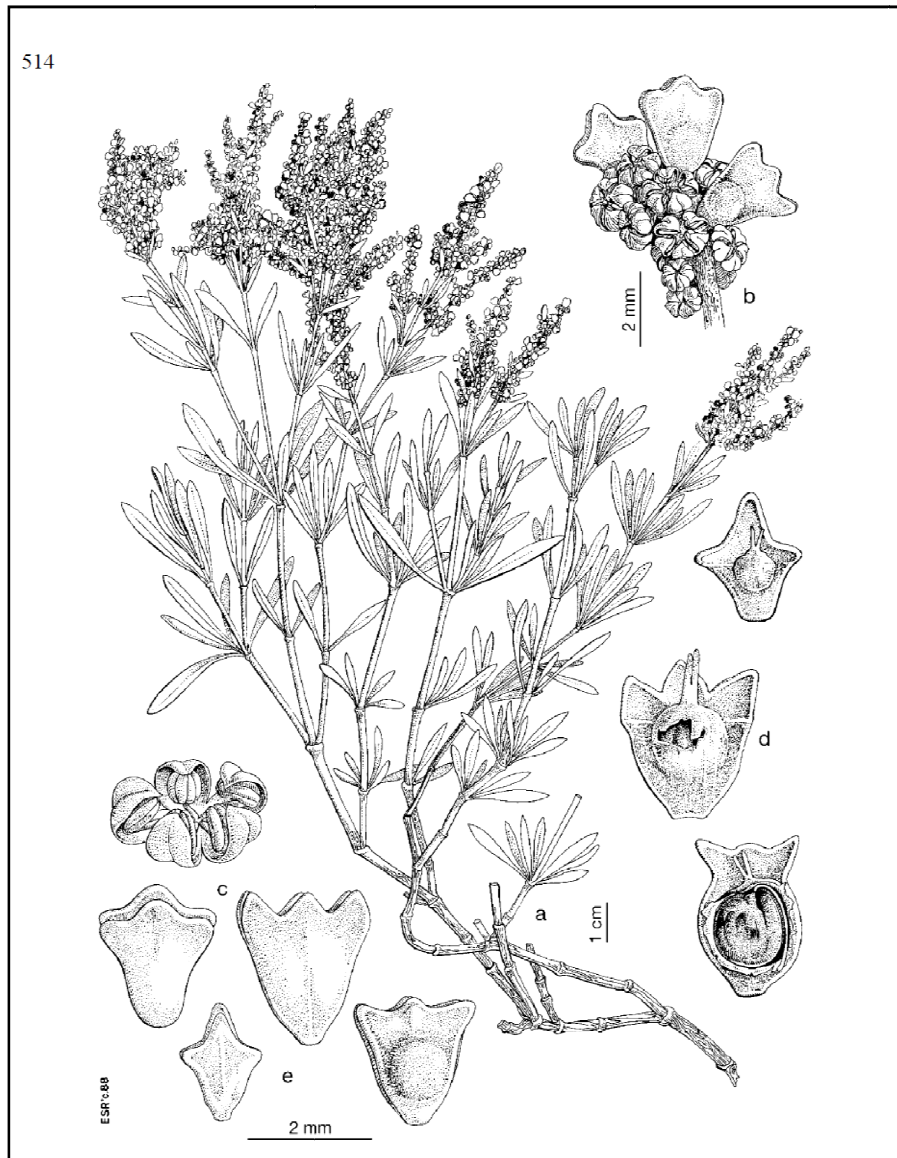
como consecuencia directa o indirecta de las actividades antrópicas (Kent, 2000; SER, 2004). El objetivo principal de la restauración debe ser el restablecimiento de los procesos y funciones ecológicas, y de las interacciones abióticas y bióticas del ecosistema (Society of Wetland Scientists, 2000). Durante las últimas décadas se han llevado a cabo un gran número de proyectos de restauración ecológica en ecosistemas costeros, en los que tiene una gran importancia la revegetación de las zonas degradadas (Montes y Carrascal, 2008). Muchos de estos proyectos han centrado sus investigaciones en la posibilidad de emplear plantas para la eliminación, degradación y descontaminación de suelos, sedimentos y aguas contaminadas por diferentes contaminantes. La fitorremediación se puede definir como el uso de las plantas y la microbiota asociada del suelo para reducir la concentración o los efectos tóxicos de los contaminantes en el medio (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Como ejemplos de plantas con aplicaciones en fitorremediación podemos citar *Atriplex halimus* (L.) (Mateos-Naranjo *et al.*, 2013), *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Jacques (Wang *et al.*, 2012), *Halimione portulacoides* (L.) Aellen (Cambrollé *et al.*, 2012b), *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss (Cambrollé *et al.*, 2013), *Salix* sp. (Wang *et al.*, 2016), *Smilax aspera* (L.) (Poschenrieder *et al.*, 2012), *Spartina maritima* (Curtis) Fernald (Reboreda y Caçador 2007), *Triticum aestivum* (L.) (Chandra *et al.*, 2009) y *Typha domingensis* Pers. (Mufarrege *et al.*, 2014) entre otras.

Normalmente, las plantas utilizadas en proyectos de revegetación y restauración de ecosistemas provienen de invernaderos, donde son propagadas a partir de semillas. Sin embargo, el potencial que poseen ciertas plantas para ser multiplicadas mediante esquejes puede suponer una herramienta efectiva para llevar a cabo este tipo de proyectos (Benítez-Pardo *et al.*, 2002). Un esqueje se puede definir como un fragmento de planta que una vez trasplantado, desarrolla un sistema radical y es capaz de crecer hasta formar una planta autónoma completa. En el caso de especies con elevado potencial de regeneración, la plantación de esquejes en proyectos de revegetación permite un ahorro de tiempo

---

y costes ya que, en muchos casos, se alcanzan tasas de establecimiento muy elevadas (Aránzazu Prada *et al.*, 2008). Además, los esquejes pueden estar disponibles en cualquier momento del año en poblaciones naturales, mientras que las semillas solo están disponibles en determinados periodos (Woodhouse, 1982; Gomes Neto *et al.*, 2006), lo que además facilita la selección de líneas vegetales que posean características que interese potenciar. Así, la utilización de plantas costeras con capacidad de propagación vegetativa en técnicas de fitorremediación puede resultar de gran interés, pues la vegetación propia de estos medios se caracteriza por un alto grado de especialización, con características que les permiten adaptarse a condiciones ecológicas particulares y especialmente difíciles, como la movilidad del sustrato, la inundación, las altas concentraciones salinas, o el alto contenido en metales y contaminantes en general (Bejarano Palma, 1997).

Entre las especies usadas para la revegetación de ecosistemas costeros con capacidad para propagarse de manera vegetativa se encuentra *Halimione portulacoides* (L.) Aellen, comúnmente conocida como salobreña, verdolaga marina, falsa verdolaga o sayón. *H. portulacoides* es una angiosperma perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, subfamilia *Chenopodioideae*. Es una planta arbustiva perenne, decumbente, de color plateado, que puede alcanzar hasta 1,5 m de altura. Presenta tallos radicales, con un desarrollo tipo caméfito postrado. Las hojas son opuestas, espatuladas o lanceoladas a linear-lanceoladas, excepcionalmente deltoides, atenuadas en pecíolo claro y carnosas. Esta especie florece entre junio y septiembre, y presenta flores agrupadas en espigas laxas que en su conjunto forman una inflorescencia paniculiforme (Castroviejo *et al.*, 1989) (Figura 1).



**Figura 1.** *Halimione portulacoides*, marismas de Huelva (MA 28923): a) rama florífera; b) ápice de la inflorescencia; c) flor masculina; d) detalles de una flor femenina en diferentes estados de desarrollo y desprovista de una bractéola; e) bractéolas fructíferas. Tomado de Castroviejo *et al.*, 1989.

---

*Halimione portulacoides* es frecuente en marismas, terrenos salinos y encharcados en el litoral, extendiéndose alrededor de las costas del Mediterráneo, del Atlántico europeo, norteamericano y África austral. Es frecuentemente la especie dominante en marismas altas y bien drenadas, y suele bordear canales y zonas inundadas durante la marea alta, creciendo en una amplia variedad de sustratos (Chapman, 1950). Como consecuencia, *H. portulacoides* se expone a salinidades cercanas a la del agua del mar, habiéndose demostrado experimentalmente su capacidad para desarrollarse en un rango amplio de salinidades (Jensen, 1985; Redondo-Gómez *et al.*, 2007). *H. portulacoides* es capaz de desarrollarse en suelos altamente contaminados por metales pesados, pudiendo tolerar concentraciones muy elevadas de estos compuestos en los tejidos vegetales (Caçador *et al.*, 2000; Reboreda y Caçador, 2007; Cambrollé *et al.*, 2008). Estudios recientes han profundizado en diferentes aspectos sobre la respuesta fisiológica de esta especie frente a elevadas concentraciones de diferentes metales pesados, poniéndose en valor su potencial en fitorremediación de suelos contaminados (p.e., Cambrollé *et al.*, 2012a, b; Anjum *et al.*, 2014). Recientemente, Andrades-Moreno *et al.* (2013) exploraron por primera vez la capacidad de *H. portulacoides* para desarrollarse desde esquejes, poniendo en valor la posible aplicabilidad de los esquejes de esta especie en la recuperación de suelos contaminados. Sin embargo, exceptuando la información expuesta en dicho estudio, no existe información sobre la capacidad de implantación y desarrollo de la especie a través de esta técnica de multiplicación vegetativa.

## OBJETIVOS

La realización de la presente Tesis Doctoral persigue avanzar en el conocimiento de la capacidad de implantación y desarrollo de *Halimione portulacoides* a partir de esquejes bajo diferentes condiciones, con el fin último de evaluar la aplicabilidad real de esta técnica en la restauración de ecosistemas degradados, y en particular, en estrategias de fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados.

A continuación se exponen los objetivos específicos planteados, que serán concretados en los diferentes capítulos que integran la presente Tesis Doctoral:

1.- Determinar las características biométricas óptimas de los esquejes de *H. portulacoides* para ser utilizados con éxito en proyectos de revegetación.

2.- Evaluar la capacidad de los esquejes de *H. portulacoides* para desarrollarse en diferentes tipos de sustrato y bajo diferentes concentraciones salinas.

3.- Evaluar la tolerancia de los esquejes de *H. portulacoides* frente a distintas concentraciones de metales pesados.

---

## ESTRUCTURA DE LA TESIS

A este capítulo introductorio le siguen cinco capítulos donde se presentan los resultados que abordan los objetivos citados anteriormente. Estos capítulos están escritos con la finalidad de que puedan ser leídos de modo independiente, conteniendo toda la información necesaria para su comprensión.

Los dos primeros trabajos (capítulos 2 y 3) versan sobre el tipo de sustrato, zona de obtención y características óptimas que deben tener los esquejes de *Halimione portulacoides* para ser utilizados con éxito en proyectos de revegetación. En el tercer trabajo (capítulo 4) se estudia la capacidad de los esquejes para desarrollarse bajo diferentes concentraciones salinas. En el cuarto y quinto trabajo (capítulo 5 y 6) se evalúa la tolerancia de los esquejes frente a distintas concentraciones experimentales de dos metales altamente contaminantes en las zonas costeras, el zinc y el cobre. Por último, en el Capítulo 7 se expone la discusión general, y en el Capítulo 8 las conclusiones de la presente Tesis Doctoral.



---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Figueroa, M.E., Mateos-Naranjo, E. 2013. Growth and survival of *Halimione portulacoides* stem cuttings in heavy metal contaminated soils. *Marine Pollution Bulletin* **75**, 28-32.
- Anjum, N.A., Israr, M., Duarte, A.C., Pereira, M.E., Ahmad, I. 2014. *Halimione portulacoides* (L.) physiological/biochemical characterization for its adaptive responses to environmental mercury exposure. *Environmental Research* **131**, 39-49.
- Aránzazu Prada, M., Arizpe, D. 2008. Manual de propagación de árboles y arbustos de ribera. Una ayuda para la restauración de riberas en la región mediterránea. Consellería de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda, Generalitat Valenciana.
- Benítez-Pardo, O., Flores-Verdugo F., Valdez. JL. 2002. Reproducción vegetativa de dos especies arbóreas en un manglar de la costa norte del Pacífico mexicano. *Maderas y Bosques* **8**, 57-71.
- Bejarano Palma, R. 1997. El análisis de la vegetación como criterio de interpretación del paisaje (Andalucía atlántica). *Estudios Geográficos* **226**, 5-32.
- Caçador, I., Vale, C., Catarino, F. 1996a. Accumulation of Zn, Pb, Cu and Ni in sediments between roots of the Tagus estuary salt marshes, Portugal. *Estuarine Coastal Shelf Science* **42**, 393-403.
- Caçador, I., Vale, C., Catarino, F. 1996b. The influence of plants on concentration and fractionation of Zn, Pb, and Cu in salt marsh sediments (Tagus Estuary, Portugal). *Journal of aquatic ecosystem health* **5**, 193-198.

- 
- Caçador, I., Vale, C., Catarino, F. 2000. Seasonal variation of Zn, Pb, Cu and Cd concentrations in the root-sediment system of *Spartina maritima* and *Halimione portulacoides* from Tagus estuary salt marshes. *Marine Environmental Research* **49**, 279-290.
- Cambrollé, J., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M.E. 2008. Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Marine Pollution Bulletin* **56**, 2037-2042.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M.E. 2012a. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* **86**, 867-874.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M.E. 2012b. Tolerance and accumulation of copper in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Marine Pollution Bulletin* **64**, 721-728.
- Cambrollé, J. Mancilla-Leytón, J.M. Muñoz-Vallés, S. Figueroa-Luque, E. Luque, T. Figueroa, M.E. 2013. Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. *Environmental and Experimental Botany* **85**, 50-57.
- Castroviejo, S., Laínz, M., López, G., Montserrat, P., Muñoz, F., Paiva, J., Villar, L. (Eds.) 1989. *Flora Ibérica* **3**, 513-514. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Chandra, R., Bharagava, R.N., Yadav, S., Mohan, D. 2009. Accumulation and distribution of toxic metals in wheat (*Triticum aestivum* L.) and Indian mustard (*Brassica campestris* L.) irrigated with distillery and tannery effluents. *Journal of Hazardous Materials* **162**, 1514-1521.
- Chapman, V.J. 1950. *Halimione portulacoides* (L.) Aellen. *Journal of Ecology* **1**, 214-222.

- Comisión Europea. 2011. Comunicación de la comisión al parlamento europeo, al consejo, al comité económico y social europeo y al comité de las regiones. Estrategia de la UE sobre la biodiversidad hasta 2020: nuestro seguro de vida y capital natural. COM (2011) 244 Final. Bruselas.
- Ernst, W.H.O., Nelissen, H.J.M., Ten Bookum, W.M. 2000. Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn and Cu resistant population of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. *Environmental and Experimental Botany* **43**, 55-71.
- French, P.W. 1997. Coastal and Estuarine Management. *Routledge*, London.
- Gomes Neto, A., Cunha, S.R., Voigt, E.L. 2006. Vegetative propagation of the dune building plant *Ipomoea Pes-Caprae* for use in dune rehabilitation projects. *Journal of Coastal Research* **39**, 1251-1254.
- Hanikenne, M., Nouet, C. 2011. Metal hyperaccumulation and hypertolerance: a model for plant evolutionary genomics. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 252-259.
- Ibáñez, C., Morris, J.T., Mendelssohn, I.A., Day, J.W. 2013. Coastal Marshes, En: Day, J.W., Crump, B.C., Kemp, W.M., Yáñez-Arancibia, A. (Eds.), *Estuarine Ecology*. Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Jensen, A. 1985. On the ecophysiology of *Halimione portulacoides*. *Vegetatio* **61**, 231-240.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants. *CRC Press*, Boca Raton, Florida; London
- Kent, D. M. 2000 (Ed.). Applied wetlands science and technology. *CRC Press*.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Perez-Martin, A. 2013. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*:

- 
- Ecotoxicological implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **90**, 136-142.
- McCabe, O.M., Baldwin, J.L., Otte, M.L. 2001. Metal tolerance in wetland plants? *Minerva Biotech* **13**, 141-149.
- Milliman, J.D., Emery, K.O. 1968. Sea levels during the past 35,000 years. *American Association for the Advancement of Science* **162**, 1121-1123.
- Montes, C., Rendón-Martos, M., Varela L. y Cappa M. J. 2007. Manual de restauración de humedales mediterráneos. *Consejería de Medio Ambiente*. Sevilla, España.
- Montes. C., Carrascal, F. 2008. La restauración ecológica del río Guadiamar y el proyecto del corredor verde. *Junta de Andalucía*. Sevilla, España.
- McLusky, D.S., Elliott, M. 2004. The Estuarine Ecosystem - Ecology, Threats, and Management. *Oxford University Press*, Oxford.
- Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Di Luca, G.A., Maine, M.A. 2014. Metal dynamics and tolerance of *Typha domingensis* exposed to high concentrations of Cr, Ni and Zn. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **105**, 90-96.
- Pedro, S., Duarte, B., Raposo de Almeida, P., Caçador, I. 2015. Metal speciation in salt marsh sediments: Influence of halophyte vegetation in salt marshes with different morphology. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **167**, 248-255.
- Pethick, J.S., 1981. Long-term accretion rates on tidal salt marshes. *Journal of Sedimentary Petrology* **51**, 571-577.
- Poschenriedera, C., Lluganya, M., Lombinia, A., Dinellib, E., Bechc, J., Barceló, J. 2012. *Smilax aspera* L. an evergreen Mediterranean climber for phytoremediation. *Journal of Geochemical Exploration* **123**, 41-44.
- Reboreda, R., Caçador, I. 2007. Copper, zinc and lead speciation in salt marsh

- sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Chemosphere* **69**, 1655-1661.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A.J., Fernández-Muñoz, F., Castellanos, E., Luque, T., Figueroa, M.E. 2007. Growth and photosynthetic responses to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany* **100**, 555-563.
- SER, Society for Ecological Restoration international 2004. Principios de SER International sobre la restauración ecológica. Grupo de trabajo sobre ciencias políticas. En: *www.ser.org*.
- Sghaier D.B., Pedro S, Diniz M.S., Duarte B., Caçador I., Sleimi N. 2016. Tissue Localization and Distribution of As and Al in the Halophyte *Tamarix gallica* under Controlled Conditions. *Frontiers in Marine Science* **3**, 274.
- Society of Wetland Scientist 2000. Position Paper on the definition of wetland restoration. *Bulletin* **17**, 9-10.
- Teixeira, A., Duarte, B., Caçador, I. 2014. Salt Marshes and Biodiversity. En: Khan, M. A., Böer, B., Öztürk, M., Al Abdessalaam, T. Z., Clüsener-Godt, M., & Gul, B. (Eds.). *Sabkha ecosystems: volume IV: cash crop halophyte and biodiversity conservation*, 283-298. Springer Netherlands.
- Wang Y, Yan A, Dai J, Wang N, Wu D. 2012. Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in *Chlorophytum comosum*: a popular ornamental plant and potential Cd hyperaccumulator. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**, 929-37.
- Wang W., Wu Y., Akbar S., Jia X., He Z., Tian X. 2016. Effect of heavy metals combined stress on growth and metals accumulation of three *Salix* species with different cutting position. *International Journal of Phytoremediation* **18**, 761-767.
- Weis, J.S., Weis, P. 2004. Metal uptake, transport and release by wetland plants:

---

implications for phytoremediation and restoration. *Environment International* **30**, 685-700.

Woodhouse, W.W. 1982. Coastal sand dunes of the U.S. En: Lewis, R.R. (Ed.) *Creation and Restoration of Coastal Plant Communities*. 1-44. CRC press. Boca Raton, Florida.

# 2

*Supervivencia, crecimiento y respuesta fisiológica de  
esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen en  
diferentes tipos de sustrato*





## INTRODUCCIÓN

La presión antrópica es el mayor desencadenante de problemas ambientales en los ecosistemas costeros, pudiéndose citar de manera más específica los riesgos derivados de las actividades mineras que suponen contaminación por metales pesados, la mala gestión en los planes de ordenación del territorio, la acumulación de residuos, los vertidos industriales y de origen urbano, las infraestructuras, la contaminación térmica, agrícola y atmosférica, los drenajes ácidos, la introducción de especies alóctonas o el tráfico marítimo, entre otros (Bejarano Palma, 1997; Lacambra *et al.*, 2003; Giménez-Casalduero, 2006). La restauración ecológica surge como una respuesta eficiente y sostenible ante este tipo de problemas ambientales.

Según “*The Society for Ecological Restoration*” la restauración ecológica incluye las actividades encaminadas al restablecimiento de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido como resultado directo o indirecto de las actividades del hombre. El objetivo principal de la restauración debe ser el restablecimiento de los procesos y funciones ecológicas, y de las interacciones abióticas y bióticas del ecosistema (Society of Wetland Scientists, 2000). Durante las últimas décadas se han llevado a cabo un gran número de proyectos de restauración ecológica en ecosistemas costeros, en los que tiene una gran importancia la revegetación de las zonas degradadas. Por ejemplo, autores como Woodhouse (1982) sugieren que la mejor alternativa para la estabilización de dunas, fase esencial en la restauración de estos ecosistemas, es la revegetación, debido a su bajo coste, durabilidad y su mecanismo auto-reparador (Cordazzo y Davy, 1999; Gomes Neto *et al.*, 2003; Gomes Neto *et al.*, 2006). Algunas de las especies usadas para la revegetación de ecosistemas costeros tienen la capacidad de propagarse de manera vegetativa. Existen estudios realizados con especies con dicha cualidad, principalmente centrados en especies de interés comercial, que evalúan el éxito de diferentes técnicas para potenciar el desarrollo de los esquejes.

---

Por ejemplo, existen estudios que analizan la viabilidad de esquejes de diferentes tamaños, en diferentes sustratos o haciendo uso de diferentes compuestos con actividad hormonal (Álvarez-Herrera *et al.*, 2007; Sotomayor León *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2013). Uno de los factores más relevantes a tener en cuenta a la hora de plantear proyectos de revegetación mediante técnicas de propagación vegetativa es el tipo de suelo y las características físico-químicas del mismo, ya que de ello va a depender la supervivencia, implantación y crecimiento de los esquejes.

*Halimione portulacoides* es frecuentemente la especie dominante en marismas altas y bien drenadas, y suele bordear canales y zonas inundadas durante la marea alta, siendo capaz de crecer en una amplia variedad de sustratos: con gran cantidad de guijarros, arenosos, limosos y arcillosos (Chapman, 1950). Andrades-Moreno *et al.*, (2013) exploraron por primera vez la capacidad de regeneración de esquejes de esta especie, evaluando la supervivencia y crecimiento de los mismos en suelos con elevados porcentajes de limo y arcilla, procedentes de las marismas del Río Tinto, una de las zonas con mayores niveles de contaminación por metales pesados del mundo. Aunque dicho estudio puso en valor la posible aplicabilidad de la propagación vegetativa de *H. portulacoides* en la recuperación de ecosistemas degradados, no existe información sobre la capacidad de regeneración y supervivencia de los esquejes de esta especie en diferentes tipo de sustrato.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de los esquejes de *H. portulacoides* para desarrollarse en diferentes tipos de sustrato. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- a) Evaluar la supervivencia, crecimiento y estado fisiológico de los esquejes en sustratos con diferentes composiciones granulométricas.
- b) Testar si el enterramiento de yemas afecta a la supervivencia y desarrollo de los esquejes en dichos sustratos.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Recogida y procesado de sustratos*

Se recogieron dos tipos de sustrato, arenoso y arcilloso, en una zona de duna semiestabilizada y en una zona de marisma media, respectivamente, dentro del Paraje Natural Marismas del Río Piedras y Flecha del Rompido (37°12'N, 7°10'O). El material fue transportado al laboratorio, donde se eliminaron manualmente los elementos gruesos y materia muerta, utilizando un tamiz (AISI, Ø300 mm, luz 1 mm) en el caso del suelo arenoso. Adicionalmente, se preparó un sustrato areno-arcilloso, mediante la mezcla de volúmenes iguales de los dos tipos de sustrato recogidos (50% arena : 50% arcilla). En la tabla 1 se muestran las características físico-químicas de cada uno de los tres tipos de sustrato.

**Tabla 1.** Propiedades físico-químicas de los sustratos utilizados. Se muestran valores medios  $\pm$  error estándar.

	Textura (%)		Conductividad (mS cm <sup>-1</sup> )	pH
	Limo+arcilla	Arena		
<b>Arcilloso</b>	91	9	12,7 $\pm$ 0,7	7,4 $\pm$ 0,4
<b>Areno-arcilloso</b>	44	56	4,7 $\pm$ 0,5	8,0 $\pm$ 0,6
<b>Arenoso</b>	5	95	0,2 $\pm$ 0,1	8,3 $\pm$ 0,3

### *Material vegetal y tratamientos*

Las semillas de *Halimione portulacoides* se recogieron en las marismas de "La Mata-Torre vieja" (Alicante, SE de España). Las semillas fueron germinadas a una temperatura de 25°C durante 30 días. Las plántulas resultantes se trasplantaron en macetas de plástico individuales utilizando perlita como sustrato y se colocaron en un invernadero de los Servicios Generales de Investigación de

la Universidad de Sevilla, con una temperatura controlada de entre 21 y 25°C, una humedad relativa de entre 40 y 60% y luz natural (flujo mínimo y máximo de luz: 200 y 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente). Tras 4 meses de crecimiento, cuando las plantas alcanzaron un tamaño de entre 40 y 45 cm de altura, se realizaron una serie de cortes en las ramificaciones primarias de las plantas para obtener los esquejes. Los esquejes resultantes tenían entre 4 y 6 nudos (incluido el nudo apical).

Para evaluar la respuesta de los esquejes en cada uno de los tres sustratos descritos anteriormente, se prepararon macetas individuales de plástico (11 cm de diámetro) que fueron llenadas con aproximadamente 2-3 cm de vermiculita en el fondo y posteriormente llenados hasta el borde con los diferentes sustratos (arena, arcilla y arena-arcilla). Las macetas se depositaron en bandejas de plástico (10 macetas por bandeja; una bandeja por tratamiento). De cada tipo de sustrato se prepararon dos bandejas, con 10 macetas cada una, para testar la respuesta de los esquejes a dos métodos de plantación: i) con la última yema enterrada en el sustrato (Y+), y ii) sin la última yema enterrada en el sustrato (Y-). Por tanto, se prepararon seis tratamientos (3 tipos de sustrato x 2 tipos de plantación). En cada tratamiento se plantó un esqueje por maceta, a una profundidad de 3 cm.

Las bandejas se colocaron en el invernadero, con las mismas condiciones de temperatura, humedad y luz. Cada bandeja fue rellenada con un volumen de 3 l de solución Hoagland al 20% (Hoagland y Arnon, 1938), marcándose el nivel del volumen en cada bandeja y manteniéndolo constante durante todo el experimento.

### ***Desarrollo y crecimiento***

Al inicio del experimento se recogieron 15 esquejes de aproximadamente la misma longitud y peso, que los plantados en los diferentes tratamientos, con el fin de obtener el peso seco inicial. Para el peso seco final se tomaron las plantas

---

completas de cada uno de los tratamientos, tras los 45 días de experimentación. En ambos casos se separó la biomasa aérea y la subterránea, en el caso de que la hubiera. Ambas fracciones se secaron en una estufa a 80°C durante 48 horas y se pesaron en una báscula de precisión para obtener el peso seco inicial y final.

La tasa relativa de crecimiento (RGR) de las plantas completas, y de la parte aérea, se calculó mediante la fórmula:

$$\text{RGR} = (\ln B_f - \ln B_i) * D^{-1} \quad (\text{g g}^{-1}\text{día}^{-1})$$

donde:  $B_f$ = biomasa final seca;  $B_i$ = biomasa inicial seca ;  $D$  = duración del experimento en días.

Además, se midió la longitud final de cada planta, midiendo desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más apical.

### ***Intercambio gaseoso***

Las medidas de intercambio gaseoso se realizaron en hojas completamente desarrolladas ( $n = 15$ ), una medida por planta más cinco medidas elegidas al azar entre todas las macetas) tras 45 días de tratamiento, utilizando un analizador de gases por infrarrojo (IRGA) en circuito abierto (LI-6400, LI-COR Inc., Neb., USA). La tasa de fotosíntesis neta ( $A$ ), la tasa de conductancia estomática ( $G_s$ ) y la concentración de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $C_i$ ) fueron medidas a una concentración de  $\text{CO}_2$  de  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$  y a  $1000 \mu\text{mol de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La iluminación se obtuvo de una lámpara de luz fotosintéticamente activa acoplada a la cámara de hojas del LI-6400. La temperatura de las hojas se mantuvo entre 20 y 25 °C, y la humedad relativa entre el 45 y 55 %.  $A$ ,  $G_s$  y  $C_i$  se calcularon usando las fórmulas de Von Caemmerer y Farquhar (1981).

### ***Pigmentos fotosintéticos***

Al final del periodo experimental, se extrajeron los pigmentos fotosintéticos en hojas completamente desarrolladas de cada tratamiento (n = 15), una hoja por planta más cinco hojas elegidas al azar entre todas las macetas). Las medidas se realizaron a partir de muestras de 0,05 g de material fresco trituradas en un mortero con 10 ml de acetona al 80%. Se filtró el sobrenadante resultante y, posteriormente, se diluyó 1 ml del mismo en 2 ml de acetona para medir la absorbancia (A) a tres longitudes de onda (470,0; 646,8 y 663,2 nm), utilizando para ello un espectrofotómetro Hitachi U-2001. Las concentraciones de clorofila *a* (Clf *a*), clorofila *b* (Clf *b*) y carotenoides (carotenos y xantofilas; Cx+c) se obtuvieron aplicando la metodología de Lichtenthaler (1987).

### ***Análisis estadístico***

Antes de iniciar los análisis se utilizaron los test habituales para el contraste de normalidad y homocedasticidad (Test de Kolmogorov-Smirnov y Test de Levene, respectivamente). Para todas las variables analizadas, las diferencias entre los tratamientos de enterramiento de yemas se realizaron mediante pruebas no paramétricas de comparación de medias (U de Mann-Whitney). Los análisis fueron realizado utilizando el paquete informático IBM SPSS Statistics for Windows, v. 24.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA)

---

## RESULTADOS

### *Supervivencia y crecimiento*

Todos los esquejes sometidos a los tratamientos en sustratos de Arena-Arcilla y Arcilla murieron tras la primera semana de experimentación sin haber desarrollado sistema radical. El 80% de los esquejes en suelos arenosos, en ambos tratamientos de enterramiento de yemas, sobrevivieron durante todo el periodo experimental, mostrando crecimiento de la parte subterránea y aérea.

Los resultados mostraron que los valores de RGR del tratamiento Arena Y+ fueron significativamente mayores que los de Arena Y-, para la parte aérea y la planta completa ( $U=14,45$ ;  $U=12,31$ ;  $p \leq 0,05$  respectivamente; Tabla 2).

Aunque los valores medios de peso seco de las plantas establecidas en arena a partir de esquejes Y+ fueron mayores que las de los esquejes Y-, no existieron diferencias significativas entre dichos valores para las fracciones aérea y subterránea ( $p \geq 0,05$  en ambos casos, Tabla 2).

Los valores de longitud final de las plantas desarrolladas a partir de esquejes Y+ fueron significativamente mayores que las desarrolladas a partir de esquejes Y- ( $U= 9,34$ ;  $p \leq 0,05$ , Tabla 2).

### *Intercambio gaseoso y pigmentos fotosintéticos*

La tasa de fotosíntesis neta (A), la conductancia estomática (Gs) y la concentración de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>) no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos estudiados ( $p \geq 0,05$ ). Del mismo modo, los valores de concentración de pigmentos tampoco mostraron diferencias significativas entre dichos tratamientos ( $p \geq 0,05$ , Tabla 3).



**Tabla 2.** Tasa relativa de crecimiento y peso seco de la fracción aérea y subterránea, y longitud final de los esquejes de *Halimione portulacoides* tras 45 días de experimento en sustrato arenoso y con dos tipos de plantación, con enterramiento de yema (Y+) y sin enterramiento de yema (Y-). Se muestran valores medios  $\pm$  error estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

	Arena (Y+)	Arena (Y-)
<b>RGR (g g<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) parte aérea</b>	0,034 $\pm$ 0,003 a	0,024 $\pm$ 0,003 b
<b>RGR (g g<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) planta completa</b>	0,036 $\pm$ 0,003 a	0,026 $\pm$ 0,004 b
<b>Peso seco aéreo (g)</b>	0,26 $\pm$ 0,05 a	0,17 $\pm$ 0,07 a
<b>Peso seco subterráneo (g)</b>	0,03 $\pm$ 0,01 a	0,02 $\pm$ 0,01 a
<b>Longitud final (cm)</b>	15,01 $\pm$ 2,45 a	9,98 $\pm$ 1,81 b

**Tabla 3.** Tasa de fotosíntesis neta (A), conductancia estomática (Gs), concentración de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>), concentración de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) y carotenoides (Cx+c) en esquejes de *Halimione portulacoides* tras 45 días de experimento en diferentes tipos de sustrato y con dos tipos de plantación, con enterramiento de yema (Y+) y sin enterramiento de yema (Y-). Se muestran valores medios  $\pm$  error estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

	Arena (Y+)	Arena (Y-)
<b>A (μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	7,9 $\pm$ 0,8 a	7,4 $\pm$ 0,5 a
<b>Gs (mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	0,14 $\pm$ 0,01 a	0,12 $\pm$ 0,01 a
<b>C<sub>i</sub> (μmol mol<sup>-1</sup>)</b>	287 $\pm$ 7,1 a	301 $\pm$ 4,9 a
<b>Chl a (g g<sup>-1</sup> pf)</b>	5,2 $\pm$ 0,2 a	4,5 $\pm$ 0,3 a
<b>Chl b (g g<sup>-1</sup> pf)</b>	3,1 $\pm$ 0,4 a	2,8 $\pm$ 0,2 a
<b>Cx+c (g g<sup>-1</sup> pf)</b>	1,2 $\pm$ 0,2 a	1,1 $\pm$ 0,3 a

---

## DISCUSIÓN

Nuestro estudio indica que los suelos areno-arcillosos y arcillosos no son apropiados para el desarrollo de los esquejes de *Halimione portulacoides*. Estos tipos de suelos, con altos porcentajes de limo y arcilla, presentan propiedades físicas que difieren en gran medida de los suelos arenosos, donde sí se establecieron y desarrollaron los esquejes. Entre dichas propiedades podemos destacar la porosidad, que debe ser considerada un indicador de la calidad del suelo por su capacidad para almacenar agua y permitir el intercambio físico-químico y biológico entre las diferentes fases presentes en el suelo (Karlen *et al.*, 1997; Sojka y Upchurch, 1999; Ruiz-Camacho *et al.*, 2009). No existiendo limitantes atmosféricas, biológicas, ni de nutrición mineral y suministro de agua, es la macroporosidad del suelo y su mayor o menor rigidez lo que regula el crecimiento de las raíces. Las arenas y las turbas contienen poros grandes y tienen alta porosidad no capilar (Rucks *et al.*, 2000). La mayoría de los estudios con esquejes realizados por diferentes autores hacen uso de sustratos muy porosos y poco compactos como arena, vermiculita, turba, etc (Ramirez *et al.*, 2013; Gomes Neto *et al.*, 2006; Álvarez-Herrera *et al.*, 2007; Sotomayor *et al.*, 2011; Cruz-Silva *et al.*, 2015). Sin embargo, debemos mencionar que Andrades-Moreno *et al.* (2013) detectaron crecimiento en esquejes de *H. portulacoides* plantados en suelos de marisma con elevados porcentajes de limo y arcilla. En base a nuestro estudio, los sustratos arcillosos con las características físico-químicas testadas no permiten el desarrollo de un sistema radicular con presencia o ausencia de yemas enterradas, por lo que sería interesante realizar otros experimentos en suelos arcillosos con propiedades físico-químicas diferentes para determinar las causas específicas de la muerte de los esquejes, así como estudiar los umbrales de pH, potencial redox y conductividad que pudieran posibilitar el desarrollo y regeneración de los esquejes de *H. portulacoides*.

Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto que las plantas desarrolladas a partir de los esquejes plantados con yemas presentaron un mayor crecimiento en relación a los esquejes plantados sin yema. No solo encontramos en este tratamiento valores medios mayores en el peso seco de las plantas, tanto de la fracción aérea como de la subterránea, en comparación a aquellas que fueron plantadas sin enterramiento de yemas, sino que las longitudes finales también fueron superiores. La presencia de dichas yemas en el suelo implica la existencia de una zona de formación de raíces adventicias. Taiz y Zeiger (2015) definen este tipo de raíces como aquellas que se originan de tejido no radical, pudiendo surgir de una serie de localizaciones tisulares a partir de grupos de células maduras que renuevan su actividad de división celular; este proceso debe implicar una profunda transformación en la actividad histológica del esqueje, que supone que células maduras dirijan su funcionamiento hacia la formación de una estructura meristemática primaria. Estas células en división se convertirían en meristemas apicales de la raíz de modo análogo a la formación de raíces laterales.

En el caso de los esquejes plantados en suelos arenosos, los valores medios de RGR mostraron un crecimiento similar al obtenido por otros autores en plantas de esta especie desarrolladas a partir de semillas y en condiciones control (Redondo-Gómez *et al.*, 2007; Cambrollé *et al.*, 2012). Otros autores que han estudiado la propagación vegetativa en especies como *Ipomoea pes-Caprae* (Gomes Neto *et al.*, 2003) o *Panicum racemosum* (Cordazzo y Davy, 1999) han evaluado el desarrollo de esquejes de diferentes tamaños, demostrando que los de mayor tamaño presentan un crecimiento superior, por lo que en próximos estudios se debería tener en cuenta este factor.

En cuanto al estudio fisiológico de las plantas establecidas a partir de los esquejes de *H. portulacoides* los valores de intercambio gaseoso registrados fueron similares a los obtenidos por otros autores en condiciones ambientales similares (Andrades-Moreno *et al.*, 2013). Los valores de tasa de fotosíntesis neta

---

y de concentración de pigmentos fotosintéticos obtenidos en los esquejes crecidos en arena fueron similares a los obtenidos por Cambrollé *et al.* (2012) en plantas desarrolladas desde semillas bajo condiciones óptimas de luz, humedad, temperatura y riego. Estos resultados indican que, una vez establecido el sistema radical, las plantas procedentes de esquejes muestran un rendimiento fisiológico similar al de las plantas procedentes de semillas.

Nuestro estudio demuestra que el uso de esquejes de *H. portulacoides* podría ser un buen recurso a utilizar en proyectos de restauración de zonas costeras con suelos arenosos. No obstante, el uso de técnicas de propagación vegetativa mediante esquejes u otro tipo de estructuras vegetales con dichos fines debe ser alternado con plantas desarrolladas a partir de semillas o con esquejes procedentes de diferentes plantas, con el fin de evitar la pérdida de variabilidad genética, factor importante para el mantenimiento de la población en cuanto a su evolución frente a las condiciones futuras del medio.

## **CONCLUSIONES**

Este trabajo supone el primer estudio en testar el crecimiento de esquejes de *Halimione portulacoides* en diferentes tipos de sustratos y con diferentes técnicas de plantación. Este estudio experimental confirma que el suelo arenoso es el más adecuado para el desarrollo de esquejes de *H. portulacoides* en comparación con los suelos areno-arcillosos y arcillosos. Para confirmar la imposibilidad del desarrollo de los esquejes de la especie de estudio en suelos arcillosos sería conveniente ampliar las pruebas con suelos que presenten características físico-químicas diferentes. Asimismo, los resultados de este estudio muestran que la plantación con enterramiento de yemas en el suelo tiene un efecto positivo en el establecimiento y desarrollo de los esquejes de *H. portulacoides*.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Álvarez-Herrera, J. G., Rodríguez, S. L., Chacón, E. 2007. Effect of different sizes of stem cuttings and substrates on the propagation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agronomía Colombiana* **25**, 224-230.
- Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Figueroa, M.E., Mateos-Naranjo, E. 2013. Growth and survival of *Halimione portulacoides* stem cuttings in heavy metal contaminated soils. *Marine Pollution Bulletin* **75**, 28-32.
- Bejarano Palma, R. 1997. El análisis de la vegetación como criterio de interpretación del paisaje (Andalucía atlántica). *Estudios Geográficos* **226**, 5-32.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M.E. 2012. Tolerance and accumulation of copper in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Marine Pollution Bulletin* **64**, 721-728.
- Chapman, V.J. 1950. *Halimione portulacoides* (L.) Aellen. *Journal of Ecology* **1**, 214-222.
- Cordazzo, C.V., Davy, A.J. 1999. Vegetative regeneration of *Panicum racemosum* from rhizome fragments on southern Brazilian coastal dunes. *Journal of Coastal Research* **15**, 520-525.
- Cruz-Silva, C.T.A., Marcon, A., Nobrega, L. 2015. Propagação vegetativa de insulina (*Cissus verticillata* (L.) Nicholson & CE Jarvis) via estaquia. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **17**, 171-174.
- Giménez-Casalduero, F. 2006. Gestión de la franja costera: un enfoque integrado. En: Museo de la Ciencia y el Agua (ed.) *Contrastes naturales en la región bioclimática del Mediterráneo*, 261-272. Murcia.

- 
- Gomes Neto, A., Cunha, S.R., Voigt, E.L. 2003. Produção de mudas de *Ipomoea pes-caprae* a partir de estacas, para utilização em projetos de recuperação de dunas frontais. *II Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental* (Itajaí, Santa Catarina), 228.
- Gomes Neto, A., Cunha, S.R., Voigt, E.L. 2006. Vegetative propagation of the dune building plant *Ipomoea Pes-Caprae* for use in dune rehabilitation projects. *Journal of Coastal Research* **39**, 1251-1254.
- Hoagland, D., Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circulation* **347**, 1-39.
- Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., Schuman, G. E. 1997. Soil quality: A concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Science Society of America Journal* **61**, 4-10.
- Lacambra, C., Lozano, C., Alonso, D., Fontalvo, M. 2003. Amenazas naturales y antrópicas en las zonas costeras colombianas. *Serie de documentos generales de INVEMAR* **15**.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Primack, R., Massardo, F. 2001. Restauración ecológica. En: Primack, R., R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo y F. Massardo (eds.). *Fundamentos de conservación biológica: Perspectivas latinoamericanas*. 559-582. *Fondo de Cultura Económica*, México.
- Ramírez, L. A., González, E. P., Zuluaga, C. M., Marín, M. A., Morales, J. G., Núñez, C. E., Cotes, J. M. 2013. Uso de esquejes de tallo lateral para evaluar la resistencia de genotipos de *Solanum phureja* a *Spongospora subterranea* f. sp. subterranea. *Tropical Plant Pathology* **38**, 303-312.

- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A.J., Fernández-Muñoz, F., Castellanos, E., Luque, T., Figueroa, M.E. 2007. Growth and photosynthetic responses to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany* **100**, 555-563.
- Rucks, L., García, F., Kaplan, A., Ponce De León, J. 2000. Propiedades físicas del suelo. Facultad de agronomía. Departamento de suelos y Aguas. Montevideo, Uruguay
- Ruiz-Camacho, N., Velásquez, E., Pando, A., Decaens, T., Dubs, F. 2009. Indicateurs synthétiques de la qualité du sol. *Étude et Gestion des Sols* **16**, 323-338.
- SER, Society for Ecological Restoration international 2004. Principios de SER International sobre la restauración ecológica. Grupo de trabajo sobre ciencias políticas. En: *www.ser.org*.
- Society of Wetland Scientist 2000. Position Paper on the definition of wetland restoration. *Bulletin* **17**, 9-10.
- Sojka, R.E., Upchurch, D.R. 1999. Reservations regarding the soil quality concept. *Soil Science Society of America Journal* **63**, 1039-1054.
- Sotomayor, E. L., Tolosa, M. R. E., Guerra, C. A. R. 2011. Propagation of *Lisianthus cv. Blue* by cuttings in peat pots under mist, with different concentrations of  $\beta$ -indole butyric acid, in the Azapa Valley. *IDESIA (Chile)* **1**, 99-102.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. 2015. Plant physiology and development. *Sinauer Associates, Incorporated*.
- Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**, 376-387.

---

Woodhouse, W.W. 1982. Coastal sand dunes of the U.S. En: Lewis, R.R. (Ed.)  
*Creation and Restoration of Coastal Plant Communities*, 1-44. CRC press.  
Boca Raton, Florida.



# 3

*Determinación de las características biométricas de esquejes de Halimione portulacoides (L.) Aellen para ser utilizados en proyectos de revegetación*



## INTRODUCCIÓN

Según la totipotencialidad del tejido vegetal, los órganos de una planta, tras sufrir una serie de modificaciones fisiológicas, anatómicas y funcionales, pueden dar lugar a una planta completa e independiente, genéticamente idéntica a la planta progenitora (Taiz *et al.*, 2015). Por tanto, un esqueje puede definirse como un fragmento de planta que, una vez trasplantado, desarrolla un sistema radical y es capaz de crecer hasta formar una planta autónoma completa (Longman, 1993).

La capacidad de multiplicación vegetativa supone un ahorro de tiempo y costo a la hora de realizar un proyecto de restauración, siendo cada vez más habitual la combinación de diferentes métodos de propagación para llevar a cabo dichos proyectos (Aránzazu y Arizpe, 2008). Entre las especies usadas en la revegetación de ecosistemas costeros se pueden citar *Typha domingensis* Pers. (Mufarrege *et al.*, 2014), *Spartina maritima* (Curtis) Fernald (Reboreda y Caçador 2007), *Atriplex halimus* (L.) (Mateos-Naranjo *et al.*, 2013), *Smilax aspera* (L.) (Poschenrieder *et al.*, 2012) y *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss (Cambrollé *et al.*, 2013), además de nuestra especie de estudio, *Halimione portulacoides*. Recientemente se ha demostrado que esta especie es capaz de multiplicarse vegetativamente, poniendo en valor la posible aplicabilidad de éstos en la recuperación de suelos contaminados (Andrades-Moreno *et al.*, 2013). Sin embargo, ciertos aspectos básicos de la biología de la especie, cuyo conocimiento resulta necesario para poner en práctica la utilización de esquejes en proyectos de restauración (p.e. localización del esqueje, tamaño óptimo, etc.), no han sido estudiados en profundidad.

---

El objetivo del presente estudio fue determinar las características óptimas de los esquejes de *H. portulacoides* para ser utilizados con éxito en proyectos de revegetación. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- a) Establecer la zona más apropiada de la planta para la obtención del esqueje.
- b) Testar si el enterramiento de yemas en el sustrato afecta diferencialmente a la supervivencia y desarrollo de los esquejes en función del tamaño inicial del mismo.
- c) Determinar el tamaño óptimo inicial de los esquejes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Localización del corte para obtener el esqueje*

Para determinar si existen o no diferencias a la hora de seleccionar las distintas partes de la planta madre para la obtención de los esquejes, se realizaron cortes en las ramificaciones laterales y apicales de las plantas descritas en el capítulo anterior (apartado material vegetal y tratamientos), con el fin de obtener esquejes con al menos 7 nudos (más el nudo apical). Se midió la dureza o resistencia a la rotura de 100 esquejes con un dinamómetro digital PCE-FM50, en cada uno de los entrenudos. Las medidas siempre fueron realizadas en la mitad de cada entrenudo.

### *Determinación del tamaño óptimo del esqueje y efecto del enterramiento de yemas*

Para testar el efecto de la longitud del esqueje, se realizaron cortes en las ramificaciones laterales a diferentes alturas para obtener los siguientes tipos:

- a) Esquejes pequeños: 2 nudos desarrollados incluido el nudo apical (2N; Longitud:  $5,33 \pm 0,25$  cm).
- b) Esquejes medianos: 4 nudos desarrollados incluido el nudo apical (4N; Longitud:  $10,84 \pm 0,42$  cm).
- c) Esquejes grandes: 6 nudos desarrollados incluido el nudo apical (6N; Longitud:  $16,91 \pm 0,88$  cm).

---

Los cortes se realizaron por la mitad del entrenudo siguiente al número de nudos elegidos. Asimismo, para testar el efecto del enterramiento se realizaron dos métodos de plantación: i) con la última yema enterrada en el sustrato (Y+), y ii) sin la última yema enterrada en el sustrato (Y-).

Tras el corte, los esquejes fueron plantados en macetas con arena inerte a una profundidad de 2-3 cm (3 tamaños de esqueje (2N, 4N, 6N) x 2 tratamientos de enterramiento (Y+, Y-) x 10 réplicas = 60 macetas). Las macetas se depositaron en bandejas de plástico, las cuales fueron colocadas durante 35 días en el invernadero de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla, con una temperatura controlada de entre 21 y 25°C, una humedad relativa de entre 40 y 60% y luz natural (flujo mínimo y máximo de luz: 200 y 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente). Cada bandeja fue rellenada con un volumen de 3 l de solución Hoagland al 20% (Hoagland y Arnon, 1938), marcándose el nivel del volumen en cada bandeja y manteniéndolo constante durante todo el experimento.

### ***Análisis del crecimiento***

Al inicio del experimento se tomaron 15 esquejes por cada uno de los diferentes tamaños con las mismas características que los esquejes plantados, que fueron secados en una estufa a 80°C durante 48 horas y pesados en una báscula de precisión para obtener el peso seco inicial. Una vez finalizado el experimento (tras 35 días), se recogieron las plantas completas de cada uno de los tratamientos, repitiendo la misma metodología para obtener el peso seco final. En ambos casos se separó la biomasa aérea y la subterránea, en el caso de que la hubiera.

La tasa relativa de crecimiento (RGR) de las plantas completas se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{RGR} = (\ln B_f - \ln B_i) * D^{-1} \quad (\text{g g}^{-1}\text{día}^{-1})$$

donde:  $B_f$ = biomasa final seca;  $B_i$ = biomasa inicial seca ;  $D$  = duración del experimento en días.

Además, se realizó un conteo semanal del número de hojas vivas y se determinó la superficie foliar a partir de la superficie proyectada mediante escaneo y digitalización de las hojas (V30 Epson, Seiko Epson Corp., Nagano, Japón), usando el software MideBMP (Ordiales-Plaza, 2000) para su procesamiento y análisis.

### ***Análisis estadísticos***

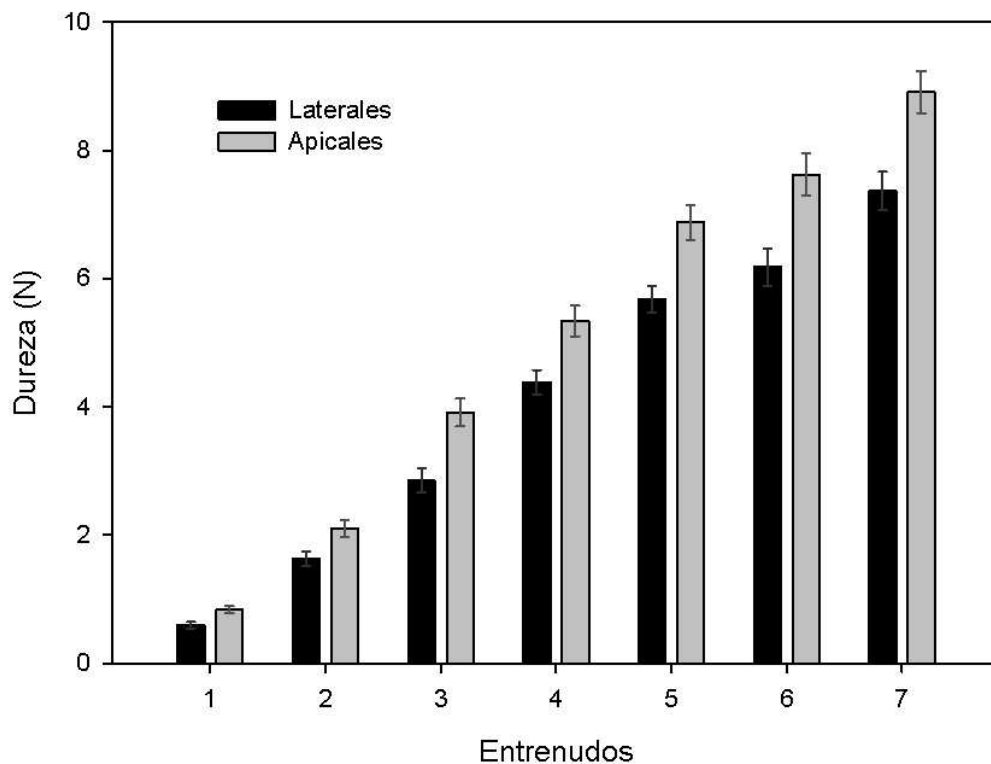
Antes de iniciar los análisis se comprobó la normalidad (Test de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad (Test de Levene) de los datos. Las diferencias entre las medidas de la dureza de las ramas y el tratamiento diferencial de enterramiento de yemas se compararon mediante el test de la T-Student ( $t$ -test). El resto de los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) unifactorial. Se utilizó el test de Tukey para identificar diferencias cuando existieron resultados significativos en el ANOVA. La evolución de la superficie foliar fue analizada mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete informático SPSS v. 24.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

---

## RESULTADOS

### *Localización del corte para la obtención del esqueje*

La figura 1 muestra la dureza o resistencia a la rotura de cada uno de los entrenudos de las ramificaciones laterales y apicales de *Halimione portulacoides*. En todos los entrenudos analizados se encontraron diferencias significativas entre las ramificaciones laterales y apicales (t-test,  $p \leq 0,05$  para todos los casos). Los entrenudos de las ramificaciones laterales siempre mostraron menor dureza que los entrenudos apicales, suponiendo un descenso de entre el 20 y el 30%.



**Figura 1.** Dureza (N) de los entrenudos de tallos apicales y laterales de *Halimione portulacoides*. El entrenudo n° 1 es el que se encuentra más cercano al ápice y el n° 7 es el más alejado.



---

### *Determinación del tamaño óptimo del esqueje y efecto del enterramiento de yemas*

#### *Supervivencia*

Todos los esquejes del tratamiento Y+ presentaron una supervivencia del 100% independientemente de su tamaño. Sin embargo, en el tratamiento Y- la supervivencia de los esquejes estuvo influenciada por el material inicial; la supervivencia fue del 80% en el caso de los esquejes 2N y del 60% en el caso de los esquejes 4N y 6N.

#### *Desarrollo de raíces en los diferentes tratamientos*

En el 30-40% de los esquejes del tratamiento Y- las raíces fueron generadas en el entrenudo, y en el 60-70% de los casos restantes, las raíces fueron emitidas del nudo basal no enterrado del esqueje. No se encontraron raíces en los esquejes muertos. En todos los esquejes del tratamiento Y+ las raíces se generaron a partir del nudo enterrado, independientemente del número de nudos.

#### *Tasa relativa de crecimiento*

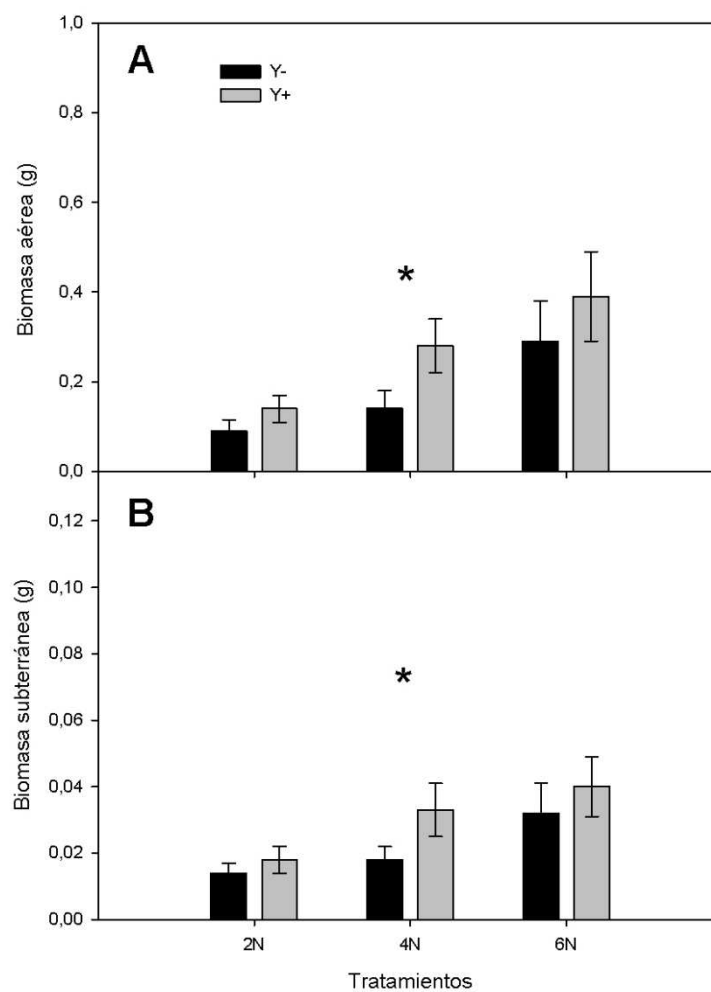
Para todos los tamaños de esqueje, la tasa relativa de crecimiento (RGR) de la parte aérea fue significativamente mayor en los tratamientos Y+ que en los tratamientos Y- ( $F= 14,54$ ;  $p \leq 0,05$ ). El mismo patrón fue encontrado para la RGR de la planta completa. Tanto en los tratamiento Y+ como Y-, no se encontraron diferencias significativas en la RGR aérea y total entre los diferentes tamaños de esqueje ( $p \geq 0,05$ , en ambos casos) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tasa relativa de crecimiento de la parte aérea y de la planta completa en esquejes de *Halimione portulacoides* según el tamaño inicial (2N, 4N y 6N) y tipo de plantación (con enterramiento de yema, Y+; sin enterramiento de yema, Y-) tras 35 días de crecimiento. Se muestra la media  $\pm$  error estándar. Distintas letras en la misma fila indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tamaño	RGR AÉREA ( $\text{g g}^{-1}\text{día}^{-1}$ )		RGR TOTAL ( $\text{g g}^{-1}\text{día}^{-1}$ )	
	Y-	Y+	Y-	Y+
2N	0,016 $\pm$ 0,002 a	0,027 $\pm$ 0,002 b	0,017 $\pm$ 0,003 a	0,029 $\pm$ 0,003 b
4N	0,010 $\pm$ 0,003 a	0,027 $\pm$ 0,003 b	0,012 $\pm$ 0,003 a	0,029 $\pm$ 0,002 b
6N	0,016 $\pm$ 0,003 a	0,025 $\pm$ 0,003 b	0,017 $\pm$ 0,002 a	0,028 $\pm$ 0,003 b

#### *Peso seco*

Los valores de peso seco aéreo y subterráneo, en los esquejes de los tres tamaños testados, fueron mayores en los tratamientos Y+ que en los tratamientos Y-, aunque tales diferencias solo fueron significativas en los esquejes 4N ( $F=9,25$ ;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 2).



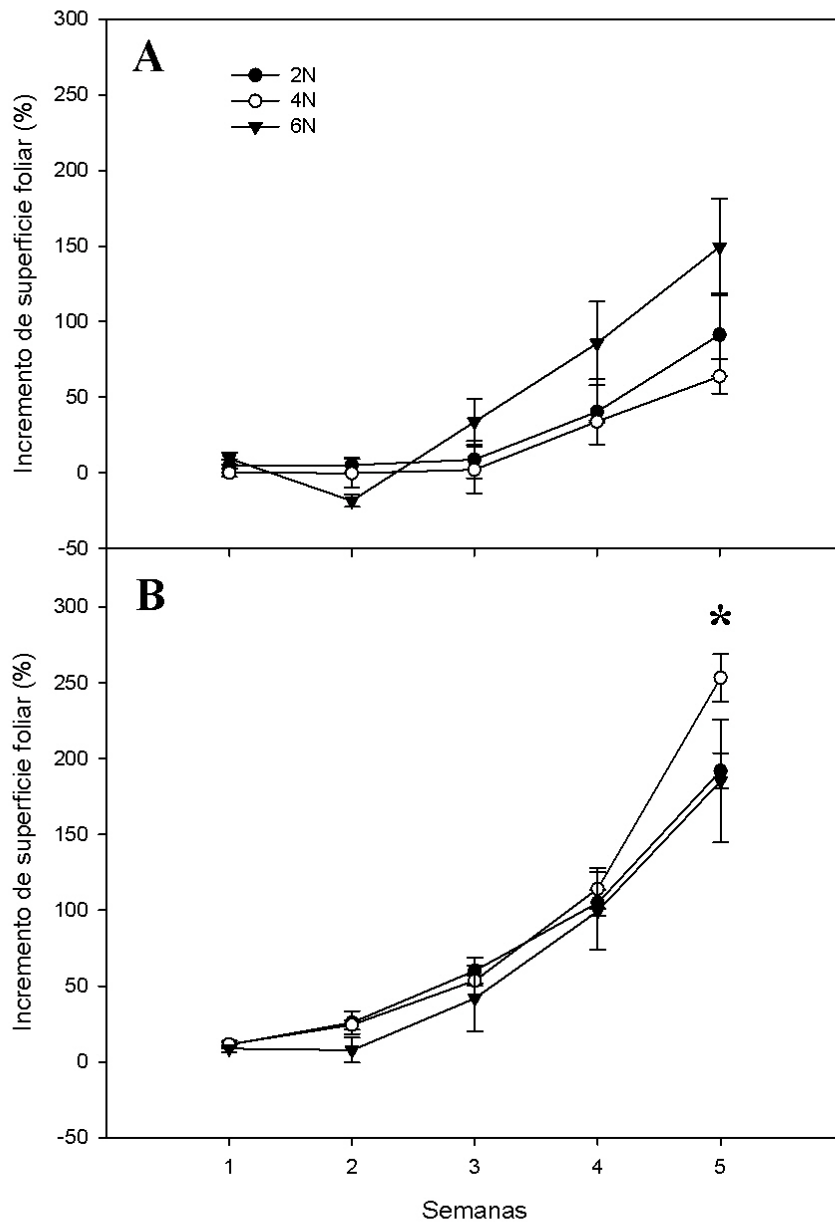
**Figura 2.** Peso seco (g) de la fracción aérea (A) y subterránea (B) en esquejes de *Halimione portulacoides* según el tamaño inicial (2N, 4N y 6N) y tipo de plantación (con enterramiento de yema, Y+; sin enterramiento de yema, Y-) tras 35 días de crecimiento. Se muestra la media  $\pm$  error estándar. \* Indica diferencias significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,05$ ).

---

### *Evolución temporal de la superficie foliar*

Independientemente del tamaño inicial, las plantas desarrolladas de los esquejes Y+ presentaron una evolución e incremento de la superficie foliar mayor que la de los esquejes Y-. En el caso del tratamiento Y-, la evolución de la superficie foliar fue similar a lo largo del periodo observado en los esquejes de los tres tamaños testados, solo encontrándose diferencias significativas en el tratamiento 6N, que sufrió una caída significativa del 30% de su superficie foliar en la segunda semana con respecto a los valores iniciales ( $F= 11,45$ ;  $p \leq 0,05$ ; Figura 3A).

En el caso del tratamiento Y+, la evolución de la superficie foliar fue similar en los esquejes de los tres tamaños testados a lo largo de todo el periodo experimental. Los esquejes 4N mostraron valores ligeramente superiores respecto a los otros dos tamaños a partir de la tercera semana, siendo tales diferencias significativas en la quinta semana ( $F= 24,54$ ;  $p \leq 0,05$ ) (Figura 3B).



**Figura 3.** Evolución de la superficie foliar (%) en esquejes de *Halimione portulacoides* según el tamaño inicial (2N, 4N y 6N) y tipo de plantación (sin enterramiento de yema, Y- (A); con enterramiento de yema, Y+ (B)) tras 35 días de crecimiento. Se muestran valores medios  $\pm$  error estándar. \*Muestra diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0,05$ ).

---

## DISCUSIÓN

Para llevar a cabo estrategias de propagación asexual o propagación vegetativa no sólo se tiene que tener en cuenta el estado fisiológico y fitosanitario de las plantas madre, sino también el lugar de la planta de donde se obtienen los esquejes, ya que en gran medida ello condicionará el adecuado establecimiento de los mismos, así como su rendimiento y producción de biomasa (Oliveira *et al.*, 2016). Los resultados de este estudio mostraron que la dureza o resistencia a la rotura de los entrenudos de las ramas laterales fue significativamente menor que la de las ramas apicales. La resistencia a la rotura es la fuerza requerida por unidad de superficie para producir una rotura a una velocidad estable, y se trata de una propiedad fundamental del material a analizar (Atkins y Mai, 1985). La dureza puede ser una medida indirecta del contenido de lignina, que nos aporta información del grado de especialización de ese tejido. La lignina es un polímero orgánico complejo que constituye principalmente la pared secundaria de los tejidos vegetales proporcionando soporte, engrosamiento, diferenciación celular, rigidez y dureza. Los tejidos que presentan un nivel alto de lignificación poseen mayores dificultades para poder llevar a cabo el enraizamiento de la planta en comparación con aquellos tejidos que presentan un nivel más bajo, razón atribuida a las auxinas, ya que estas presentan un efecto mayor sobre los tejidos poco lignificados, induciendo así un mayor porcentaje de raíces caulinares, y como consecuencia un mayor volumen de raíz (Castellanos y Bonfil, 2010; Loeza-Corte *et al.*, 2013). En base a ello, nuestros resultados indican que sería más adecuado obtener los esquejes de *Halimione portulacoides* de las ramificaciones laterales de la planta madre, ya que su menor dureza favorecería el proceso de formación de raíces.

Por lo general, el contenido de auxinas es mayor en los brotes más jóvenes, induciendo en estos una mayor división celular y un mayor crecimiento de las raíces adventicias (Bandurski *et al.*, 1995; Taiz *et al.*, 2015). La presencia de

yemas en el suelo potencia la existencia de una zona de formación de raíces adventicias (Lemes *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 2004; Bonilla y Martínez, 2010). El mayor enraizamiento se da siguiendo el movimiento denominado transporte polar de auxinas; este hace que las auxinas se muevan más rápido hacia la parte inferior de los tallos (Bandurski *et al.*, 1995; Azamal, 2012). Este hecho también repercute en los días necesarios para la brotación, ya que el material más lignificado, con menor concentración de auxinas reacciona de una forma más lenta que el que presenta un menor grado de lignificación (Loeza-Corte *et al.*, 2013), pudiendo incluso derivar en la muerte de los esquejes. Ejemplo de esto sucedió con los esquejes plantados sin enterramiento de yemas (Y-), en los que se registró un aumento de la mortandad con el incremento del tamaño inicial del esqueje, lo cual pudo estar relacionado con la mayor dureza, y por tanto mayor lignificación de la zona enterrada de los esquejes de mayor tamaño.

La presencia de yemas en el suelo implica la existencia de una zona de formación de raíces adventicias, mejorando las condiciones de los esquejes para desarrollarse. Los resultados de nuestro estudio mostraron que los esquejes plantados con yema (Y+) presentaron un mayor crecimiento en relación a los esquejes sin yemas (Y-), habiéndose registrado mayores valores tanto de peso seco como de superficie foliar, confirmándose así los resultados obtenidos en el capítulo anterior. En base a nuestros resultados, no se puede afirmar que el enterramiento de yemas en la plantación tenga efectos diferentes en función del tamaño inicial del esqueje, ya que aunque las diferencias en biomasa solo fueron significativas en el caso de los esquejes 4N, también se registraron mayores valores medios de biomasa aérea y subterránea en los esquejes 2N y 6N plantados con yema respecto a los plantados sin yema. Durante las tres primeras semanas de experimentación, la producción de hojas fue muy baja, siendo a partir de la cuarta semana cuando el número de hojas comenzó a aumentar considerablemente, y se registraron incrementos acusados de la superficie foliar, detectándose diferencias entre los diferentes tratamientos. En tal sentido se puede resaltar la caída de la

---

superficie foliar registrada en la segunda semana de experimentación en los esquejes de mayor tamaño (6N) plantados sin yema, consecuencia de una pérdida de hoja que posiblemente esté relacionada con la mayor inversión de la planta en la generación del sistema radical, en detrimento del mantenimiento y producción de biomasa aérea. Tal tendencia fue menos acusada en los esquejes 6N plantados con enterramiento de yema, confirmándose de nuevo el efecto positivo de dicho sistema de plantación. Nuestros resultados ponen de manifiesto que las plantas realizan una mayor inversión de recursos en el establecimiento y desarrollo del sistema radical durante las primeras semanas, en detrimento de la producción de biomasa fotosintética. Nuestro estudio no reveló diferencias destacables en el crecimiento de las plantas en función del tamaño inicial del esqueje, aunque en el caso de los esquejes plantados con yema, los de tamaño intermedio (4N) alcanzaron mayores valores de superficie foliar. Cabe destacar que los valores medios de tasa relativa de crecimiento del tratamiento Y+ fueron similares a los obtenidos por otros autores en plantas de esta especie desarrolladas a partir de semillas y en condiciones control (p.e., Cambrollé *et al.*, 2012).

## **CONCLUSIONES**

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que los tallos laterales de las plantas de *Halimione portulacoides* son, potencialmente, el material más adecuado para la obtención de esquejes debido a su menor lignificación, pudiendo inducir así un mayor porcentaje de raíces caulinares. Además, se puede confirmar que el enterramiento de yemas en la plantación tiene un efecto positivo en la supervivencia, establecimiento y desarrollo de los esquejes, no existiendo diferencias destacables en tal efecto en función del tamaño inicial del esqueje. En relación al tiempo de enraizamiento, los resultados indican que se requiere un periodo de entre dos y tres semanas para la formación de un sistema radical lo suficientemente desarrollado para que comience el desarrollo de la parte aérea.



Asimismo, nuestros resultados indican que el tamaño intermedio de esqueje (4N, con cuatro nudos desarrollados) presenta una respuesta de crecimiento ligeramente superior al resto de tamaños estudiados.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, M. 2011. Multiplicación de plantas/Plant Propagation: Una guía esencial para conocer los distintos tipos de multiplicación y su correcta aplicación en el inicio de un cultivo/An essential guide to learn. *Editorial Albatros*.
- Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Figueroa, M.E., Mateos-Naranjo, E. 2013. Growth and survival of *Halimione portulacoides* stem cuttings in heavy metal contaminated soils. *Marine Pollution Bulletin* **75**, 28-32.
- Aránzazu Prada, M., Arizpe, D. 2008. Manual de propagación de árboles y arbustos de ribera. Una ayuda para la restauración de riberas en la región mediterránea. Consellería de Medio Ambiente, Agua, Urbanismo y Vivienda, Generalitat Valenciana.
- Atkins, A.G., Mai, Y.W. 1985. Elastic and plastic fracture: metals, polymers, ceramics, composites, biological materials. Chichester, *Ellis Horwood*; New York, *Halsted Press*.
- Azamal H. 2012. Changes of soluble sugars and enzymatic activities during adventitious rooting in cuttings of *Grewia optiva* as affected by age of donor plants and auxin treatments. *American Journal of Plant Physiology* **7**, 1-16.
- Bandurski, R.S., Cohen, J.D., Slovin, J.P., Reinecke, D.M. 1995. Auxin biosynthesis and metabolism. En: *Plant hormones*, 39-65. *Springer Netherlands*.
- Bonilla, C., Martínez, F. 2010. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.) Producción y manejo poscosecha. Corredor Tecnológico Agroindustrial. *Cámara de Comercio de Bogotá*. Colombia.

- Cambrollé, J. Mancilla-Leytón, J.M. Muñoz-Vallés, S. Figueroa-Luque, E. Luque, T. Figueroa, M.E. 2013. Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. *Environmental and Experimental Botany* **85**, 50-57.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M.E. 2012. Tolerance and accumulation of copper in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Marine Pollution Bulletin* **64**, 721-728.
- Hoagland, D., Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circulation* **347**, 1-39.
- Lemes-Hernández, C.M., Rodríguez- Ferradá, C.A., Acosta de la Luz, L. 2001. Multiplicación Vegetativa de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* **3**.
- Loeza-Corte, J.M., Díaz- López, E., Campos -Pastelín, J.M., Orlando Guerrero, J.I. 2013. Efecto de lignificación de estacas sobre enraizamiento de *Bursera morelensis* Ram. y *Bursera galeottiana* Engl. en la Universidad de la Cañada en Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, México. *CIENCIA ergo-sum* **3**, 222-226.
- Longman, K.A. 1993. Rooting cuttings of tropical trees: propagation and planting manuals. *Commonwealth Science Council*. London, United Kingdom.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Perez-Martin, A. 2013. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **90**, 136-142.
- Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Di Luca, G.A., Maine, M.A. 2014. Metal dynamics and tolerance of *Typha domingensis* exposed to high

- 
- concentrations of Cr, Ni and Zn. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **105**, 90-96.
- Oliveira, F.A., Wendling, I., Castro C.C., Iracema M., Alves Lameira, O. 2016. Enraizamiento de estacas juveniles de *Bertholletia excelsa* con diferentes concentraciones de ácido indol-butírico. *Agrociencia* **50**, 227-238.
- Ordiales-Plaza, R. 2000. 'Midebmp, V.4.2'. Estación Experimental de Zonas Áridas CSIC, Almería, España.
- Poschenriedera, C., Lluganya, M., Lombinia, A., Dinellib, E., Bechc, J., Barceló, J. 2012. *Smilax aspera* L. an evergreen Mediterranean climber for phytoremediation. *Journal of Geochemical Exploration* **123**, 41-44.
- Reboreda, R., Caçador, I. 2007. Copper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Chemosphere* **69**, 1655-1661.
- Rojas, S., García, J., Alarcón, M. 2004. Propagación asexual de plantas. Conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, *CORPOICA*, Colombia.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. 2015. Plant physiology and development. *Sinauer Associates, Incorporated*.

# 4

*Respuesta de los esquejes de  
Halimione portulacoides (L.) Aellen  
a la salinidad*



## INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas costeros están sujetos a elevados aportes de sal procedente del mar, la cual es depositada en el suelo a través del “spray salino” y de la inmersión, como consecuencia de las mareas (Ranwell, 1972). La topografía propia de las zonas costeras da lugar a diferentes tipos de hábitats, con niveles muy variables de salinidad (Ishikawa y Kachi, 2000). Los efectos de la salinidad en las plantas son consecuencia de factores osmóticos e iónicos que causan reducciones en el crecimiento y en el rendimiento de las misma, llegando a ocasionar la muerte en caso de persistir las condiciones salinas (Storey y Walter, 1999). Aunque todas las especies halófilas son capaces de completar su ciclo de vida bajo condiciones de salinidad elevada, dichas especies difieren mucho en su tolerancia a la sal. Algunos especies halófilas crecen mejor a una salinidad relativamente baja (Wang *et al.*, 1997), mientras que otras son capaces de tener un buen rendimiento a concentraciones de  $\text{Na}^+$  superiores a  $500 \text{ mmol l}^{-1}$  (Inan *et al.*, 2004). Estas especies muestran distintas adaptaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas a los ambientes salinos, las cuales varían ampliamente dependiendo del genotipo y del estadio de desarrollo de la planta (Willadino y Cámara, 2005). Estudios comparativos sobre la tolerancia a la salinidad en las plantas, realizados en diversos hábitats con diferentes niveles de salinidad, han mostrado que dicha tolerancia es mayor en plantas procedentes de zonas caracterizadas por elevadas concentraciones salinas (p.e. Pearcy y Usin, 1984; Zedler, 1990).

Sólo unas pocas especies altamente tolerantes a la sal son capaces de sobrevivir y florecer en las marismas costeras sin experimentar efectos fisiológicos adversos en respuesta al estrés por sal (Qiu *et al.*, 2003; Redondo-Gómez *et al.*, 2007). *Halimione portulacoides* ha sido descrita como una especie capaz de desarrollarse en un amplio rango de concentraciones salinas (desde medios hiposalinos a hipersalinos) (Jensen, 1985; Carvalho *et al.*, 2001; Redondo

---

*et al.*, 2007). Aunque existen numerosos estudios centrados en la tolerancia de diferentes especies de marismas salinas a las elevadas concentraciones de sal, la capacidad de implantación y desarrollo de esquejes de este tipo de plantas en medios con diferente salinidad nunca ha sido estudiado. El conocimiento de la respuesta de los esquejes de *H. portulacoides* bajo diferentes concentraciones salinas podría aportar información relevante a tener en cuenta en el futuro desarrollo de estrategias de restauración.

El objetivo principal de este estudio fue examinar la implantación, crecimiento, y la respuesta fisiológica de esquejes de *H. portulacoides* bajo un rango de tratamientos experimentales de salinidad. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- a) Evaluar la implantación y el crecimiento de esquejes de *H. portulacoides* en distintos tratamientos experimentales de sal que variaron entre 0 y 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl.
  
- b) Determinar en qué medida puede afectar la salinidad al rendimiento de las plantas crecidas desde esquejes, centrándonos en la influencia de la sal sobre el aparato fotosintético (Fotosistema II), las características del intercambio gaseoso y la concentración de pigmentos fotosintéticos.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal*

Los esquejes fueron obtenidos de las ramificaciones laterales de las plantas “madre” descritas en el capítulo 2, apartado material vegetal y tratamientos. Los esquejes fueron representativos del tamaño mediano (4N, cuatro nudos desarrollados incluido el nudo apical, capítulo 3, apartado determinación del tamaño óptimo del esqueje. Posteriormente, los esquejes se plantaron en macetas con arena humedecida con solución Hoagland (Hoagland y Arnon, 1938) a una profundidad de 3 cm.

### *Tratamientos de estrés*

Los esquejes de los diferentes tamaños se sometieron a los siguientes tratamientos de sal: 0, 50, 150, 300 y 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl. Se utilizó una bandeja para cada tratamiento, colocando 10 macetas en cada una de ellas. Los tratamientos de sal se prepararon combinando solución Hoagland al 20 % y NaCl a la concentración apropiada. Las bandejas se colocaron en el invernadero de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla, con una temperatura controlada de entre 21 y 25°C, una humedad relativa de entre 40 y 60% y luz natural (flujo mínimo y máximo de luz: 200 y 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente)

Al inicio del experimento, se añadieron 3 l de la solución correspondiente en cada una de las bandejas y se marcó el nivel que alcanzaba la solución. Durante el periodo experimental, los niveles de la solución en cada bandeja se monitorizaron y se completaron con solución Hoagland (sin la adición de NaCl), siempre que fue necesario, hasta los niveles marcados inicialmente para mantener

---

las concentraciones estables. Además, la solución de cada uno de los tratamientos (incluyendo NaCl) se renovó cada dos semanas.

### ***Medidas de crecimiento***

Al inicio del experimento se tomaron 15 esquejes, que fueron secados en una estufa a 80°C durante 48 horas y pesados en una báscula de precisión para obtener el peso seco inicial. Una vez finalizado el experimento (tras 50 días de tratamiento), se recogieron todas las plantas de cada tratamiento, repitiendo la misma metodología para obtener el peso seco final.

La tasa relativa de crecimiento (RGR) de las plantas completas se calculó mediante la fórmula:

$$\text{RGR} = (\ln B_f - \ln B_i) * D^{-1} \quad (\text{g g}^{-1}\text{día}^{-1})$$

donde:  $B_f$ = biomasa final seca;  $B_i$ = biomasa inicial seca;  $D$  = duración del experimento en días.

Además, se midió la longitud final de cada planta, desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más apical, y se determinó la superficie foliar a partir de la superficie proyectada mediante escaneo y digitalización de las hojas (V30 Epson, Seiko Epson Corp., Nagano, Japón), usando el software MideBMP (Ordiales-Plaza, 2000) para su procesamiento y análisis.

### ***Intercambio gaseoso***

Las medidas de intercambio gaseoso se realizaron en hojas completamente desarrolladas (n=10) tras 50 días de experimentación, en las plantas sometidas a cada una de las diferentes concentraciones salinas, utilizando un analizador de

gases por infrarrojo (IRGA) en circuito abierto (LI-6400, LI-COR Inc., Neb., USA). Se midió la tasa de fotosíntesis neta (A) a una concentración de CO<sub>2</sub> de 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  y a 1000  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La iluminación se obtuvo de una lámpara de luz fotosintéticamente activa acoplada a la cámara de hojas del LI-6400. La temperatura de las hojas se mantuvo entre 20 y 25 °C, y la humedad relativa entre el 45 y 55 %. La tasa de fotosíntesis neta se calculó usando las fórmulas de Von Caemmerer y Farquhar (1981).

### ***Fluorescencia de la clorofila***

La fluorescencia de la clorofila se midió utilizando un fluorímetro portátil modulable (FMS-2, Hansatech Instrument Ltd., England) en hojas completamente desarrolladas (n=10), después de 50 días de experimentación, en cada una de las diferentes concentraciones de sal. Los parámetros de adaptación a luz y oscuridad de la fluorescencia se midieron al amanecer (a una luz ambiental estable de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para conocer los posibles efectos de las diferentes concentraciones de sal sobre la sensibilidad de las plantas a la fotoinhibición. Durante un periodo de 30 minutos las plantas se adaptaron a la oscuridad utilizando unas pinzas preparadas para este fin. El nivel mínimo de fluorescencia en condiciones de adaptación a la oscuridad ( $F_0$ ) se midió utilizando un pulso modulado ( $<0,05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de 1,8  $\mu\text{s}$ ) demasiado pequeño para inducir cambios fisiológicos en la planta (Schreiber *et al.*, 1986). El dato almacenado fue un promedio obtenido durante un periodo de 1,6 segundos. La fluorescencia máxima en este estado ( $F_m$ ) se midió después de aplicarle a la hoja un pulso saturante de luz actínica de 15000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 0,7 segundos (Bolhàr-Nordenkampf y Öquist, 1993). El valor de  $F_m$  fue registrado como la mayor diferencia entre dos puntos consecutivos. Los valores de la fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_0$ ) y la eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) se calcularon a partir de los valores de  $F_0$  y  $F_m$ . Este cociente de las fluorescencias variable y máxima se correlaciona con el número de centros de reacción funcionales del fotosistema II

---

y puede ser utilizado para cuantificar el nivel de fotoinhibición (Maxwell y Johnson, 2000).

### ***Pigmentos fotosintéticos***

Al final del periodo experimental, se extrajeron los pigmentos fotosintéticos en hojas completamente desarrolladas de cada tratamiento (n=10) tras 50 días de experimentación. Las medidas se realizaron a partir de muestras de 0,05 g de material fresco trituradas en un mortero con 10 ml de acetona al 80%. Se filtró el sobrenadante resultante y, posteriormente, se diluyó 1 ml del mismo en 2 ml de acetona para medir la absorbancia a tres longitudes de onda (470,0; 646,8 y 663,2 nm), utilizando para ello un espectrofotómetro Hitachi U-2001. Las concentraciones de clorofila *a* (Clf *a*) y clorofila *b* (Clf *b*) se obtuvieron aplicando la metodología de Lichtenthaler (1987).

### ***Análisis estadísticos***

Antes de iniciar los análisis se utilizaron los test habituales para el contraste de normalidad y homocedasticidad (Test de Kolmogorov-Smirnov y Test de Levene, respectivamente). Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) unifactorial. Las diferencias entre las medias se determinaron mediante el Test de Tukey. Con el objetivo de explorar las posibles correlaciones entre las diferentes variables, se realizaron análisis de correlación de Pearson. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete informático IBM SPSS v. 24.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

## RESULTADOS

### *Supervivencia y crecimiento*

La supervivencia de los esquejes se vio mermada por la concentración de sal externa; los tratamientos control y 50 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl presentaron el mayor porcentaje de supervivencia (100%) y el tratamiento de 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl el menor (60%) (Tabla 1).

En la figura 1 se muestran las variables biométricas analizadas para las plantas crecidas a partir de esquejes de *Halimione portulacoides* en los distintos tratamientos experimentales de sal. El patrón obtenido en la altura y superficie foliar final de las plantas fue similar; el tratamiento 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl presentó valores significativamente menores al resto de los tratamientos estudiados para ambas variables ( $F=6,75$ ;  $p \leq 0,05$  y  $F=11,01$ ;  $p \leq 0,001$ , respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre el resto de tratamientos (Figura 1A y B).

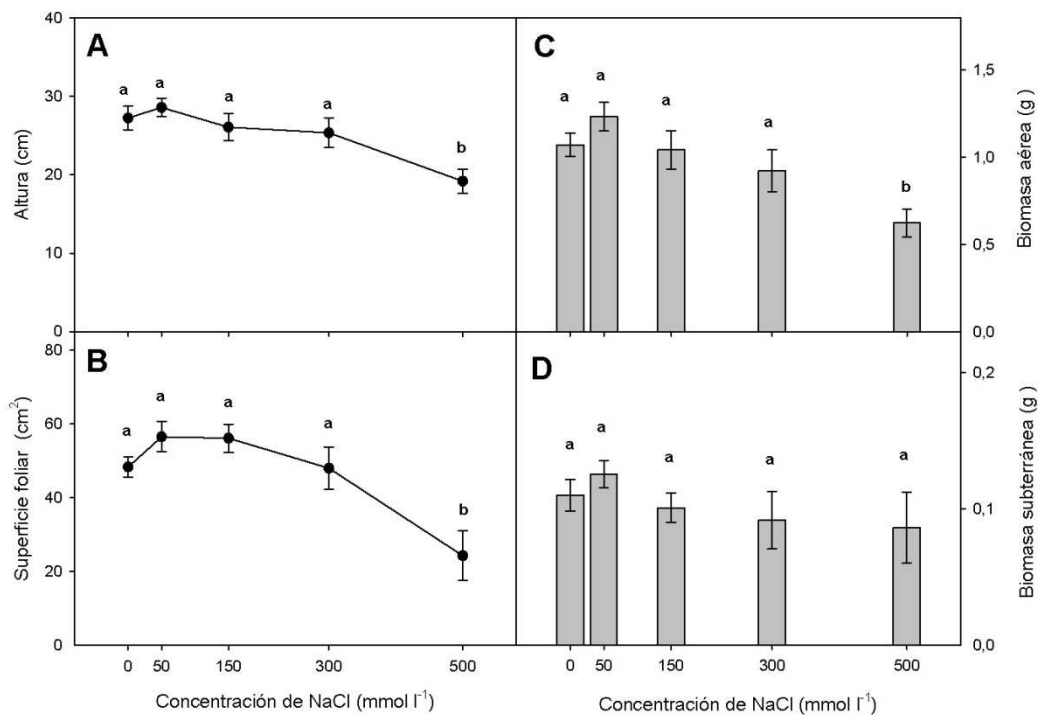
En cuanto a la biomasa aérea de las plantas, los valores oscilaron entre 1,23g, en el tratamiento de 50 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl y 0,62 g, en el tratamiento de 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl (Figura 1C). La biomasa aérea de las plantas crecidas en el tratamiento de 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl fue significativamente menor a la registrada en el resto de los tratamientos ( $F=3,74$ ;  $p \leq 0,05$ ). En cuanto a la biomasa subterránea no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos estudiados ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 1D).

Por último, la tasa relativa de crecimiento (RGR) de las plantas crecidas a partir de esquejes no se vio afectada por el incremento de la concentración salina hasta el tratamiento de 300 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl. No obstante, los valores de RGR registrados en las plantas sometidas al tratamiento de 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl

mostraron una reducción de aproximadamente el 30-35% respecto al resto de los tratamientos, siendo dicha reducción significativa ( $F=4,49$ ;  $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 1.** Porcentaje de supervivencia y tasa relativa de crecimiento (RGR) en esquejes de *Halimione portulacoides* bajo diferentes concentraciones de sal tras 50 días de tratamiento. Se muestran los valores medios  $\pm$  error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tratamientos	Supervivencia (%)	RGR ( $\text{g g}^{-1}\text{día}^{-1}$ )
Control	100	$0,057 \pm 0,005$ a
50 $\text{mmol l}^{-1}$ de NaCl	100	$0,059 \pm 0,007$ a
150 $\text{mmol l}^{-1}$ de NaCl	75	$0,054 \pm 0,007$ a
300 $\text{mmol l}^{-1}$ de NaCl	75	$0,053 \pm 0,004$ a
500 $\text{mmol l}^{-1}$ de NaCl	60	$0,041 \pm 0,006$ b



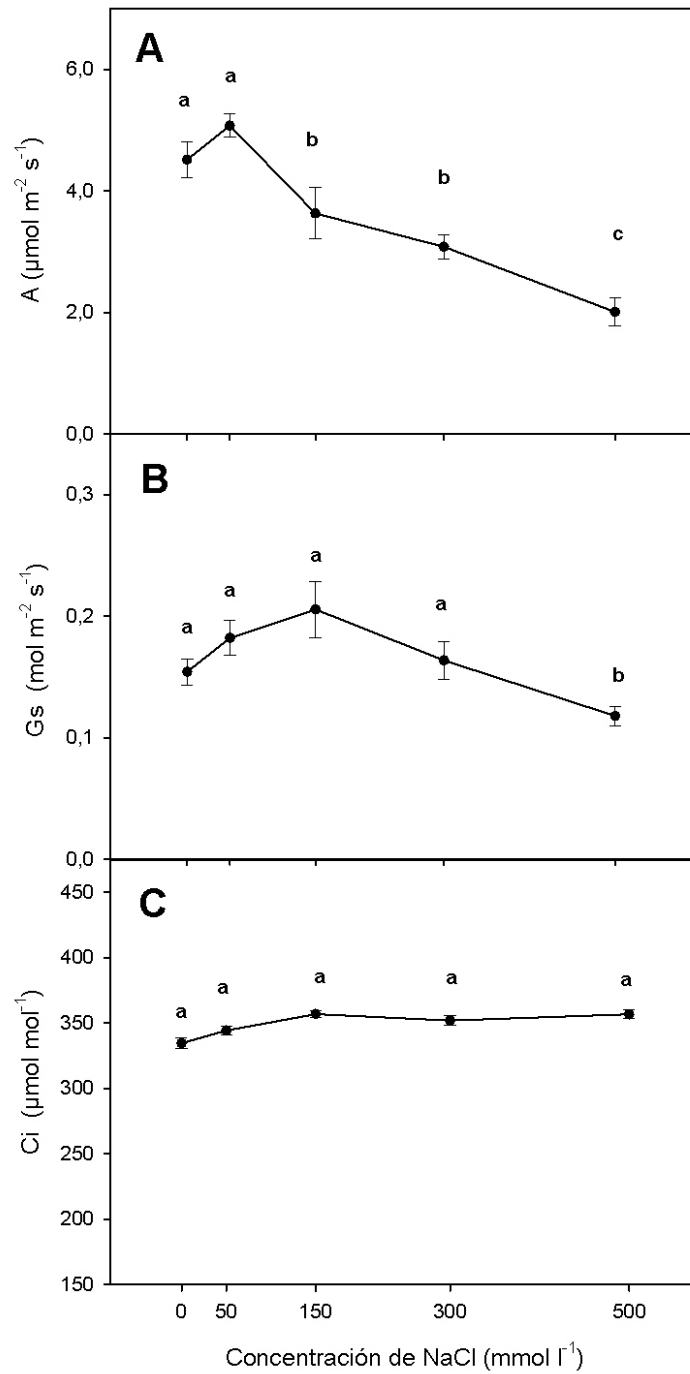
**Figura 1.** Altura (A), superficie foliar final (B), biomasa aérea (C) y biomasa subterránea (D) de las plantas crecidas a partir de esquejes de *Halimione portulacoides* en respuesta a distintas concentraciones de sal tras 50 días de tratamiento. Se representan valores medios  $\pm$  error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### ***Intercambio gaseoso***

Los valores de tasa de fotosíntesis neta (A) mostraron una tendencia de disminución a partir del tratamiento de 150 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl, registrándose el valor mínimo en el tratamiento salino más elevado. Los valores de A fueron similares en el tratamiento control y 50 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl. Existió una correlación positiva entre los valores de A y RGR ( $r = 0,80$ ,  $p \leq 0,05$ ). La tasa de conductancia estomática (Gs) estuvo directamente correlacionada con A ( $r = 0,77$ ,  $p \leq 0,05$ ). Respecto a la concentración de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>), no se registró una tendencia clara respecto al incremento de la concentración externa de sal, con un ligero incremento entre los valores del tratamiento control y 200 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl (Figura 2).

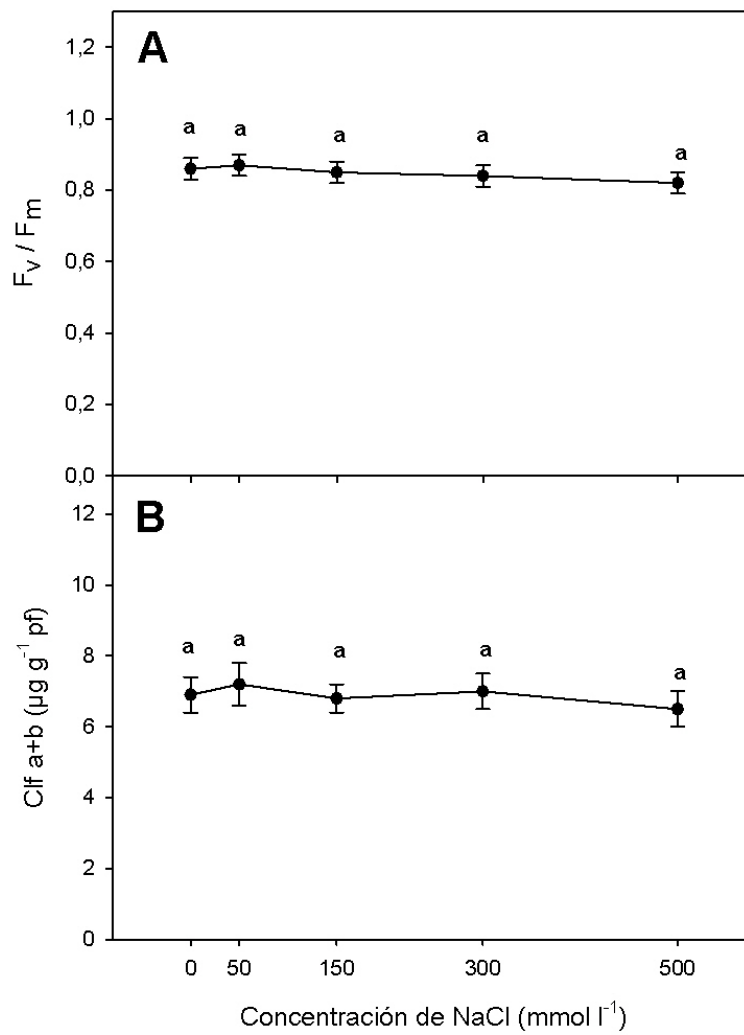
### ***Fluorescencia y pigmentos fotosintéticos***

Tras 50 días de tratamiento, los valores de F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> registrados al amanecer mostraron pequeñas variaciones respecto a la salinidad externa, no siendo estas diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 3A). De la misma forma, la concentración de pigmentos fotosintéticos no mostró una tendencia clara respecto al incremento de la salinidad en el medio (Figura 3B).



**Figura 2.** Tasa de fotosíntesis neta, A (A), conductancia estomática, Gs (B), concentración de CO<sub>2</sub> intercelular, Ci (C) en hojas de plantas crecidas a partir de esquejes de *Halimione portulacoides* en respuesta a distintas concentraciones de sal tras 50 días de tratamiento. Se representan valores medios ± error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).





**Figura 3.** Eficiencia fotoquímica potencial del PSII,  $F_v/F_m$  al amanecer (A) y concentración de clorofila  $a + b$  (B) en hojas de plantas crecidas a partir de esquejes de *Halimione portulacoides* en respuesta a distintas concentraciones de sal tras 50 días de tratamiento. Se representan valores medios  $\pm$  error estándar. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

---

## DISCUSIÓN

Los esquejes de *Halimione portulacoides* mostraron una alta tolerancia a la salinidad, ya que fueron capaces de sobrevivir y desarrollar un sistema radical bajo concentraciones salinas de hasta 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl. Los esquejes plantados en este estudio mostraron altas tasas de crecimiento hasta el tratamiento de 300 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl, concentración que se puede considerar inhibitoria para otras especies costeras (Greenway y Munns, 1980).

La asociación entre efectos osmóticos e iónicos (toxicidad iónica y deficiencias y/o desequilibrios en las concentraciones de nutrientes) es una de las principales causas de las reducciones en el crecimiento bajo estrés salino (Yahya, 1998). La reducción del crecimiento se debe principalmente a los efectos osmóticos de la acumulación de sales en la zona radical, mientras que la acumulación de iones tóxicos en los tejidos vegetales es responsable de una serie de daños progresivos sobre las funciones fisiológicas de las plantas (Munns, 2002). En algunas especies costeras ha sido documentado que la exposición prolongada a la salinidad provoca reducciones considerables del crecimiento. Por ejemplo, en *Artemisia stelleriana* se han registrado reducciones de la tasa relativa de crecimiento (RGR) del 29 y el 83% estando sometida a concentraciones de 100 y 300 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl respectivamente (Ishikawa y Kachi, 2000). Niu y Rodríguez (2006) obtuvieron disminuciones en el crecimiento de aproximadamente el 50% en *Teucrium chamaedry* bajo concentraciones salinas de 180 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl. En nuestro estudio, las plantas establecidas a partir de los esquejes de *H. portulacoides* fueron capaces de crecer y desarrollarse, sin diferencias respecto al tratamiento control, hasta concentraciones de 300 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl. Sólo las plantas desarrolladas en la concentración de 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl vieron significativamente reducido su crecimiento con respecto al resto de tratamientos. Otras especies halófitas, como *Halosarcia pergranulata* (Short y Colmer, 1999), *Suaeda fruticosa* (Khan *et al.*, 2000) y *Sarcocornia fruticosa*

(Redondo-Gómez *et al.*, 2006) también presentan valores óptimos de crecimiento bajo salinidades moderadas y altas.

El movimiento de las sales hacia el interior de las raíces y hacia las estructuras aéreas es el resultado del flujo de transpiración requerido para mantener el estado hídrico de la planta (Yeo, 1998). El cierre estomático es una respuesta inmediata a la salinidad que mitiga, en parte, el flujo de iones hacia las estructuras aéreas de la planta (Hasegawa *et al.*, 2000). Nuestros resultados mostraron ciertos efectos de la salinidad sobre las tasas de conductancia estomática ( $G_s$ ) y fotosíntesis neta ( $A$ ). Sin embargo, la concentración de  $CO_2$  intercelular ( $C_i$ ) no estuvo afectada negativamente por el cierre estomático, observándose una tendencia de incremento en los valores de este parámetro. Centritto *et al.* (2003) observaron que el estrés salino afecta tanto a la conductancia estomática como a la conductancia del mesófilo, por lo tanto, la acumulación de  $CO_2$  en los espacios intercelulares podría indicar que la caída en la fotosíntesis podría haber sido causada por una limitación difusional de la fotosíntesis, más que por un efecto sobre la capacidad de carboxilación. Redondo *et al.* (2007) también registraron tendencias similares de los citados parámetros en plantas de *H. portulacoides* tras una semana de exposición a salinidades moderadas y altas.

Ha sido demostrado que algunas especies costeras, como *Myrica cerifera*, son capaces de sobrevivir a salinidades elevadas mediante el cierre gradual de los estomas, lo cual les permite sobrevivir durante los primeros días de exposición a la sal manteniendo niveles bajos de fotosíntesis (Naumann *et al.*, 2008). Debido a la continua demanda de carbono por parte de la planta, así como a la diferencia en el potencial hídrico entre la atmósfera y las células de las hojas, el cierre estomático se convierte en una estrategia insostenible a largo plazo frente a la salinidad, pudiendo causar la muerte de la planta (Hasegawa *et al.*, 2000). En nuestro estudio, las plantas de *H. portulacoides* establecidas a partir de esquejes

---

fueron capaces de sobrevivir, bajo concentraciones salinas muy elevadas (500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl), manteniendo tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> considerablemente bajas hasta el final del experimento. A pesar de mostrar valores bajos de intercambio gaseoso, las plantas sometidas a las concentraciones de 300 y 500 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl fueron capaces de desarrollar hojas sanas hasta el final del periodo de estudio.

El estrés salino incrementa la acumulación de NaCl en los cloroplastos de las plantas superiores, lo cual frecuentemente se relaciona con disminuciones en las actividades de transporte de electrones durante la fotosíntesis (Munns, 2002). En nuestro estudio, los valores de F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> registrados al amanecer no mostraron diferencias entre los diferentes tratamientos, con valores cercanos a los parámetros control para plantas no estresadas (Björkman y Demmig, 1987). Asimismo, la concentración de pigmentos fotosintéticos no fue afectada por el incremento de salinidad en el medio. Estos resultados indican que las plantas de *H. portulacoides* desarrolladas a partir de esquejes, no experimentan efectos adversos en el aparato fotosintético estando sometidos a un amplio rango de salinidades. Redondo-Gómez *et al.* (2007) obtuvieron resultados similares en individuos adultos de *H. portulacoides* bajo salinidades que oscilaron entre 20 y 700 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl.

## CONCLUSIONES

Los esquejes de *Halimione portulacoides* son capaces de enraizar y crecer bajo un amplio rango de salinidades, mostrando tasas de establecimiento por encima del 50% incluso estando sometidos a concentraciones hipersalinas. Estos resultados reflejan la gran variedad de hábitats, con concentraciones salinas altamente variables, en los que esta especie es capaz de desarrollarse. Las plantas obtenidas a partir de esquejes presentan valores óptimos de crecimiento bajo concentraciones salinas de hasta 300 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl, mientras que las concentraciones superiores a esta causan una disminución en el crecimiento que parece estar relacionada con reducciones del intercambio gaseoso no ligadas a daños estructurales en el aparato fotosintético.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Björkman, O., Demmig, B. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**, 489-504.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Öquist, G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C. y Long, S.P. (Eds.) *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. 193-206. *Chapman & Hall*, London.
- Carvalho L.M., Caçador I., Martins-Loução M.A. 2001. Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza* **11**, 303-309.
- Greenway, H., Munns, R. 1980. Mechanism of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**, 149-190.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity, *Annual Review of Plant Physiology* **51**, 463-499.
- Hoagland, D., Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circulation* **347**, 1-39.
- Inan G., Zhang Q., Li P., Wang Z., Cao Z., Zhang H., Zhang C., Quist T.M., Goodwin S.M., Zhu J., Shi H., Damsz B., Charbaji T., Gong Q., Ma S., Fredricksen M., Galbraith D.W., Jenks M.A., Rodees D., Hasegawa P.M., Bohnert H.J., Joly R.J., Bressan R.A., Zhu J.K. 2004. Salt stress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its

- applicability to molecular genetics analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiol* **135**, 1718-1737.
- Ishikawa, S.I., Kachi N. 2000. Differential salt tolerance of two *Artemisia* species growing in contrasting coastal habitats. *Ecological Research* **15**, 241-247.
- Jensen, A. 1985. On the ecophysiology of *Halimione portulacoides*. *Vegetatio* **61**, 231-240.
- Khan M.A., Ungar I.A., Showalter A.M. 2000. The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. *Journal of Arid Environments* **45**, 73-84.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659-668.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* **25**, 239-250.
- Naumann, J.C., Young, D.R., Anderson J.E. 2008. Leaf chlorophyll fluorescence, reflectance, and physiological response to freshwater and saltwater flooding in the evergreen shrub, *Myrica cerifera*. *Environmental and Experimental Botany* **63**, 402-409.
- Niu, G., Rodriguez, D.S. 2006. Relative salt tolerance of selected herbaceous perennials and groundcovers. *Scientia Horticulturae* **110**, 352-358.
- Ordiales-Plaza, R. 2000. 'Midebmp, V.4.2'. Estación Experimental de Zonas Áridas CSIC, Almería, España.
- Pearcy, R.W., Ustin S.L. 1984. Effects of salinity on growth and photosynthesis of three California tidal marsh species. *Oecologia* **62**, 68-73.

- 
- Qiu, N., Lu Q., Lu C. 2003. Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophyll cycle in the salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica*. *New Phytologist* **159**, 479-486.
- Ranwell, D.S., 1972. Ecology of salt marshes and sand dunes. *Chapman & Hall*, London.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A.J., Fernández-Muñoz, F., Castellanos, E., Luque, T., Figueroa, M.E. 2007. Growth and photosynthetic responses to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany* **100**, 555-563.
- Redondo-Gómez, S., Wharmby, C., Castillo, J.M., Mateos-Naranjo, E., Luque, C.J., de Cires, A., Luque, T., Davy, A.J., Figueroa, M.E. 2006. Growth and photosynthetic responses to salinity in an extreme halophyte, *Sarcocornia fruticosa*. *Physiologia Plantarum* **128**, 116-124.
- Short D.C., Colmer T.D. 1999. Salt tolerance in the halophyte *Halosarcia pergranulata* subsp. *pergranulata*. *Annals of Botany* **83**, 207-213.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* **10**, 51-62.
- Storey, R., Walker, R.R. 1999. Citrus and salinity. *Scientia Horticulturae* **78**, 39-81.
- Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**, 376-387.
- Wang L.W, Showalter A.M., Ungar I.A. 1997. Effect of salinity on growth, ion content, and cell wall chemistry in *Atriplex postrata* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany* **84**, 1247-1255.



- Willadino, L.G., Câmara, T.R. 2005. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. En: Nogueira, R.J.M.C., Araújo, E.L., Willadino, L.G., Cavalcante U.M.T. (Eds.) *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*, 118-126. UFRPE, Imprensa Universitária, Recife.
- Yahya, A. 1998. Salinity effects on growth and on uptake and distribution of sodium and some essential mineral nutrients in sesame. *Journal of Plant Nutrition* **21**, 1439-1451.
- Zedler, J.B. 1990. Differential responses to salinity help explain the replacement of native *Juncus kraussii* by *Thypha orientalis* in Western Australian salt marshes. *Australian Journal of Ecology* **15**, 57-72.



# 5

*Tolerancia y acumulación de Zinc en esquejes  
de Halimione portulacoides (L.) Aellen*



## INTRODUCCIÓN

Los niveles de metales pesados se han incrementado en los últimos años como resultado de determinadas actividades antropogénicas, como el empleo de fungicidas y herbicidas o las actividades de fundiciones, refinerías e instalaciones petrolíferas (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Los principales problemas ecológicos derivados de la contaminación son la entrada de los metales pesados a la red trófica del ecosistema y la bioamplificación en los diferentes niveles tróficos (Luque *et al.*, 1999). La disponibilidad de metales pesados para las plantas puede estar afectada por diferentes factores, tales como el pH, el potencial redox, la textura del suelo y el contenido de arcilla y materia orgánica (Greger, 2004). A pesar de los graves efectos que puede causar el exceso de metales pesados, ciertas plantas han desarrollado tolerancia a estos contaminantes y son capaces de desarrollarse bajo elevadas concentraciones de metales. Estas plantas desarrollan diferentes mecanismos para protegerse de la asimilación de metales tóxicos, además de restringir el transporte de los mismos hacia los tejidos vegetales. Estos mecanismos incluyen la compartimentación sub-celular y el secuestro del metal por compuestos orgánicos, concentrando de manera efectiva el metal en el interior de los tejidos de las raíces (Ross y Kaye, 1994). Algunas de estas plantas tolerantes pueden ser utilizadas para descontaminar ambientes con altas concentraciones de metales pesados. Como ejemplos podemos citar *Typha domingensis* Pers. (Mufarrege *et al.*, 2014), *Atriplex halimus* (L.) (Mateos-Naranjo *et al.*, 2013), *Chlorophytum comosum* (Thunb.) Jacques (Wang *et al.*, 2012), *Smilax aspera* (L.) (Poschenrieder *et al.*, 2012), *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss (Cambrollé *et al.*, 2013) y *Triticum aestivum* (L.) (Chandra *et al.*, 2009), entre otras.

Las marismas, estuarios y zonas adyacentes son a menudo zonas expuestas a altas concentraciones de metales pesados debido a la elevada presión humana. Por ejemplo, el zinc es considerado un importante contaminante de origen

---

industrial del medio ambiente terrestre y acuático (Barak y Helmke, 1993), que se caracteriza por su gran movilidad y biodisponibilidad (Morillo *et al.*, 2004). El exceso de este metal puede tener efectos en la permeabilidad de las membranas celulares y en la síntesis de proteínas, y puede inducir desequilibrios en las concentraciones de nutrientes y causar efectos considerables en los procesos de fotosíntesis y respiración celular, dando todo ello lugar a alteraciones del crecimiento de las plantas (Van Assche y Clijsters, 1986; Chaney, 1993; Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

Diferentes estudios indican que hay una tolerancia innata a los metales pesados en las plantas costeras (McCabe *et al.*, 2001), la cual parece tener alguna relación con el funcionamiento biogeoquímico de la rizosfera (Otte *et al.*, 2004). Durante los últimos años diversos estudios han puesto de manifiesto la elevada tolerancia y capacidad de acumulación de ciertas especies de marisma. Entre estas plantas podemos encontrar algunas de las especies dominantes en los ecosistemas costeros, como *Halimione portulacoides*. Recientemente, Andrades *et al.* (2013) exploraron por primera vez la capacidad de esta especie para desarrollarse desde esquejes bajo elevadas concentraciones de metales pesados, poniendo en valor la posible aplicabilidad de los esquejes para la recuperación de suelos contaminados. La utilización de esquejes en fitorremediación puede tener importantes ventajas frente a la utilización de plantas adultas, sin embargo, ciertos aspectos determinantes para la utilización de esta metodología, como el conocimiento de los límites de fitotoxicidad de los esquejes y la capacidad de estos para desarrollar raíces bajo elevadas concentraciones de contaminantes, no han sido estudiados hasta el momento.

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la tolerancia a zinc en esquejes de diferentes tamaños de *H. portulacoides*. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- a) Realizar una aproximación a la determinación de los valores umbral de fitotoxicidad del Zn en esquejes de diferentes tamaños, analizando para ello el crecimiento de las plantas desarrolladas a partir de éstos, bajo una serie de tratamientos experimentales de zinc que variaron entre 0 y 130 mmol l<sup>-1</sup>.
- b) Evaluar los posibles efectos del Zn sobre el rendimiento fotosintético de plantas crecidas desde esquejes, centrándonos en la influencia de este elemento sobre el aparato fotosintético (Fotosistema II).
- c) Determinar el tamaño óptimo inicial de los esquejes de *H. portulacoides* para ser empleados en estrategias de fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal y tratamientos de estrés*

Los esquejes para el desarrollo de este estudio fueron obtenidos de las ramificaciones laterales de las plantas “madres” descritas en el capítulo 2 apartado material vegetal y tratamientos. Para testar el efecto de la longitud del esqueje, se realizaron cortes en las ramificaciones laterales a diferentes alturas para obtener los tipos de esquejes descritos en el capítulo 3: i) esquejes pequeños, 2N; ii) esquejes medianos, 4N; y iii) esquejes grandes, 6N. Posteriormente, los esquejes se plantaron en macetas con arena estéril a una profundidad de 3 cm.

Los esquejes de los diferentes tamaños se sometieron a los siguientes tratamientos de zinc: 0, 15, 50 y 130 mmol l<sup>-1</sup>. Se utilizó una bandeja por cada tratamiento de zinc y tamaño de esqueje, colocando 10 macetas por bandeja. Los tratamientos de zinc se prepararon combinando solución Hoagland al 20% y ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O a la concentración apropiada. El tratamiento control (0 mmol l<sup>-1</sup> de zinc) contuvo exactamente 0,002 mmol l<sup>-1</sup> de zinc, ya que la solución Hoagland contiene una pequeña cantidad de este elemento como micronutriente esencial. Las concentraciones de zinc se eligieron basándonos en estudios previos, con el objetivo de reflejar los rangos de concentraciones detectados por varios autores en diferentes estuarios contaminados con metales pesados al Sur de la Península Ibérica (Nelson y Lamothe, 1993; Sáinz y Ruiz, 2006; Reboreda y Caçador, 2007b; Cambrollé *et al.*, 2008), así como en experimentos previos para determinar los umbrales de fitotoxicidad en esquejes de *Halimione portulacoides* (Cambrollé *et al.*, 2012).

Al inicio del experimento se añadieron 3 litros de la solución correspondiente en cada una de las bandejas. Estas se colocaron durante 50 días en el invernadero de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad



de Sevilla, con una temperatura controlada de entre 21 y 25°C, una humedad relativa de entre 40 y 60% y luz natural (flujo mínimo y máximo de luz: 200 y 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , respectivamente). Durante el periodo experimental, los niveles de solución se monitorizaron y se completaron con solución Hoagland (sin  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  adicional), siempre que fue necesario, hasta los niveles marcados inicialmente, con el objetivo de evitar cambios en las concentraciones de zinc debidas a la evaporación del agua de la solución nutritiva. Además, la solución de cada uno de los tratamientos (incluyendo  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) se renovó cada dos semanas.

### ***Crecimiento***

Al inicio del experimento se tomaron 15 esquejes, que fueron secados en una estufa a 80°C durante 48 horas y pesados en una báscula de precisión para obtener el peso seco inicial. Una vez finalizado el experimento (tras 50 días de tratamiento), se recogieron todas las plantas de cada tratamiento, repitiendo la misma metodología para obtener el peso seco final.

La tasa relativa de crecimiento (RGR) de las plantas completas se calculó mediante la fórmula:

$$\text{RGR} = (\ln B_f - \ln B_i) * D^{-1} \quad (\text{g g}^{-1}\text{día}^{-1})$$

donde:  $B_f$ = biomasa final seca;  $B_i$ = biomasa inicial seca ;  $D$  = duración del experimento en días.

El área foliar se determinó a partir de la superficie proyectada mediante escaneo y digitalización de las hojas (V30 Epson, Seiko Epson Corp., Nagano, Japón), usando el software MideBMP (Ordiales-Plaza, 2000) para su

---

procesamiento y análisis. Asimismo, se realizó un conteo semanal del número de hojas vivas y se midió la longitud final de cada planta, midiendo desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más apical.

### ***Intercambio gaseoso***

Las medidas de intercambio gaseoso se realizaron en hojas completamente desarrolladas (n=10) tras 50 días de experimentación, en cada una de las diferentes concentraciones de Zn, utilizando un analizador de gases por infrarrojo (IRGA) en circuito abierto (LI-6400, LI-COR Inc., Neb., USA). Se midió la tasa de fotosíntesis neta (A) a una concentración de CO<sub>2</sub> de 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  y a 1000  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La iluminación se obtuvo de una lámpara de luz fotosintéticamente activa acoplada a la cámara de hojas del LI-6400. La temperatura de las hojas se mantuvo entre 20 y 25 °C, y la humedad relativa entre el 45 y 55 %. La tasa de fotosíntesis neta se calculó usando las fórmulas de Von Caemmerer y Farquhar (1981).

### ***Fluorescencia de la clorofila***

La fluorescencia de la clorofila se midió utilizando un fluorímetro portátil modulable (FMS-2, Hansatech Instrument Ltd., England) en hojas completamente desarrolladas (n=10), después de 50 días de experimentación, en cada una de las diferentes concentraciones de zinc. Los parámetros de adaptación a luz y oscuridad de la fluorescencia se midieron al amanecer (a una luz ambiental estable de 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para conocer los posibles efectos de las diferentes concentraciones de cobre sobre la sensibilidad de las plantas a la fotoinhibición.

Durante un periodo de 30 minutos las plantas se adaptaron a la oscuridad utilizando unas pinzas preparadas para este fin. El nivel mínimo de fluorescencia en condiciones de adaptación a la oscuridad ( $F_0$ ) se midió utilizando un pulso modulado ( $<0,05 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de  $1,8 \mu\text{s}$ ) demasiado pequeño para inducir cambios fisiológicos en la planta (Schreiber *et al.*, 1986). El dato almacenado fue un promedio obtenido durante un periodo de 1,6 segundos. La fluorescencia máxima en este estado ( $F_m$ ) se midió después de aplicarle a la hoja un pulso saturante de luz actínica de  $15000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante 0,7 segundos (Bolhàr-Nordenkampf y Öquist, 1993). El valor de  $F_m$  fue registrado como la mayor diferencia entre dos puntos consecutivos. Los valores de la fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_0$ ) y la eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) se calcularon a partir de los valores de  $F_0$  y  $F_m$ . Este cociente de las fluorescencias variable y máxima se correlaciona con el número de centros de reacción funcionales del fotosistema II y puede ser utilizado para cuantificar el nivel de fotoinhibición (Maxwell y Johnson, 2000).

#### ***Determinación de la concentración de zinc***

Al final del experimento se secaron muestras de hojas y raíces de *H. portulacoides* a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 horas, y se trituraron. Antes de realizar el análisis, las hojas y raíces se lavaron cuidadosamente con agua destilada. Posteriormente, 0,5 g de muestra, obtenidos de una mezcla de hojas o raíces de las plantas de cada tratamiento, se digirieron por triplicado con 6 ml de  $\text{HNO}_3$ , 0,5 ml de HF y 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las concentraciones de Zn en raíz y hojas se midieron mediante un espectrómetro de masas (ICP) (ARL-Fison 3410, USA).

---

### *Análisis estadístico*

Antes de iniciar los análisis, se comprobó que los datos fueran normales utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov, y homogéneos, mediante el test de Levene. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos factores. La evolución del número de hojas fue analizada mediante ANOVA para medidas repetidas. Con el objetivo de explorar las posibles correlaciones entre las diferentes variables, se realizaron análisis de correlación de Pearson y Spearman. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete informático SPSS v. 24.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA)

## RESULTADOS

### *Supervivencia*

Todos los esquejes medianos y grandes sobrevivieron durante los 50 días de experimento en los diferentes tratamientos testados. El 100% de los esquejes pequeños sobrevivió a concentraciones de hasta 50 mmol l<sup>-1</sup> de Zn, mientras que en el tratamiento de 130 mmol l<sup>-1</sup> se registró una supervivencia del 80%. En el tratamiento de Zn más elevado se observaron síntomas de clorosis y necrosis foliar, siendo estos efectos especialmente visibles en los esquejes pequeños.

### *Crecimiento*

Los esquejes de los distintos tamaños testados respondieron de manera diferente a los tratamientos de Zn, siendo significativos los efectos en la tasa relativa de crecimiento (RGR) el tamaño inicial del esqueje ( $F=6,759; p \leq 0,001$ ), la concentración externa de Zn ( $F=14,715; p \leq 0,001$ ) y la interacción tamaño/concentración ( $F=3,973; p \leq 0,001$ ). En los esquejes pequeños se registró una importante disminución de la RGR en el tratamiento de 130 mmol l<sup>-1</sup>, de aproximadamente un 53%, respecto al tratamiento control (Tabla 1), existiendo diferencias significativas entre dichos tratamientos (14,71,  $p \leq 0,001$ ). En esquejes medianos y grandes, las reducciones de RGR en el tratamiento de Zn más elevado fueron de aproximadamente el 19% y 20% respecto al tratamiento control, respectivamente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Porcentajes de reducción respecto al tratamiento control en la tasa relativa de crecimiento (RGR), peso seco total (PST), superficie foliar (SF) y longitud final del tallo (LF), en esquejes de *Halimione portulacoides*, de los diferentes tamaños testados, en respuesta a un rango de concentraciones externas de Zn durante 50 días.

	Tamaño	15 mmol l <sup>-1</sup> de Zn	50 mmol l <sup>-1</sup> de Zn	130 mmol l <sup>-1</sup> de Zn
% RGR	2N	1,86	10,45	53,20
	4N	7,93	6,79	18,61
	6N	3,77	14,96	19,85
% PST	2N	8,35	29,47	74,50
	4N	25,43	22,25	37,39
	6N	11,46	37,14	41,99
% SF	2N	16,72	28,77	74,22
	4N	29,57	23,26	35,36
	6N	15,58	43,11	47,87
% LF	2N	-11,86	9,68	62,45
	4N	-1,9	8,55	41,97
	6N	11,98	9,52	22,73

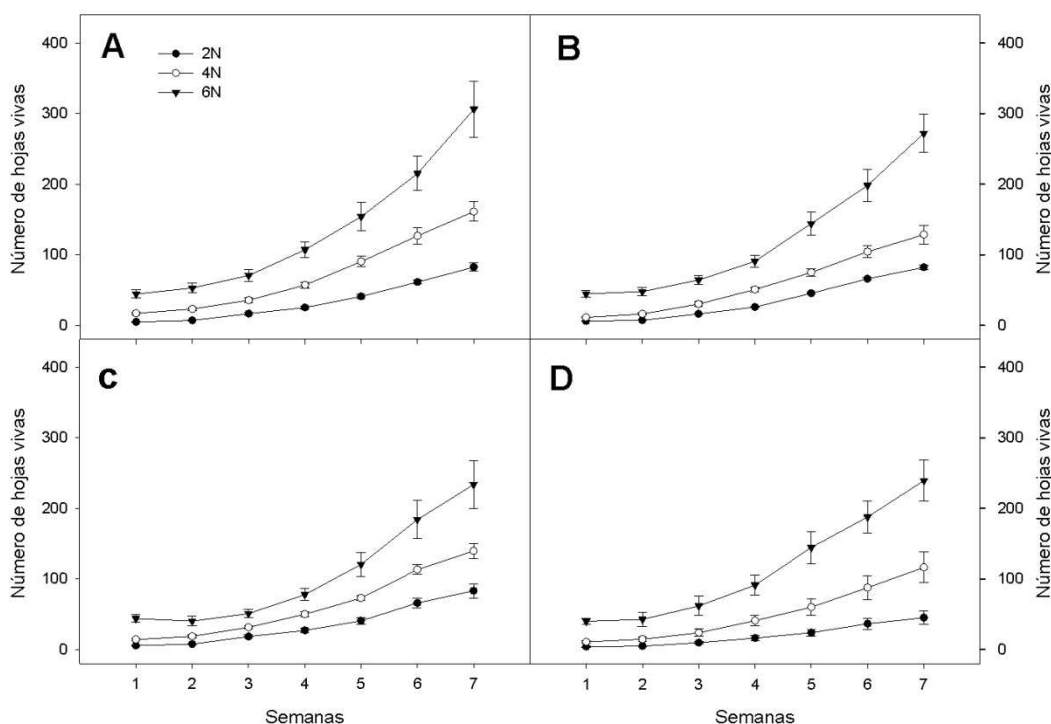
El incremento de la concentración externa de Zn afectó significativamente al peso seco total de las plantas de los diferentes tamaños testados ( $F = 52,63$ ;  $p \leq 0,001$ ). Los efectos adversos más pronunciados se detectaron en el tratamiento de 130 mmol l<sup>-1</sup> Zn, y fueron especialmente acusados en los esquejes pequeños, con una reducción respecto al tratamiento control de aproximadamente el 74% (Tabla 1). El peso seco total de las plantas procedentes de esquejes grandes fue significativamente mayor que el de las plantas procedentes de esquejes pequeños y medianos en el tratamiento de 15 mmol l<sup>-1</sup> Zn ( $F = 10,17$ ;  $p \leq 0,001$ ). En los tratamientos de 50 y 130 mmol l<sup>-1</sup> Zn, el peso seco total no mostró diferencias significativas entre esquejes medianos y grandes ( $p \geq 0,05$ ), detectándose valores significativamente más bajos en los esquejes pequeños ( $F = 6,29$ ;  $p \leq 0,001$ ).

La superficie foliar mostró una tendencia a disminuir con el incremento de la concentración de Zn en los tres tamaños de esqueje estudiados. Las reducciones de la superficie foliar en el tratamiento más elevado de Zn, respecto al tratamiento control, fueron del 74%, 35% y 48% en esquejes pequeños, medianos y grandes, respectivamente (Tabla 1).

En los tres tamaños de esqueje estudiados, la longitud final del tallo no mostró una tendencia clara respecto al incremento de la concentración externa de Zn hasta el tratamiento de 50 mmol l<sup>-1</sup>. En esquejes pequeños y medianos se detectó una caída considerable de la longitud del tallo en el tratamiento de 130 mmol l<sup>-1</sup> (aproximadamente un 62% y 42% de reducción respecto al control, en esquejes pequeños y medianos, respectivamente), siendo esta caída más suave en los esquejes grandes (23% de reducción respecto al control). En plantas procedentes de esquejes grandes no existieron diferencias significativas en la longitud final entre los diferentes tratamientos testados ( $p \geq 0,05$ ; Tabla 1).

### ***Evolución temporal del número de hojas***

En esquejes de los tres tamaños estudiados, se observó un incremento leve del número de hojas vivas durante las primeras semanas de experimento en todos los tratamientos. El incremento de la concentración externa de Zn afectó a la producción de hojas ( $F= 14,32$ ;  $p \leq 0,001$ , Figura 1B, D), siendo más acusado el efecto del metal en las plantas procedentes de esquejes pequeños, que mostraron incrementos especialmente leves en el tratamiento de 130 mmol l<sup>-1</sup> durante todo el periodo experimental (Figura 1D).



**Figura 1.** Evolución temporal del número de hojas vivas en esquejes de *Halimione portulacoides*, de los diferentes tamaños testados, en respuesta a un rango de concentraciones externas de Zn. 0 mmol l<sup>-1</sup> (A), 15 mmol l<sup>-1</sup> (B), 50 mmol l<sup>-1</sup> (C) y 130 mmol l<sup>-1</sup> (D). Se muestran valores medios ± error estándar.

### *Intercambio gaseoso y fluorescencia de la clorofila*

La tasa de fotosíntesis neta (A) no mostró diferencias significativas con el incremento de la concentración de Zn ( $p \geq 0,05$ , en todos los casos), con valores aproximados de  $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en las plantas procedentes de los tres tamaños de esquejes estudiados. En cuanto a las medidas de  $F_v/F_m$  realizadas al amanecer, se detectaron escasas variaciones en los diferentes tratamientos ( $p \geq 0,05$ , en todos los casos), con valores aproximados en torno a 0,83 en los esquejes de los tres tamaños testados (Tabla 2).



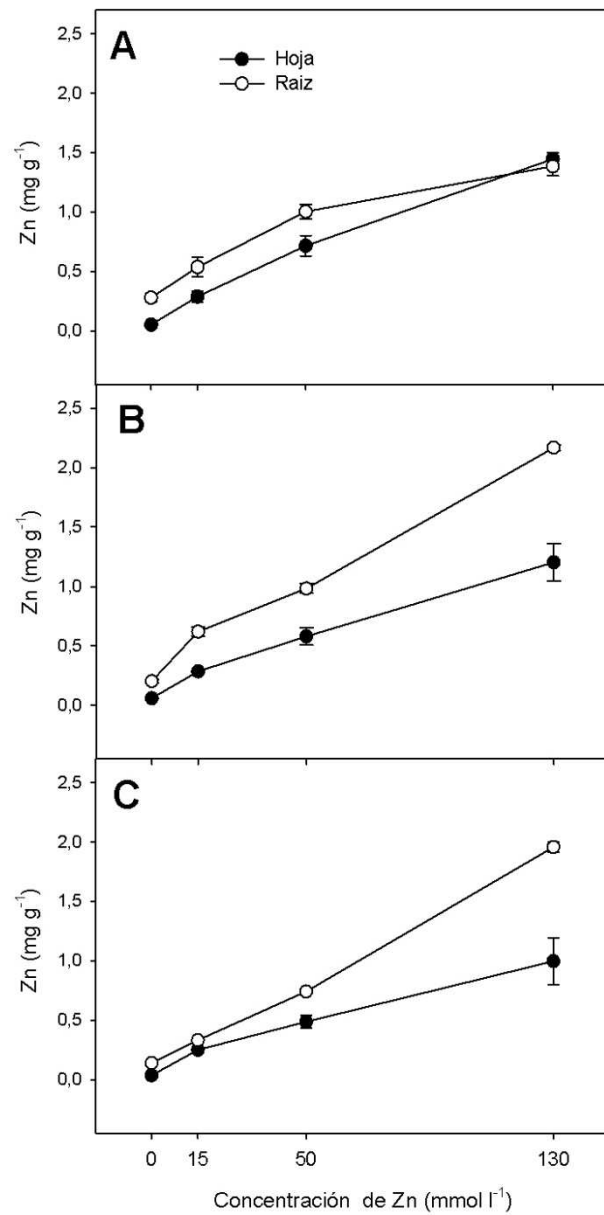
**Tabla 2.** Tasa de fotosíntesis neta, A (A) y eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II,  $F_v/F_m$  (B), en esquejes de *Halimione portulacoides*, de los diferentes tamaños testados, en respuesta a un rango de concentraciones externas de Zn durante 50 días. Se muestran valores medios  $\pm$  error estándar.

<b>Tasa de fotosíntesis neta (<math>\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}</math>)</b>			
	<b>2N</b>	<b>4N</b>	<b>6N</b>
<b>Control</b>	12,37 $\pm$ 0,69	12,13 $\pm$ 0,62	12,10 $\pm$ 0,31
<b>15 mmol l<sup>-1</sup> de Zn</b>	12,22 $\pm$ 0,25	11,83 $\pm$ 0,17	11,88 $\pm$ 0,83
<b>50 mmol l<sup>-1</sup> de Zn</b>	12,07 $\pm$ 0,57	12,07 $\pm$ 0,40	12,01 $\pm$ 0,49
<b>130 mmol l<sup>-1</sup> de Zn</b>	12,53 $\pm$ 0,33	12,32 $\pm$ 0,61	11,88 $\pm$ 0,43
<b>Eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II</b>			
	<b>2N</b>	<b>4N</b>	<b>6N</b>
<b>Control</b>	0,812 $\pm$ 0,008	0,824 $\pm$ 0,004	0,819 $\pm$ 0,004
<b>15 mmol l<sup>-1</sup> de Zn</b>	0,838 $\pm$ 0,006	0,829 $\pm$ 0,004	0,815 $\pm$ 0,005
<b>50 mmol l<sup>-1</sup> de Zn</b>	0,840 $\pm$ 0,006	0,834 $\pm$ 0,003	0,826 $\pm$ 0,008
<b>130 mmol l<sup>-1</sup> de Zn</b>	0,852 $\pm$ 0,002	0,844 $\pm$ 0,004	0,846 $\pm$ 0,003

### ***Determinación de la concentración de zinc***

Al final del experimento, la concentración de Zn en los tejidos vegetales estuvo correlacionada significativamente con el incremento de los niveles de Zn en el medio, en plantas procedentes de esquejes pequeños ( $r= 0,962$ ,  $p \leq 0,001$ ;  $r= 0,950$ ,  $p \leq 0,001$ ; en raíz y hojas, respectivamente), medianos ( $r= 0,972$ ,  $p \leq 0,001$ ;  $r= 0,970$ ,  $p \leq 0,001$ ; en raíz y hojas, respectivamente), y grandes ( $r= 0,972$ ,  $p \leq 0,001$ ;  $r=0,972$ ,  $p \leq 0,001$ ; en raíz y hojas, respectivamente) (Figura 2A, C). En las plantas procedentes de esquejes medianos y grandes, la concentración de Zn fue mayor en raíces que en hojas en todos los tratamientos testados (Figura 2B, C). En el caso de las plantas procedentes de esquejes pequeños, la concentración de Zn en raíces fue mayor que en hojas hasta el tratamiento de 50 mmol l<sup>-1</sup> Zn, sin embargo, en el tratamiento de Zn más elevado se registraron

concentraciones ligeramente superiores en los tejidos foliares respecto a las concentraciones obtenidas en raíces (Figura 2A).



**Figura 2.** Concentraciones totales de Zn en hojas (●) y raíces (○) de *Halimione portulacoides* en respuesta a diferentes concentraciones de Zn tras 50 días de tratamiento, en plantas procedentes de esquejes pequeños (A), medianos (B) y grandes (C). Se muestran valores medios  $\pm$  error estándar.

## DISCUSIÓN

Los umbrales de toxicidad en plantas son muy difíciles de determinar debido a las complejas interacciones entre el metal y otros elementos, así como a otros factores biológicos y físicos (Foy *et al.*, 1978). Sin embargo, nuestro estudio aporta información suficiente para realizar una aproximación a la determinación de los niveles umbral de fitotoxicidad del Zn en esquejes de la especie de estudio. Los esquejes de *Halimione portulacoides* mostraron una gran tolerancia al estrés por Zn. La concentración letal (LC50, la concentración de metal en el sustrato que causa la muerte del 50% de las plantas) estuvo por encima de  $130 \text{ mmol l}^{-1}$  de Zn, ya que todos los esquejes medianos y grandes sobrevivieron durante los 50 días de experimento y tan solo se detectó un 20% de mortalidad en los esquejes de tamaño pequeño. Cambrollé *et al.* (2012) obtuvieron resultados similares en cuanto a la supervivencia de esta especie en plantas de aproximadamente 4 meses. Los resultados de nuestro estudio indican que la especie de estudio es capaz de sobrevivir y establecerse a partir de esquejes en medios con concentraciones muy elevadas de Zn.

La inhibición del crecimiento y la reducción de la biomasa son respuestas generales al exceso de Zn en las plantas superiores (Kochian, 1993; Vaillant *et al.*, 2005). En esquejes de los tres tamaños testados, sometidos a concentraciones de hasta  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  de Zn, la reducción de la tasa relativa de crecimiento (RGR) respecto al tratamiento control estuvo por debajo del 15%. Es más, en esquejes medianos y grandes sometidos a la concentración de Zn más elevada, la reducción de RGR respecto al tratamiento control estuvo ligeramente por debajo del 20%, mientras que los esquejes de tamaño pequeño fueron los que experimentaron una reducción más acusada del crecimiento. De la misma forma, la longitud del tallo y la superficie foliar experimentaron las caídas más acusadas en plantas procedentes de esquejes pequeños, siendo más adversos los efectos de la concentración de Zn más elevada.

---

La concentración efectiva (EC50) se puede definir como la concentración de metal en el medio que causa una reducción del 50% de la biomasa de las plantas (Paschke *et al.*, 2000). Paschke *et al.* (2006) detectaron valores de EC50 de entre 1,2 y 3,4 mmol l<sup>-1</sup> de Zn para varias especies herbáceas usadas en actividades de restauración de zonas contaminadas. En el caso de las plantas procedentes de esquejes medianos y grandes de *H. portulacoides*, los valores de EC50 estuvieron por encima de 130 mmol l<sup>-1</sup> de Zn, ya que en dicho tratamiento *H. portulacoides* experimentó una reducción del peso seco final de aproximadamente el 40%. Sin embargo, en plantas procedentes de esquejes pequeños, los valores de EC50 estuvieron entre 50 y 130 mmol l<sup>-1</sup> de Zn. Los efectos del Zn registrados en el crecimiento de *H. portulacoides* son congruentes respecto a los obtenidos por Cambrollé *et al.* (2012), cuyo estudio reveló que esta especie experimenta efectos adversos en el crecimiento bajo concentraciones externas por encima de 70 mmol l<sup>-1</sup> de Zn. La integración de nuestros resultados indica que por debajo de un determinado tamaño inicial de esqueje, las plantas experimentan efectos más acusados en el crecimiento como consecuencia del exceso de Zn.

Durante las primeras semanas de experimentación, la producción de hojas fue más lenta que en las últimas semanas, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que las plantas realizaran una mayor inversión de recursos en el establecimiento y desarrollo del sistema radical durante la primera fase del estudio, en detrimento de la producción de biomasa fotosintética (como ha sido descrito en el capítulo 3). Los efectos causados por la concentración de 130 mmol l<sup>-1</sup> de Zn fueron visibles desde las primeras semanas de experimentación, en las que se detectaron síntomas de clorosis y necrosis foliar. El incremento temporal del número de hojas en los esquejes pequeños sometidos al tratamiento de Zn más elevado fue menor que en las plantas procedentes de esquejes medianos y grandes, con valores muy bajos durante los 50 días de experimentación. Considerando que algunos esquejes pequeños murieron en el tratamiento de 130

mmol l<sup>-1</sup> sin haber desarrollado un sistema radical, es probable que la escasa producción de biomasa fotosintética en estas plantas se deba a la incapacidad para establecer un sistema radical suficientemente desarrollado bajo tales concentraciones de Zn en el medio.

Estudios previos han demostrado que *H. portulacoides* acumula mayores concentraciones de metales en las raíces que en los tejidos aéreos (Reboredo, 1991; Cacador *et al.*, 2000; Reboredo y Cacador, 2007a), lo cual contribuye en gran medida a la gran tolerancia de esta especie a los metales pesados (Sousa *et al.*, 2008). En ese sentido, Cambrollé *et al.* (2012) observaron que *H. portulacoides* es capaz de limitar el transporte de Zn hacia las estructuras aéreas hasta una determinada concentración externa del metal, detectando concentraciones foliares de Zn por encima de las registradas en los tejidos radicales cuando la planta era sometida a concentraciones externas del metal por encima de 30 mmol l<sup>-1</sup>. En nuestro experimento, las plantas procedentes de esquejes medianos y grandes mostraron concentraciones de Zn mayores en las raíces que en las hojas en todos los tratamientos testados. Sin embargo, en las plantas procedentes de esquejes pequeños esta tendencia no se mantuvo bajo la concentración externa de Zn más elevada, en la que se detectaron concentraciones foliares ligeramente superiores a las existentes en las raíces. La integración de nuestros resultados indica que en las plantas procedentes de esquejes pequeños, sometidas a la concentración de 130 mmol l<sup>-1</sup> de Zn, el sistema radical no habría alcanzado el grado de desarrollo necesario para controlar suficientemente la translocación de Zn desde los tejidos radicales, dando lugar a concentraciones del metal excesivamente elevadas en los tejidos aéreos, que derivaron en un menor crecimiento de estas plantas.

La toxicidad por Zn inhibe el proceso fotosintético a diferentes niveles y a través de diferentes mecanismos (Van Assche y Clijsters, 1986; Chaney, 1993). En este aspecto, diferentes estudios han revelado los efectos de las elevadas

---

concentraciones de Zn sobre la cadena transportadora de electrones (p.e., Vaillant *et al.*, 2005; Di Baccio *et al.*, 2009). En nuestro experimento, los valores de eficiencia fotoquímica potencial del PSII (Fv/Fm) registrados al amanecer mostraron valores cercanos a los parámetros control para plantas no estresadas (Björkman y Demmig, 1987). Además, la tasa de fotosíntesis neta (A) en plantas procedentes de los tres tamaños de esqueje se mantuvo sin variaciones importantes en los diferentes tratamientos testados. Estos resultados indican que los esquejes de *H. portulacoides*, una vez establecidos, no experimentan daños severos en la función fotosintética, reforzando la idea de que el principal efecto del exceso de Zn en las plantas procedentes de esquejes fue la inhibición del crecimiento.

## CONCLUSIONES

Los esquejes de *Halimione portulacoides* pueden establecerse y desarrollar un sistema radical bajo concentraciones de hasta 130 mmol l<sup>-1</sup> de Zn (aproximadamente 9000 mg Kg<sup>-1</sup>). La plantación de esquejes excesivamente pequeños, en medios con concentraciones muy elevadas de Zn, puede derivar en la incapacidad de estos para establecer un sistema radical lo suficientemente desarrollado para evitar la translocación de excesivos niveles del metal hacia los tejidos aéreos, lo cual puede dar lugar a inhibiciones acusadas en el crecimiento de las plantas. En base a nuestros resultados, se puede afirmar que en suelos altamente contaminados, con concentraciones de Zn a partir de 50 mmol l<sup>-1</sup>, es recomendable la utilización de esquejes con al menos cuatro nudos desarrollados. La utilización de esquejes de *H. portulacoides* puede ser de gran utilidad para la restauración y descontaminación de suelos contaminados con Zn.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Figueroa, M.E., Mateos-Naranjo, E. 2013. Growth and survival of *Halimione portulacoides* stem cuttings in heavy metal contaminated soils. *Marine Pollution Bulletin* **75**, 28-32.
- Barak, P., Helmke, P.A. 1993. The chemistry of zinc. En: Robson, A.D. (Ed.) *Zinc in Soils and Plants*, 1-13. *Springer Netherlands*.
- Björkman, O., Demmig, B. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**, 489-504.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Öquist, G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C. y Long, S.P. (Eds.) *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*, 193-206. *Chapman & Hall*, London.
- Caçador, I., Vale, C., Catarino, F. 2000. Seasonal variation of Zn, Pb, Cu and Cd concentrations in the root-sediment system of *Spartina maritima* and *Halimione portulacoides* from Tagus estuary salt marshes. *Marine Environmental Research* **49**, 279-290.
- Cambrollé, J., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M.E. 2008. Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Marine Pollution Bulletin* **56**, 2037-2042.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M.E. 2012. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* **86**, 867-874.

- 
- Cambrollé, J. Mancilla-Leytón, J.M. Muñoz-Vallés, S. Figueroa-Luque, E. Luque, T. Figueroa, M.E. 2013. Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. *Environmental and Experimental Botany* **85**, 50-57.
- Chandra, R., Bharagava, R.N., Yadav, S., Mohan, D. 2009. Accumulation and distribution of toxic metals in wheat (*Triticum aestivum* L.) and Indian mustard (*Brassica campestris* L.) irrigated with distillery and tannery effluents. *Journal of Hazardous Materials* **162**, 1514-1521.
- Chaney, R.L., Ryan, J.A. 1994. Heavy metals and toxic organic pollutants in MSW-composts: research results on phytoavailability, bioavailability, fate, etc. Environmental Protection Agency, Cincinnati, United States.
- Di Baccio, D., Tognetti, R., Minocci, A., Sebastiani, L. 2009. Responses of the *Populus xeuramericana* clone I-214 to excess zinc: carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization. *Environmental and Experimental Botany* **67**, 153-163.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology* **29**, 511-566.
- Greger, M., 2004. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. En: Prasad, M.N.V. (Ed.), *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*, 1-27. Springer Science & Business Media.
- Hoagland, D., Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circulation* **347**, 1-39.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida; London.



- Kochian, L.V. 1993. Zinc absorption from hydroponic solution by plants roots. En: Robson, A.D. (Ed.), *Zinc in Soils and Plants. Developments in Plants and Soil Sciences*, 45-57. *Kluwer Academic Press*, New York.
- Luque, C.J., Castellanos, E.M., Castillo, J.M., González, M., González-Vilches, M.C., Figueroa, M.E. 1999. Metals in halophytes of a contaminated estuary (Odiel Saltmarshes, SW Spain). *Marine Pollution Bulletin* **38**, 49-51.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Perez-Martin, A. 2013. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **90**, 136-142.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659-668.
- McCabe, O.M., Baldwin, J.L., Otte, M.L. 2001. Metal tolerance in wetland plants? *Minerva Biotech* **13**, 141-149.
- Morillo, J., Usero, J., Gracia, I. 2004. Heavy metal distribution in marine sediments from the southwest coast of Spain. *Chemosphere* **55**, 431-442.
- Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Di Luca, G.A., Maine, M.A. 2014. Metal dynamics and tolerance of *Typha domingensis* exposed to high concentrations of Cr, Ni and Zn. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **105**, 90-96.
- Nelson, C.H., Lamothe, P.J. 1993. Heavy metal anomalies in the Tinto and Odiel River and estuary system, Spain. *Estuaries* **16**, 496-511.
- Ordiales-Plaza, R. 2000. 'Midebmp, V.4.2'. Estación Experimental de Zonas Áridas CSIC, Almería, España.
- Otte, M.L., Matthews, D.J., Jacob, D.L., Moran, B.M., Baker, A.J.M. 2004. Biogeochemistry of metals in the rhizosphere of wetland plants - an

- 
- explanation for “innate” metal tolerance? En: Wong, M.H. (Ed.), *Wetland ecosystems in Asia: function, usage and management* **1**, 87-94. *Developments in ecosystems*. Elsevier.
- Paschke, M.W., Redente, E.F., Levy, D.B. 2000. Zinc toxicity thresholds for important reclamation grass species of the western United States. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 2751-2756.
- Paschke, M.W., Perry, L.G., Redente, E.F. 2006. Zinc toxicity thresholds for reclamation forb species. *Water, Air, & Soil Pollution* **170**, 317-330.
- Poschenriedera, C., Lluganya, M., Lombinia, A., Dinellib, E., Bechc, J., Barceló, J. 2012. *Smilax aspera* L. an evergreen Mediterranean climber for phytoremediation. *Journal of Geochemical Exploration* **123**, 41-44.
- Reboreda, R., Caçador, I. 2007a. Halophyte vegetation influences in salt marsh retention capacity for heavy metals. *Environmental Pollution* **146**, 147-154.
- Reboreda, R. y Caçador, I., 2007b. Copper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Chemosphere* **69**, 1655-1661.
- Reboredo, F. 1991. Cu and Zn uptake by *Halimione portulacoides* (L.) Aellen. A long-term accumulation experiment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **46**, 442-449.
- Ross, S.M., Kaye, K.J. 1994. The meaning of metal toxicity in soil-plant system. En: Ross, S.M. (Ed.), *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*, 27-61. *John Wiley & Sons*, New York.
- Sáinz, A., Ruiz, F. 2006. Influence of the very polluted inputs of the Tinto–Odiel system on the adjacent littoral sediments of south-western Spain: a statistical approach. *Chemosphere* **62**, 1612-1622.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching

with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* **10**, 51-62.

Sousa, A.I., Caçador, I., Lillebo, A.I., Pardal, M.A. 2008. Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: intra- and extra-celular metal binding sites. *Chemosphere* **70**, 850-857.

Vaillant, N., Monnet, F., Hitmi, A., Sallanon, H., Coudret, A. 2005. Comparative study of responses in four *Datura* species to zinc stress. *Chemosphere* **59**, 1005-1013.

Van Assche, F.V., Clijsters, H. 1986. Inhibition of photosynthesis by treatment of *Phaseolus vulgaris* with toxic concentration of Zinc: effects on electron transport and photophosphorylation. *Physiologia Plantarum* **66**, 717-721.

Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**, 376-387.

Wang Y, Yan A, Dai J, Wang N, Wu D. 2012. Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in *Chlorophytum comosum*: a popular ornamental plant and potential Cd hyperaccumulator. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**, 929-37.



# 6

*Efectos del estrés por cobre en esquejes de  
Halimione portulacoides (L.) Aellen*



## INTRODUCCIÓN

El cobre es uno de los principales metales pesados contaminantes presentes en las marismas debido a la alta actividad minera de las regiones adyacentes, el procesamiento de metales, así como el uso de fertilizantes y fungicidas, entre otras causas (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Aunque el cobre es un micronutriente esencial para el crecimiento y metabolismo de las plantas, formando parte además de varias proteínas (algunas de ellas implicadas en la cadena transportadora de electrones, como la plastocianina y la citocromo oxidasa) (Barón *et al.*, 1995), a elevadas concentraciones es potencialmente tóxico para la mayoría de las plantas (Dewez *et al.*, 2005). El exceso de este elemento puede causar importantes alteraciones en los procesos fotosintéticos y respiratorios, además de alterar la permeabilidad de las membranas, la síntesis de proteínas y la estructura de la cromatina (Sandman y Böger, 1980; Van Assche y Clijsters, 1990; Fernandes y Henriques, 1991). El aparato fotosintético es especialmente susceptible a este catión, que puede inducir disminuciones en la actividad del PSII y reducciones en las tasas de transferencia de electrones (Fernandes y Henriques, 1991; Mallick y Mohn, 2003). A pesar de ello, ciertas plantas son capaces de crecer en suelos contaminados con Cu y acumular cantidades elevadas del mismo en sus tejidos sin experimentar efectos adversos (Ernst *et al.*, 2000; Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

Estudios recientes demuestran que *Halimione portulacoides* es capaz de desarrollarse en sedimentos con altas concentraciones de metales pesados. En el estuario común de los ríos Tinto y Odiel (SW España), una de las zonas más contaminadas por metales pesados del mundo, esta especie crece en sedimentos con concentraciones de hasta 3000 mg kg<sup>-1</sup> de Cu (Nelson y Lamothe, 1993; Sáinz y Ruiz, 2006; Cambrollé *et al.*, 2008). Además, varios estudios desarrollados en las marismas del estuario del Tajo (Lisboa, Portugal) han demostrado la capacidad de esta especie para tolerar y secuestrar altos niveles de

---

este metal (p.e. Caçador *et al.*, 2000). En un estudio reciente, Cambrollé *et al.* (2012), tras evaluar experimentalmente la respuesta fisiológica de *H. portulacoides* frente a elevados niveles de Cu, demostraron que esta especie es capaz de desarrollarse en suelos con concentraciones de hasta 1000 mg Cu l<sup>-1</sup> sin experimentar efectos fisiológicos adversos, poniendo en valor el potencial de *H. portulacoides* para la restauración de zonas contaminadas con cobre.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la tolerancia de esquejes de *H. portulacoides* frente a altas concentraciones de Cu. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- a) Realizar una aproximación a la determinación de los valores umbral de fitotoxicidad del Cu en esquejes de la especie de estudio, analizando para ello el crecimiento de las plantas, establecidas a partir de los mismo, bajo una serie de tratamientos experimentales de Cu que variaron entre 0 y 9 mmol l<sup>-1</sup>.
- b) Evaluar los posibles efectos del Cu sobre el rendimiento fotosintético de plantas desarrolladas a partir de esquejes, centrándonos en la influencia de este elemento sobre el intercambio gaseoso y el aparato fotosintético (Fotosistema II).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal y tratamientos de estrés*

Los esquejes para el desarrollo de este estudio fueron obtenidos de las ramificaciones laterales de las plantas “madres” descritas en el capítulo 2, apartado material vegetal y tratamientos. Los esquejes fueron representativos del tamaño mediano descrito en el capítulo 3 (4N). Posteriormente, los esquejes se plantaron en macetas con arena estéril a una profundidad de 3 cm.

Los esquejes se sometieron a los siguientes tratamientos de Cu: 0; 1,5; 4,5 y 9 mmol l<sup>-1</sup>. Las concentraciones de Cu se eligieron basándonos en estudios previos, con el objetivo de reflejar los rangos de concentraciones detectados por varios autores en diferentes estuarios contaminados con metales pesados al Sur de la Península Ibérica (p.e., Sáinz y Ruiz, 2006; Cambrollé *et al.*, 2008), así como en experimentos previos sobre la especie para determinar los umbrales de fitotoxicidad (Cambrollé *et al.*, 2012). Los tratamientos de Cu se prepararon combinando solución Hoagland al 20% y CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O a la concentración apropiada. El tratamiento control (0 mmol l<sup>-1</sup> de Cu) contuvo exactamente 0,0005 mmol l<sup>-1</sup> de Cu, ya que la solución Hoagland contiene una pequeña cantidad de este elemento como micronutriente esencial. Se utilizó una bandeja por cada tratamiento de Cu, colocando 10 macetas por bandeja.

Estas se colocaron en el invernadero de los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla, con una temperatura controlada de entre 21 y 25°C, una humedad relativa de entre 40 y 60% y luz natural (flujo mínimo y máximo de luz: 200 y 1000 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, respectivamente). Al inicio del experimento se añadieron 3 litros de la solución correspondiente en cada una de las bandejas. Durante el periodo experimental, los niveles de solución se monitorizaron y se completaron con solución Hoagland (sin CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O

---

adicional), siempre que fue necesario, hasta los niveles marcados inicialmente para evitar cambios en las concentraciones de Cu debidas a la evaporación del agua de la solución nutritiva. Además, la solución de cada uno de los tratamientos (incluyendo  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) se renovó cada dos semanas.

### ***Crecimiento***

Al inicio del experimento se tomaron 15 esquejes, que fueron secados en una estufa a 80°C durante 48 horas y pesados en una báscula de precisión para obtener el peso seco inicial. Una vez finalizado el experimento (tras 50 días de tratamiento), se recogieron todas las plantas de cada tratamiento, repitiendo la misma metodología para obtener el peso seco final.

La tasa relativa de crecimiento (RGR) de las plantas completas se calculó mediante la fórmula:

$$\text{RGR} = (\ln B_f - \ln B_i) * D^{-1} \quad (\text{g g}^{-1}\text{día}^{-1})$$

donde:  $B_f$ = biomasa final seca;  $B_i$ = biomasa inicial seca;  $D$  = duración del experimento en días.

Además, se realizó un conteo semanal del número de hojas vivas y se midió la longitud final de cada planta, midiendo desde la base del tallo hasta la punta de la hoja más apical. Asimismo, se determinó la superficie foliar a partir de la superficie proyectada mediante escaneo y digitalización de las hojas (V30 Epson, Seiko Epson Corp., Nagano, Japón), usando el software MideBMP (Ordiales-Plaza, 2000) para su procesamiento y análisis.

### ***Intercambio gaseoso***

Las medidas de intercambio gaseoso se realizaron en hojas completamente desarrolladas (n=10) tras 50 días de experimentación, en cada una de las diferentes concentraciones de Cu, utilizando un analizador de gases por infrarrojo (IRGA) en circuito abierto (LI-6400, LI-COR Inc., Neb., USA). Se midió la tasa de fotosíntesis neta (A) a una concentración de CO<sub>2</sub> de 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  y a 1000  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La iluminación se obtuvo de una lámpara de luz fotosintéticamente activa acoplada a la cámara de hojas del LI-6400. La temperatura de las hojas se mantuvo entre 20 y 25 °C, y la humedad relativa entre el 45 y 55 %. La tasa de fotosíntesis neta se calculó usando las fórmulas de Von Caemmerer y Farquhar (1981).

### ***Fluorescencia de la clorofila***

La fluorescencia de la clorofila se midió utilizando un fluorímetro portátil modulable (FMS-2, Hansatech Instrument Ltd., England) en hojas completamente desarrolladas (n=10), después de 50 días de experimentación, en cada una de las diferentes concentraciones de cobre. Los parámetros de adaptación a luz y oscuridad de la fluorescencia se midieron al amanecer (a una luz ambiental estable de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para conocer los posibles efectos de las diferentes concentraciones de cobre sobre la sensibilidad de las plantas a la fotoinhibición. Durante un periodo de 30 minutos las plantas se adaptaron a la oscuridad utilizando unas pinzas preparadas para este fin. El nivel mínimo de fluorescencia en condiciones de adaptación a la oscuridad ( $F_0$ ) se midió utilizando un pulso modulado ( $<0,05 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de 1,8  $\mu\text{s}$ ) demasiado pequeño para inducir cambios fisiológicos en la planta (Schreiber *et al.*, 1986). El dato almacenado fue un promedio obtenido durante un periodo de 1,6 segundos. La fluorescencia máxima en este estado ( $F_m$ ) se midió después de aplicarle a la hoja un pulso saturante de luz actínica de 15000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 0,7 segundos (Bolhàr-

---

Nordenkampf y Öquist, 1993). El valor de  $F_m$  fue registrado como la mayor diferencia entre dos puntos consecutivos. Los valores de la fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_0$ ) y la eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) se calcularon a partir de los valores de  $F_0$  y  $F_m$ . Este cociente de las fluorescencias variable y máxima se correlaciona con el número de centros de reacción funcionales del fotosistema II y puede ser utilizado para cuantificar el nivel de fotoinhibición (Maxwell y Johnson, 2000).

### ***Pigmentos fotosintéticos***

Al final del periodo experimental, se extrajeron los pigmentos fotosintéticos en hojas completamente desarrolladas de cada tratamiento ( $n=10$ ) tras 50 días de experimentación. Las medidas se realizaron a partir de muestras de 0,05 g de material fresco trituradas en un mortero con 10 ml de acetona al 80%. Se filtró el sobrenadante resultante y, posteriormente, se diluyó 1 ml del mismo en 2 ml de acetona para medir la absorbancia a tres longitudes de onda (470,0; 646,8 y 663,2 nm), utilizando para ello un espectrofotómetro Hitachi U-2001. Las concentraciones de clorofila *a* (Clf *a*) y clorofila *b* (Clf *b*) se obtuvieron aplicando la metodología de Lichtenthaler (1987).

### ***Análisis estadísticos***

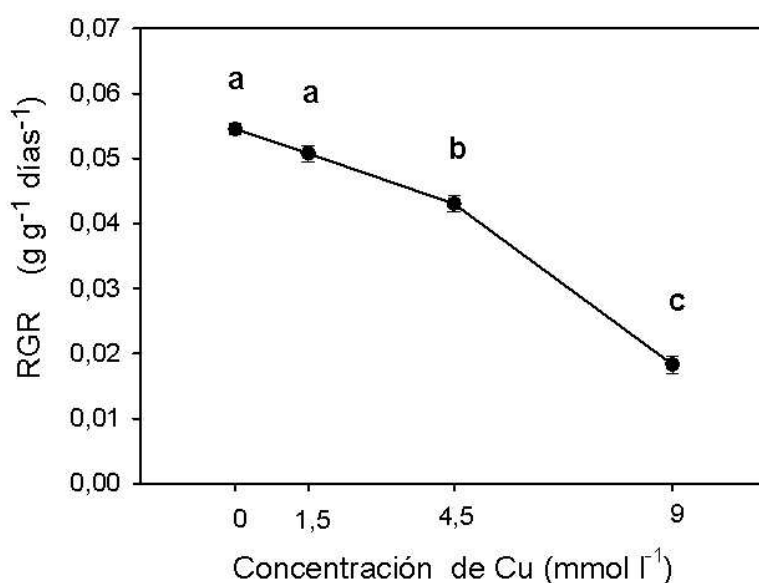
Antes de iniciar los análisis se comprobó la normalidad (Test de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad (Test de Levene) de los datos. La evolución de la superficie foliar fue analizada mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas. El modelo incluyó dos factores: tratamiento (concentración de Cu) y tiempo. El resto de variables fueron analizadas mediante ANOVA unifactorial. Las diferencias entre las medias se determinaron mediante el Test de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete informático IBM SPSS v. 24.0 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

## RESULTADOS

### *Crecimiento*

#### *Tasa relativa de crecimiento*

En todos los tratamientos sobrevivió el 100% de los esquejes plantados. La tasa relativa de crecimiento (RGR) de los esquejes de *Halimione portulacoides* disminuyó con el incremento de la concentración externa de Cu, aunque no existieron diferencias significativas entre los valores registrados en los tratamientos control y 1,5 mmol l<sup>-1</sup> ( $p \geq 0,05$ ). Comparado con el control, las reducciones de RGR registradas en los tratamientos de 4,5 y 9 mmol l<sup>-1</sup> fueron de aproximadamente el 20 y el 70%, respectivamente, existiendo diferencias significativas entre los valores registrados en dichos tratamientos y el tratamiento control ( $F=16, 28; p \leq 0,001$ , Figura 1).

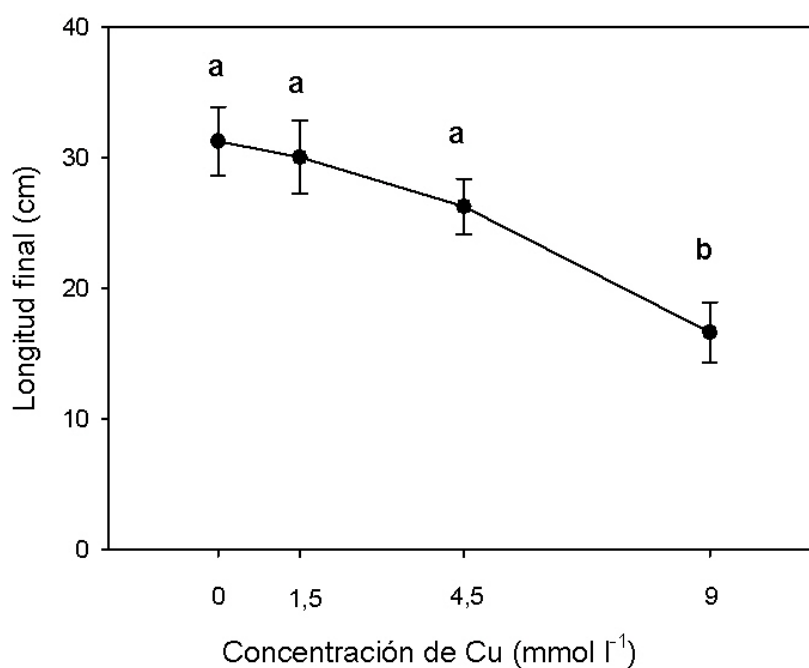


**Figura 1.** Tasa relativa de crecimiento en esquejes de *Halimione portulacoides* en respuesta a un rango de concentraciones externas de Cu durante un periodo de 50 días. Se muestran valores medios  $\pm$  error estadístico. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

---

### Longitud final

Se registró una tendencia leve de decrecimiento en la longitud final de las plantas desarrolladas a partir de los esquejes con el incremento de la concentración de Cu hasta el tratamiento de  $4,5 \text{ mmol}^{-1}$ , registrándose una caída acusada en el tratamiento de  $9 \text{ mmol}^{-1}$ . En los tratamientos de  $4,5$  y  $9 \text{ mmol}^{-1}$  de Cu la reducción fue de aproximadamente el 15 y 45% respecto al tratamiento control (Figura 2). Los valores registrados en el tratamiento más elevado de Cu fueron significativamente inferiores a los registrados en el resto de tratamientos ( $F= 71,81, p \leq 0,001$ ; Figura 2).



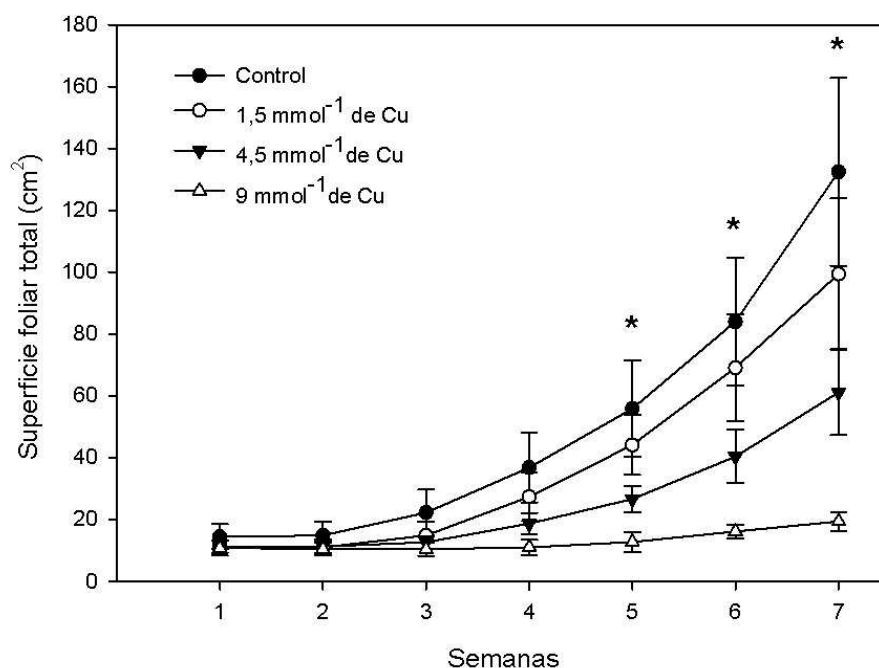
**Figura 2.** Longitud final del tallo en esquejes de *Halimione portulacoides* en respuesta a un rango de concentraciones externas de Cu durante un periodo de 50 días. Se muestran valores medios  $\pm$  error estadístico. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

### ***Evolución temporal de la superficie foliar***

En los tratamientos control y  $1,5 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu, la superficie foliar mostró un incremento acusado a partir de la tercera semana de experimentación, alcanzando los valores máximos al final del periodo experimental (aproximadamente  $140\text{-}160 \text{ cm}^2$ ). No se registraron diferencias significativas en la superficie foliar entre dichos tratamientos a lo largo de todo el experimento ( $p \geq 0,05$ ). En el tratamiento de  $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu también se registró un incremento en la superficie foliar a partir de la tercera semana de experimentación, alcanzándose valores similares a los registrados en el tratamiento de  $1,5 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu al final del experimento. La evolución temporal de la superficie foliar en los esquejes sometidos a  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu mostró una tendencia diferente a la registrada en el resto de tratamientos, no registrándose una tendencia de incremento hasta la quinta semana de experimentación. Los valores de superficie foliar final en el tratamiento de  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  fueron significativamente más bajos a los registrados en el resto de tratamientos ( $F=77,07$ ;  $p \leq 0,001$ ), con valores en torno a  $20 \text{ cm}^2$  (una reducción de aproximadamente el 85% respecto a los valores del tratamiento control) (Figura 3).

### ***Intercambio gaseoso***

La tasa de fotosíntesis neta (A) no mostró una tendencia clara con el aumento de Cu externo hasta la concentración de  $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ , pero disminuyó significativamente bajo la exposición a  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu en la solución nutritiva ( $F=55,44$ ;  $p \leq 0,001$ ), siendo esta reducción de aproximadamente el 60% respecto a los valores registrados en el tratamiento control (Tabla 1).



**Figura 3.** Superficie foliar total en esquejes de *Halimione portulacoides* en respuesta a un rango de concentraciones externas de Cu durante un periodo de 50 días. 0 mmol l<sup>-1</sup> (●), 1,5 mmol l<sup>-1</sup> (○), 4,5 mmol l<sup>-1</sup> (▼) y 9 mmol l<sup>-1</sup> (Δ). Se muestran valores medios ± error estándar. \* Indica diferencias significativas entre los distintos tratamientos ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 1:** Tasa de fotosíntesis neta (A), eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II (Fv/Fm) y suma de concentración de clorofila a y clorofila b (Chl a+b) (B) en esquejes de *Halimione portulacoides* en respuesta a un rango de concentraciones externas de Cu durante un periodo de 50 días. Se muestran valores medios ± error estándar. En cada columna distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Tratamiento	A ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Fv/Fm	Clf a+b ( $\mu\text{g g}^{-1}$ pf)
Control	10,089 ± 0,135 a	0,861 ± 0,003 a	8,864 ± 0,625 a
1,5 mmol l <sup>-1</sup> de Cu	11,129 ± 0,635 a	0,860 ± 0,004 a	9,184 ± 0,714 a
4,5 mmol l <sup>-1</sup> de Cu	12,289 ± 0,519 a	0,852 ± 0,003 a	8,990 ± 0,646 a
9 mmol l <sup>-1</sup> de Cu	4,015 ± 0,392 b	0,516 ± 0,084 b	4,420 ± 0,716 b



***Fluorescencia de la clorofila y pigmentos fotosintéticos***

La eficiencia fotoquímica potencial del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) medida al amanecer mostró escasas variaciones en los diferentes tratamientos hasta la concentración de  $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$  con valores aproximados en torno a 0,85 (Tabla 1). Sin embargo, se registró una reducción acusada en el tratamiento de Cu más elevado (aproximadamente el 40% respecto al tratamiento control), existiendo diferencias significativas entre dichos valores y los registrados en el resto de tratamientos ( $F=16,40$ ;  $p \leq 0,01$ ). Los valores de concentración de pigmentos fotosintéticos mostraron una tendencia similar, con valores significativamente más bajos en el tratamiento de  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  ( $F=11,56$ ;  $p \leq 0,001$ ), siendo dicha reducción de aproximadamente un 50% respecto a los valores del tratamiento control.

---

## DISCUSIÓN

Los esquejes de *Halimione portulacoides* mostraron una alta tolerancia al cobre, ya que fueron capaces de sobrevivir y generar un sistema radical completamente desarrollado bajo concentraciones de hasta  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu. Paschke y Redente (2002) registraron valores de CL50 (concentración de metal que reduce la supervivencia de las plantas al 50%) en torno a  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu tras 60 días de tratamiento en un experimento realizado con plantas adultas de seis especies herbáceas usadas en actividades de restauración de zonas contaminadas. La inhibición del crecimiento y la reducción de la biomasa son respuestas generales al exceso de Cu en las plantas superiores (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Cambrollé *et al.* (2012) demostraron que las plantas adultas de *H. portulacoides* procedentes de semillas son capaces de desarrollarse bajo concentraciones de hasta  $15 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu sin experimentar disminuciones detectables en el crecimiento. En nuestro experimento, los esquejes se desarrollaron sin efectos drásticos de toxicidad por cobre, como inhibiciones acusadas del crecimiento o clorosis foliar, bajo concentraciones de cobre de hasta  $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ . Así, bajo dicha concentración, se registraron valores de tasa relativa de crecimiento (RGR) similares a los valores óptimos descritos por Redondo-Gómez *et al.* (2007) en la especie de estudio. En nuestro estudio, los esquejes sometidos a la concentración de Cu más elevada ( $9 \text{ mmol l}^{-1}$ ) experimentaron una reducción de la RGR de aproximadamente un 80% y una reducción de la longitud de aproximadamente un 45% respecto al tratamiento control. Nuestros resultados indican que la concentración efectiva (EC50; concentración de metal en el medio que causa una reducción del 50% de la biomasa de las plantas) en esquejes de *H. portulacoides* estuvo entre  $4,5$  y  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu.

Estudios previos demuestran que la raíz acumula mayores concentraciones de Cu que la biomasa aérea y que esta podría actuar como una barrera para la captación o transporte de este metal (Caçador *et al.*, 2000; Reboreda y Caçador,

2007; Cambrollé *et al.* 2012). Los esquejes invierten gran cantidad de energía para desarrollar un sistema radical adecuado y establecerse en el medio. Así, en nuestro estudio, los esquejes del tratamiento control y los sometidos a 1,5 y 4,5 mmol l<sup>-1</sup> de Cu prácticamente no produjeron biomasa foliar durante las tres primeras semanas de experimentación, periodo durante el cual los esquejes invertirían la mayor parte de la energía en desarrollar el sistema radical. Cabe destacar que los esquejes sometidos a 9 mmol l<sup>-1</sup> de Cu no mostraron incrementos detectables de la superficie foliar hasta el periodo final del experimento. Así, nuestros resultados indican que los esquejes sometidos a concentraciones superiores a 4,5 mmol l<sup>-1</sup> de Cu necesitaran más tiempo para crear un sistema radical lo suficientemente desarrollado como para tolerar altas concentraciones de este metal e invertir energía en el desarrollo de biomasa aérea. Considerando la importancia del sistema radical en los mecanismos de tolerancia de esta especie (Sousa *et al.*, 2008) y en base a los resultados de este estudio, se puede afirmar que las concentraciones superiores a 9 mmol l<sup>-1</sup> de Cu podrían frenar el desarrollo de las raíces, pudiendo llegar a bloquear el desarrollo de estas e impedir la supervivencia de los esquejes.

Los efectos del exceso de cobre sobre las funciones fisiológicas han sido estudiados intensamente, y está ampliamente reconocido que la toxicidad por cobre induce la inhibición de los procesos fotosintéticos (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Muchas interacciones complejas entre el Cu y otros elementos se observan en el medio radicular externo y también dentro de los tejidos vegetales (Kabata-Pendias y Pendias, 2001, Ke *et al.*, 2007). En nuestro estudio, el exceso de cobre causó un efecto acusado sobre la tasa de fotosíntesis neta (A) bajo concentraciones externas de 9 mmol l<sup>-1</sup> de Cu. Numerosos estudios han registrado un efecto directo del cobre sobre la cadena transportadora de electrones (Shioi *et al.*, 1978; Sandmann y Böger, 1980; Jegershöld *et al.*, 1995), mientras que otros autores han relacionado la caída de la tasa fotosintética con los efectos de diferentes metales pesados sobre la actividad de la RuBP-carboxilasa (Siedlecka

---

y Krupa, 2004; Cambrollé *et al.*, 2011, entre otros). En nuestro experimento, la eficiencia fotoquímica potencial del PSII ( $F_v/F_m$ ) estuvo afectada por las concentraciones externas de  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu, indicando que el exceso de este metal acrecentó los niveles de fotoinhibición inducidos por el estrés lumínico. Además, los valores de  $F_v/F_m$  registrados bajo dicha concentración permanecieron por debajo de los parámetros control para plantas no estresadas (Björkman y Demmig, 1987), indicando la existencia de una fotoinhibición crónica. Asimismo, la concentración de pigmentos fotosintéticos, que mostró valores similares a los registrados por otros autores en la especie de estudio hasta  $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu (Cambrollé *et al.*, 2012), disminuyó considerablemente bajo el efecto del tratamiento de  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu. El cobre en exceso causa degradación de la estructura interna del cloroplasto y disminuciones del contenido en pigmentos (Ciscato *et al.*, 1997, Ouzounidou, 1996). La integración de nuestros resultados indica que la caída de la tasa de fotosíntesis neta registrada en el tratamiento de  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  de Cu debe ser atribuida a los daños estructurales causados por el exceso de cobre en el aparato fotosintético.

## CONCLUSIONES

Los esquejes de *Halimione portulacoides* pueden tolerar niveles externos de Cu de hasta  $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$  sin sufrir efectos fisiológicos adversos, siendo capaces de desarrollar un sistema radical y sobrevivir con niveles de Cu externos de hasta  $9 \text{ mmol l}^{-1}$  (aprox.  $600 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ ). Sin embargo, dicha concentración causa un severo descenso en la función fotosintética, lo cual deriva en reducciones acusadas del crecimiento de las plantas. Bajo concentraciones de Cu hasta  $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$  (aprox.  $300 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ ), tras superar el periodo de implantación, las plantas son capaces de producir una gran cantidad de biomasa foliar, lo cual indica que, una vez implantadas en suelos altamente contaminados, se podrían retirar del sistema cantidades considerables de material vegetal rico en este metal

sin afectar a la supervivencia de la planta. Este estudio permite concluir que el uso de esquejes de *H. portulacoides* puede ser una herramienta valiosa y eficiente para la recuperación de ecosistemas costeros contaminados con cobre.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Barón, M., Arellano, J.B., Gorgé, L. 1995. Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiologia Plantarum* **94**, 174-180.
- Björkman, O., Demmig, B. 1987. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**, 489-504.
- Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Öquist, G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. En: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C. y Long, S.P. (Eds.) *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. 193-206. *Chapman & Hall*, London.
- Caçador, I., Vale, C., Catarino, F. 2000. Seasonal variation of Zn, Pb, Cu and Cd concentrations in the root-sediment system of *Spartina maritima* and *Halimione portulacoides* from Tagus estuary salt marshes. *Marine Environmental Research* **49**, 279-290.
- Cambrollé, J., Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M.E. 2008. Comparison of the role of two *Spartina* species in terms of phytostabilization and bioaccumulation of metals in the estuarine sediment. *Marine Pollution Bulletin* **56**, 2037-2042.
- Cambrollé, J., Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gomez, S., Luque, T., Figueroa, M.E., 2011. Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Crantz. *Environmental and Experimental Botany* **71**, 57-64.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M.E. 2012. Tolerance and accumulation of copper in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Marine Pollution Bulletin* **64**, 721-728.

- Ciscato, M., Valcke, R., Van Loven, K., Clijsters, H., Navari-Izzo, F. 1997. Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. *Physiologia Plantarum* **100**, 901- 908.
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., Popovic, R. 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic Toxicology* **74**, 150-159.
- Ernst, W.H.O., Nelissen, H.J.M., Ten Bookum, W.M. 2000. Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of a Zn and Cu resistant population of *Silene vulgaris* on polymetallic soils. *Environmental and Experimental Botany* **43**, 55-71.
- Fernandes, J.C., Henriques, F.S. 1991. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Botanical Review* **57**, 246-273.
- Hoagland, D., Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circulation* **347**, 1-39.
- Jegerschöld, C., Arellano, J.B., Schröder, W.P., Van Kan, P.J.M., Barón, M., Styring, S. 1995. Copper(II) inhibition of electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 12747-12754.
- Ke, W.S., Xiong, Z.T., Chen, S.J. y Chen, J.J. 2007. Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicus* populations from a copper mine and an uncontaminated field sites. *Environmental and Experimental Botany* **59**, 59-67.

- 
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants. *CRC Press*, Boca Raton, Florida; London
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Mallick, N., Mohn, F.H. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**, 64-69.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659-668.
- Nelson, C.H., Lamothe, P.J. 1993. Heavy metal anomalies in the Tinto and Odiel River and estuary system, Spain. *Estuaries* **16**, 496-511.
- Ordiales-Plaza, R. 2000. 'Midebmp, V.4.2'. Estación Experimental de Zonas Áridas CSIC, Almería, España.
- Ouzounidou, G. 1996. The use of photoacoustic spectroscopy in assessing leaf photosynthesis under copper stress: correlation of energy storage to photosystem II fluorescence parameters and redox change of P700. *Plant Science* **113**, 229-237.
- Paschke, M.W., Redente, E.F. 2002. Copper toxicity thresholds for important restoration grass species of the western United States. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 2692-2697.
- Reboreda, R., Caçador, I. 2007. Copper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Chemosphere* **69**, 1655-1661.
- Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A.J., Fernández-Muñoz, F., Castellanos, E., Luque, T., Figueroa, M.E. 2007. Growth and photosynthetic responses to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany* **100**, 555-563.



- Sáinz, A., Ruiz, F. 2006. Influence of the very polluted inputs of the Tinto–Odiel system on the adjacent littoral sediments of south-western Spain: a statistical approach. *Chemosphere* **62**, 1612-1622.
- Sandmann G., Böger, P. 1980. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiology* **66**, 797-800.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* **10**, 51-62.
- Shioi, Y., Tamai, H., Sasa, T. 1978. Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **19**, 203-209.
- Siedlecka, A., Krupa, Z. 2004. Rubisco activity maintenance in environmental stress condition –how many strategies. *Cellular and Molecular Biology Letters* **9**, 56-57.
- Sousa, A.I., Caçador, I., Lillebo, A.I., Pardal, M.A. 2008. Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: intra- and extra-celular metal binding sites. *Chemosphere* **70**, 850-857.
- Van Assche, F., Clijsters, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* **13**, 195-206.
- Von Caemmerer, S., Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**, 376-387.



# 7

## *Discusión general*



## DISCUSIÓN GENERAL

La utilización de esquejes con altas tasas de establecimiento en proyectos de restauración ecológica, en lugar de plantas crecidas en invernadero a partir de semillas, permite un ahorro de costes y tiempo (Wang *et al.*, 2016). En determinados ecosistemas, como los ecosistemas costeros, conseguir material vegetal suficiente para realizar proyectos de revegetación de gran envergadura utilizando la propagación a partir de semillas conlleva importantes dificultades, pues los organismos que habitan en ellos poseen elevados requerimientos para desarrollarse; por ejemplo, las especies costeras generalmente requieren determinadas condiciones ambientales para alcanzar altas tasas de germinación, y a menudo requieren determinados niveles de salinidad en el medio para alcanzar un cierto porte (Pomeroy y Wiegert, 2012). El uso de plantas con capacidad de propagación vegetativa permite eliminar tales problemas, ya que los esquejes pueden estar disponibles en cualquier momento del año en poblaciones naturales, sin limitaciones en cuanto a la disponibilidad de material (Huiskes, 1979; Woodhouse, 1982; Gomes Neto *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso de esquejes requiere de un conocimiento amplio sobre la biología de la especie a utilizar. Los resultados de la presente Tesis Doctoral profundizan en diferentes aspectos relacionados con el uso de esquejes de la especie *Halimione portulacoides*, una planta costera ampliamente distribuida con aplicaciones en fitorremediación, en proyectos de restauración de ecosistemas costeros degradados.

Para abordar con éxito proyectos de revegetación mediante técnicas de propagación vegetativa es necesario que los esquejes presenten tasas elevadas de implantación. En tal sentido, se deben considerar, entre otros factores, el estado fisiológico y fitosanitario de las plantas madre, el lugar de la planta de donde se obtienen los esquejes, el tamaño inicial de los mismos, así como el sistema de plantación a utilizar, ya que todo ello condicionará en gran medida el adecuado establecimiento y desarrollo de los esquejes (Hansen 1986; Burgess *et al.*, 1990;

---

Verwijst *et al.*, 2012, 2017). Los resultados de la presente Tesis Doctoral ponen de manifiesto una serie de características a tener en cuenta para maximizar las tasas de establecimiento y desarrollo de los esquejes de *H. portulacoides*.

En primer lugar, nuestros resultados indican que sería más adecuado obtener los esquejes de las ramificaciones laterales de la planta madre, ya que debido a su menor lignificación se favorecería el proceso de formación de raíces. Recientemente, Wang *et al.* (2016) exploraron la respuesta de crecimiento y la capacidad de acumulación de metales pesados en esquejes obtenidos en diferentes partes de la planta madre en tres especies de sauce (*Salix* sp.); los autores registraron un menor crecimiento y una mayor absorción de metales pesados en medios contaminados en los esquejes obtenidos de zonas apicales de las ramas de la planta madre, y concluyeron que a la hora de llevar a cabo proyectos de fitorremediación no solo es necesario elegir la especie, sino también la posición del corte para obtener los esquejes. En futuros estudios, sería interesante profundizar en la tolerancia y capacidad de acumulación de metales pesados de esquejes de *H. portulacoides* obtenidos de diferentes zonas de la planta madre.

En cuanto al tamaño inicial de los esquejes de *H. portulacoides*, en nuestro estudio se evaluó la supervivencia y desarrollo de tres tamaños diferentes, con un número variable de nudos, y por tanto diferentes valores iniciales de biomasa y longitud. Los resultados presentados muestran que los esquejes de tamaño intermedio (4N, con cuatro nudos desarrollados y una longitud aproximada de 10 cm), presentan una respuesta de crecimiento ligeramente superior al resto de tamaños evaluados. El hecho de que se haya registrado un mayor crecimiento en este tipo de esquejes podría deberse simplemente a que estos requieran menos tiempo para implantarse, comenzando antes la producción de biomasa aérea; este hecho podría tener importantes repercusiones a la hora de llevar a cabo plantaciones de esquejes en campo, pues las plantas son especialmente sensibles a cualquier tipo de perturbación externa durante el periodo de implantación,

durante el cual carecen de un sistema radical desarrollado (Taiz *et al.*, 2015). Asimismo, nuestros estudios sobre tolerancia a metales pesados son congruentes con lo anteriormente comentado. Los esquejes con menos de cuatro nudos desarrollados presentaron menores tasas de establecimiento en medios altamente contaminados en relación a los esquejes de mayor tamaño; además, estos no fueron capaces de establecer un sistema radical lo suficientemente desarrollado para evitar la translocación de excesivos niveles del metal hacia los tejidos aéreos, lo cual puede derivar en inhibiciones acusadas del crecimiento (Vaillant *et al.*, 2005; Cambrollé *et al.*, 2012).

En base a los resultados presentados en los capítulos 2 y 3, se puede afirmar que el sistema de plantación con enterramiento de yemas favorece el establecimiento de los esquejes de *H. portulacoides*, ya que implica la existencia de una zona de formación de raíces adventicias en el suelo. Los resultados de la presente Tesis Doctoral pusieron de manifiesto que los esquejes realizan una mayor inversión de recursos en el establecimiento y desarrollo del sistema radical durante las primeras semanas tras la plantación, en detrimento de la producción de biomasa fotosintética; en base a este estudio, en suelos no contaminados sin limitaciones del recurso hídrico, son necesarias entre dos y tres semanas para la formación de un sistema radical lo suficientemente desarrollado para que comience el desarrollo de la parte aérea.

*Halimione portulacoides* es capaz de desarrollarse en una amplia variedad de sustratos: con gran cantidad de guijarros, arenosos, limosos y arcillosos (Chapman, 1950). Uno de los principales interrogantes que surgen a la hora de plantear el uso de técnicas de propagación vegetativa en proyectos de revegetación es la capacidad de implantación de los esquejes en diferentes tipos de sustrato. Generalmente, los estudios sobre la temática ponen de manifiesto que se necesitan sustratos muy porosos y poco compactos para alcanzar altas tasas de implantación (Ramírez *et al.*, 2003; Gomes Neto *et al.*, 2006; Álvarez-Herrera *et*

---

*al.*, 2007; Sotomayor *et al.*, 2011; Cruz-Silva *et al.*, 2014), aunque un estudio reciente indica que *H. portulacoides* es capaz de establecerse en suelos de marisma con elevados porcentajes de limo y porcentajes de arena inferiores al 20% (Andrades-Moreno *et al.*, 2013). Los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral indican que la especie de estudio requiere elevados porcentajes de arena para alcanzar tasas elevadas de supervivencia. La aparente discrepancia de nuestros resultados con los presentados en el trabajo de Andrades-Moreno *et al.* (2013) podría estar relacionada con el procesamiento llevado a cabo en los sustratos utilizados en dicho estudio, que fueron secados, molidos, homogeneizados y posteriormente hidratados, antes de llevar a cabo la plantación de los esquejes de *H. portulacoides*. Tal procesamiento, que con gran probabilidad implicó variaciones considerables en la estructura, pH, salinidad y biota original del suelo, no fue realizado en los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral, con el objetivo de reproducir las condiciones naturales a las que estarían sometidos los esquejes en el ecosistema. Aunque en nuestro estudio los suelos experimentales con elevados porcentajes de limo y arcilla presentaron niveles de salinidad considerablemente superiores a los de los suelos arenosos, este factor no debió de ser el causante de la muerte de los esquejes, pues los resultados del estudio de tolerancia a la salinidad demostraron que los esquejes de *H. portulacoides* son capaces de enraizar bajo un amplio rango de concentraciones salinas (desde agua dulce hasta concentraciones hipersalinas; capítulo 4). Sería necesario profundizar en la capacidad de implantación de los esquejes en suelos con diferentes propiedades físico-químicas para determinar las causas específicas que impiden la supervivencia de los esquejes de *H. portulacoides* en suelos con bajos porcentajes de arena.

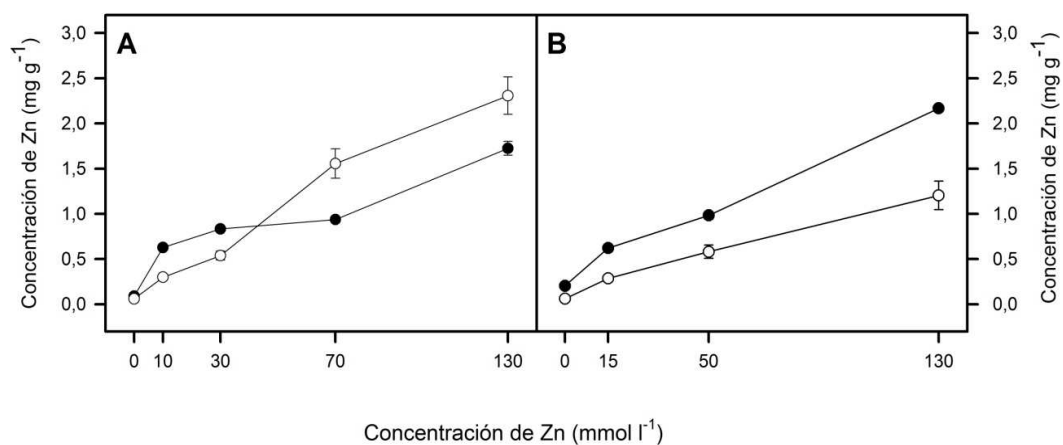
Durante los últimos años, diferentes estudios han puesto de manifiesto la capacidad de *H. portulacoides* para desarrollarse en suelos altamente contaminados por metales pesados, poniendo en valor la aplicabilidad de esta especie en técnicas de fitorremediación de suelos contaminados (p.e., Cambrollé



*et al.*, 2012, Anjum *et al.*, 2014). La gran capacidad de retención de metales pesados de las raíces de *H. portulacoides* es una de las características que contribuye en mayor medida a la elevada tolerancia de la especie a estos contaminantes (Caçador *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2008). Así, sería esperable que la plantación de esquejes en suelos altamente contaminados pudiera derivar en tasas muy bajas de implantación, debido a la ausencia de un sistema radical que minimice la asimilación de metales hacia los tejidos aéreos. Sin embargo, los esquejes de *H. portulacoides* presentaron tasas de establecimiento del 100% bajo concentraciones de hasta 130 mmol l<sup>-1</sup> de zinc y 9 mmol l<sup>-1</sup> de cobre (aproximadamente 9000 mg kg<sup>-1</sup> y 600 mg kg<sup>-1</sup> de Zn y Cu, respectivamente), concentraciones tóxicas, e incluso letales, para la mayoría de especies vegetales (Markert, 1992; Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Recientemente, Mancilla-Leytón *et al.* (2016) demostraron que los esquejes de *Atriplex halimus* son capaces de enraizar y crecer bajo concentraciones similares de Cu, aunque registraron caídas acusadas en la supervivencia y crecimiento de los esquejes sometidos a concentraciones superiores a 1,5 mmol l<sup>-1</sup>. Nuestros resultados permiten confirmar la aplicabilidad del uso de esquejes de *H. portulacoides* en proyectos de restauración y recuperación de suelos altamente contaminados por metales pesados.

Como se comentó anteriormente, la capacidad de retención de metales de las raíces de *H. portulacoides*, que evita (o minimiza) la translocación de estos contaminantes hacia los tejidos foliares, es una de las principales características que determinan la elevada tolerancia de la especie a los metales pesados (Reboredo, 1991; Caçador *et al.*, 2000; Reboredo y Cacador, 2007). En ese sentido, Cambrollé *et al.* (2012), en un estudio de tolerancia a Zn en plantas adultas de *H. portulacoides*, demostraron que esta especie es capaz de limitar eficientemente el transporte de Zn hacia las estructuras aéreas bajo concentraciones externas de hasta 30 mmol l<sup>-1</sup> de Zn; cuando dicha concentración externa era sobrepasada, los niveles de Zn foliares aumentaban

considerablemente como consecuencia de la incapacidad de las raíces para retener tales concentraciones del metal (Figura 1A), alcanzándose niveles tóxicos de Zn en los tejidos foliares que derivaron en una caída del crecimiento. Sin embargo, en nuestro estudio de tolerancia a Zn, las plantas de *H. portulacoides* desarrolladas a partir de esquejes fueron capaces de retener el Zn en las raíces (evitando la translocación de niveles excesivos del metal hacia las hojas) bajo concentraciones de hasta  $130 \text{ mmol l}^{-1}$  de Zn en el medio (Figura 1B). Esta comparativa abre un interrogante interesante, sobre la posibilidad de que las raíces desarrolladas en medios contaminados presenten determinadas diferencias a nivel fisiológico que puedan suponer una mayor tolerancia a los metales frente a plantas cuyas raíces se hayan desarrollado en medios no contaminados. En caso de confirmarse dicha hipótesis, el uso de esquejes en técnicas de fitorremediación no solo conferiría ventajas logísticas (en cuanto a costes y tiempo), sino también en cuanto a la eficiencia de las plantas en la recuperación de suelos contaminados.



**Figura 1.** Concentraciones totales de Zn en raíces (●) y hojas (○) de *Halimione portulacoides* en respuesta a concentraciones crecientes de Zn, en plantas crecidas en medios no contaminados (A) (adaptado de Cambrollé *et al.*, 2012), y en plantas procedentes de esquejes de tamaño intermedio (4N) sembrados directamente bajo las diferentes concentraciones experimentales del metal (B) (adaptado del capítulo 5). Los valores representan la media y el error estándar.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral suponen un avance en el conocimiento de la biología de *H. portulacoides* y demuestran el potencial del uso de técnicas de propagación vegetativa mediante esquejes como herramienta en proyectos de revegetación de ecosistemas costeros, así como en la recuperación de suelos altamente contaminados por metales pesados. Serían necesarios experimentos adicionales en condiciones naturales para corroborar la información obtenida en los diferentes estudios, así como para abordar los interrogantes planteados a lo largo de este capítulo.

---

## BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Herrera, J. G., Rodríguez, S. L., Chacón, E. 2007. Effect of different sizes of stem cuttings and substrates on the propagation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agronomía Colombiana* **25**, 224-230.

Andrades-Moreno, L., Cambrollé, J., Figueroa, M.E., Mateos-Naranjo, E. 2013. Growth and survival of *Halimione portulacoides* stem cuttings in heavy metal contaminated soils. *Marine Pollution Bulletin* **75**, 28-32.

Anjum, N.A., Israr, M., Duarte, A.C., Pereira, M.E., Ahmad, I. 2014. *Halimione portulacoides* (L.) physiological/biochemical characterization for its adaptive responses to environmental mercury exposure. *Environmental Research* **131**, 39-49.

Burgess, D., Hendrickson, Q., Roy, L. 1990. The importance of initial cutting size for improving the growth performance of *Salix alba* L. *Scandinavian Journal of Forest Research* **5**, 215-224.

Caçador, I., Vale, C., Catarino, F. 2000. Seasonal variation of Zn, Pb, Cu and Cd concentrations in the root-sediment system of *Spartina maritima* and *Halimione portulacoides* from Tagus estuary salt marshes. *Marine Environmental Research* **49**, 279-290.

Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J.M., Muñoz-Vallés, S., Luque, T., Figueroa, M.E. 2012. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* **86**, 867-874.

Chapman, V.J. 1950. *Halimione portulacoides* (L.) Aellen. *Journal of Ecology* **1**, 214-222.

Cruz-Silva, C.T.A., Marcon, A., Nobrega, L. 2015. Propagação vegetativa de insulina (*Cissus verticillata* (L.) Nicholson & CE Jarvis) via estaquia. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **17**, 171-174.

Gomes Neto, A., Cunha, S.R., Voigt, E.L. 2006. Vegetative propagation of the dune building plant *Ipomoea Pes-Caprae* for use in dune rehabilitation projects. *Journal of Coastal Research* **39**, 1251-1254.

Hansen J. 1986. Influence of cutting position and stemlength on rooting of leafbud cuttings of *Schefflera arboricola*. *Scientia Horticulturae-Amsterdam* **28**,177-186.

Huiskes, A.H.L. 1979. *Ammophila arenaria* (L.) Link (*Psamma arenaria* (L.) Roem. et Schult.; *Calamgrostis arenaria* (L.) Roth). *Journal of Ecology* **67**, 363-382.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 2001. Trace Elements in Soils and Plants. *CRC Press*, Boca Raton, Florida; London

Mancilla-Leytón, J. M., Navarro-Ramos, M. J., Muñoz-Vallés, S., Figueroa, M. E., Cambrollé, J. 2016. Evaluation of the potential of *Atriplex halimus* stem cuttings for phytoremediation of metal-polluted soils. *Ecological Engineering* **97**, 553-557.

Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659-668.

Pomeroy, L.R., Wiegert, R.G. (Eds.). 2012. *The ecology of a salt marsh*. *Springer Science & Business Media*.

Ramírez, L.A., González, E.P., Zuluaga, C.M., Marín, M.A., Morales, J.G., Núñez, C.E., Cotes, J.M. 2013. Uso de esquejes de tallo lateral para evaluar la resistencia de genotipos de *Solanum phureja* a *Spongospora subterranea* f. sp. subterranea. *Tropical Plant Pathology* **38**, 303-312.

Reboreda, R., Caçador, I. 2007. Copper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Chemosphere* **69**, 1655-1661.

---

Reboredo, F. 1991. Cu and Zn uptake by *Halimione portulacoides* (L.) Aellen. A long-term accumulation experiment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **46**, 442-449.

Sotomayor, E. L., Tolosa, M. R. E., Guerra, C. A. R. 2011. Propagation of *Lisianthus* cv. Blue by cuttings in peat pots under mist, with different concentrations of  $\beta$ -indole butyric acid, in the Azapa Valley. *IDESIA* (Chile) **1**, 99-102.

Sousa, A.I., Caçador, I., Lillebo, A.I., Pardal, M.A. 2008. Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: intra- and extra-celular metal binding sites. *Chemosphere* **70**, 850-857.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. 2015. Plant physiology and development. *Sinauer Associates*, Incorporated.

Vaillant, N., Monnet, F., Hitmi, A., Sallanon, H., Coudret, A. 2005. Comparative study of responses in four *Datura* species to zinc stress. *Chemosphere* **59**, 1005-1013.

Verwijst T, Lundkvist A, Edelfeldt S, Forkman J, Nordh NE. 2012. Effects of clone and cutting traits on shoot emergence and early growth of willow. *Biomass Bioenerg* 37:257-264.

Verwijst, T., Tavaziva, V. J., & Lundkvist, A. (2017). Effects of selective cutting and herbicide use in spring barley on seed production of *Cirsium arvense*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, 1-9.

Wang W., Wu Y., Akbar S., Jia X., He Z., Tian X. 2016. Effect of heavy metals combined stress on growth and metals accumulation of three *Salix* species with different cutting position. *International Journal of Phytoremediation* **18**, 761-767.

Woodhouse, W.W. 1982. Coastal sand dunes of the U.S. En: Lewis, R.R. (Ed.) *Creation and Restoration of Coastal Plant Communities*. 1-44. CRC press. Boca Raton, Florida.





# 8

## *Conclusiones*



Los resultados de la presente Tesis Doctoral confirman el uso de técnicas de propagación vegetativa mediante esquejes de *Halimium portulacoides* como una herramienta eficiente en proyectos de revegetación de ecosistemas costeros, así como en la recuperación de suelos altamente contaminados por metales pesados.

Las principales conclusiones que se pueden extraer de los resultados obtenidos son las siguientes:

1. El suelo arenoso es el más adecuado para el desarrollo de esquejes de *H. portulacoides* en comparación con los suelos areno-arcillosos y arcillosos.
2. El enterramiento de yemas en la plantación tiene un efecto positivo en la supervivencia, establecimiento y desarrollo de los esquejes.
3. Se requiere un periodo de entre dos y tres semanas para la formación de un sistema radical lo suficientemente desarrollado para que comience el desarrollo de la parte aérea.
4. El tamaño intermedio de esqueje, con cuatro nudos desarrollados y aproximadamente 10 cm de longitud, presenta una respuesta de crecimiento ligeramente superior al resto de tamaños estudiados.
5. Los esquejes de *H. portulacoides* son capaces de enraizar y crecer bajo un amplio rango de salinidades, mostrando tasas de establecimiento por encima del 50% incluso estando sometidos a concentraciones hipersalinas.

- 
6. Las plantas obtenidas a partir de esquejes presentan valores óptimos de crecimiento bajo concentraciones salinas de hasta 300 mmol l<sup>-1</sup> de NaCl, mientras que las concentraciones superiores a esta causan una disminución en el crecimiento, que parece estar relacionada con reducciones del intercambio gaseoso no ligadas a daños estructurales en el aparato fotosintético.
  7. Los esquejes de *H. portulacoides* pueden establecerse y desarrollar un sistema radical bajo concentraciones de hasta 130 mmol l<sup>-1</sup> de Zn.
  8. La plantación de esquejes de *H. portulacoides* excesivamente pequeños, en medios con concentraciones muy elevadas de Zn, puede derivar en la incapacidad de estos para establecer un sistema radical lo suficientemente desarrollado para evitar la translocación de excesivos niveles del metal hacia los tejidos aéreos, lo cual puede dar lugar a inhibiciones acusadas en el crecimiento de las plantas.
  9. En suelos altamente contaminados, con concentraciones a partir de 50 mmol l<sup>-1</sup> de Zn, es recomendable la utilización de esquejes de *H. portulacoides* con al menos cuatro nudos desarrollados.
  10. Los esquejes de *H. portulacoides* son capaces de desarrollar un sistema radical y sobrevivir con niveles de Cu externos de hasta 9 mmol l<sup>-1</sup>.
  11. Los esquejes de *H. portulacoides* pueden tolerar niveles externos de Cu de hasta 4,5 mmol l<sup>-1</sup> sin sufrir efectos fisiológicos adversos. Concentraciones superiores a esta causan un severo descenso en la función fotosintética, lo cual deriva en reducciones acusadas del crecimiento de las plantas.

