



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL DE FI DE GRAU

VARIACIÓ DE L'ESTRÈS OXIDATIU AL LLARG DEL CICLE ANUAL EN ESPÈCIES DE SISTEMES DUNARS

Pere Miquel Mir Rosselló

Grau de Biologia

Facultat de Ciències

Any acadèmic 2020-21

VARIACIÓ DE L'ESTRÈS OXIDATIU AL LLARG DEL CICLE ANUAL EN ESPÈCIES DE SISTEMES DUNARS

Pere Miquel Mir Rosselló

Treball de Fi de Grau

Facultat de Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any acadèmic 2020-21

Paraules clau del treball:

Biomarcadors, catalasa, catena dunar, cicle anual, conductivitat, estrès oxidatiu, halòfits, MDA, ROS, salinitat

Nom del tutor del treball: Llorenç Gil Vives

Autoritz la Universitat a incloure aquest treball en el repositori institucional per consultar-lo en accés obert i difondre'l en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor/a		Tutor/a	
Sí	No	Sí	No
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Resum

Les plantes halòfitas completen el seu cicle vital en condicions d'elevada salinitat, la qual pot causar un desequilibri fisiològic en les plantes desembocant en estrès oxidatiu per la formació excessiva d'espècies reactives d'oxigen (ROS). La resposta enzimàtica és un dels mecanismes utilitzats per les plantes per combatre les ROS, que si superen aquesta defensa reaccionen amb diferents biomolècules causant dany oxidatiu. Treballs previs avaluen la resposta de diferents espècies a la salinitat en un moment puntual, però l'objectiu d'aquest treball és avaluar la variació de la resposta antioxidant d'espècies dels sistemes dunars al llarg del cicle anual. Se seleccionaren cinc espècies de diferents posicions de la catena dunar (*Elymus farctus*, *Ammophila arenaria*, *Crucianella maritima*, *Teucrium dunense* i *Helianthemum caput-felis*) en una localitat al Sud de Mallorca. De cada espècie es mostrejaren fulles de cinc/sis individus als moments d'inici de la floració, màxima sequera i creixement òptim, per mesurar-ne l'activitat catalasa i els nivells de malondialdehid (MDA) com a biomarcadors. L'activitat catalasa augmentà en el moment de màxima sequera respecte al de creixement òptim en *E. farctus* i *T. dunense*, però no varià significativament en *A. arenaria* ni *C. maritima*. Els nivells de MDA disminuïren al moment de floració en *E. farctus*, no variaren en *A. arenaria* ni *C. maritima*, i augmentaren en el moment de la floració i especialment en sequera en *T. dunense*. Les interferències en les lectures espectrofotomètriques de *H. caput-felis* n'impediren les mesures. Aquests resultats suggereixen que les dues poàcies es protegeixen en època reproductora, i després deixen morir la part aèria; l'elevada protecció enzimàtica al llarg de tot l'any a *C. maritima* la fa tolerant a la salinitat; *T. dunense* seria l'espècie menys tolerant, donat que la seva resposta enzimàtica no aconsegueix evitar el dany oxidatiu; i finalment, sembla que *H. caput-felis* es protegeix sintetitzant composts fenòlics.

Índex

Introducció.....	P. 1
Material i mètodes.....	P. 5
Resultats.....	P. 10
Discussió.....	P. 15
Conclusions.....	P. 21
Agraïments.....	P. 22
Referències bibliogràfiques.....	P. 23

Introducció

Es coneixen com plantes halòfitas aquelles que habiten de forma natural i completen el seu cicle vital en condicions d'elevada salinitat, això és, en concentracions de NaCl iguals o superiors a 200 mM (Flowers *et al.*, 1986; Flowers i Colmer, 2008). Aquests hàbitats poden ser litorals, com els sistemes dunars o els roquissars, que presenten una elevada salinitat per l'efecte del *spray* salí (Boyce, 1954) o de les mareas (Eleuterius i Eleuterius, 1979); salobrars, zones on es forma un gradient de concentració salina pel contacte entre l'aigua marina i la fluvial (Slater, 2016); o fins i tot a regions interiors sense influència marina, com els llacs interiors salins (Seaman *et al.*, 1991) o a sòls salins (Stanković *et al.*, 2015; Gil *et al.*, 2019). Elevades concentracions salines suposen un problema per a la supervivència i el creixement de la planta, degut a l'estrès hídric causat per la diferència de potencial osmòtic entre la cèl·lula vegetal i el medi, i la toxicitat causada per l'acumulació d'ions com Na⁺, Cl⁻ i K⁺ (Munns i Termaat, 1986). Així, els halòfits han desenvolupat diferents estratègies fisiològiques, morfològiques i fenològiques per adaptar-se als hàbitats altament salins (Ungar, 1991).

La salinitat causa estrès hídric i un desequilibri iònic en les plantes. Això provoca un augment en la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) per un desequilibri entre els agents oxidants i els antioxidants dins les cèl·lules (Sies, 1997; Bartosz, 1997; Hasegawa *et al.*, 2000). Les principals ROS són el peròxid d'hidrogen (H₂O₂), el radical superòxid (O₂^{•-}) i el radical hidroxil (•OH). Concentracions excessives de ROS poden causar estrès oxidatiu, que es reflecteix en forma de dany cel·lular irreversible per la peroxidació de lípids i l'oxidació de proteïnes i DNA (Cross *et al.*, 1987). Per protegir-se de les ROS, les plantes presenten diferents mecanismes de protecció tant enzimàtics com no enzimàtics (Larson, 1988).

Pel que fa a la defensa enzimàtica, els enzims més coneguts són la superòxid dismutasa (SOD) i la catalasa, que catalitzen la detoxificació en cadena del radical O₂^{•-} (Inzé i Van Montagu, 1995; Mhadhbi *et al.*, 2004). La SOD fa reaccionar dues molècules d'O₂^{•-} amb dos protons (H⁺), donant lloc a una molècula de H₂O₂ i una d'O₂ (McCord i Fridovich, 1969). Seguidament, la catalasa utilitza dues molècules de H₂O₂ per formar dues de H₂O i una d'O₂ (Loew, 1901). El metabolisme del glutatió també està implicat en la defensa enfront les ROS (Noctor *et al.*, 2012). El glutatió presenta una forma reduïda amb un grup tiol (GSH) i una oxidada formant ponts disulfur

(GSSG). La glutatió peroxidasa (GPx) oxida el GSH en presència de ROS, donant lloc a GSSG i derivats de les ROS menys reactius. Llavors la glutatió reductasa (GRd) recicla el GSSG reduint-lo de nou per un mecanisme dependent de NADPH. Implicat en el metabolisme del glutatió també es troba l'enzim glutatió S-transferasa (GST), que catalitza la reacció del grup tiol del GSH amb substàncies electrofíliques.

Els halòfits també presenten diferents mecanismes no enzimàtics pels quals poden combatre els efectes negatius de la salinitat i les ROS. El mecanisme principal és l'absorció i compartimentació d'ions, conjuntament amb la síntesi de soluts compatibles, el que permet un ajust osmòtic dins la planta (Flowers i Colmer, 2008). A les plantes destaquen els composts fenòlics, els quals no només les protegeixen de l'excés de radiació, sinó que també actuen com antioxidants (Larson, 1988; Rubio-Moraga *et al.*, 2013; Castañeda-Arriaga *et al.*, 2018). Els composts fenòlics principals són els flavonoides i els tocoferols (derivats de la vitamina E). També actuen com antioxidants diferents alcaloides, carotenoides i vitamines (Larson, 1988).

Quan els diferents mecanismes de defensa de les plantes no basten per controlar les ROS, aquestes reaccionen amb les diferents biomolècules causant problemes en les cèl·lules. Un dels tipus de biomolècules més susceptibles a la reacció amb ROS són els àcids grassos insaturats. El malondialdehid (MDA) és el principal producte de la peroxidació de lípids, donant lloc a una disminució de la flexibilitat i la fluïdesa de la membrana cel·lular (Morales i Munné-Bosch, 2019). Les ROS també poden alterar la funcionalitat de proteïnes quan reaccionen amb els grups aromàtics i els grups tiol (Rinalducci *et al.*, 2008). Finalment, les ROS poden oxidar nucleòtids, modificant les bases nitrogenades, causant substitucions i fins i tot ruptures en les cadenes de DNA (Mancini *et al.*, 2006). Les diferents biomolècules de defensa enfront les ROS (com la catalasa), així com els productes de la reacció de les ROS amb diferents biomolècules (com el MDA), es poden utilitzar com biomarcadors de l'estrès oxidatiu causat per la salinitat en plantes (Gil *et al.*, 2019, Gil *et al.*, 2020).

A les Illes Balears, la major part dels halòfits es distribueixen al llarg dels sistemes litorals: dunes, roquissars i salobrars (Llorens *et al.*, 2007). Parlant concretament dels sistemes dunars, com el de l'àrea de Sa Ràpita (localització on es va dur a terme l'estudi), aquests presenten una geomorfologia condicionada principalment per l'acció del vent i per la vegetació que hi habita (Müller-Hohenstein,

1992; Gil, 1994). El vent i les onades arrossegueu partícules d'arena des de la mar, que es van acumulant a la costa originant formes de relleu conegudes com dunes, les quals formen cordons paral·lels a la línia de costa. Diferents factors ambientals (com la salinitat o la fixació del substrat) condicionen la distribució de les comunitats vegetals, les quals segueixen una zonació que varia des de la costa cap a l'interior formant una catena (Gil, 1994; Llorens *et al.*, 2007). Més detalladament, les diferents comunitats que componen la catena dunar de Sa Ràpita i que són d'interès en aquest treball són (Gil, 1994; Llorens *et al.*, 2007; Sanjaume i Gracia, 2011):

- 1) *Cypero mucronati-Agropyretum juncei* Kühnholtz ex Br.-Bl. 1933: és la comunitat pròpia de dunes embrionàries, que són les de la zona més propera a la mar (just després de la zona de platja). Aquestes són dunes molt exposades a l'acció del vent, de manera que és on hi ha un major moviment d'arena. La comunitat es compon per geòfits i hemicriptòfits, destacant poàcies com *Sporobolus pungens* (Shreber) Kunth o *Elymus farctus* (Viv.) Runemark ex Melderis.
- 2) *Medicagini marinae-Ammophiletum australis* Br.-Bl. 1921 corr. F. Prieto & T.E. Díaz 1991: aquesta comunitat ocupa les dunes blanques o mòbils. Pren importància la poàcia *Ammophila arenaria* (L.) Link, que ocupa cobertures destacables i li aporta una certa especialització a la duna. També comencen a aparèixer alguns camèfits com *Lotus cytisoides* L. i *Medicago marina* L.
- 3) *Loto cretici-Crucianelletum maritimae* Alcaraz, T.E. Díaz, Rivas-Martínez & P. Sánchez 1989: aquesta comunitat ocupa les dunes grises o semi-fixes, les quals s'han anat estabilitzant per la presència de vegetació. La composició de la comunitat varia en funció de l'estabilitat del substrat, de manera que a les zones més properes a les dunes mòbils predomina *Crucianella maritima* L., però a la zona més allunyada del litoral comencen a destacar altres camèfits com *Teucrium dunense* Sennen o *Helichrysum stoechas* (L.) Moench.
- 4) *Teucrio dunensis-Helianthemetum capitatis-felicis* Rivas-Martínez & Costa in Rivas-Martínez, Costa, P. Soriano, Pérez-Badía, Llorens & Roselló 1992: la catena dunar acaba a les dunes fixes, on l'estabilitat del substrat permet la formació de comunitats amb arbusts de major mida com *Cistus clusii* Dunal

o *Anthyllis cytisoides* L. En aquest treball cal destacar el camèfit de distribució microareal *Helianthemum caput-felis* Boiss.

En els darrers anys s'han anat publicant diversos treballs sobre la resposta fisiològica de diferents espècies vegetals enfront a l'estrès oxidatiu degut a la salinitat. Diferents exemples són *Cakile maritima* Scop. (Amor *et al.*, 2006), *Mesembryanthemum crystallinum* L. (Shevyakova *et al.*, 2006), *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. (Modarresi *et al.*, 2013), *Crithmum maritimum* L. (Gil *et al.*, 2019) i *Myriophyllum spicatum* L. (Gil *et al.*, 2020). Aquests estudis avaluen la resposta de les plantes en un moment puntual del seu cicle vital, però encara no s'ha estudiat com varia l'estrès oxidatiu al llarg del cicle anual d'una espècie d'hàbitats salins. En aquest treball se seleccionaren cinc espècies de la catena dunar del Sud de Mallorca, per fer-ne tres mostrejors en diferents moments de l'any. L'objectiu és avaluar l'evolució de diferents marcadors d'estrès oxidatiu al llarg de les diferents etapes del cicle anual d'aquestes espècies, i comparar aquesta resposta entre elles.

Material i mètodes

Àrea d'estudi i material vegetal

L'estudi es va dur a terme a un sistema dunar de Sa Ràpita, una localitat costanera al Sud de Mallorca (Illes Balears, Espanya). Concretament, es va dur realitzar a la quadrícula DD9656 (coordenades UTM, datum ETRS89). El clima de la zona és de tipus mediterrani, amb una època seca ($2T > P$) i càlida entre els mesos de Febrer i Setembre, tot i que la sequera s'accentua a partir de Maig, en l'època corresponent a l'estiu (Figura 1). Aquesta època de dèficit hídric tan llarga (8 mesos), juntament amb el pobre règim de pluges corresponent a l'època humida ($2T < P$), situa a Sa Ràpita com una de les zones més xèriques de Mallorca (Gil, 1994).

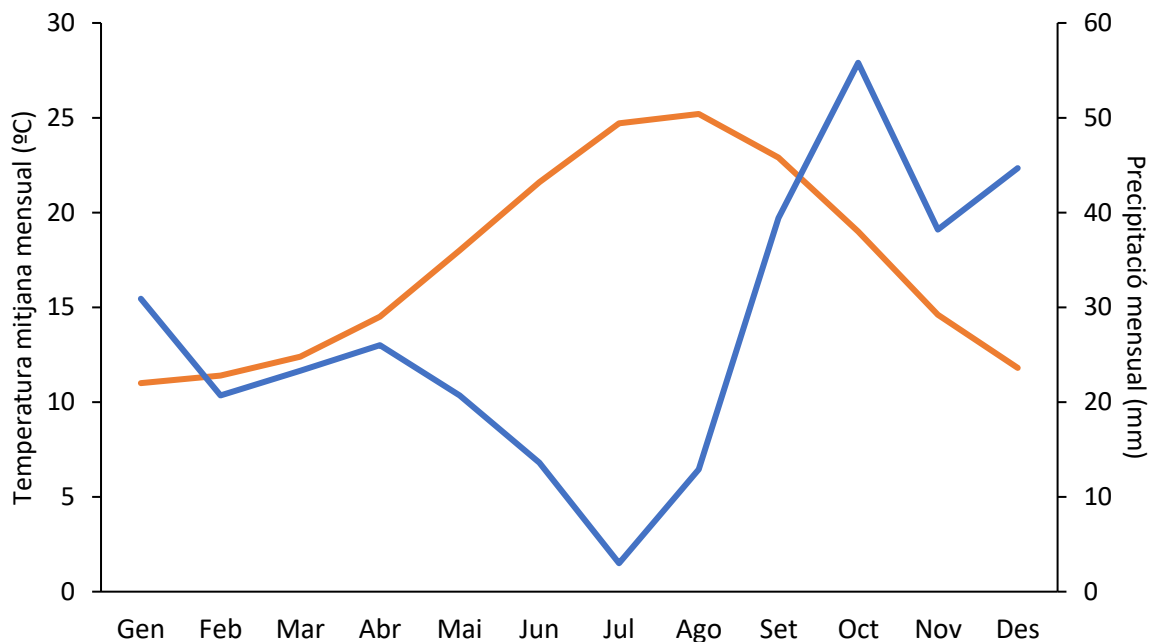


Figura 1. Dades climàtiques de la quadrícula DD9656 (coordenades UTM, datum ETRS89) corresponents a Sa Ràpita: taronja= temperatura mitjana mensual (°C); blau= precipitació mensual (mm). Font: Guijarro (1986).

Les mostres es recolliren a diferents localitzacions del sistema dunar de Sa Ràpita. Se seleccionaren cinc espècies pertanyents a diferents punts de la catena dunar. S'elegiren espècies que mantinguessin la part aèria al llarg de tot el cicle anual, per així poder fer els tres mostrejos d'interès. La Taula 1 inclou informació més detallada sobre les diferents espècies seleccionades.

De cada espècie es recolliren fulles de cinc/sis individus diferents, tres vegades entre Abril de 2020 i Gener de 2021 (Figura 2): 1) al moment de l'inici de la floració

(Taula 1); 2) al moment de màxima sequera (14/08/2020); 3) al moment de creixement òptim (14/01/2021). El segon mostreig es va fer després del mes amb precipitació mínima (Juliol). El tercer mostreig estava planejat fer-se en Novembre, però en ser mesos més secs de l'esperat, es va mostrejar el mes de Gener, després d'un període de pluges (Figura 2).

Taula 1. Espècies seleccionades per a l'avaluació de la variació de l'estrès oxidatiu al llarg de l'any. Per a cada tàxon s'indiquen el nom científic i la família a la qual pertanyen, la posició en la catena dunar, la localització de Sa Ràpita on es va mostrejar (coordenades UTM, datum ETRS89) i la data del primer mostreig (corresponent al moment de l'inici de la floració de cada espècie).

Espècie	Família	Posició	Localització	1ra mostra
<i>Elymus farctus</i>	Poaceae	Duna embrionària	496733E 4356875N	02/06/2020
<i>Ammophila arenaria</i>	Poaceae	Duna blanca	496599E 4356969N 496586E 4356966N 496593E 4356957N 496578E 4356960N	23/04/2020
<i>Crucianella maritima</i>	Rubiaceae	Duna grisa	496664E 4356875N	20/05/2020
<i>Teucrium dunense</i>	Lamiaceae	Duna grisa	496639E 4356922N	20/05/2020
<i>Helianthemum caput-felis</i>	Cistaceae	Duna fixa	496788E 4356902N	23/04/2020

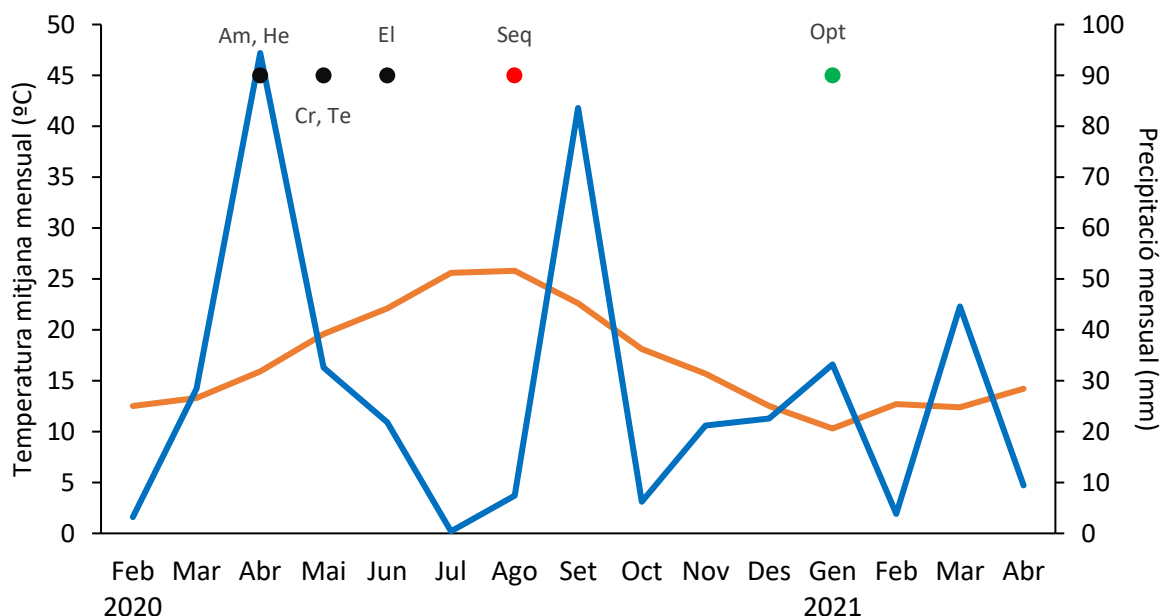


Figura 2. Dades climàtiques de Sa Ràpita entre Febrer de 2020 i Abril de 2021: taronja=temperatura mitjana mensual (°C); blau= precipitació mensual (mm). Els punts representen els diferents mostrejos: negre= floració (Am= *Ammophila arenaria*; Cr= *Crucianella maritima*; El= *Elymus farctus*; He= *Helianthemum caput-felis*; Te= *Teucrium dunense*); vermell= màxima sequera (Seq); verd= creixement òptim (Opt). Font: Balears Meteo, estació de Sa Ràpita (http://www.balearsmeteo.com/sa_rapita/wxindex.php).

Les mostres es guardaren dins bosses de plàstic en una gelera portàtil per posteriorment conservar-les a -20 °C fins al moment de realitzar els assajos bioquímics.

Conductivitat del sòl

Es va mostrejar sòl arenós al peu d'un individu de cada espècie seleccionada, cada una de les tres vegades que es va mostrejar. El sòl es va introduir dins tubs Corning de 50 ml de capacitat i es va guardar en una gelera portàtil. Posteriorment, els tubs es guardaren a 4 °C fins al moment de realitzar l'anàlisi de conductivitat.

Les mostres es varen dissoldre dins aigua destil·lada en una proporció 1:5 (pes/volum). Les dissolucions es mantingueren en agitació amb un agitador magnètic a 700 r.p.m. durant 2 h. Seguidament, es filtraren amb paper de filtre dins recipients de vidre durant 3 hores. Finalment, es va mesurar la conductivitat en $\mu\text{S}/\text{cm}$ amb un conductímetre XS Instruments COND 51+.

Activitat catalasa

Es pesaren 250 mg de cada mostra vegetal, i s'introduïren dins tubs de centrífuga de 2 ml de capacitat. A cada mostra es va afegir tampó Tris HCl 50 mM, 1 mM EDTA, pH 7,5 fins arribar a una proporció 1:5 (pes/volum). Seguidament les mostres s'homogeneïtzaren dins gel amb un homogeneïtzador IKA Ultra-Turrax®. Un cop homogeneïtzades, les mostres se centrifugaren a 10000 g i 4 °C durant 15 min. Un cop acabada la centrifugació, el sobrenedant es va passar a tubs Eppendorf de 1,5 ml de capacitat; el precipitat es va descartar. Les mostres es guardaren a -40 °C fins el moment de l'anàlisi de marcadors de dany oxidatiu.

L'activitat de l'enzim catalasa, com marcador de defensa enfront les ROS, es va mesurar seguint la metodologia descrita per Aebi (1984). Es va utilitzar un tampó fosfat 50 mM, pH 7. Dins cubetes de quars s'introduïren 2 ml de tampó, i després 100 μl d'homogenat (20 μl en el cas de les mostres de *T. dunense* en el moment de creixement òptim, per disminuir les interferències presentades en les lectures espectrofotomètriques). Un cop col·locades les cubetes dins un espectrofotòmetre

Shimadzu UV-2100, es va afegir 1 ml d'H₂O₂ 30 mM. Finalment, es va mesurar el decreixement de l'absorbància a 240 nm com a mesura de la descomposició de l'H₂O₂.

L'activitat catalasa de cada mostra es va normalitzar per mg de proteïna. La quantificació de proteïnes en les mostres es va dur a terme amb un kit comercial Biorad®, amb un fonament basat en el mètode de Bradford (1976). En una microplaca ELISA s'afegiren 5 µl d'homogenat (o de patró) per duplicat per a cada mostra. Seguidament, a cada pouet s'afegiren 250 µl de reactiu de Bradford (ja preparat al kit) i es va deixar la placa incubant en obscuritat durant 10 min. Finalment, es va llegir l'absorbància de cada pouet a 595 nm. Es va utilitzar BSA com a patró.

Nivells de MDA

Els nivells de MDA es mesuraren com indicador de la peroxidació de lípids. Es va utilitzar un kit comercial Sigma-Aldrich®. Dins tubs Eppendorf™ de 1,5 ml s'introduïren 325 µl de 1-metil-2-fenilindol 10,3 mM en acetonitril:metanol en proporció 3:1. Després s'afegiren 100 µl del mateix homogenat en Tris HCl utilitzat per a la mesura de catalasa (o de patró), i 75 µl de HCl 12N. Les mostres s'incubaren durant 1 h a 45 °C, es refredaren en gel durant 10 min i se centrifugaren a 15000 g durant 10 min a 4 °C (el patró no). Finalment, de cada mostra (sobrenedant) i patró s'aliquotaren 200 µl per duplicat en una microplaca ELISA, per llegir-ne l'absorbància a 586 nm. Es va utilitzar MDA en concentracions conegudes (inclòs en el kit) com a patró. Els nivells de MDA es normalitzaren per mg de proteïna.

Anàlisi estadística

Les dades s'expressaren en µS/cm per a la conductivitat del sòl, en mkat/mg de proteïna per a l'activitat catalasa i en pmol MDA/mg de proteïna per als nivells de MDA. Per poder comparar la variació d'aquests paràmetres al llarg de l'any per a cada espècie, es va dividir cada valor individual entre el valor mitjà del tercer mostreig per a aquella espècie.

L'anàlisi estadística es va realitzar amb el programa informàtic RStudio®. Es va aplicar el test de Shapiro-Wilk per contrastar la distribució normal de les dades, i el test de Bartlett per contrastar l'homogeneïtat de variàncies.

Per a cada espècie, es va contrastar la variació de l'activitat catalasa i dels nivells de MDA en els diferents moments de l'any amb una anàlisi de variàncies (ANOVA) d'una via, un ANOVA de Welch o un test de Kruskal-Wallis (en funció dels resultats dels tests de normalitat i homogeneïtat de variàncies). Quan les diferències varen ser significatives, s'aplicaren els respectius tests *post-hoc* de Bonferroni o de Dunn.

Els resultats s'expressaren com mitjana \pm desviació estàndard. Es consideraren diferències estadísticament significatives quan $P < 0,05$.

Resultats

Conductivitat del sòl

A la Taula 2 es poden observar, per a cada espècie, els valors de la conductivitat del sòl als tres moments en què es va mostrejar. Generalment, els valors de conductivitat foren majors a les espècies més properes a la línia de costa, i anaven disminuint per a les plantes amb una posició més endarrerida de la catena dunar. Exceptuant *E. farctus*, al moment de màxima sequera la conductivitat augmentà respecte al moment de floració. Pel que fa al moment de creixement òptim, va suposar el màxim valor de conductivitat per a *E. farctus*, *A. arenaria* i *T. dunense*; d'altra banda, en aquest moments la conductivitat va assolir els valors mínims per a *C. maritima* i *H. caput-felis*.

Taula 2. Conductivitat ($\mu\text{S}/\text{cm}$) de les diferents mostres de sòl preses al llarg de l'estudi.

Espècie	Inici de floració (1er mostreig)	Màxima sequera (2on mostreig)	Creixement òptim (3er mostreig)
<i>Elymus farctus</i>	260	258	363
<i>Ammophila arenaria</i>	223	273	365
<i>Crucianella maritima</i>	239	271	189
<i>Teucrium dunense</i>	202	224	240
<i>Helianthemum caput-felis</i>	219	242	176

Activitat catalasa

Els valors de l'activitat catalasa de les diferents espècies es resumeixen a la Taula 3. *E. farctus* va presentar una activitat significativament menor al moment de creixement òptim respecte als altres dos mostrejors. Per a *A. arenaria* i *C. maritima*, l'activitat catalasa no va presentar diferències estadísticament significatives al llarg de l'any. *T. dunense* va presentar una activitat significativament major al moment de màxima sequera en comparació al moment de creixement òptim. Degut a interferències en les lectures espectrofotomètriques no es va poder mesurar l'activitat catalasa de *H. caput-felis*.

No es detectaren diferències estadísticament significatives entre *E. farctus* i *A. arenaria* en cap dels tres moments de mostreig. *C. maritima* va presentar sempre els valors màxims en comparació a la resta d'espècies, tot i que no es diferencià

significativament de *T. dunense* en cap moment. L'activitat catalasa de *T. dunense* va ser significativament major a la d'*A. arenaria* al moment de màxima sequera, i significativament major a la d'*E. farctus* al moment de creixement òptim.

Taula 3. Activitat de l'enzim catalasa (mkat/mg de proteïna) de les diferents espècies seleccionades en els moments d'inici de la floració, de màxima sequera i de creixement òptim. Les dades s'expressen com mitjana \pm desviació estàndard (n= 5-6). Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre mostrejors (minúscules) i entre espècies (majúscules).

Espècie	Inici de floració (1er mostreig)	Màxima sequera (2on mostreig)	Creixement òptim (3er mostreig)
<i>Elymus farctus</i>	0,15 \pm 0,11 abA	0,31 \pm 0,17 aAB	0,03 \pm 0,02 bA
<i>Ammophila arenaria</i>	0,10 \pm 0,03 aA	0,06 \pm 0,00 aA	0,06 \pm 0,02 aAB
<i>Crucianella maritima</i>	7,71 \pm 3,74 aB	7,23 \pm 4,75 aC	4,87 \pm 2,91 aC
<i>Teucrium dunense</i>	1,02 \pm 0,42 abAB	1,59 \pm 0,47 aBC	0,44 \pm 0,34 bBC
<i>Helianthemum caput-felis</i>	—	—	—

La variació de l'activitat catalasa respecte a la mitjana en el moment de creixement òptim de les diferents espècies es representa a la Figura 3. Per a *E. farctus* l'activitat catalasa va ser 4,6 vegades major al moment de floració (sense diferències estadísticament significatives), i 9,6 vegades major al moment de màxima sequera. Per a *A. arenaria* va ser 1,5 vegades major al moment de floració (sense diferències estadísticament significatives), i no va variar al moment de màxima sequera. Per a *C. maritima* va ser 1,6 vegades major al moment de floració, i 1,5 vegades major al moment de màxima sequera, encara que no es donaren diferències estadísticament significatives en cap dels dos casos. Per a *T. dunense* va ser 2,3 vegades major al moment de floració (sense diferències significatives), i 3,6 vegades major al moment de màxima sequera.

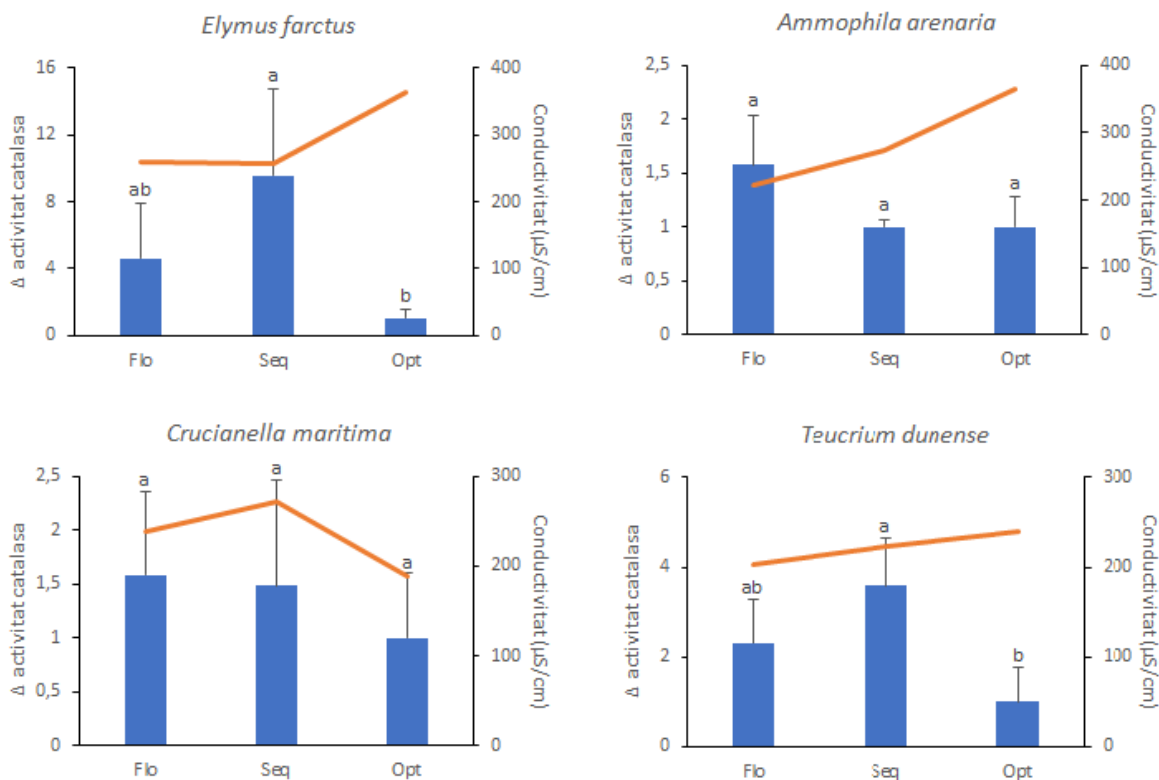


Figura 3. Variació (Δ) al llarg del cicle anual de l'activitat catalasa respecte a la mitjana en el moment de creixement òptim per a les diferents espècies de l'estudi. Blau= variació de l'activitat catalasa (tant per u); taronja= conductivitat ($\mu\text{S}/\text{cm}$). Flo= moment d'inici de la floració; Seq= moment de màxima sequera; Opt= moment de creixement òptim. Les dades s'expressen com la mitjana amb la desviació estàndard ($n= 5-6$). Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives entre mostres ($P < 0,05$).

Nivells de MDA

Els nivells de MDA de les diferents espècies es resumeixen a la Taula 4. *E. farctus* va presentar nivells de MDA significativament menors al moment de creixement òptim. Per a *A. arenaria* i *C. maritima*, els nivells de MDA no presentaren diferències estadísticament significatives al llarg de l'any. Els nivells de MDA de *T. dunense* varen presentar diferències estadísticament significatives en els tres moments de mostreig, assolint el valor màxim en el moment de màxima sequera i el valor mínim en el moment de creixement òptim. Degut a interferències en les lectures espectrofotomètriques no es varen poder mesurar els nivells de MDA de *H. caput-felis*.

No es detectaren diferències estadísticament significatives entre *E. farctus* i *A. arenaria* en cap dels tres moments de mostreig. Els nivells de MDA de *C. maritima* varen ser significativament majors als d'*A. arenaria* als moments de floració i màxima sequera, i significativament majors als d'*E. farctus* al moment de creixement òptim. *T.*

dunense va presentar sempre els valors màxims en comparació a la resta d'espècies, tot i que no es diferencià significativament de *C. maritima* en cap moment, ni d'*A. arenaria* en el moment de creixement òptim.

Taula 4. Nivells de MDA (pmol/mg de proteïna) de les diferents espècies seleccionades en els moments d'inici de la floració, de màxima sequera i de creixement òptim. Les dades s'expressen com mitjana \pm desviació estàndard (n= 5-6). Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre mostrejos (minúscules) i entre espècies (majúscules).

Espècie	Inici de floració (1er mostreig)		Màxima sequera (2on mostreig)		Creixement òptim (3er mostreig)	
<i>Elymus farctus</i>	16,2 \pm 4,5	aAB	21,7 \pm 6,4	aAB	4,5 \pm 0,5	bA
<i>Ammophila arenaria</i>	14,4 \pm 4,6	aA	12,2 \pm 2,2	aA	9,8 \pm 1,1	aAB
<i>Crucianella maritima</i>	180,0 \pm 80,8	aBC	138,6 \pm 65,6	aBC	86,2 \pm 35,3	aB
<i>Teucrium dunense</i>	252,2 \pm 82,5	aC	565,0 \pm 182,6	bC	115,0 \pm 57,3	cB
<i>Helianthemum caput-felis</i>	—		—		—	

La variació dels nivells de MDA respecte a la mitjana en el moment de creixement òptim de les diferents espècies es representa a la Figura 4. Per a *E. farctus* els nivells de MDA varen ser 3,5 vegades majors al moment de floració, i 4,8 vegades majors al moment de màxima sequera. Per a *A. arenaria* varen ser 1,5 vegades majors al moment de floració i 1,3 vegades majors al moment de màxima sequera, encara que no es trobaren diferències estadísticament significatives en cap dels dos casos. Per a *C. maritima* varen ser 2,1 vegades majors al moment de floració, i 1,6 vegades majors al moment de màxima sequera, encara que no es trobaren diferències estadísticament significatives en cap dels dos casos. Per a *T. dunense* varen ser 2,2 vegades majors al moment de floració, i 4,9 vegades majors al moment de màxima sequera.

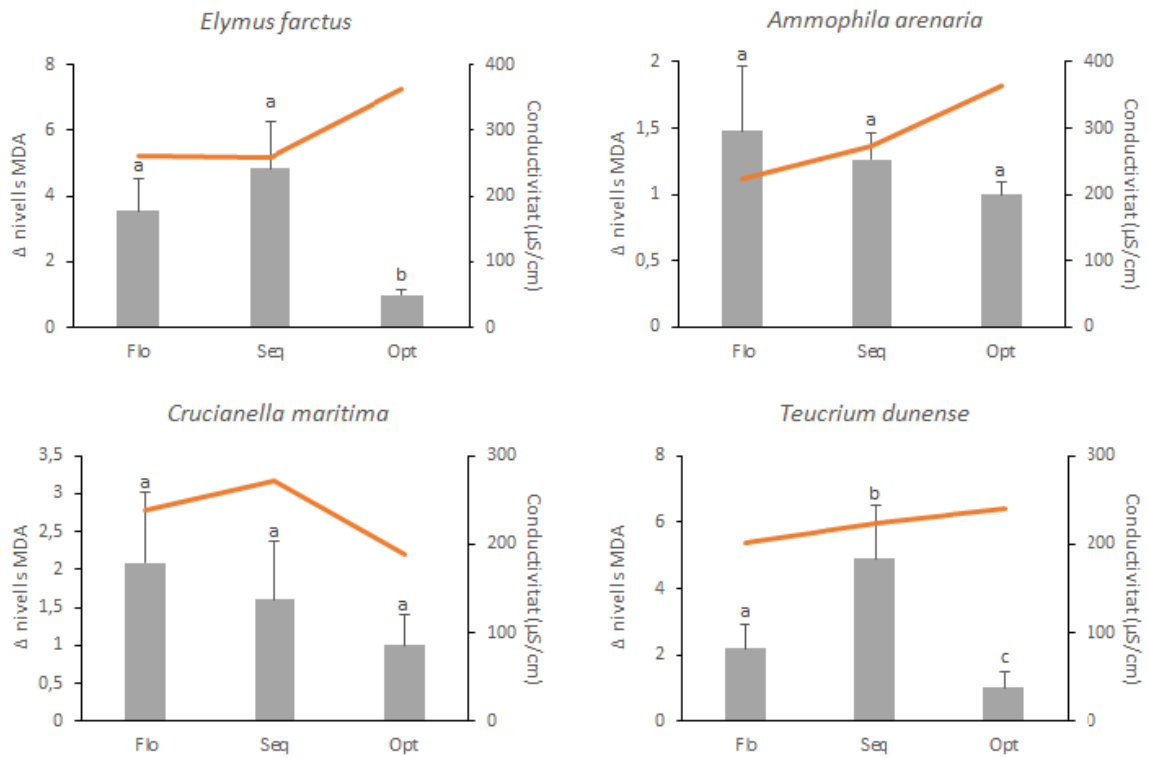


Figura 4. Variació (Δ) al llarg del cicle anual dels nivells de MDA respecte a la mitjana en el moment de creixement òptim per a les diferents espècies de l'estudi. Blau= variació dels nivells de MDA (tant per u); taronja= conductivitat ($\mu\text{S}/\text{cm}$). Flo= moment d'inici de la floració; Seq= moment de màxima sequera; Opt= moment de creixement òptim. Les dades s'expressen com la mitjana amb la desviació estàndard ($n= 5-6$). Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives entre mostres ($P < 0,05$).

Discussió

Les plantes halòfitas habiten de forma natural i completen el seu cicle vital en condicions d'elevada salinitat (Flowers *et al.*, 1986; Flowers i Colmer, 2008). La salinitat és un factor abiòtic estressant que pot desencadenar una formació excessiva de ROS, causant estrès oxidatiu en les plantes (Sies, 1997; Bartosz, 1997; Hasegawa *et al.*, 2000). Les plantes han desenvolupat diferents mecanismes de defensa enfront l'estrès oxidatiu (Ungar, 1991; Flowers i Colmer, 2008). Tot i que s'han dut a terme diferents estudis sobre aquests mecanismes, s'ha estudiat poc la variació d'aquesta protecció al llarg del cicle anual de les plantes. Amb l'objectiu d'avaluar-ho, se seleccionaren cinc espècies d'un sistema dunar de Sa Ràpita, una localitat al Sud de Mallorca. De cada espècie es mesuraren l'activitat catalasa i el nivell de MDA, com biomarcadors d'estrès oxidatiu, en tres moments de l'any: a l'inici de la floració, al moment de màxima sequera i al moment de creixement òptim.

E. farctus, una poàcia pròpia de dunes embrionàries, va presentar una activitat catalasa màxima al moment de màxima sequera, i una activitat mínima al moment de creixement òptim (Taula 3). Els seus nivells de MDA no presentaren diferències significatives entre els moments de floració i màxima sequera, però disminuïren al moment de creixement òptim (Taula 4). Els resultats obtinguts suggereixen que inicialment *E. farctus* augmenta la defensa enzimàtica com a resposta a l'estrès oxidatiu, especialment quan la sequera és màxima (Figura 3). Aquesta defensa evitaria que el dany oxidatiu en condicions de sequera augmentés respecte al moment de la floració (Figura 4). A partir d'aquí, s'ha de considerar que: 1) els dos primers mostrejos d'aquesta espècie es feren en època de sequera i relativament propers en el temps (Figura 2); 2) *E. farctus* perd quasi completament les fulles a l'estiu, la qual cosa es considera un mecanisme per evitar la sequera (Alessio *et al.*, 2004; El-Amier, 2016); 3) el moment de creixement òptim va ser l'únic mostreig per a aquesta espècie en què no es trobava en època de sequera, però va ser el moment en que la conductivitat del sòl va ser màxima (Taula 2). És probable que aquest darrer fet es degui a la manca de precipitació dels dies abans de la presa de mostres, acompanyada de la incidència de vents de l'Oest (Balears Meteo), la qual cosa hauria desembocat en un augment de la salinitat del sòl per la influència del *spray* salí (Boyce, 1954). Així, és possible que l'activitat antioxidant d'*E. farctus* augmentés per protegir-se al llarg de la floració i fructificació (que encara hauria coincidit amb el moment de

màxima sequera), i un cop acabada aquesta fase deixés de respondre per passar a la fase d'estivació perdent la major part de la biomassa aèria. De fet, en altres gramínies s'ha reportat que hi ha una resposta inicial a factors abiòtics estressants, que minva després de superar-se certs nivells d'exposició (Nayyar i Gupta, 2006; Modarresi *et al.*, 2013). Tot i que la conductivitat va ser màxima en el moment de creixement òptim, l'activitat catalasa no va augmentar. A més, la renovació de la part aèria a l'hivern podria explicar per què va haver tan poca acumulació de MDA en aquest moment, donat que el contingut cel·lular seria pràcticament nou. Aquests nivells mínims d'activitat catalasa i de MDA per a *E. farctus* enregistrats al moment de creixement òptim suggereixen que aquesta espècie es veu més afectada per la sequera que per la salinitat del sòl.

Ni l'activitat catalasa ni els nivells de MDA variaren significativament al llarg de l'any en *A. arenaria* (Taules 3 i 4). Sembla que la resposta antioxidant no varia significativament al llarg de l'any en aquesta espècie, i que el dany oxidatiu tampoc varia, de manera que *A. arenaria* podria presentar qualche estratègia diferent de la defensa enzimàtica antioxidant. *A. arenaria* es classifica com a hemicriptòfit, donat que perd gran part de la biomassa aèria durant l'estiu (Huiskes, 1979). Així, aquesta planta podria evitar l'estrès oxidatiu causat per la sequera i l'elevada salinitat pròpies de l'estiu a través d'una adaptació fenològica, més que amb una resposta enzimàtica.

Tot i que *C. maritima* va mantenir una activitat enzimàtica relativament elevada al llarg de tot l'any (Taula 3), no es va apreciar una variació estadísticament significativa per a la seva activitat catalasa ni els seus nivells de MDA (Figures 3 i 4). Encara així, els factors d'estrès ambiental variaren al llarg del temps d'estudi, tant pel que fa al balanç hídric del sòl (Figura 2) com pel que fa a la conductivitat (Taula 2). Així, és possible que la defensa enzimàtica de *C. maritima* es combini amb altres mecanismes de defensa. En el moment en què es va dur a terme aquest estudi, l'època de floració hauria estat relativament favorable per a *C. maritima*, donat que va coincidir amb un època sense dèficit hídric (Figura 2) i amb una conductivitat del sòl relativament baixa (Taula 2). Pel que fa al període d'estiu, aquesta planta, encara que es considera un camèfit, perd gran part de la biomassa aèria, com ocorre amb altres espècies perennifòlies d'ambients salins (Ungar, 1991), senyal que les condicions pròpies de l'època estival afecten negativament a la planta. Així, *C. maritima* s'hauria adaptat a una estratègia parcialment hemicriptofítica per evitar les condicions més

desfavorables de l'estiu. A més, encara que les diferències no resultaren estadísticament significatives, s'intueix una davallada de l'activitat catalasa en el moment de creixement òptim respecte als altres dos mostrejos (Figura 3), que com ja s'ha comentat coincideix amb la conductivitat mínima per a *C. maritima*. També es pot apreciar una tendència dels nivells de MDA a disminuir de forma constant des del moment de floració fins al de creixement òptim (Figura 4). Aquestes tendències podrien correspondre a una variació de la resposta antioxidant i del dany oxidatiu, que podria estar sent ocultada per l'elevada variabilitat de les mostres. A més, les lectures espectrofotomètriques presentaven cert grau d'interferència (es comentarà més endavant), cosa que podria afegir-se a aquest eclipsament dels resultats. Seria necessari augmentar el nombre mostral, per comprovar si la resposta enzimàtica de *C. maritima* realment no varia significativament al llarg de l'any, o si hi ha una variació que no es pot apreciar per l'elevada variabilitat de les dades.

T. dunense va presentar una activitat catalasa mínima al moment de creixement òptim (Figura 3), que coincideix amb els nivells de MDA més baixos per a aquesta espècie (Figura 4). En contraposició a aquests mínims, va presentar un pic d'activitat catalasa i de nivells de MDA al moment de màxima sequera, i uns valors intermedis al moment de la floració. D'aquesta manera, es pot veure com l'activitat catalasa de *T. dunense* augmenta amb la conductivitat del sòl en condicions de sequera. Encara així, aquesta resposta sembla no ser suficient per protegir la planta, donat que el dany oxidatiu va augmentar al moment de floració i especialment al de màxima sequera (Figura 4). La floració sembla ser un factor estressant per a *T. dunense*, donat que quan aquesta inicia les fulles del camèfit comencen a entrar en senescència des de la part més basal de la tija cap a l'àpex, on es reuneixen les flors. Generalment, aquesta senescència seqüencial es deu al transport de nutrients des de les fulles cap a les flors, per assegurar l'èxit en la reproducció i la fructificació (Himmelblau i Amasino, 2001). Aquest transport de nutrients dins la planta li causa un desequilibri fisiològic, el qual desemboca en estrès oxidatiu (Bartosz, 1997), contra el qual la planta s'ha de defensar. A l'estiu, la sequera i la salinitat del sòl suposen un factor encara més estressant per a *T. dunense*, el qual incrementa significativament la seva activitat enzimàtica antioxidant, però no aconsegueix evitar un augment en el dany oxidatiu. És possible que *T. dunense* sigui una espècie menys tolerant a la salinitat que les altres analitzades fins ara. De fet, altres plantes que habiten ambients salins de forma

natural també poden patir dany oxidatiu com a conseqüència de concentracions salines molt elevades (Amor *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2020). Tot i així, seria capaç d'aguantar les condicions ambientals, que no tendrien per què suposar un problema en certes èpoques de l'any, com es pot veure en el moment de creixement òptim. Encara així, el valor màxim de conductivitat del sòl es va assolir en aquest punt (Taula 2), moment en què tant la resposta enzimàtica com el dany oxidatiu foren mínims. Això es podria explicar per un tipus de defensa no enzimàtic. De fet, com ja s'ha puntualitzat a la metodologia, les mostres de *T. dunense* recollides al moment de creixement òptim presentaren interferències en les lectures espectrofotomètriques, la qual cosa sol ser senyal d'una interferència per composts fenòlics (Escarpa i González, 2001; Morales i Munné-Bosch, 2019). Així, *T. dunense* presentaria principalment una defensa enzimàtica en època de floració i en condicions de sequera, però en el moment en què el règim hídric fos més favorable podria dedicar més recursos a la formació de composts fenòlics com a defensa antioxidant, coincidint amb el moment de creixement vegetatiu.

No es va poder mesurar l'activitat antioxidant de *H. caput-felis*, degut a que les lectures a l'espectrofotòmetre presentaven interferències molt grans o els nivells d'absorbància se saturaven. Això es podria deure a la presència de composts fenòlics en les mostres. L'estructura amb dobles enllaços conjugats dels composts fenòlics els permet absorbir llum a diferents longituds d'ona, de manera que poden causar interferències a l'hora de fer lectures espectrofotomètriques (Escarpa i González, 2001; Morales i Munné-Bosch, 2019). De fet, diverses espècies del gènere *Helianthemum* poden comportar-se com plantes crasses, sintetitzant aquests composts per protegir-se d'elevades radiacions i de factors oxidants (Rubio-Moraga *et al.*, 2013). Això suggereix que *H. caput-felis* es podria comportar funcionalment com una planta crassa, per combatre les condicions abiòtiques desfavorables dels sistemes dunars com poden ser l'elevada radiació solar i la salinitat del sòl.

Comparant les dues poàcies, podria donar-se que la resposta d'ambdues fos similar. Tant *E. farctus* com *A. arenaria* presenten un comportament tipus hemicriptòfit per evitar la sequera estival. La diferència principal en el cicle anual de les dues espècies és el moment de floració, donat que en *A. arenaria* és més primerenca, la qual cosa dificulta la comparació de dades del primer mostreig entre les dues espècies. Encara que no es va diferenciar significativament, l'activitat catalasa al

moment de la floració per a *A. arenaria* va ser lleugerament major que a la resta de l'any (Figura 3). En el temps d'estudi, aquest mostreig va coincidir amb un moment de superàvit hídric (Figura 2). Així, encara que hi hagués un estrès degut a la floració, la sequera no suposaria un factor considerablement perjudicial. D'aquesta manera, la formació de ROS seria relativament menor, la qual cosa es veuria reflectida en una menor resposta antioxidant. Podria donar-se el fet que la resposta d'*A. arenaria* fos similar a la d'*E. farctus*, protegint-se inicialment per poder mantenir la floració i fructificació, i després aturar l'activitat i perdre les fulles, però com el lapse de temps entre els dos mostrejos va ser gran, no es va poder veure el potencial pic en l'activitat catalasa. Això és una hipòtesi que s'hauria de comprovar posteriorment, fent més mostrejos al llarg de l'any. L'activitat catalasa no va diferir significativament entre poàcies però sí va ser menor al de la resta d'espècies, almenys en qualche moment de l'any (Taula 3). El dany oxidatiu en les primeres tampoc va variar significativament en cap moment de l'any (exceptuant el moment de creixement òptim per a *E. farctus*) ni va ser diferent entre les dues espècies (Taula 4), de manera que hi ha una defensa efectiva enfront a l'estrès oxidatiu. Llavors, podria donar-se el fet que en *E. farctus* i *A. arenaria* la defensa enfront a l'estrès oxidatiu no es basés només en l'activitat enzimàtica, sinó que es veiés reforçada per una defensa no enzimàtica, com podria ser la formació de soluts compatibles (Paquet *et al.*, 1994; Colmer *et al.*, 1996) o la secreció d'ions per mantenir el balanç osmòtic de la planta (Barhoumi *et al.*, 2007). També seria important el comportament tipus hemicriptòfit ja comentat, especialment en estiu (Alessio *et al.*, 2004). Els baixos nivells de dany oxidatiu a aquestes plantes (especialment en comparació a la resta d'espècies) podrien ser indicadors de l'elevada resistència de les poàcies a la salinitat, la qual cosa concorda amb altres estudis centrats en plantes de la mateixa família (Naidoo i Naidoo, 1998; Modarresi *et al.*, 2013; van Puijenbroek *et al.*, 2017).

D'entre totes les espècies seleccionades, *C. maritima* va presentar els valors més elevats d'activitat catalasa al llarg de tot l'any (Taula 3). És possible que *C. maritima* mantingui una resposta antioxidant relativament elevada durant tot l'any, i que combini aquesta resposta enzimàtica amb altres estratègies com un comportament tipus hemicriptòfit. Això permetria que *C. maritima* fos més tolerant a la salinitat que altres camèfits com *T. dunense*. De fet, aquesta segona espècie va ser la que va presentar uns majors valors de MDA, especialment en l'època de màxima

sequera (Taula 4). Tot i que la seva resposta antioxidant augmenta amb la conductivitat, no basta per evitar un augment en el dany oxidatiu. Com ja s'ha dit abans, això podria indicar que *T. dunense* no seria tan resistent a la salinitat com altres espècies. Aquest fet podria explicar per què *T. dunense* es troba a una posició de la catena dunar més endarrerida que altres espècies com les poàcies o camèfits com *C. maritima* (Llorens *et al.*, 2007). Algunes mostres de *C. maritima* i *T. dunense* mostraren interferències en les lectures a l'espectrofotòmetre, encara que no tan fortes com per impedir-ne la mesura, com va ocórrer en el cas de *H. caput-felis*. Aquest fet suggereix que els camèfits de la catena dunar podrien utilitzar composts fenòlics com a part de la seva defensa antioxidant (Larson, 1988; Rubio-Moraga *et al.*, 2013; Castañeda-Arriaga *et al.*, 2018). Per evitar aquestes interferències de cara a futurs treballs, es podrien utilitzar substàncies capaces de precipitar composts fenòlics, com el PVPP (Ranatunge *et al.*, 2017).

Conclusions

Les diferents espècies de la catena dunar de Sa Ràpita presenten diferents estratègies per combatre l'estrès oxidatiu propiciat per la sequera, la salinitat, la floració o per una combinació d'aquestes. Aquestes estratègies es diferencien en l'evolució de la resposta antioxidant al llarg de l'any.

E. farctus mostra un augment inicial en la resposta enzimàtica, que podria servir per protegir-se durant la floració i fructificació, fins que perd la majoria de la part aèria en estiu per renovar-la quan les condicions són òptimes per al creixement. No es veu una variació en la resposta antioxidant d'*A. arenaria*, encara que la seva fenologia fa pensar que podria comportar-se de forma similar a *E. farctus*. La resposta antioxidant de *C. maritima* es manté elevada al llarg de tot l'any, evitant un augment significatiu en el dany oxidatiu, i sembla combinar-se amb una adaptació fenològica; tot i així, l'elevada variabilitat de les mostres podria estar eclipsant una evolució de la resposta enzimàtica al llarg del cicle anual. *T. dunense* respon a l'augment de la salinitat, però la defensa no basta per evitar el dany oxidatiu, de manera que es podria considerar una espècie relativament poc tolerant a la salinitat. Sembla que *H. caput-felis* es comporta com una planta crassa, sintetitzant composts fenòlics com a mecanisme de defensa (que impedeixen la mesura de l'activitat enzimàtica a l'espectrofotòmetre).

Les diferents estratègies i capacitats de tolerància a la salinitat podrien ser condicionants de la distribució de les espècies al llarg de la catena dunar. Les dues poàcies són les espècies més resistents, com es pot veure en els baixos nivells de dany oxidatiu. *C. maritima* manté una activitat catalasa relativament elevada, la qual cosa la fa més tolerant a la salinitat i permet que se situï a posicions més avançades de la catena dunar que altres camèfits com *T. dunense*, el qual seria l'espècie menys tolerant a la salinitat de totes les que s'han estudiat. Finalment, les interferències en les lectures espectrofotomètriques suggereixen que els tres camèfits, en especial *H. caput-felis*, produeixen composts fenòlics, almenys a qualche moment de l'any, com a part de la seva defensa antioxidant.

Agraïments

Voldria agrair al Dr. Llorenç Gil per la direcció i l'aconsellament al llarg del treball, i per la recollida de mostres quan ens trobàvem confinats. També agrair a Marcello Cerrato per tota l'ajuda amb el processament de les mostres, i tant a ell com al Dr. Antoni Sureda per l'ajuda amb les determinacions bioquímiques. Finalment, agrair a la meva parella, Laura López, per el seu recolzament incondicional, i per voler llegir i opinar sobre el treball.

Referències bibliogràfiques

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Alessio, G. A., De Lillis, M., Brugnoli, E., i Lauteri, M. (2004). Water sources and water-use efficiency in Mediterranean coastal dune vegetation. *Plant Biology*, 6, 350-357.
- Amor, N. B., Jiménez, A., Megdiche, W., Lundqvist, M., Sevilla, F., i Abdelly, C. (2006). Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. *Physiologia Plantarum*, 126, 446-457.
- Barhoumi, Z., Djebali, W., Smaoui, A., Chaïbi, W., i Abdelly, C. (2007). Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus litoralis* (Willd) Parl. *Journal of Plant Physiology*, 164, 842-850.
- Bartosz, G. (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19, 47-64.
- Boyce, S. G. (1954). The salt spray community. *Ecological Monographs*, 24, 29-67.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Castañeda-Arriaga, R., Pérez-González, A., Reina, M., Alvarez-Idaboy, J. R., i Galano, A. (2018). Comprehensive investigation of the antioxidant and pro-oxidant effects of phenolic compounds: A double-edged sword in the context of oxidative stress? *The Journal of Physical Chemistry B*, 122, 6198-6214.
- Colmer, T. D., Teresa W. M, F., Läuchli, A., i Higashi, R. M. (1996). Interactive effects of salinity, nitrogen and sulphur on the organic solutes in *Spartina alterniflora* leaf blades. *Journal of Experimental Botany*, 47, 369-375.
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., ... i Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 107, 526-545.

El-Amier, Y. A. (2016). Vegetation structure and soil characteristics of five common geophytes in desert of Egypt. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 172-186.

Eleuterius, L. N., i Eleuterius, C. K. (1979). Tide levels and salt marsh zonation. *Bulletin of Marine Science*, 29, 394-400.

Escarpa, A., i González, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427, 119-127.

Flowers, T. J., Hajibagheri, M. A., i Clipson, N. J. W. (1986). Halophytes. *The Quarterly Review of Biology*, 61, 313-337.

Flowers, T. J., i Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179, 945-963.

Gil, L. (1994). *Biología reproductiva de la flora litoral de Baleares. I. Dunas y roquedos marítimos*. [Tesi doctoral inèdita]. Universitat de les Illes Balears.

Gil, L., Capó, X., Tejada, S., Mateu-Vicens, G., Ferriol, P., Pinya, S., i Sureda, A. (2020). Salt variation induces oxidative stress response in aquatic macrophytes: The case of the Eurasian water-milfoil *Myriophyllum spicatum* L. (Saxifragales: Haloragaceae). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 239, 106756.

Gil, L., Pinya, S., Tejada, S., Capó, X., i Sureda, A. (2019). Antioxidant defenses in wild growing halophyte *Crithmum maritimum* from inland and coastline populations. *Chemistry & Biodiversity*, 16, e1800448.

Guijarro, J. A. (1986). *Contribución a la Bioclimatología de Baleares* [Tesi doctoral, Universitat de les Illes Balears]. Repositori AEMET.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., i Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology*, 51, 463-499.

Himelblau, E., i Amasino, R. M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*, 158, 1317-1323.

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

Inzé, D., i Van Montagu, M. (1995). Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 153-158.

Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969-978.

Llorens, Ll., Gil, Ll., i Tébar, F. J. (2007). *La vegetació de l'illa de Mallorca. Bases per a la interpretació i gestió d'hàbitats*. Associació Jardí Botànic de Palma.

Loew, O. (1901). Characterisation of catalase. *US Department of Agriculture, Report*, 68, 47-55.

Mancini, A., Buschini, A., Restivo, F. M., Rossi, C., i Poli, P. (2006). Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Science*, 170, 845-852.

McCord, J. M., i Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *Journal of Biological Chemistry*, 244, 6049-6055.

Mhadhbi, H., Jebara, M., Limam, F., i Aouani, M. E. (2004). Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 717-722.

Modarresi, M., Nematzadeh, G. A., i Moradian, F. (2013). Salinity response pattern and isolation of catalase gene from halophyte plant *Aeluropus litoralis*. *Photosynthetica*, 51, 621-629.

Morales, M., i Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiology*, 180, 1246-1250.

Müller-Hohenstein, K. (1992). Las dunas como ecosistemas: experiencias en Europa, Arabia y Africa. *Bosque*, 13, 9-21.

Munns, R., i Termaat, A. (1986). Whole-plant responses to salinity. *Functional Plant Biology*, 13, 143-160.

Naidoo, G., i Naidoo, Y. (1998). Salt tolerance in *Sporobolus virginicus*: the importance of ion relations and salt secretion. *Flora*, 193, 337-344.

Nayyar, H., i Gupta, D. (2006). Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 58, 106-113.

Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Márquez-García, B., ... i Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, 35, 454-484.

Paquet, L., Rathinasabapathi, B., Saini, H., Zamir, L., Gage, D. A., Huang, Z. H., i Hanson, A. D. (1994). Accumulation of the compatible solute 3-dimethylsulfoniopropionate in sugarcane and its relatives, but not other gramineous crops. *Functional Plant Biology*, 21, 37-48.

Ranatunge, I., Adikary, S., Dasanayake, P., Fernando, C. D., i Soysa, P. (2017). Development of a rapid and simple method to remove polyphenols from plant extracts. *International journal of analytical chemistry*, 2017, 7230145.

Rinalducci, S., Murgiano, L., i Zolla, L. (2008). Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 59, 3781-3801.

Rubio-Moraga, Á., Argandoña, J., Mota, B., Pérez, J., Verde, A., Fajardo, J., ... i Gómez-Gómez, L. (2013). Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 287-296.

Sanjaume, E., i Gracia, F. J. (2011). *Las dunas en España*. Sociedad Española de Geomorfología.

Seaman, M. T., Ashton, P. J., i Williams, W. D. (1991). Inland salt waters of southern Africa. *Hydrobiologia*, 210, 75-91.

Shevyakova, N. I., Rakitin, V. Y., Stetsenko, L. A., Aronova, E. E., i Kuznetsov, V. V. (2006). Oxidative stress and fluctuations of free and conjugated polyamines in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. under NaCl salinity. *Plant Growth Regulation*, 50, 69-78.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82, 291-295.

Slater, F. M. (2016). Ecotones, ecoclines and eco-perturbations: the aquatic flora and fauna of S'Albufera Natural Park, Mallorca: a contribution and review. *Mediterranean Journal of Biosciences*, 1, 120-127.

Stanković, M. S., Petrović, M., Godjevac, D., i Stevanović, Z. D. (2015). Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants? *Journal of Arid Environments*, 120, 26-32.

Ungar, I. A. (1991). *Ecophysiology of vascular halophytes*. CRC press.

Van Puijenbroek, M. E., Teichmann, C., Meijdam, N., Oliveras, I., Berendse, F., i Limpens, J. (2017). Does salt stress constrain spatial distribution of dune building grasses *Ammophila arenaria* and *Elytrigia juncea* on the beach? *Ecology and Evolution*, 7, 7290-7303.