



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Efecto de la salinidad sobre la inducción del CAM
y la succulencia en *Talinum triangulare*

Presentado por: Estefanía Montero Salazar

Tutora: Dra. Ana Herrera (IBE, UCV)

Caracas, octubre de 2017

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DE LA BR. ESTEFANÍA MONTERO SALAZAR**

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por el Consejo de la Escuela de Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado presentado por la Br. Estefanía Montero Salazar, C.I. V- 21.414.322, titulado: "Efecto de la salinidad sobre la inducción del CAM y la succulencia en *Talinum triangulare*" para optar al título de Licenciado en Biología, consideramos que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos por los reglamentos respectivos de la Universidad Central de Venezuela y por lo tanto lo declaramos APROBADO con una calificación de DIECIOCHO (18) puntos.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 27 días del mes de septiembre del año 2017.



Dra. Nathalie Suárez (USB)
Jurado



Dr. Wilmer Tezara (UCV)
Jurado



Dra. Ana Herrera (IBE)
Tutora

Resumen

Talinum triangulare Jacq. Wild. [sin. *Talinum fruticosum* (L.) Juss.] es una hierba perenne terrestre pantropical reportada como CAM inducible frente a condiciones de sequía igual que varias especies también pertenecientes a la familia Talinaceae y particularmente del género *Talinum*. El CAM puede ser inducido por diferentes factores ambientales como lo son la sequía, el fotoperíodo, la temperatura y la salinidad. El presente estudio fue realizado para examinar si la salinidad es un factor inductor del CAM en plantas de *T. triangulare*, donde se determinó la influencia de tratamientos con NaCl 150, 300 y 400 mM sobre la acumulación nocturna de ácidos, intercambio gaseoso, concentración de clorofilas, relaciones hídricas y variables de crecimiento y anatómicas de las plantas. Las plantas toleraron el tratamiento con NaCl hasta 300 mM, mientras que el tratamiento con NaCl 400 mM hizo disminuir la tasa fotosintética, el crecimiento y el esfuerzo reproductivo. Las plantas en salinidad realizaron un importante ajuste osmótico. Se determinó que bajo tratamientos con NaCl 300 mM las plantas de *T. triangulare* presentaron una acumulación nocturna de malato significativamente mayor que las plantas control, lo cual es evidencia de la operación del CAM en la modalidad reciclante.

Palabras clave: CAM, salinidad, *Talinum*, succulencia.

ÍNDICE

	página
Introducción.....	1
Objetivos.....	5
<i>General</i>	5
<i>Específicos</i>	5
Materiales y métodos.....	6
<i>Material biológico y condiciones de crecimiento de las plantas</i>	6
<i>Variables microclimáticas dentro del invernadero</i>	6
<i>Determinación alométrica del área foliar</i>	6
<i>Curso de descarboxilación</i>	6
<i>Acumulación nocturna de ácidos</i>	6
<i>Intercambio gaseoso</i>	7
<i>Contenido de pigmentos foliares</i>	7
<i>Suculencia</i>	7
<i>Relaciones hídricas</i>	7
<i>Análisis de crecimiento</i>	7
<i>Anatomía foliar</i>	8
Resultados.....	8
<i>Variables microclimáticas dentro del invernadero</i>	8
<i>Determinación alométrica del área foliar</i>	8
<i>Curso de descarboxilación</i>	9
<i>Acumulación nocturna de ácidos</i>	9
<i>Intercambio gaseoso</i>	11
<i>Contenido de pigmentos foliares</i>	12
<i>Suculencia</i>	13
<i>Relaciones hídricas</i>	14
<i>Análisis de crecimiento</i>	16
<i>Anatomía foliar</i>	17

Discusión.....	20
Conclusiones.....	23
Bibliografía.....	23
Agradecimientos.....	27

Introducción

El metabolismo ácido de Crasuláceas (CAM) consiste en una ruta de fijación fotosintética de carbono que permite a las células con cloroplastos fijar CO_2 inicialmente en la noche, cuando la pérdida de agua transpiracional es baja, mediante la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en el citosol. Esto conlleva la formación de ácidos orgánicos C_4 (Cushman, 2001), donde el CO_2 se combina con fosfoenolpiruvato (PEP) mediante la acción de PEPC para generar oxalacetato, el cual se reduce a malato por acción de la malato deshidrogenasa. El malato es transportado pasivamente a la vacuola, siguiendo a protones transportados activamente, y el ácido málico se acumula durante la noche (Winter, 1985). Durante el día ocurre la descarboxilación del ácido málico en el citoplasma, lo que deviene en liberación de CO_2 y promueve el cierre estomático, generando una fuente interna de CO_2 que se concentra alrededor de Rubisco, aumentando la fijación del CO_2 , suprimiendo la actividad oxigenasa de Rubisco y minimizando por tanto la fotorrespiración (Cushman, 2001).

Dicha ruta de fijación de carbono ha sido descrita en cuatro fases:

Fase I: una cantidad considerable de CO_2 es fijado por PEPC en la noche (Niewiadomska *et al.*, 2004) y se almacena malato en la vacuola (Hurst *et al.*, 2004). Fase II: la actividad carboxilasa de PEPC disminuye al amanecer, favoreciendo la actividad de Rubisco (Niewiadomska *et al.*, 2004) y se realiza toma neta de CO_2 al comienzo del día (Cushman, 2001). Fase III: se libera ácido málico al citoplasma, ocurre la descarboxilación del malato y se genera CO_2 en alta concentración, que es asimilado mediante el ciclo de Calvin con los estomas cerrados (Niewiadomska *et al.*, 2004), y disminuye la fotorrespiración debido a una baja relación O_2/CO_2 (Hurst *et al.*, 2004). Mientras el CO_2 producido por descarboxilación es usado, se genera una alta presión parcial de oxígeno antes de abrirse los estomas (Hurst *et al.*, 2004). Fase IV: al final del día, cuando el malato se ha agotado, los estomas se abren, permitiendo la fijación directa de CO_2 por Rubisco (Niewiadomska *et al.*, 2004).

Los principales caracteres para diagnosticar el CAM son la acumulación nocturna de ácidos y la presencia de apertura estomática nocturna (Herrera, 2009).

Existen diversas modalidades del CAM, entre las que se encuentran el CAM obligado o constitutivo, el CAM inducible, facultativo o C_3 -CAM, el CAM y el CAM fútil.

En el CAM obligado o constitutivo, la toma neta de CO₂ ocurre casi exclusivamente de noche y con poca asimilación neta de CO₂ durante fases II y IV, es decir, al comienzo y al final de día (Cushman, 2001), comportamiento que se observa bajo condiciones tanto de riego como de sequía (Nobel, 1988). Las plantas CAM obligadas se caracterizan principalmente por realizar acumulación nocturna de ácidos y fijación nocturna de CO₂ elevadas (Herrera, 2009). En los cactus, hasta el 99% de la asimilación de carbono ocurre durante la noche (Nobel, 1988).

Las plantas con metabolismo CAM inducible, facultativo o C₃-CAM son plantas C₃ o C₄ en las que los factores ambientales inducen la asimilación nocturna de CO₂. En el estado no inducido las plantas realizan una forma C₃ o C₄ de fijación de CO₂ y acumulación nocturna de ácidos nula, mientras que en el estado inducido ocurre una pequeña fijación nocturna de CO₂ y acumulación nocturna de ácidos (Herrera, 2009). Las especies de plantas intermediarias C₃-CAM se encuentran principalmente en las familias Aizoaceae, Crassulaceae, Portulacaceae, Talinaceae y Vitaceae (Smith y Winter, 1996).

Las plantas CAM reciclantes realizan toma diurna de CO₂ con refijación de CO₂ respiratorio en las noches acompañada de ligeras fluctuaciones de ácidos C₄ (Cushman, 2001), sin apertura estomática nocturna (Herrera, 2009). Ejemplos de especie CAM reciclante son *Talinum calycinum* (Martin *et al.*, 1988) y *Euphorbia milii* (Herrera, 2013).

El CAM fútil se desarrolla en todas las modalidades del CAM bajo condiciones de estrés extremas, siendo el último estadio en la operación del CAM, y consiste en la presencia de pequeñas oscilaciones diarias en la acidez sin asimilación nocturna o diurna de CO₂ (Ting, 1985).

El cambio en la vía de fijación de carbono de C₃ o C₄ al CAM puede ser inducido por diversos factores tales como sequía, fotoperíodo, temperatura, salinidad, alta densidad de flujo fotónico (DFF) y deficiencia de nitrógeno o fósforo, entre otros (Martin y Zee, 1983; Winter, 1985; Herrera *et al.*, 1991; Winter y Holtum, 2005; Herrera, 2009).

Cambiar de metabolismo e inducir el CAM es una estrategia adaptativa que las plantas CAM inducibles adoptan frente a condiciones de adversidad ambiental, ya que les confiere mayor eficiencia de uso de agua en condiciones de deficiencia de recursos (Herrera, 2009) y, por lo mismo, resulta una modificación beneficiosa para las plantas que

viven en ambientes salinos (Bloom, 1979; Niewiadomska *et al.*, 2004). Dicho cambio permite la realización de fijación nocturna de CO₂ y el cierre estomático durante el día, lo que reduce la pérdida de agua por transpiración (Vernon *et al.*, 1993), mantiene la integridad fotosintética bajo condiciones limitantes de agua, garantiza la supervivencia y puede aumentar el éxito reproductivo, como se ha demostrado en algunos casos (Winter y Ziegler, 1992; Taisma y Herrera, 1998; Herrera, 1999).

La familia Talinaceae agrupa diversas especies reportadas como plantas CAM (Martin y Zee, 1983; Martin *et al.*, 1988), dentro de las cuales se encuentran seis especies del género *Talinum*. La inducción del CAM frente a condiciones de sequía ha sido reportada en *Talinum calycinum* (Martin y Zee, 1983), *T. parviflorum*, *T. teretifolium* (Martin *et al.*, 1988), *T. paniculatum* (Güerere *et al.*, 1996) y *T. triangulare* (Herrera *et al.*, 1991). En *T. triangulare* el CAM no es el principal metabolismo usado para la adquisición de CO₂; sin embargo, produce un reciclaje de CO₂ importante durante la operación del CAM, el cual se traduce en un ahorro significativo de agua (Güerere *et al.*, 1996; Herrera *et al.*, 1991; Herrera *et al.*, 2015).

La salinidad es un factor que produce estrés hídrico en las plantas al disminuir el potencial hídrico del sustrato (Vernon *et al.*, 1993); también, a pesar de la capacidad de las plantas para realizar ajuste osmótico mediante la absorción de iones inorgánicos del suelo, la salinidad genera una situación de “sequía fisiológica” (Winter y Gademann, 1990). Las interacciones entre la raíz y el tallo juegan un papel importante en la inducción del CAM por salinidad, donde están implicadas señales provenientes de la raíz (Michalowski y Bonhert, 1992).

La mayoría de las plantas CAM no poseen mecanismos que les permitan tolerar condiciones de salinidad en el suelo (Lüttge, 1993); sin embargo, existen especies, como *Mesembryanthemum crystallinum* y *M. nodiflorum*, que poseen dicha capacidad (Winter y Holtum, 2005). Plantas de *M. crystallinum* regadas con soluciones salinas exhiben las características fotosintéticas de una planta CAM, mientras que sin salinidad se comportan como una planta C₃ (Winter y Gademann, 1990).

Una variable potencialmente útil en la evaluación del grado de la operación del CAM es el índice de succulencia mesofilar (S_m), que corresponde al resultado de dividir la masa de agua contenida en una hoja entre la de clorofila (Kluge y Ting, 1978). Las plantas

CAM poseen un valor del índice de succulencia mesofilar superior a 1 g mg^{-1} (Kluge y Ting, 1978). Tanto en *T. triangulare* como en *T. paniculatum*, ambas caracterizadas como CAM inducible, S_m fue mayor de 1 (Herrera *et al.*, 1991; Güerere *et al.*, 1996).

Para estimar la concentración de malato y citrato en diferentes horas del día y verificar si hay acumulación nocturna, se determina la diferencia en contenido de H^+ entre el amanecer y el atardecer anterior (ΔH^+), basado en la titulación hasta pH 7 con KOH de filtrados foliares, donde se neutraliza el 99 % de los H^+ que pueden ser disociados de malato (Nobel, 1988), y hasta pH 8.4, donde se neutralizan los protones de los tres grupos carboxilo del citrato (Franco *et al.*, 1990).

Haciendo cursos diarios del intercambio gaseoso en hojas, con la utilización de un analizador infra rojo de gases (IRGA), pueden medirse la tasa de asimilación de CO_2 y la tasa de respiración y así determinar cuando la planta realice fijación nocturna de CO_2 .

La morfología y anatomía de las hojas son afectadas por el estrés salino (Parida *et al.*, 2004), desarrollándose modificaciones tales como el engrosamiento e incremento de la succulencia de las hojas de las plantas que crecen en zonas salinas respecto a las que crecen en suelos libres de sal (Gates, 1972).

El ajuste osmótico (AO) es un mecanismo empleado por algunas plantas para disminuir el potencial osmótico foliar (ψ_s) e incrementar el potencial de turgencia frente a condiciones de déficit hídrico (Munns y Tester, 2008). Algunas especies, como por ejemplo *Nicotiana glauca*, realizan AO frente a condiciones de salinidad (González *et al.*, 2012). Las plantas de *T. triangulare* realizaron AO frente a condiciones de sequía durante el CAM inducido (Herrera *et al.*, 2015).

Talinum triangulare Jacq. Wild. [sin. *Talinum fruticosum* (L.) Juss.] (Talinaceae), una hierba perenne terrestre pantropical, crece en Venezuela desde el nivel del mar hasta una altitud de 300 m en la zona costera norte. Las plantas son de unos 50 cm de alto, tienen tallos lignificados y hojas que senescen y caen después de aproximadamente dos meses de sequía. Han sido bien caracterizadas la inducción del CAM por sequía en plantas de *T. triangulare* (Herrera *et al.*, 1991; Herrera *et al.*, 2015), así como también su capacidad para tolerar hasta 560 mM NaCl y modificaciones en caracteres morfoanatómicos tales como el aumento de la succulencia foliar, variaciones en el área foliar y cambios en el tamaño general de la planta (Bamidele *et al.*, 2007).

Para estudiar si ocurre inducción del CAM por salinidad en plantas de *T. triangulare* se debe estimar si las plantas realizan acumulación nocturna de ácidos y/o apertura estomática nocturna al ser sometidas a salinidad.

T. triangulare (water leaf, verdolaga de cabra) es un vegetal no convencional consumido en pequeña proporción en Venezuela y Colombia, y de manera intensa en Nigeria, donde se encuentra disponible para la venta en mercados urbanos y múltiples áreas en los alrededores de las ciudades; en ese país es extensamente cultivado en suelos áridos compuestos principalmente de arena (Ukpong y Moses, 2001). Nutricionalmente se ha probado que es un vegetal con alto contenido de proteínas crudas (22 %), cenizas (34 %) y fibra cruda (11 %); también se le adjudican propiedades medicinales. Su demanda se encuentra en aumento y por ende incrementa su cultivo, sobre todo por parte de los pequeños productores locales (Enete y Okon, 2010). Estas características del cultivo, unidas a la predicción de aridificación y salinización que sufrirán zonas de la Tierra por el cambio global, introducen un carácter aplicado a la investigación propuesta aquí.

En este trabajo se propone determinar la inducción del CAM por salinidad en plantas de *T. triangulare*. Se harán determinaciones de los posibles cambios en ΔH^+ , el intercambio gaseoso diario, variables de relaciones hídricas, pigmentos fotosintéticos, variables de crecimiento y variables anatómicas foliares.

Objetivos

General:

Determinar el efecto de la salinidad del suelo sobre la expresión CAM en plantas de *Talinum triangulare*.

Específicos: Determinar en condiciones de salinidad

1. La acumulación de ácidos orgánicos
2. El intercambio gaseoso
3. La concentración de pigmentos fotosintéticos y la succulencia
4. Relaciones hídricas y el posible ajuste osmótico
5. Variables de crecimiento
6. Cambios en la anatomía foliar

Materiales y métodos

Material biológico y condiciones de crecimiento de las plantas

Se tomaron 25 plantas adultas de *T. triangulare*, similares en altura y follaje, mantenidas en el invernadero del Instituto de Biología Experimental (IBE) de Caracas en macetas de 6 L con 5 Kg de tierra abonada comercial. Las plantas estuvieron por dos meses en el invernadero, donde fueron regadas interdiariamente con agua corriente y semanalmente con solución nutritiva (1 g L⁻¹ Fertilizante Soluble Campos Green Multi-Plants-18-18-18, Inversiones Green Valley C.A., Venezuela). Luego se tomaron cinco plantas para cada tratamiento donde se regaron interdiariamente por veintidós días unas con agua corriente (control), otras con NaCl 150 mM, otras con NaCl 300 mM y otras con NaCl 400 mM. Cinco plantas fueron sometidas a sequía. A todas excepto las plantas en sequía se les agregó una vez por semana solución nutritiva.

Variables microclimáticas dentro del invernadero

Se midió DFF con un sensor cuántico 190-S conectado a un medidor LI-185 (LI-COR Inc., Lincoln, NE). La temperatura del aire y la humedad relativa fueron medidas con dos data loggers HOBO PRO V2 y se transfirió la información a la computadora con un HOBO Waterproof Shuttle (Onset Computer Corporation, Pocasset, MA).

Determinación alométrica del área foliar

Se midió el largo por el ancho de 20 hojas. Se hicieron siluetas de las hojas en papel y se pesaron. Se tomó el peso de un círculo de papel con radio de 1 cm para relacionar su área con el área de las hojas. Se calculó el área foliar a través de la ecuación de la regresión área calculada v. área medida.

Curso de descarboxilación

Para determinar la hora de la mañana en que se obtenía el mayor contenido de H⁺ se midió la concentración de ácidos en hojas de plantas sometidas a siete días de sequía cada hora desde las 07:20 hasta las 11:20 h.

Acumulación nocturna de ácidos

Cada siete días se tomaron dos hojas por planta, una en la mañana y otra en la tarde. Se determinó la masa fresca (MF) y se midieron el largo y el ancho para calcular el área foliar utilizando la relación alométrica calculada previamente. Cada muestra se cortó en pequeños segmentos que se hirvieron en 20 mL de agua destilada contenida en un vaso de precipitado

de 50 mL por 1 min en un horno microondas a su máxima potencia. Se colaron los residuos de hojas y se realizaron titulaciones de las soluciones resultantes con KOH 10 mM hasta pH 7.0 y 8.4 medido en un pHmetro Orion (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA).

Intercambio gaseoso

Se midió en hojas intactas la tasa de asimilación (P_N) con un IRGA de CO₂ y H₂O CIRAS 2 conectado a una cámara de asimilación PLC (B) (PP Systems Inc., Amesbury, MA). Se utilizó CO₂ ambiental, correspondiente a $403 \pm 1 \mu\text{mol mol}^{-1}$ y DFF $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante el día. Se realizaron cursos de 24 horas con mediciones cada 30 minutos, en una hoja por planta por cada tratamiento.

Contenido de pigmentos foliares

El contenido de clorofila y carotenoides se determinó en extractos etanólicos según Wellburn (1994). Se colocó un disco de hoja de cada planta en 2 ml de etanol 90% por tres días a 4 °C y luego se midió la absorbancia de la solución en un espectrofotómetro a λ 470, 649 y 665 nm.

Suculencia

Se determinó MF de las hojas y se estimó su área. Las hojas se secaron por 48 h a 60 °C para determinar la masa seca (MS). El contenido de agua foliar se calculó como $\text{CAF} = 1000 \times (\text{MF} - \text{MS}) / \text{área} \text{ (mg cm}^{-2}\text{)}$. El índice de suculencia mesofilar se calculó como $S_m = \text{g agua mg}^{-1} \text{ clorofila total}$.

Relaciones hídricas

El potencial hídrico (ψ) se midió colocando discos foliares tomados entre las 08:00 y 09:00 h (am) y entre las 11:30 y 12:30 h (md) en cámaras C-52 conectadas a un micro-voltímetro HR-33T (Wescor Inc., Logan, UT) operado en el modo psicrométrico. Los discos de hojas con los que se midió ψ fueron mantenidos a -20 °C por 48 horas y medidos nuevamente sin descongelar para determinar ψ_s . El AO se calculó al final del experimento en plantas sin rehidratar como $\text{AO} = \psi_s \text{ control} - \psi_s \text{ sal}$.

Variables de crecimiento

A los veintidós días del experimento se cosecharon las plantas, se cuantificó la masa seca de las diferentes estructuras de la planta divididas en tallo, raíz, hojas y estructuras reproductivas. Se calculó la relación raíz/vástago (R/V) y el esfuerzo reproductivo (ER) como $\text{ER} = 100 \times \text{MS estructuras reproductivas} / \text{MS hojas}$

Anatomía foliar

Se midió el grosor de los diferentes tejidos foliares en cortes transversales a mano alzada de muestras mantenidas en formol:acético:agua. Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina y fotografiados al microscopio a un aumento de 100x. Las mediciones se hicieron usando el programa ImageJ. Se calculó la densidad estomática (DE) y el índice estomático (IE) como:

$$DE=100x \text{ estomas/área}$$

$$IE=100x \text{ estomas/células de la epidermis}$$

Resultados

Variables microclimáticas dentro del invernadero

Los valores mínimos y máximos de temperatura del aire y humedad relativa fueron $15\pm 2/34\pm 2$ °C, y $45\pm 4/83\pm 2$ %, respectivamente. El valor máximo de DFF fue de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Determinación alométrica del área foliar

De la regresión lineal se obtuvo la curva (Fig. 1) de donde se tomaron los valores de la intersección entre los ejes y el coeficiente para realizar los cálculos de área foliar. Para calcular el área foliar se utilizó la fórmula:

$$\text{Área}=\text{intersección en y} + \text{largo medido} \times \text{ancho medido} \times \text{pendiente.}$$

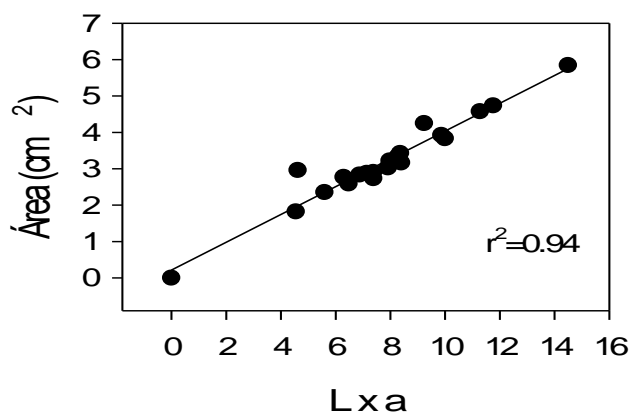


Fig. 1. Regresión lineal de la calibración del área foliar para hojas de *Talinum tiangulare*.

Curso de descarboxilación

Entre las 08:00 y 10:00 h se encontró la mayor cantidad de H^+ correspondientes a malato, mientras que no hay diferencias significativas en el contenido correspondiente a citrato (Fig. 2). Con base en estos resultados se decidió tomar las muestras a las 08:00 y las 16:00 h.

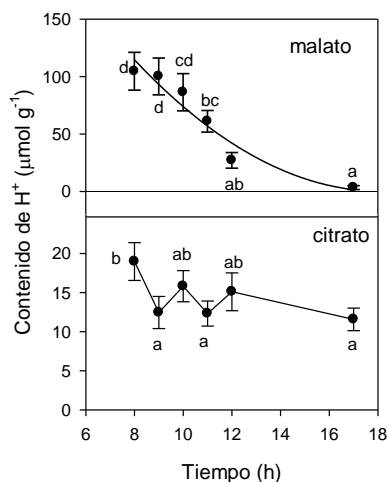


Fig. 2. Cambios diurnos en el contenido de H^+ correspondientes a malato y citrato en hojas de *T. triangulare* después de seis días de sequía. Donde $n=5$ y los valores son media±ES. Letras distintas indican diferencias significativas determinadas a través de una ANOVA de una vía.

Acumulación nocturna de ácidos

Las plantas sometidas a NaCl 300 mM realizaron acumulación nocturna de malato de manera significativa respecto al control los días 10 y 15 de tratamiento; en el resto de los tratamientos de salinidad se observó acumulación nocturna de malato sin diferencias significativas respecto al control (Fig. 3). A ninguna salinidad hubo diferencias significativas durante el tratamiento en el contenido de citrato am y pm respecto al control, ni tampoco hubo cambios significativos en ΔH^+ citrato. Las plantas sometidas a sequía acumularon malato en la noche de manera significativa respecto al control los días 9 y 15 de sequía. No se encontraron diferencias en el contenido de citrato en plantas de sequía respecto al control (Fig. 3).

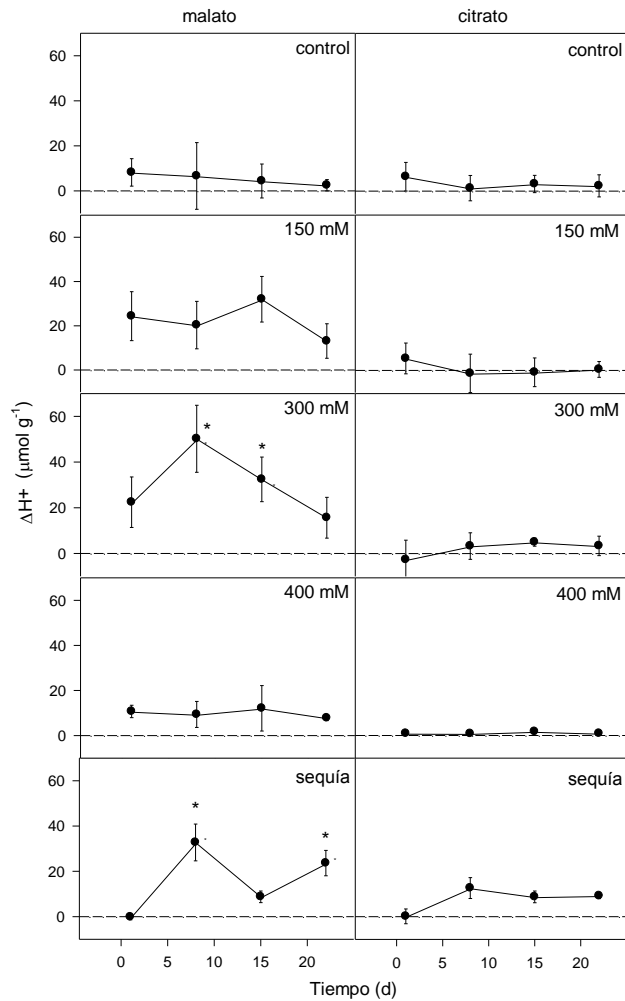


Fig. 3. Cambios en el tiempo en la acumulación nocturna de ácidos en hojas de *T. triangulare* sometidas a riego con NaCl 0 (control), 150, 300 y 400 mM, y a sequía. Los valores son media \pm ES (n=5). Los asteriscos indican diferencias significativas determinadas a través de una ANOVA de una vía.

Intercambio gaseoso

La mayor P_N se midió en las plantas control y en las plantas regadas con NaCl 150 mM, en las cuales incrementó P_N con el tiempo bajo tratamiento (Fig. 4). En las plantas regadas con NaCl 150 mM por 21 días hubo compensación nocturna de CO_2 . En las plantas regadas con solución 300 mM y 400 mM, P_N disminuyó en el tiempo y encontró compensación en la noche (Fig. 4).

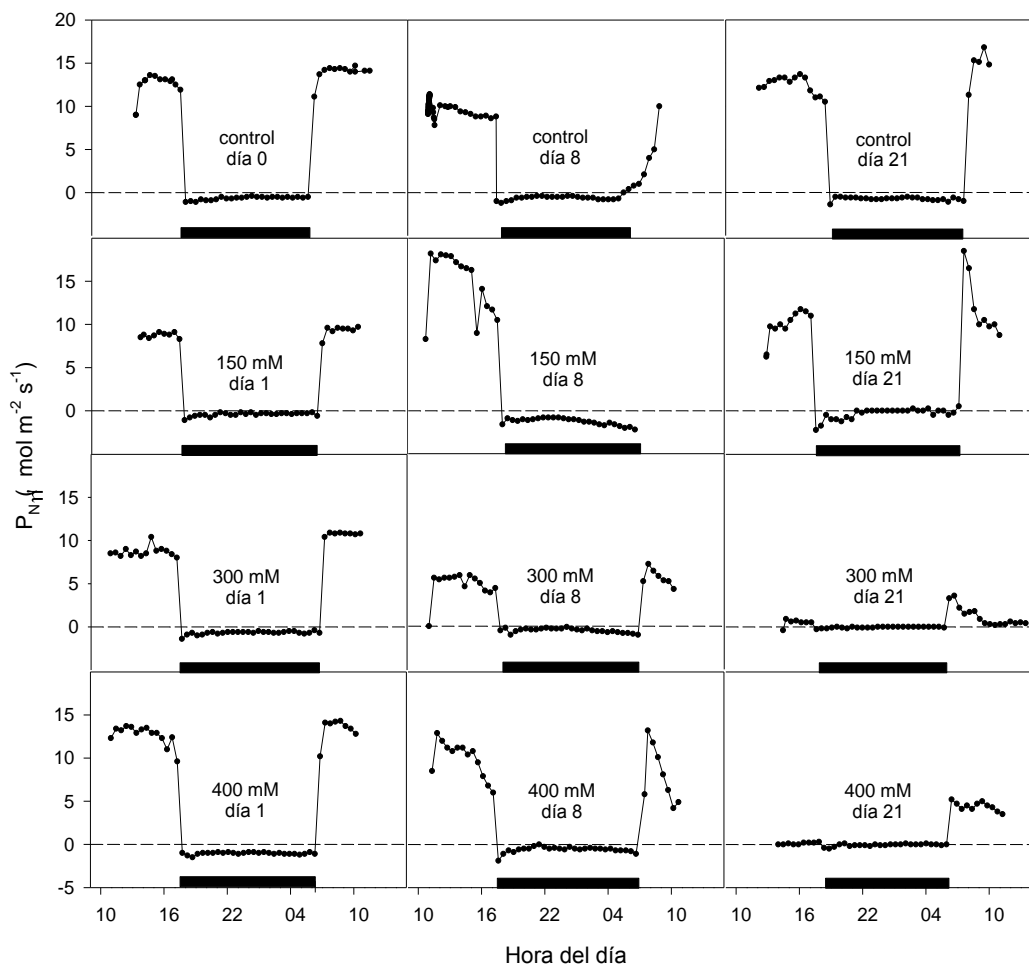


Fig. 4. Cambios en el tiempo en los cursos diarios de intercambio de CO_2 en plantas de *T. triangulare* sometidas a riego con NaCl 0 (control), 150, 300 y 400 mM.

Contenido de pigmentos foliares

La Fig. 5 muestra los cambios con cada tratamiento en el contenido de los pigmentos fotosintéticos. No hubo diferencias significativas entre el contenido de clorofila total al final del experimento en las plantas expuestas a salinidad respecto al control; en el control y todas las salinidades esta variable disminuyó ligeramente. La relación clorofila a/b aumentó ligeramente en el control, en NaCl 150 y 300 mM, y más marcadamente en 400 mM. El contenido de carotenoides no se vio afectado ni por el tratamiento ni por la duración de éste, mientras que la relación clorofila total/carotenoides tuvo una pequeña disminución a todas las [NaCl] menos 400 mM, cuando la disminución fue más marcada.

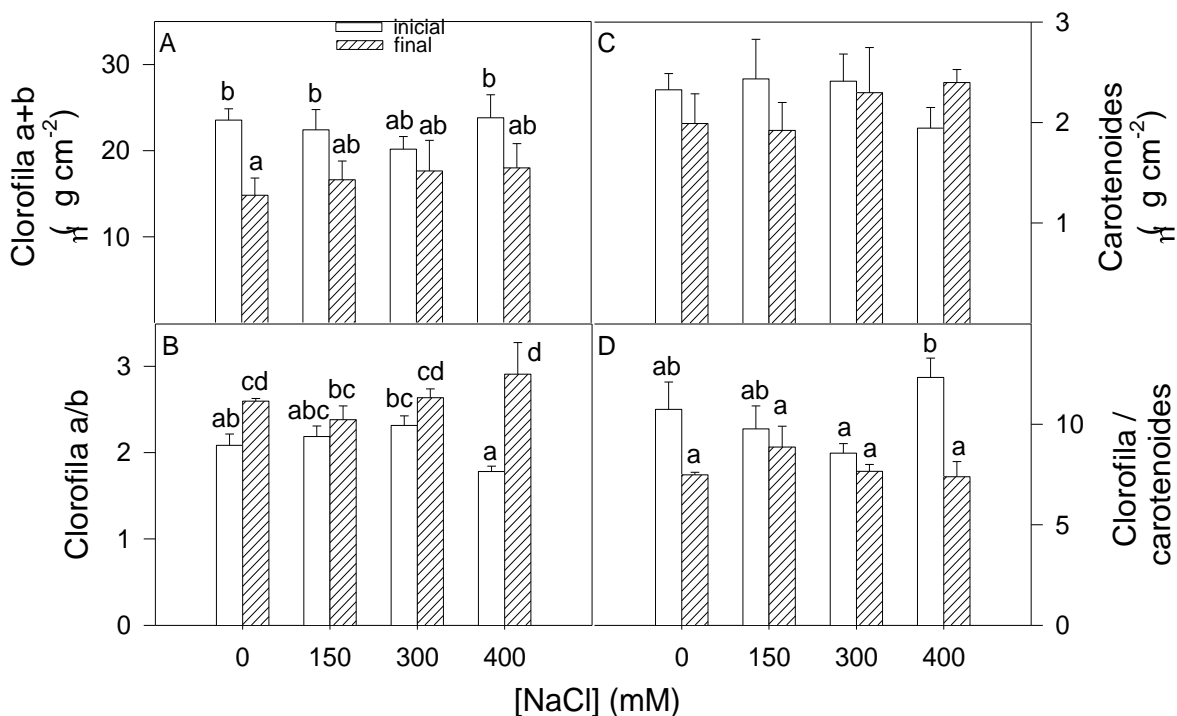


Fig. 5. Cambios en el tiempo en el contenido de pigmentos en hojas de *T. triangulare* sometidas a riego con NaCl 0 (control), 150, 300 y 400 mM (símbolos en la leyenda inserta). Los valores son media \pm ES (n=5). Las letras indican diferencias significativas determinadas a través de una ANOVA de dos vías (tiempo v. tratamiento) ($p < 0.05$).

Suculencia

En las plantas regadas con NaCl 300 mM el valor del CAF incrementó significativamente al final del experimento, mientras que el resto de los tratamientos no ocasionaron diferencias significativas en el CAF después de 22 días de tratamiento. El valor de S_m incrementó al final del experimento en las plantas control y en las regadas con NaCl 150 y 300 mM, mientras que se mantuvo igual que al inicio a los 22 días de riego con NaCl 400 mM.

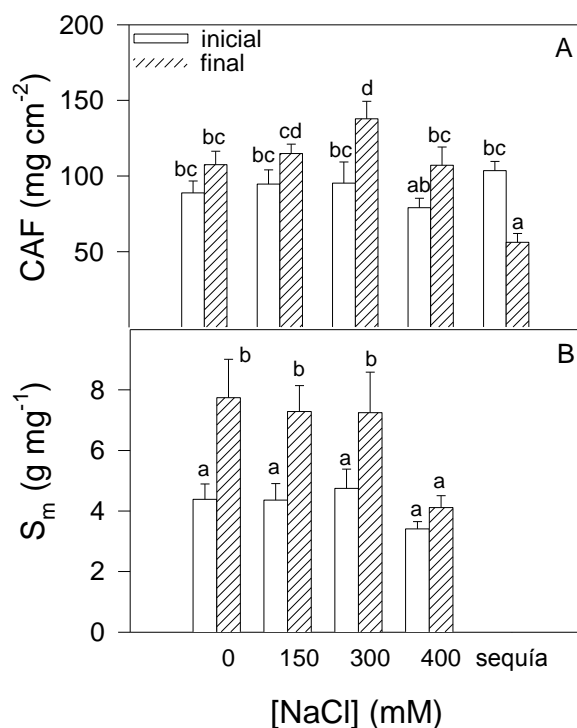


Fig. 6. Cambios en el tiempo en: A, el contenido de agua foliar y B, el índice de succulencia mesofilar de plantas de *T. triangulare* sometidas a riego con NaCl 0 (control), 150, 300 y 400 mM (símbolos en la leyenda inserta) y a sequía. Los valores son media \pm ES (n=5). Las letras indican diferencias significativas determinadas a través de una ANOVA de dos vías (tiempo v. tratamiento; p<0.05).

Relaciones hídricas

No se encontraron diferencias significativas entre el ψ y ψ_s medidos en la mañana respecto al mediodía. Para el día 20 de experimento las plantas expuestas a NaCl 150 mM tuvieron valores de ψ y ψ_s significativamente menores a los encontrados en las plantas control durante la mañana, mientras que a mediodía no hubo diferencias significativas. A los 20 días de tratamiento con NaCl 300 mM los valores de ψ y ψ_s fueron significativamente menores a los reportados para las plantas control tanto en la mañana como al mediodía, hecho que sucedió de igual manera para las plantas sometidas a 20 días de tratamiento con NaCl 400 mM a excepción del ψ_s medido para el mediodía, donde no hubo diferencia respecto al control.

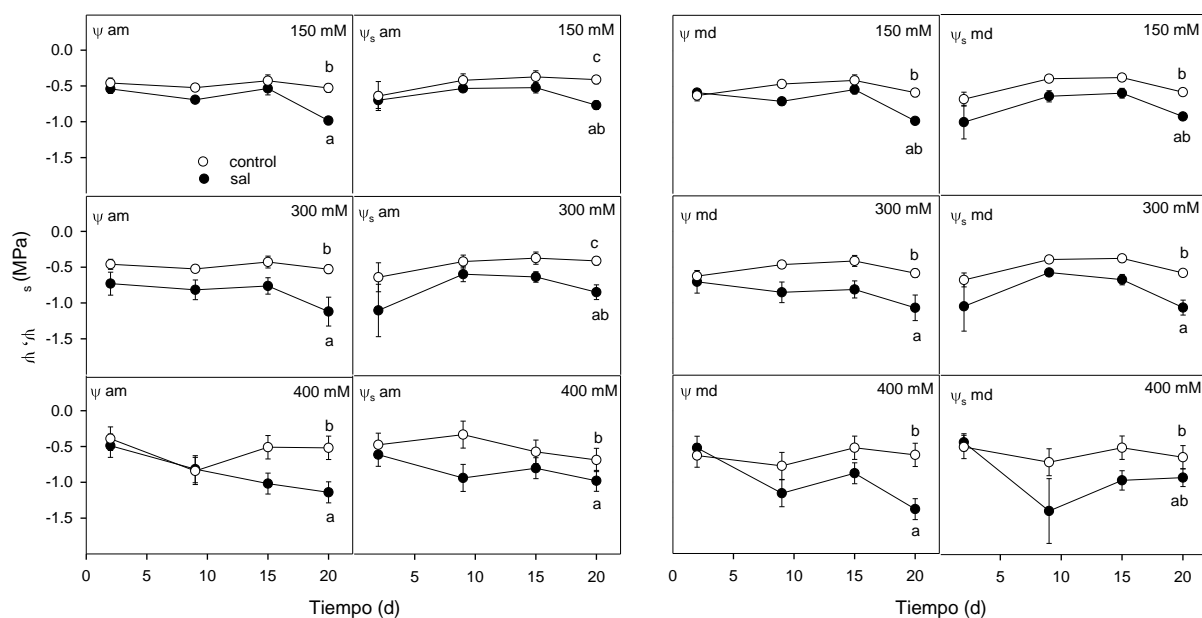


Fig. 7. Cambios en el tiempo en el potencial hídrico y osmótico de la mañana y el mediodía en hojas de *T. triangulare* sometidas a riego con NaCl 0 (control), 150, 300 y 400 mM. Círculos blancos, control; círculos negros, salinidad. Los valores son media \pm ES (n=5). Las letras indican diferencias significativas determinadas a través de una ANOVA de una vía (control v. tratamiento; $p < 0.05$).

No hubo diferencias significativas en el AO calculado el día 20 con valores de ψ am y ψ md entre los tres tratamientos de salinidad, con un valor promedio de 0.60 ± 0.08 MPa.

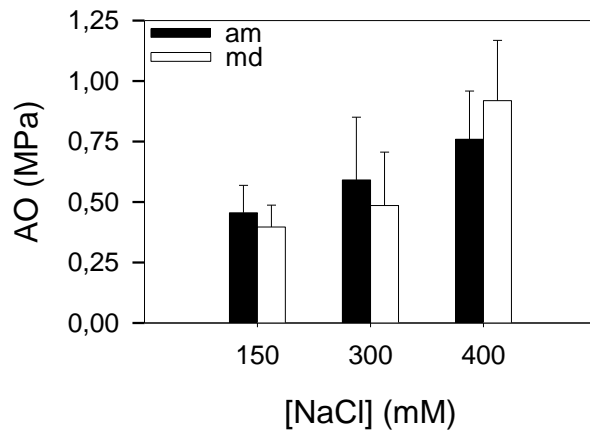


Fig. 8. Cambios con la salinidad en el ajuste osmótico calculado en la mañana (barras negras) y a mediodía (barras blancas) en hojas de *T. triangulare* para el día 20 de tratamiento con NaCl 150, 300 y 400 mM. Los valores son media \pm ES (n=5).

El porcentaje de contribución a ψ_s de malato y citrato en el final del experimento fue igual para las plantas control y todos los tratamientos de salinidad a excepción de las plantas regadas con solución NaCl 400 mM, cuyo porcentaje de contribución tanto de malato como de citrato incrementó significativamente. Sin embargo, el mayor porcentaje calculado, que fue en las plantas regadas con NaCl 400 mM, fue menor del 1.5 %.

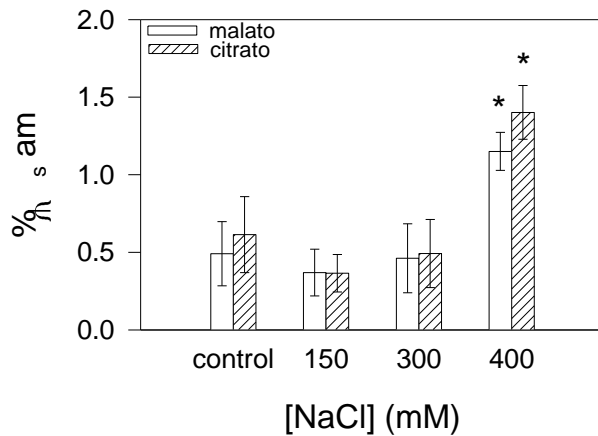


Fig. 9. Cambios con la salinidad en la proporción de contribución de malato (barras blancas) y citrato (barras rayadas) en el ajuste osmótico realizado por hojas de *T. triangulare* a los 22 días de tratamiento con soluciones NaCl 0 (control), 150, 300 y 400 mM. Los valores son media±ES (n=5). Los asteriscos indican diferencias significativas determinadas a través de una ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

Análisis de crecimiento

Después de 22 días de experimento únicamente las plantas regadas con solución NaCl 400 mM mostraron una reducción significativa en el valor correspondiente a los tallos, a las estructuras reproductivas y al ER respecto a las plantas control. El resto de los tratamientos no produjo diferencias en la distribución de biomasa, R/V ni ER.

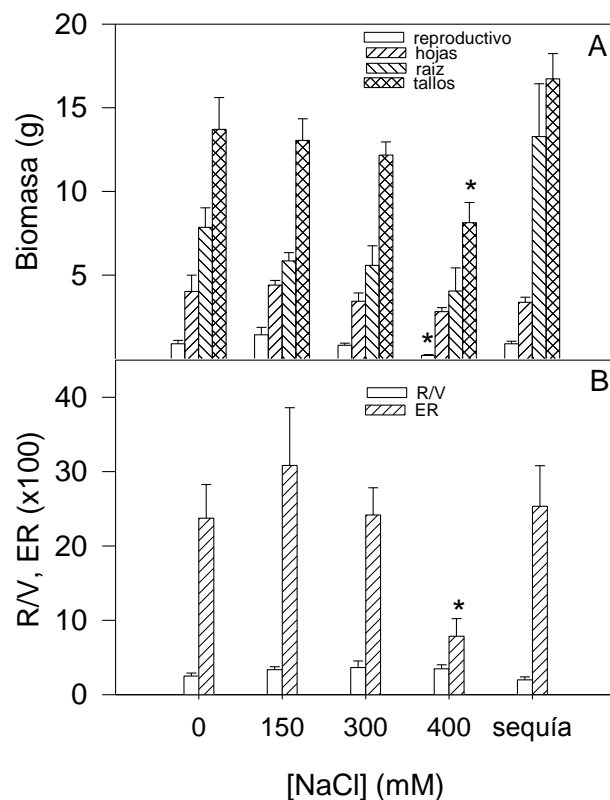


Fig. 11. Cambios con la [NaCl] de la solución de riego y con la sequía en: A, la distribución de biomasa (símbolos en la leyenda inserta) y B, la relación vástago/raíz y el esfuerzo reproductivo en plantas de *T. triangulare* sometidas a tratamiento por 22 días. Los valores son media \pm ES (n=5). Los asteriscos indican diferencias significativas determinadas a través de una ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

Anatomía foliar

No hubo diferencias significativas al final del experimento en DE de la cara abaxial entre las plantas control y las sometidas a tratamientos salinos; la DE de la cara adaxial fue inferior a la de la abaxial y sufrió leves cambios con el tratamiento, presentándose el mayor valor en el tratamiento con NaCl 150 mM (Fig. 12). Al final del experimento, el IE de ambas caras de las plantas sometidas a tratamientos salinos se mantuvo en general igual que al inicio, excepto por un incremento significativo respecto al resto en las plantas control (Fig. 12). Hubo variaciones significativas en los valores de IE de la cara abaxial dadas por, el tratamiento, el tiempo y la interacción, y en la cara adaxial por el tratamiento y la interacción con el tiempo.

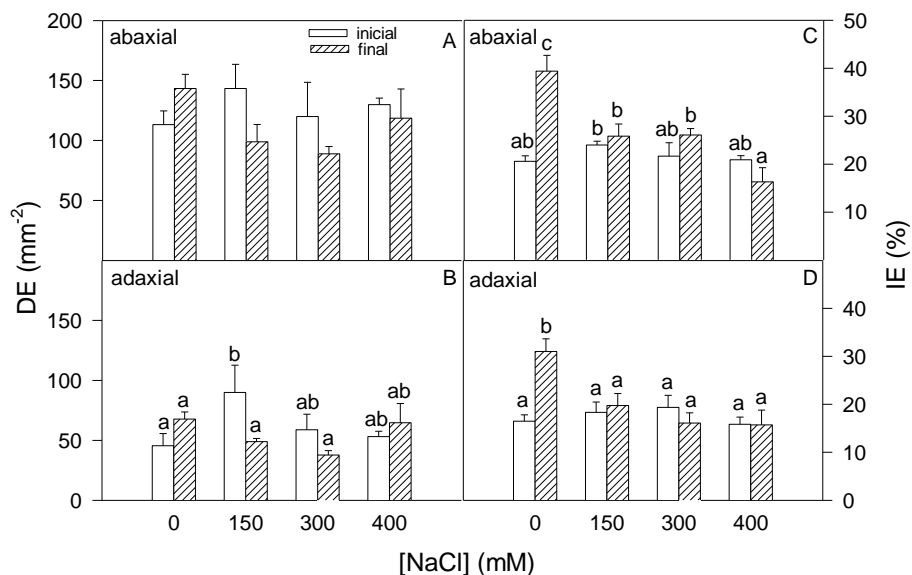


Fig. 12. Cambios en la densidad estomática y el índice estomático calculados para ambas caras de hojas de *T. triangulare* después de 22 días de tratamiento con NaCl 0 (control), 150, 300 y 400 mM. Barras vacías, inicio; barras rayadas, final. Los valores son media±ES (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas determinadas a través de una ANOVA de dos vías (tratamiento v. tiempo; $p < 0.05$).

Como se indica en la Tabla 1, el riego con NaCl 150 y 300 mM produjo un incremento significativo en el grosor de la hoja entera, en el grosor del parénquima empalizada y en el grosor del parénquima esponjoso al final del experimento, mientras que las hojas del control y las regadas con NaCl 400 mM permanecieron igual al inicio y al final; sin embargo, solo las plantas regadas con NaCl 300 mM tuvieron diferencias significativas al final del experimento respecto al control en cuanto al grosor de la hoja entera. Tanto la epidermis superior como la inferior siempre se mantuvieron iguales para todos los tratamientos al inicio y al final. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo en el grosor del parénquima empalizada entre las plantas sometidas a salinidad respecto al control. Tanto la epidermis superior como la inferior se mantuvieron iguales para todos los tratamientos al inicio y al final de los experimentos, así como tampoco cambió el número de células ni del parénquima empalizada ni del esponjoso. Hubo diferencias significativas debidas al tratamiento, el tiempo y la interacción en el grosor de la hoja entera, el parénquima empalizada y el parénquima esponjoso.

Tabla 1. Cambios en el tiempo bajo tratamiento con soluciones de diferente concentración de NaCl en variables anatómicas foliares de plantas de *T. triangulare*. Los valores son media±ES (n=5). Letras diferentes indican diferencias significativas después de una ANOVA de dos vías (tiempo x tratamiento).

	[NaCl] (mM)								p
	0		150		300		400		
Grosor del tejido	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final	
hoja entera	755±92abc	771±58bc	569±69a	927±32cd	624±50ab	971±76d	566±35ab	643±70ab	0.016
epidermis superior	37±4a	37±1a	32±2a	37±6a	30±2a	30±3a	29±3a	33±5a	0.916
parénquima en empalizada	362±45ab	372±39ab	268±39ab	477±17ab	288±31ab	465±35b	271±20ab	297±48a	0.015
parénquima esponjoso	314±50ab	316±19ab	247±40a	373±16bc	275±23a	451±41c	225±13a	273±21a	0.036
epidermis inferior	29±4a	35±2b	19±2a	26±3ab	22±1a	25±4a	28±3ab	28±4ab	0.655
Número de células									
parénquima en empalizada	4ab	4ab	4ab	4ab	4ab	4b	3ab	3a	0.557
parénquima esponjoso	4ab	4ab	4a	5ab	4ab	5b	5ab	5b	0.436

Se indica el valor de p para la interacción tiempo x tratamiento. En negritas, valores de p<0.05.

Discusión

Las plantas de *T. triangulare* toleraron el tratamiento con NaCl hasta 300 mM, mientras que el tratamiento con NaCl 400 mM hizo disminuir la tasa fotosintética, el crecimiento y el esfuerzo reproductivo. Bajo tratamiento con NaCl 300 mM las plantas presentaron una acumulación nocturna de malato significativamente mayor que el control, lo cual es evidencia de la operación del CAM.

El riego con NaCl 300 mM indujo la acumulación nocturna de malato respecto al control, acumulando el día 9 de tratamiento $50 \pm 15 \mu\text{mol H}^+ \text{g}^{-1}$, incluso en mayor medida que las plantas sometidas a sequía, las cuales el día 9 acumularon $33 \pm 8 \mu\text{mol g}^{-1}$, ambos valores representativos de plantas CAM. Los mayores valores de ΔH^+ malato previamente encontrados en *T. triangulare* fueron 80-100 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Herrera *et al.*, 1991; Taisma y Herrera, 1998; Herrera, 1999).

Que haya sido el día 9 donde se encontró mayor ΔH^+ malato entra dentro del periodo de tiempo descrito como necesario para la inducción del CAM por salinidad, correspondiente a entre una y dos semanas (Lüttge, 1993). La planta CAM inducible *M. crystallinum* a los diez días de tratamiento con NaCl 400 mM tuvo un ΔH^+ (malato) de aproximadamente 120 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (recalculado de Broetto *et al.*, 2007). El retraso en la inducción del CAM sugiere que es una adaptación a largo plazo para la disponibilidad de agua reducida asociada a la salinidad, pero no un mecanismo para tolerar propiamente en los tejidos altos niveles de sal (Lüttge, 1993).

La sal no ocasionó en las plantas de *T. triangulare* una disminución en P_N sino a partir de NaCl 300 mM, concentración que generó un incremento en los valores de CAF y S_m , así como valores de ΔH^+ malato mayores que en el control. Las plantas sometidas a NaCl 300 mM fueron también las que realizaron más compensación nocturna de CO_2 .

El aumento en CAF se correlacionó con un aumento en el grosor de la hoja y del parénquima esponjoso en las plantas bajo riego con NaCl 300 mM, tal y como se encontró en plantas de *Nicotiana glauca* sometidas a salinidad (González *et al.*, 2012).

Según Herrera *et al.* (2015), los cambios en ΔH^+ observados en plantas de *T. triangulare* sometidas a sequía no fueron causados por cambios en la succulencia foliar, ya que ésta no varió. En el presente estudio, sin embargo, se obtuvo una disminución significativa en CAF de las plantas sometidas a 22 días de sequía. El valor de S_m en plantas

control fue de 3.4 g mg^{-1} , similar al hallado en plantas regadas de *T. paniculatum* (3.4 g mg^{-1} ; Güerere *et al.*, 1996), típico de plantas CAM (Kluge y Ting, 1978). El valor de S_m en plantas de *T. triangulare* aumentó con la salinidad hasta 7.7 g mg^{-1} , en el caso de NaCl 300 mM debido no a una disminución en el contenido de clorofila sino a un aumento del CAF; sin embargo, el incremento en S_m estuvo asociado a un mayor ΔH^+ solo en el caso de 300 mM.

El contenido total de clorofilas disminuyó al finalizar el experimento en el control probablemente debido a no haberse cubierto las altas demandas de nitrógeno que se sabe por experiencias previas que presentan estas plantas, ya que solo se regó una vez por semana con fertilizante. La salinidad no alteró el contenido de clorofilas, así como tampoco lo hizo la sequía, donde la relación clorofila a/b y la cantidad de clorofila total no varió después de 24 días de sequía respecto al control (Herrera *et al.*, 1991). En hojas de *T. paniculatum* tampoco varió la clorofila total frente a 23 días de sequía (Güerere *et al.*, 1996) ni frente a tratamientos salinos con NaCl 20, 50 y 100 mM respecto al control, pero incrementó las clorofilas totales al regar con NaCl 200 y 300 mM (Assaha *et al.*, 2017). Por el contrario, en plantas de *Zygophyllum xanthoxylum* la salinidad incrementó el contenido de clorofilas (Ma *et al.*, 2011).

El AO máximo encontrado en plantas bajo NaCl 400 mM al mediodía fue de $0.92 \pm 0.25 \text{ MPa}$, valor similar al encontrado en el mangle *Avicennia germinans*, cuando la salinidad ocasionó un ajuste osmótico, medido con valores de ψ_s a turgencia total, de 1.2 MPa (Suárez y Sobrado, 2000). El promedio del AO realizado por plantas de *T. triangulare* al final del experimento en las tres salinidades fue mayor que los valores reportados en plantas de *T. triangulare* después de 27 días de sequía ($0.49 \pm 0.10 \text{ MPa}$; Herrera *et al.*, 2015). En plantas de *N. glauca* AO fue mayor bajo salinidad que en condiciones de sequía (González *et al.*, 2012). Después de 15 días de tratamientos salinos, las plantas de *Lycium nodosum* mostraron valores de AO correspondientes a 0.94 MPa (Tezara *et al.*, 2003) y P_N se mantuvo constante, apoyando la hipótesis de que el AO contribuye al mantenimiento de la actividad fotosintética (Munns y Tester, 2008).

Ya que el porcentaje de contribución de malato y citrato a AO en la mañana fue siempre menor del 1.5 % para todos los tratamientos, y que los valores de AO encontrados al mediodía, cuando no hay ácidos en las hojas, fueron iguales a los de la mañana, se

concluye que el AO no viene dado por la acumulación nocturna de ácidos sino por otros solutos, como lo pueden ser NaCl o azúcares acumulados en la vacuola. En plantas de *T. paniculatum* la acumulación de prolina fue el principal soluto responsable del AO en plantas regadas con NaCl 100, 200 y 300 mM (Assaha *et al.*, 2017), donde la sal se acumuló principalmente en la raíz, no en las hojas, caso que pudiera estar ocurriendo en las plantas de *T. triangulare* debido al hábito similar entre ambas plantas. Para esclarecer cuál soluto es el responsable del AO en plantas de *T. triangulare* se necesita determinar la concentración de Na⁺ y azúcares en las diferentes partes de la planta.

La ausencia de diferencias en ψ o ψ_s , sean am o md, entre plantas sometidas a las diferentes salinidades sugiere que no fueron cambios en el estado hídrico de las hojas lo que indujo el CAM bajo NaCl 300 mM. Esto concuerda con lo reportado en plantas de *T. triangulare* sometidas a sequía (Herrera *et al.*, 2015), en las cuales el potencial de turgencia no fue distinto entre plantas regadas y plantas en sequía. En plantas de la especie CAM inducible *Guzmania monostachia*, solo la región foliar apical realizó CAM en sequía, a pesar de que no se encontró reducción en el contenido relativo de agua respecto a la misma región de las hojas de plantas regadas que solo realizaron fotosíntesis C₃ (Freschi *et al.*, 2010).

El riego con NaCl 400 mM produjo en *T. triangulare* una disminución significativa únicamente en la biomasa del tallo respecto al control, hecho reportado también para plantas de *T. paniculatum*, en las que NaCl 300 mM produjo una reducción del 53 % en la biomasa del tallo (Assaha *et al.*, 2017). Contrario al caso de *T. paniculatum*, la biomasa de ninguno de los otros órganos en *T. triangulare* se vio afectada por ninguna de las salinidades.

El hecho de que el IE se mantuviera igual al inicio y al final del experimento en todas las plantas sometidas a tratamientos salinos implica que el desarrollo de estomas pudo haber estado inhibido, ya que las plantas control mostraron un mayor IE al final del experimento que al inicio. La reducción por sal del IE tanto en la cara adaxial como la abaxial de hojas de *Solanum pennellii* respecto al control fue interpretada como una medida para reducir la pérdida de agua (Albaladejo *et al.*, 2017).

Conclusiones

1. Las plantas de *T. triangulare* toleraron el tratamiento con NaCl hasta 300 mM, mientras que el tratamiento con NaCl 400 mM hizo disminuir la tasa fotosintética, el crecimiento y el esfuerzo reproductivo.
2. Bajo tratamientos con NaCl 300 mM las plantas presentaron una acumulación nocturna de malato significativamente mayor que las plantas control, lo cual es evidencia de la operación del CAM en la modalidad reciclante.
3. La inducción del CAM por salinidad no tuvo una relación obvia con el estado hídrico de la hoja, el cual fue similar entre las diferentes salinidades, aunque inferior al control.
4. El riego con soluciones salinas indujo en *T. triangulare* una importante realización de ajuste osmótico.

Bibliografía

- Albaladejo, I., Meco, C., Plascencia, F., Flores, F., Bolarin, M., Egea, I. 2017. Unravelling the strategies used by the wild tomato species *Solanum pennellii* to confront salt stress: from leaf anatomical adaptations to molecular responses. *Environmental and Experimental Botany* 135: 1-12.
- Assaha, D., Mekawy, A., Liu, L. Noori, M., Kokulan, K. Ueda, A., Nagaoka, T., Saneoka, H. 2017. Na⁺ retention in the root is a key adaptive mechanism to low and high salinity in the glycophyte, *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. (Portulacaceae). *Journal of Agronomy and Crop Science* 203: 56-67.
- Bamidele, J.F., Egharevba, R.K.A., Okpoh, I.M. 2007. Physiological changes in seedlings of *Talinum triangulare* (water leaf) grown in saline conditions. *Assian Journal of Plant Sciences* 6: 56-60.
- Bloom, A. 1979. Salt requirement for crassulacean acid metabolism in the annual succulent, *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology* 63: 749-753.
- Broetto, F., Monteroi, H., Luttge, U. 2007. Responses of chlorophyll fluorescence parameters of the facultative halophyte and C3-CAM intermediate species *Mesembryanthemum crystallinum* to salinity and high irradiance stress. *Journal of*

- Plant Physiology. 164: 904-912.
- Cushman, J.C. 2001. Crassulacean acid metabolism: a plastic photosynthetic adaption to arid environments. *Plant Physiology* 127: 1439-1448.
- Enete, A., Okon, U. 2010. Economics of waterleaf (*Talinum triangulare*) production in Akwa Ibom state, Nigeria. *Field Actions Science Reports*. Vol. 4. <http://factsreports.revues.org/438>.
- Franco, A.C., Ball, E., Lüttge U. 1990. Patterns of gas exchange and organic acid oscillations in tropical trees of the genus *Clusia*. *Oecologia* 85: 108-114.
- Freschi, L., Takahashi, C.A., Cambui, C.A., Semprebom, T.R., Cruz, A.B., Miotto, P. 2010. Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *Journal of Plant Physiology* 167: 526-33.
- Gates, C. T. 1972. Ecological responses of the Australian native species *Acacia harpophylla* and *Atriplex nummularia* to soil salinity: effects on cation content, leaf area, and transpiration rate. *Australian Journal of Botany* 20: 261-272.
- González, A., Tezara, W., Rengifo, E., Herrera, A. 2012. Ecophysiological responses to drought and salinity in the cosmopolitan invader *Nicotiana glauca*. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 24: 212-222.
- Güerere, I., Tezara, W., Herrera, C., Fernandez, M., Herrera, A. 1996. Recycling of CO₂ during induction of CAM by drought in *Talinum paniculatum* (Portulacaceae). *Physiologia Plantarum* 98: 471-476.
- Herrera, A., Delgado, J., Paragatay, I. 1991. Occurrence of inducible crassulacean acid metabolism in leaves of *Talinum triangulare* (Portulacaceae). *Journal of Experimental Botany* 42: 493-499.
- Herrera, A. 1999. Effects of photoperiod and drought on the induction of CAM and the reproduction of plants of *Talinum triangulare*. *Canadian Journal of Botany* 77: 1-6.
- Herrera, A. 2009. Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Annals of Botany* 103: 645-653.
- Herrera, A. 2013. Crassulacean acid metabolism-cycling in *Euphorbia milii*. *AoB PLANTS* 5: plt014; doi:10.1093/aobpla/plt014.

- Herrera, A., Ballestrini, C., Montes, E. 2015. What is the potential for dark CO₂ fixation in the facultative crassulacean acid metabolism species *Talinum triangulare*? *Journal of Plant Physiology* 174:55-61.
- Hurst, A., Grams, T., Ratajczak, R. 2004. Effects of salinity, high irradiance, ozone, and ethylene on mode of photosynthesis, oxidative stress and oxidative damage in the C₃/CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant, Cell and Environment* 27: 187-197.
- Kluge, M., Ting, I. 1978. Crassulacean acid metabolism. Springer-Verlag, Berlin, pp. 29-38.
- Lüttge, U. 1993. The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New Phytologist* 125: 59-71.
- Ma, Q., Yue, L., Zhang, J., Wu, G., Bao, A., Wang, S. 2012. Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Tree Physiology* 32: 4-13.
- Martin C., Zee, A. 1983. C₃ photosynthesis and CAM in a Kansas rock outcrop succulent, *Talinum calycinum* (Portulacaceae). *Plant Physiology* 73: 718-723.
- Martin, C., Highley, M., Wang, W. 1988. Ecophysiological significance of CO₂-recycling via crassulacean acid metabolism in *Talinum calycinum* Engelm. (Portulacaceae). *Plant Physiology* 86: 562-568.
- Michalowski CB, Bonhert HJ, 1992. Nucleotide sequence of a root-specific transcript encoding a germin-like protein from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology* 100: 537-538.
- Munns, R., Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- Niewiadomska, E., Karpinska, B., Romanowska, E., Slesak, I. y Karpinski, S. 2004. A salinity-induced C₃-CAM transition increases energy conservation in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant and Cell Physiology* 45: 789-794.
- Nobel, P. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 49-50.
- Parida, A.K., Das, A. B., & Mitra, B. 2004. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees* 18: 167-174.

- Suárez, N., Sobrado, M.A. 2000. Adjustments in leaf water relations of mangrove (*Avicennia germinans*) seedlings grown in a salinity gradient. *Tree Physiology* 20: 277-282.
- Smith, J., Winter, K. 1996. Taxonomic distribution of crassulacean acid metabolism. En: K. Winter, J. Smith, eds., *Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 427-436.
- Taisma, M.A., Herrera, A. 1998. A relationship between fecundity, survival and the operation of CAM in *Talinum triangulare*. *Canadian Journal of Botany* 76: 1-8.
- Tezara, W., Martinez, D., Rengifo, E., Herrera, A. 2003. Photosynthetic responses of the tropical spiny shrub *Lycium nodosum* (Solanaceae) to drought, soil salinity and saline spray. *Annals of Botany* 92: 757-765.
- Ting, I. 1985. Crassulacean Acid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 595-622.
- Ukpong, I., Moses, J. 2001. Nutrient requirements for the growth of waterleaf (*Talinum triangulare*) in Uyo metropolis, Nigeria. *The Environmentalist* 21: 153-159.
- Vernon, D., Ostrem, J., Bohnert, H. 1993. Stress perception and response in a facultative halophyte: the regulation of salinity-induced genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant, Cell and Environment* 16: 437-444.
- Wellburn, A. 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313.
- Winter, K. 1985. Crassulacean Acid Metabolism. En: Barber, J., Baker, N., eds., *Photosynthetic mechanisms and the environment*. The Hague: Elsevier Science Publishers 329-387.
- Winter, K., Ziegler, H. 1992. Induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* increases reproductive success under conditions of drought and salinity stress. *Oecologia* 92: 475-479.
- Winter, K., Gademann, R. 1990. Daily changes in CO₂ and water vapor exchange, chlorophyll fluorescence, and leaf water relations in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* during the induction of crassulacean acid metabolism in response to high NaCl salinity. *Plant Physiology* 95: 768-776.

Winter, K., Holtum, J. 2005. The effects of salinity, crassulacean acid metabolism and plant age on the carbon isotopic composition of *Mesembryanthemum crystallinum* L., a halophytic C₃-CAM species. *Planta* 222: 201-209.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto PG-03-7983-2011/2 (CDCH-UCV). Agradezco la colaboración en experimentos preliminares de parte del personal del Instituto Experimental Jardín Botánico “Dr. Tobías Lasser”, UCV, especialmente el Ing. Agr. Jan Tillet. Alejandro Pieters (IVIC) facilitó parte de las cámaras C-52 usadas para medir potencial hídrico.