

REAKCJE STRESOWE U *MESEMBRYANTHEMUM CRYSTALLINUM* L.

Stress reactions in *Mesembryanthemum crystallinum* L.

Ireneusz ŚLESAK, Zbigniew MISZAŁSKI

Summary. One of the „stress model plant” is facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. This plant is native to the Namibian Desert of southern Africa and is adapted to growth in high concentration of sodium chloride (NaCl) and under drought and low-temperature conditions. In response to different environmental stresses, i. e. to salt stress or drought stress *M. crystallinum* shifts its mode of carbon assimilation from the C₃-pathway to CAM. During this transition *M. crystallinum* shows reactions at the various levels of organization: 1) regulation of turgor and gas exchange on the whole-plant level, 2) metabolic adaptations at the cellular level, 3) adaptative transport proteins at the membrane level, and 4) changes at the gene expression level of the key enzymes for CAM in particular phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), pyruvate-phosphate dikinase (PPDK), malic enzyme (ME), and tonoplast ATPase. The main progress in stress physiology made on this plant concerns the regulation of gene expression during stress conditions. *M. crystallinum* has rather small genome (about three times bigger than *Arabidopsis*). It permits this plant might well be suited to become a general model of CAM and stress research.

Key words: Crassulacean acid metabolism (CAM), halophytes, salt stress, *Mesembryanthemum crystallinum*

Mgr Ireneusz Ślesak, prof. dr hab. Zbigniew Miszałski, Zakład Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, ul. Sławkowska 17, 31–016 Kraków

WSTĘP I CHARAKTERYSTYKA GATUNKU

Wszystkie organizmy roślinne w trakcie swojego życia narażone są na działanie rozmaitych niekorzystnych czynników środowiskowych o charakterze biotycznym i abiotycznym. Czynniki te powodują reakcje nazywane reakcjami stresowymi. Potocznie jako stres rozumie się zwykle wszystkie te oddziaływania, które wywierają niekorzystny wpływ na funkcjonowanie danego organizmu, często prowadząc do jego trwałych uszkodzeń lub śmierci. Zakres pojęciowy terminu stres jest dość szeroki i brak jest jego jednoznacznej i precyzyjnej definicji. Lichtenthaler [29] proponuje rozróżnienie na tzw. eustress (ang. eu-stress) oraz disstress (ang. dis-stress). Ten pierwszy jest stresem „łagodnym” (ang. mild stress) i przyczynia się do

zmian tempa wzrostu i aktywności metabolicznej oraz nie wywołuje widocznych zaburzeń w przebiegu procesów fizjologicznych rośliny. Z kolei disstress jest stresem, który może indukować uszkodzenia w organizmie i ma generalnie negatywny wpływ na wzrost i rozwój organizmu roślinnego [29]. Do najczęściej dyskutowanych abiotycznych czynników stresowych należą: wysoka lub niska temperatura otoczenia, wysokie lub niskie napromieniowanie, zanieczyszczenia atmosferyczne, metale ciężkie, zasolenie i stres wodny. W większości przypadków miarą stresu u roślin są określone parametry fizjologiczne. Zalicza się do nich przede wszystkim produkcję biomasy, intensywność fotosyntezy oraz zdolność do pobierania substancji mineralnych [52].

W niniejszej pracy skoncentrowano się na

roślinie, która wykazuje ciekawe przystosowania do znoszenia szeroko rozumianego stresu wodnego. *Mesembryanthemum crystallinum* (przypołudnik, kryształka lśniąca, ang. common ice plant) należy do rodziny *Aizoaceae* i stanowi bardzo interesujący obiekt badań fizjologicznych i biochemicznych. Dzięki całemu wachlarzowi przystosowań roślina ta może egzystować w warunkach, które dla wielu innych gatunków byłyby szkodliwe. Zdolności adaptacyjne *M. crystallinum* można analizować na poziomie całego organizmu, funkcji poszczególnych organów, komórek, organelli komórkowych lub na poziomie regulacji genetycznej. Istnieją potencjalne możliwości praktycznego wykorzystania tej rośliny jako organizmu, który posiada zestaw genów „uodporniających” na stres wodny.

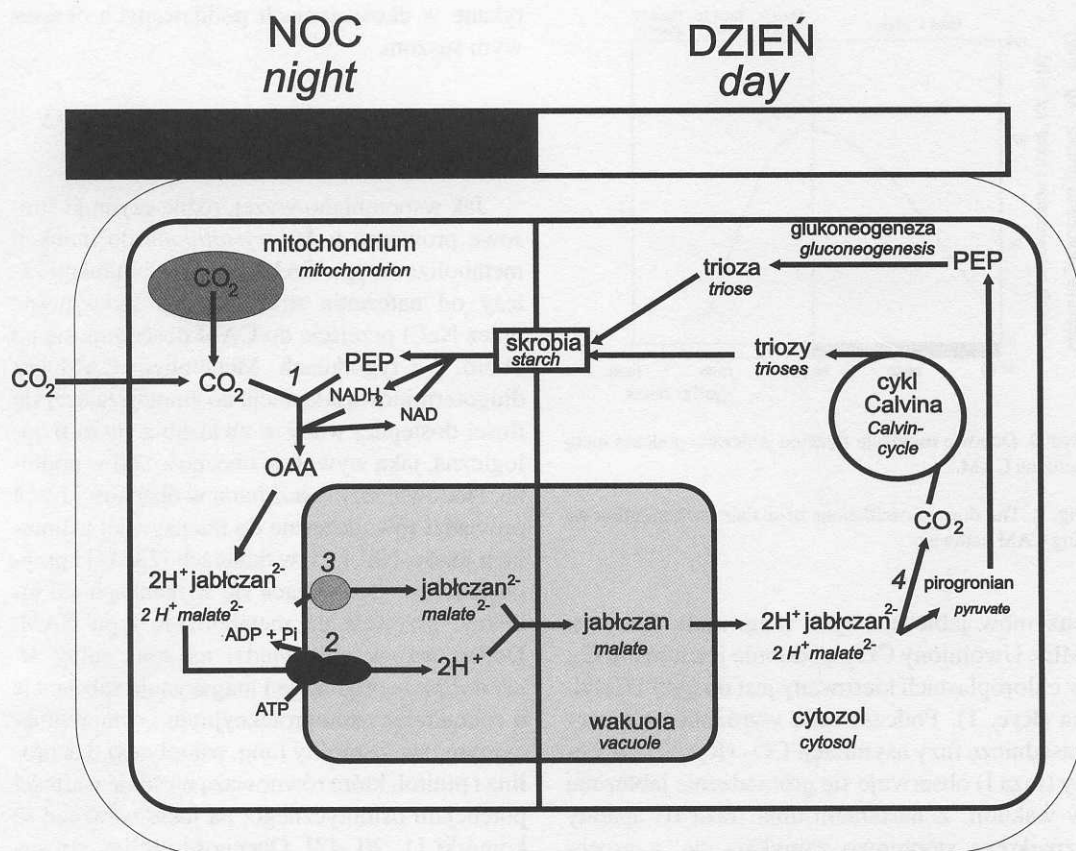
Naturalne siedliska *M. crystallinum* znajdują się na pustyniach Afryki pld.-zach., głównie na Pustyni Namib [2]. Gatunek ten powszechnie występuje także w basenie M. Śródziemnego, wchodząc w skład roślinności klifowej [67]. Znaczne niedobory wody pojawiające się w podłożu i tym samym zwiększające się stężenie roztworu glebowego, oraz okresowe zalewanie przez wodę morską przyczyniły się do wykształcenia u *M. crystallinum* unikalnych przystosowań do znoszenia znacznego deficytu wody [2]. Gatunek ten jest fakultatywnym halofitem. Stężenia 100–200 mmol·dm⁻³ NaCl stwarzają optymalne warunki dla jego wzrostu i rozwoju [19]. *M. crystallinum* toleruje także wyższe stężenia soli w podłożu dochodzące do 400 mmol·dm⁻³ NaCl [34]. Zgodnie z przedstawioną we wstępie typologią stresu, w przypadku *M. crystallinum* nie mamy do czynienia z „prawdziwym” stresem (disstressem), lecz z eustresem. Obecność dużych stężeń soli w środowisku nie jest jednak warunkiem koniecznym do wegetacji tego gatunku. Ciekawą właściwością tej rośliny jest zdolność zmiany sposobu wiązania dwutlenku węgla w zależności od warunków środowiska. Młode rośliny realizują sposób wiązania CO₂ typu C₃, a podczas postępującego procesu starzenia się roślina ta przechodzi do metabolizmu typu CAM (Crassulacean acid metabolism). Zmiana ta może być przyspieszana przez zasolenie, suszę, niską temperaturę otoczenia [66, 69].

W warunkach laboratoryjnych powszechnie stosuje się NaCl, przede wszystkim ze względu na szybkość zmian metabolicznych.

Zmiany fizjologiczno-biochemiczne, jakie zachodzą w *M. crystallinum* w trakcie przejścia C₃-CAM bada się z uwzględnieniem wszystkich poziomów organizacji, poczynsz od organizmu jako całości, a na regulacji genetycznej kończąc. Obecne badania koncentrują się na mechanizmach ekspresji genów, od których zależy funkcjonowanie metabolizmu typu CAM. Krótki cykl rozwojowy i stosunkowo niewielki genom liczący około 4·10⁸ par zasad sprawia, że *M. crystallinum* jest wygodnym obiektem badawczym [34]. Genom *M. crystallinum* jest tylko około trzy razy większy od genomu *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), która to roślina stanowi obecnie główny obiekt w badaniach regulacji i ekspresji genów [17].

CO TO JEST METABOLIZM TYPU CAM?

Zdecydowana większość roślin strefy umiarkowanej charakteryzuje się drogą asymilacji CO₂, którą określa się mianem metabolizmu typu C₃. U roślin tych pierwszym trwałym produktem wiązania CO₂ w ciągu reakcji zwanych cyklem Calvina jest 3-węglowy kwas fosfoglicerynowy. Natomiast u roślin typu C₄ i CAM pierwotnym produktem asymilacji CO₂ jest szczawiooctan, 4-węglowy kwas organiczny, z którego powstaje jabłczan. W roślinach typu C₄ jabłczan jest transportowany z komórek mezofilu do komórek pochwy okołowiązkowej, gdzie jest dekarboksylowany, a powstały w tej reakcji CO₂ włączany jest, podobnie jak u roślin C₃, w cykl Calvina. Zarówno u roślin C₃, jak i C₄ aparaty szparkowe są otwarte w ciągu dnia, co zapewnia roślinie stały dopływ CO₂. Metabolizm fotosyntetyczny realizowany u roślin C₄ i roślin CAM wykazuje wiele podobieństw. U roślin C₄ pobieranie CO₂ następuje podczas dnia, a proces karboksylacji (mezofil) i dekarboksylacji (pochwa okołowiązkowa) jest rozdzielony przestrzennie w obrębie liścia. U roślin typu CAM mamy do czynienia z czasowym rozdziałem (noc-dzień) procesów karboksylacji i dekarbo-

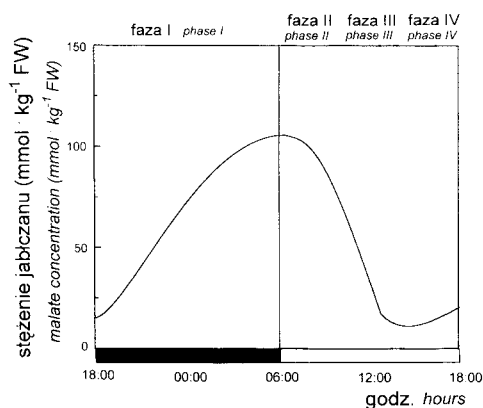


Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie podstawowych szlaków metabolicznych oraz procesów transportu membranowego zaangażowanych w metabolizm typu CAM u *M. crystallinum*; 1 – karboksylaza fosfoenolopirogronianu, 2 – H⁺-ATPaza typu V, 3 – przenośnik jabłczanu, 4 – enzym jabłczanowy (wg [35] zmodyfikowane).

Fig. 1. Summary of basic metabolic reactions and membrane transport processes involved in CAM of *M. crystallinum*; 1 – phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), 2 – V-type H^+ -ATPase, 3 – malate carrier, 4 – malic enzyme (after [35], modified).

kysylacji (Ryc. 1). Rośliny CAM mają zamknięte aparaty szparkowe podczas dnia, a dwutlenek węgla pobierany jest w nocy. Zsyntetyzowany w nocy jabłczan musi być usuwany z cytozolu z dwóch powodów. Po pierwsze pochodzące z dysocjacji jabłczanu jony H^+ mogłyby nadmiernie zakwaszać cytoplazmę, a po drugie anion jabłczanowy jest inhibitorem karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC), enzymu odpowiedzialnego za syntezę szczawiooctanu, i może na zasadzie sprzężenia zwrotnego zahamować wiązanie CO_2 . Aktywność ATPazy tonoplastowej prowadzi do powstania transmembranowego

gradientu stężenia jonów H^+ ($\Delta\mu_{H^+}$) pomiędzy wakuolą a cytoplazmą. Powstały gradient potencjału elektrycznego jest siłą napędową dla przenośnika jabłczanu (ang. malate carrier), zlokalizowanego w tonoplazmie [33]. W słabo alkalicznym cytozolu (pH 7,5–8,0) kwas jabłkowy jest całkowicie zdysocjowany na $2H^+$ i jony jabłczanowe, a w wakuoli występuje w formie niezdysocjowanej (Ryc. 1). Według Lüttge i Smith [32] jabłczan opuszcza wakuolę w ciągu dnia na drodze dyfuzji poprzez fragmenty lipidowe błony (ang. lipid soluble mechanism) i w cytoplazmie ulega dekarboksylacji dzięki aktywności



Ryc. 2. Dobowe oscylacje stężenia jabłczanu podczas metabolizmu CAM.

Fig. 2. The diurnal oscillations of malate concentration during CAM pathway.

enzymów jabłczanowych (ang. malic enzyme, ME). Uwolniony CO_2 , podobnie jak u roślin C_4 , w chloroplastach kierowany jest do cyklu Calvina (Ryc. 1). Podczas dnia wyróżnia się cztery zasadnicze fazy asymilacji CO_2 (Ryc. 2). W nocy (faza I) obserwuje się gromadzenie jabłczanu w wakuoli. Z nastaniem dnia (faza II) aparaty szparkowe stopniowo zamykają się, a proces wiązania CO_2 do trój- i czterowęglowych produktów jest zrównoważony. Około południa (faza III) zdecydowanie zaczyna przeważać dekarboksylacja jabłczanu. Z końcem dnia (faza IV), po wyczerpaniu się puli jabłczanu, możliwe jest wykorzystywanie endogennego CO_2 pochodzącego z procesów oddychowych lub pobieranie atmosferycznego dwutlenku węgla poprzez otwierające się szparki [12]. Rośliny typu C_3 w trakcie pobierania CO_2 z powietrza tracą znaczne ilości wody w wyniku transpiracji. Łatwo zauważyć, że strategia ewolucyjna roślin CAM „przystosowana” do oszczędzania wody polega na ograniczeniu transpiracji szparkowej podczas dnia. Zatem główne wyznaczniki metabolizmu CAM można ująć w dwóch punktach: nocna akumulacja jabłczanu w wakuoli oraz wzrost oporności szparkowej w ciągu dnia. Pod względem metabolizmu na poziomie komórki CAM jest biochemiczną modyfikacją fotosyntezy, mającą dla rośliny funkcje adaptacyjne, często spo-

tykane w ekosystemach poddawanych okresowemu suszom.

REAKCJE *Mesembryanthemum crystallinum* NA STRES SOLNY

Jak wspomniano wyżej, różne czynniki stresowe prowadzą u *M. crystallinum* do indukcji metabolizmu typu CAM. Szybkość indukcji zależy od natężenia stresu [5, 6]. Indukowane przez NaCl przejście do CAM obserwuje się po około 1–2 tygodniach. Metabolizm CAM jest długoterminową adaptacją do zmniejszającej się ilości dostępnej wody w związku z suszą fizjologiczną, jaką wywołuje obecność soli w podłożu. Hodowla *M. crystallinum* w obecności NaCl prowadzi równocześnie do intensywnej akumulacji jonów Na^+ i Cl^- w tkankach [23, 34] i przypuszczalnie gromadząca się w tkankach sól indukuje przejście do metabolizmu typu CAM. Dodatkowo w odpowiedzi na stres solny *M. crystallinum* produkuje i magazynuje substancje o charakterze osmoprotekcyjnym i osmoregulacyjnym tzw. osmolity (ang. osmolytes), jak prolina i pinitol, które równoważą wysokie wartości potencjału osmotycznego, na jakie narażone są komórki [1, 20, 42]. Obecność proliny stwierdzono już na wczesnych etapach stresu solnego [14]. Podobne mechanizmy tolerancji na działanie NaCl obserwuje się także u innych halofitów [28]. Prolina może również stabilizować enzymy przed denaturującym wpływem wolnych rodników, które powstają w wyniku obecności NaCl lub suszy [49]. Znaczna produkcja proliny podczas stresu solnego jest typową reakcją występującą w warunkach deficytu wody [20]. Akumulacja tego aminokwasu świadczy o istnieniu wspólnych mechanizmów rządzących odpowiedzią fizjologiczną rośliny na zasolenie i suszę.

Zdolność zmiany metabolizmu z C_3 na CAM jest także zdeterminowana genetycznie i zależy od momentu cyklu rozwojowego rośliny [66]. Im roślina jest starsza, tym w większym stopniu wykazuje cechy charakterystyczne dla metabolizmu CAM. Bez odpowiedzi pozostaje pytanie, czy do zmiany metabolizmu z C_3 na CAM wymagana jest struktura rośliny jako ca-

łości, czy też metabolizm CAM może być realizowany również na poziomie pojedynczych komórek. Ponadto indukcja CAM pozostaje w ścisłym związku ze zmieniającymi się warunkami środowiska, występującymi w naturalnych siedliskach *M. crystallinum* [9, 22, 67]. Obecność znacznych ilości soli w podłożu stanowi jeden z podstawowych naturalnych czynników stresowych u *M. crystallinum*. Po usunięciu soli powrót do metabolizmu typu C_3 jest tylko częściowy, a odwrócenie kierunku przemian jest tym trudniejsze, im starsze rośliny zostały poddane stresowi solnemu [45]. Charakterystyczne dla CAM dobowe oscylacje jabłczanu pozostają nawet wtedy, gdy rośliny przestaje się traktować NaCl. W takim przypadku zawartość jabłczanu w wakuoli spada do poziomu notowanego u roślin w tym samym wieku, nie poddawanych uprzednio stresowi solnemu [44]. Zjawisko zależnej od wieku rośliny zmiany metabolizmu obserwowano nawet w kulturach hydroponicznych [68]. Obserwacje te stwarzają interesujące perspektywy do porównania odpowiedzi na stres solny na poziomie całych roślin oraz w kulturach *in vitro*. Zarówno całe rośliny, jak i tkanki hodowane *in vitro* reagują na stres solny zwiększoną akumulacją proliny, ale tylko na poziomie całej rośliny dochodzi do wykształcenia metabolizmu typu CAM [1, 55]. Wydaje się, że synteza proliny jest jedną z reakcji na stres, natomiast indukcja enzymów charakterystycznych dla metabolizmu CAM wyraźnie zależy od stanu rozwojowego rośliny.

W wyniku działania NaCl dochodzi do istotnych zmian w wymianie gazowej. Dość obszernie opisanym zjawiskiem u wielu roślin C_3 jest tzw. depresja południowa, czyli przemykanie się aparatów szparkowych w okresie o najwyższym natężeniu napromieniowania i najwyższej temperaturze, co prowadzi do obniżenia aktywności fotosyntetycznej w godzinach południowych [34]. Wyrażną depresję południową, połączoną ze spadkiem w przewodnictwie dla pary wodnej oraz w pobieraniu CO_2 , można zaobserwować po 10–14 dniach traktowania roślin solą [65]. Wymiana gazowa osiąga wówczas stan przejściowy pomiędzy nocą a dniem (faza I / II) i dniem a nocą (faza IV / I), z chara-

kterystyczną dla roślin typu CAM fazą III, w której aparaty szparkowe są zamknięte [41]. Jednakże analiza stężenia CO_2 w przestworach międzykomórkowych (C_i) wskazuje, że faza III u roślin CAM różni się od występującego w środku dnia spadku C_i , obserwowanego u roślin C_3 w warunkach depresji południowej [34]; w fazie III u roślin CAM obserwuje się wysoki poziom C_i spowodowany intensywną dekarboksylacją jabłczanu [27]. U *M. crystallinum* podczas indukcji CAM stężenie CO_2 w przestworach międzykomórkowych pozostaje stosunkowo niewielkie, nawet w okresie najsilniejszej dekarboksylacji jabłczanu w środku dnia. Typowe dla CAM nocne pobieranie CO_2 sprzężone z akumulacją jabłczanu pojawia się w *M. crystallinum* dopiero po kilku dniach traktowania NaCl [64]. Podobne do roślin C_3 „zachowanie stresowe” *M. crystallinum* jest związane z powtarzającym się w ciągu dnia spadkiem potencjału wodnego liścia i ciśnienia turgorowego. Winter i Gademann [64] sądzą, że spadek ten może być jednym z ważnych sygnałów dla indukcji metabolizmu CAM.

Długoterminowy stres solny indukuje bardzo wyraźne zmiany w wyglądzie rośliny. Dochodzi do rozgałęzienia się pędu, a nowo rozwijające się liście są drobniejsze i grubsze [31]. Jedną z wyraźnych cech morfologicznych jest pojawienie się tzw. komórek pęcherzykowych (ang. bladder cells), które w fazie CAM pokrywają powierzchnię całej rośliny. Badania z użyciem odpowiednich sond ciśnieniowych do pomiarów ciśnienia turgorowego (P) oraz do pomiarów ciśnienia osmotycznego (π) soku komórkowego wskazują, że komórki pęcherzykowe pełnią rolę rezerwuaru wodnego rośliny [50]. W ten sposób potwierdzono pochodzące z początku wieku przypuszczenia Haberlandta, co do funkcji tych struktur jako magazynów wody [34]. W komórkach mezofilowych roślin w stanie CAM, π przyjmuje największe wartości pod koniec okresu ciemności (nocy), jako rezultat nocnej akumulacji jabłczanu, a wskaźnik ten obniża się podczas dnia, gdy jabłczan jest zużywany do produkcji CO_2 . Ciśnienie turgorowe w mezofilu jest również największe pod koniec nocy, co jest skutkiem osmotycznego pobierania

wody wywołanego przez nagromadzonego w wakuoli jabłczanu, i obniża się podczas dnia.

Pod wpływem stresu solnego w komórkach pęcherzykowych gromadzą się wspomniane wyżej osmoprotektanty, jak np. pinitol. Pinitol obok proliny jest ważną substancją osmoprotekcyjną. Stres solny indukuje akumulację pinitolu do poziomu ponad 9% w przeliczeniu na suchą masę całej rośliny [42]. Komórki pęcherzykowe akumulują znacznie więcej pinitolu niż mezofil liścia [1]. W trakcie transformacji z C_3 na CAM indukowane są również enzymy związane z syntezą pinitolu, między innymi transferaza O-metylo-myo-inozytolowa. Indukcja tego enzymu zależy od stopnia organizacji układu i zaobserwowano ją tylko w doświadczeniach na całych roślinach. Natomiast zmian aktywności tego enzymu nie stwierdzono w kulturach tkankowych. Ponadto, w przeciwieństwie do indukcji CAM, akumulacja pinitolu nie zachodzi wraz ze starzeniem się rośliny [1, 59, 60]. Cytowani autorzy sugerują, że biosynteza pinitolu, jak i pojawienie się metabolizmu typu CAM, zachodzi tylko w całych roślinach i zależy od genetycznie zdeteminowanego programu rozwojowego. Ponadto relacje pomiędzy korzeniem a pędem zdają się mieć istotne znaczenie w odpowiedzi fizjologicznej *M. crystallinum* na stres solny [16, 39].

Wielu autorów sądzi, że pierwotnym czynnikiem uruchamiającym zmianę fotosyntetycznej drogi asymilacji węgla z C_3 do CAM jest NaCl, który wywołuje zmianę poziomu endogennego kwasu abscysynowego (ABA) i cytokinin w roślinie [13, 43, 54]. W badaniach wskazywano na ważną rolę ABA w transdukcji sygnału prowadzącego do indukcji metabolizmu CAM [6]. Thomas i in. [54] obserwowali wzrost poziomu endogennego ABA pod wpływem NaCl już po około 25 godzinach traktowania roślin solą. Jednak podanie inhibitora biosyntezy ABA – lowastatyny nie zmieniało poziomu akumulacji mRNA dla PEPC. Na tej podstawie autorzy ci wykluczyli pierwotną rolę ABA w transdukcji sygnału indukującego CAM. Ta sama grupa badaczy stwierdziła, że zarówno cytokinina podana dokerzeniowo, jak i NaCl pełnią rolę sygnału uruchamiającego syntezę proliny i PEPC [54].

Oddziaływanie ABA na indukcję metabolizmu CAM wyraźnie zależy od stężenia hormonu; ABA podawany w stężeniu $5\text{--}10\ \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ prowadzi do pojawienia się metabolizmu CAM. Zbyt wysokie koncentracje ABA hamują przejście z C_3 do CAM. Zmiana metabolizmu jest najbardziej wydajnie indukowana, gdy ABA aplikuje się do pożywki korzeniowej, a słabsze efekty obserwuje się jeśli hormon podaje się dolistnie [6]. Natomiast Schmitt i Pipenbrock [47] zaobserwowali, że to korzenie mogą pełnić rolę hamulca w indukcji kluczowego dla CAM enzymu – karboksylazy fosfoenolopirogronianowej. Podana dolistnie cytokinina (6-benzylaminopuryna, BA) również zmniejsza ilość mRNA dla PEPC oraz hamuje aktywność enzymatyczną samej karboksylazy [43, 47]. Korzeń jako główne miejsce biosyntezy cytokininy zapewne odgrywa ważną funkcję regulacyjną w całym procesie transformacji z metabolizmu C_3 do CAM [47]. Problem fitohormonalnego uruchamiania metabolizmu CAM nadal pozostaje otwarty. Jest wielce prawdopodobne, że regulacja taka zależy od równoległego działania kilku fitohormonów.

NaCl w nadmiarze wpływa niekorzystnie na funkcjonowanie wielu enzymów oraz struktur błon komórkowych [28]. Organizmy żywe w rozmaity sposób bronią się przed czynnikami stresowymi. Strategie tolerancji względem nadmiaru NaCl wykształcona przez *M. crystallinum* polega na gromadzeniu jonów Na^+ i Cl^- w wakuoli. Dzięki temu roślina odseparowuje czynnik stresowy od przedziałów komórkowych, w których zachodzą istotne przemiany metaboliczne [34].

Podczas indukowanego przejścia z metabolizmu C_3 na CAM zanotowano wzrost aktywności ATPazy tonoplastowej i jakościowe zmiany, związane z budową podjednostek enzymu [51]. Wzrost aktywności enzymu poprzedza pojawienie się dobowych oscylacji jabłczanu, które świadczą o wykształceniu się metabolizmu typu CAM [4], przy czym specyficzna aktywność enzymu pozostaje niezmienną, a wzrost aktywności wynika z syntezy *de novo* białek ATPazowych. Analiza obecności enzymu za pomocą przeciwciał wskazuje, że ilościowe zmiany en-

zemu są raczej wywołane stresem solnym *per se*, a nie przejściem na metabolizm typu CAM [4]. Natomiast jakościowe zmiany w obrębie podjednostek ATPazy są ściśle związane z ekspresją genów warunkujących metabolizm CAM [45].

Oprócz opisanych powyżej zmian w aktywności enzymów tonoplastowych, w trakcie transformacji z C_3 do CAM dochodzi do zmian płynności błon tonoplastowych. Za płynność błon biologicznych odpowiedzialne są zarówno białka, jak i lipidy. Nie zaobserwowano znaczących różnic w składzie lipidowym tonoplastu po indukcji CAM [21], ale zmiany takie zanotowano w składzie białek. Prawdopodobnie stosunek białek do lipidów pełni istotną rolę w zmianach płynności błony tonoplastowej [34]. Na podstawie tych badań można stwierdzić, że istotną rolę w adaptacji do warunków stresowych odgrywa zróżnicowana zawartość białek w błonach biologicznych, co wpływa na zmianę płynności błon. Niezależnie od tych badań, dzięki metodzie elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) stwierdzono, że zarówno w fazie C_3 , jak i CAM membrany oczyszczonych pęcherzyków tonoplastowych zwiększają swoją płynność równomiernie i liniowo, w zakresie testowanych temperatur od 8 do 44°C. Dla roślin w stanie CAM wymagana jest temperatura o 3,3°C wyższa dla osiągnięcia tego samego stopnia płynności błony, jak u roślin C_3 [26]. Oznacza to, że tonoplast rośliny w stanie CAM jest bardziej sztywny, niż tonoplast rośliny w fazie C_3 . Ponieważ większa sztywność oznacza niższą przepuszczalność, może to stanowić istotną korzyść dla roślin w fazie CAM, bo oznacza większą zdolność do akumulacji jabłczanu w nocy.

Proces przechodzenia na metabolizm typu CAM jest związany z przemianami biochemicznymi na terenie komórki i podlega regulacji; stwierdzono, że szereg enzymów zmienia swoją aktywność podczas przejścia do CAM [1, 24]. Intensywniej przebiegający proces glikolizy w stadium CAM umożliwia zwiększenie syntezy akceptora CO_2 , jakim jest fosfoenolopirogronian (PEP). Kluczowym enzymem katalizującym nocne wiązanie CO_2 jest karboksylaza

fosfoenolopirogronianu (PEPC). Aktywność tego enzymu jest regulowana na poziomie transkrypcji, translacji [8, 9, 38, 46] oraz na poziomie potranslacyjnym poprzez fosforylację reszty serynowej w cząsteczce enzymu [25, 61]. Indukowana w obecności NaCl PEPC jest również regulowana przez światło, a najaktywniejszą częścią widma jest promieniowanie czerwone [37]. W regulacji aktywności PEPC zaobserwowano również zmiany wywołane przez typową reakcję fitochromową [7]. Ponadto PEPC *in vitro* jest relatywnie odporna na obecność jonów Na^+ i Cl^- , a w obecności swoich substratów może nawet być stymulowana przez NaCl [48].

Innym enzymem, który zmienia swoją aktywność podczas przejścia z C_3 do CAM, jest dikinaza nieorganicznego fosforanu i pirogronianu (ang. pyruvate-inorganic phosphate dikinase, PPDK). Enzym ten katalizuje regenerację PEP [38]. W czasie transformacji z C_3 do CAM poważnym zmianom ulega także aktywność wspomnianych wcześniej enzymów jabłczanowych (ME), katalizujących proces dekarboksylacji jabłczanu. W zależności od rodzaju koenzymu wyróżnia się dwa typy enzymów jabłczanowych: NAD-ME i NADP-ME [12]. Dekarboksylacja jabłczanu w ciągu dnia prowadzi do wysokiego stężenia wewnątrzkomórkowego CO_2 . Sytuacja taka może prowadzić do ograniczenia oksygenazowej funkcji karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (Ru-bisco) [34]. Zatem w konsekwencji możnaby się spodziewać silnej redukcji fotooddychania u *M. crystallinum*, realizującego metabolizm typu CAM. W eksperymentach nie potwierdzono różnic w aktywności enzymów zaangażowanych w szlak fotooddechowy podczas indukcji CAM [62]. W rozważaniach tych należy wziąć pod uwagę to, że w sytuacji gdy aparaty szparkowe są zamknięte, a roślina jest silnie ekspozowana na światło, może dochodzić do intensywnej produkcji O_2 . Powstająca wypadkowa wartość stosunku O_2/CO_2 będzie przypuszczalnie decydować o efekcie wzrostu lub spadku natężenia fotooddychania. Ostatnio wykazano wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w liściach *M. crystallinum* w trakcie indukcji CAM [40]. Wynik ten wskazywałby na

Tabela 1. Wybrane geny i enzymy zaangażowane w metabolizm typu CAM u *M. crystallinum* (wg [12], zmodyfikowane).
 Table 1. Selected genes and enzymes involved in CAM in *M. crystallinum* (after [12], modified).

Gen <i>Gene</i>	Enzym <i>Enzyme</i>	Lokalizacja w komórce <i>Subcellular localization</i>	Induktor <i>Inducer</i>	Literatura <i>References</i>
<i>Ppc1</i>	PEPC	cytozol cytosol	NaCl, ABA susza (<i>drought</i>), BA	[8, 54]
<i>Mdh1</i>	NADP-MDH	chloroplasty chloroplasts	NaCl	[11]
<i>Mod1</i>	NADP-ME	cytozol cytosol	NaCl	[10]
<i>Ppdk1</i>	PPDK	chloroplasty chloroplasts	NaCl	[18]
<i>AtpvA</i> <i>AtpvB</i> <i>AtpvE</i> <i>Atpvc</i>	podjednostki H ⁺ -V-ATPazy: Subunits of H ⁺ -V- ATPase podj. (sub.) A podj. (sub.) B podj. (sub.) E podj. (sub.) c	wakuola <i>vacuole</i> (tonoplast) (<i>tonoplast</i>)	NaCl NaCl NaCl NaCl, ABA światło (<i>light</i>)	[15, 30, 57]

wzrost stężenia O₂ w mezofilu i przestworach międzykomórkowych, szczególnie w fazie III i IV. W takich warunkach można spodziewać się znacznego przyspieszenia procesu fotooddychania.

U szeregu gatunków roślin poddanych stresowi solnemu zaobserwowano wyraźny wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [63]. Rosnąca aktywność SOD wskazuje na stres oksydacyjny indukowany solą. Wzrost aktywności obserwowano dla wszystkich trzech klas SOD: Mn-SOD (mitochondrialna), Fe-SOD (chloroplastowa) i Cu/Zn-SOD (cytozolowa). Aktywność wszystkich form SOD wzrasta już w pierwszych dniach traktowania solą. Wyniki te sugerują, że zasolenie powoduje stres oksydacyjny w *M. crystallinum*, w różnych przedziałach komórkowych [40]. Jednak powyższe badania nie wyjaśniły problemu, czy wzrost aktywności poszczególnych form SOD zależy bezpośrednio od stresu solnego, czy jest związany ze zmianą metabolizmu C₃-CAM. Przypuszczalnie wywołany przez zasolenie stres oksydacyjny może wpływać na ekspresję metabolizmu typu CAM.

Zmiany w aktywności enzymatycznej,

względnie indukcja nowych, nieobecnych w fazie C₃ izoenzymów, wskazują na ścisłe powiązanie metabolizmu CAM z uaktywnianiem się określonych grup genów. Znaczny postęp w badaniach nad molekularnymi zmianami w ekspresji genów *M. crystallinum* obserwuje się od końca lat 80. Schmitt i in. [46] jako pierwsi skonstruowali bibliotekę składającą się z fragmentów cDNA z *M. crystallinum*. Technika hybrydyzacji typu dot-blot określonych, sklonowanych fragmentów cDNA, skierowanych przeciwko całkowitemu RNA z *M. crystallinum* pokazała wzrost poziomu transkryptów mRNA dla PEPC i PPDK, wskutek indukowanego solą przejścia C₃-CAM [38]. Proces indukcji syntezy mRNA dla tych enzymów był odwracalny, jeśli rośliny przenoszono do warunków bezstresowych [58]. Badania te dowodzą, że stres solny indukuje określone geny odpowiedzialne za wykształcenie metabolizmu CAM, czyli zmiany zachodzą nie tylko na poziomie potranslacyjnym, ale również na etapie transkrypcji.

Stwierdzono, że rośliny C₃ nie poddawane stresowi solnemu wykazują niewielką ekspresję jednego z dwóch izoenzymów PEPC. Forma PEPC charakterystyczna dla *M. crystallinum* w

fazie C₃ kodowana jest przez gen *Ppc2*. Wzrost zasolenia wyraźnie uaktywnia gen dla innej izoformy PEPC – *Ppc1* (Tab. 1). Transkrypty własnie tego genu w postaci mRNA, a następnie enzymu – PEPC, odpowiedzialne są między innymi za ekspresję CAM. Sumarycznie zestaw wybranych genów *M. crystallinum* indukowanych przez rozmaite czynniki podano w tabeli 1. W tkankach *M. crystallinum* stwierdzono także obecność mRNA dla białek pełniących funkcje kanałów wodnych, tzw. akwaporyn. Białka te kodowane są w *M. crystallinum* przez rodzinę genów *Mip* (ang. major intrinsic protein, główne białko integralne): *MipA*, *MipB*, *MipC* [70]. Największe ilości transkryptów *MipA* i *MipC* wykryto w korzeniach i liściach. *MipA* zlokalizowano głównie w endodermie i w okolicach ksylemu korzeniowego. Jego obecność stwierdzono również w tkance sitowo-naczyniowej liścia oraz w mezofilu. Natomiast *MipB* wykryto wyłącznie w wierzchołkowej części korzenia. Ekspresja akwaporyn MIPA i MIPB w oocytach *Xenopus* zwiększała przepuszczalność błony komórkowej dla wody. Ponadto stwierdzono wyraźne fluktuacje mRNA dla *MipA* i *MipC*, ściśle związane ze zmianami turgoru liści podczas stresu solnego. Powrót do maksymalnej turgoscencji był skorelowany ze wzrostem ilości transkryptów dla opisanych wyżej akwaporyn. Na podstawie tych eksperymentów wysnuto wniosek, że akwaporyny u *M. crystallinum* regulują pobieranie wody przez komórkę, i że regulacja ta jest ściśle związana z zasoleniem podłoża [70]. Badania te dowodzą, że u podłoża indukcji CAM w obrębie tkanek liścia leży uaktywnianie się określonych genów w korzeniu. W korzeniu jako organie, który w pierwszej kolejności jest ekspozycyjny na stres solny, prawdopodobnie uruchamiany jest cały szereg sygnałów, które zapoczątkowują zmiany metabolizmu fotosyntetycznego w części nadziemnej rośliny.

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej przystosowania *M. crystallinum* do stresu abiotycznego, a zwłaszcza zasolenia, pokazują, że w badaniach doty-

czących fizjologii stresu należy uwzględniać wszystkie poziomy organizacji układu żywego.

M. crystallinum nie jest rośliną o dużym znaczeniu gospodarczym, chociaż młodych liści można używać do celów konsumpcyjnych [36]. Ponadto w rejonach o silnie zasolonych glebach próbuje się wykorzystywać ten gatunek do odsalania podłoża (inf. ustna od dr J. Cuartero). Jednak wyniki uzyskane w badaniach tego właśnie gatunku mogą mieć w przyszłości doniosłe znaczenie w zrozumieniu odporności roślin na stres. Dzisiaj wiadomo, że mechanizmy rządzące odpornością i tolerancją na rozmaite czynniki stresowe, takie jak: susza, zasolenie, niska temperatura, zanieczyszczenie atmosfery i patogeny, są bardzo podobne. Często obserwuje się, że np. rośliny o zwiększonej odporności na suszę lepiej tolerują również stres solny [2]. Zjawisko odporności na kilka rozmaitych czynników stresowych określa się mianem „odporności krzyżowej” (ang. cross-tolerance). Innymi słowy wzrost odporności na czynnik stresowy „A” wywołuje w roślinie szereg adaptacji, które sprawiają, że osobnik taki staje się uodporniony na stres wywołany przez inny czynnik stresowy „B”. Zjawisko „odporności krzyżowej” ma niebagatelne znaczenie w naturalnych ekosystemach, gdzie rośliny poddawane są całemu zespołowi rozmaitych niekorzystnych czynników środowiskowych.

Aplikacyjne podejście do zagadnienia odporności i tolerancji na stres środowiskowy koncentruje się na uzyskaniu roślin transgenicznych, w tym także roślin uprawnych o cechach gwarantujących przeżycie niekorzystnych warunków. Niepoślednią rolę odgrywają tutaj rośliny zaadaptowane do skrajnych warunków środowiskowych np. rośliny z rodzaju *Mesembryanthemum*, *Craterostigma*, *Atriplex* [2]. Gatunki te są swoistym rezerwuarem genów „anty-stresowych”. Przykładowo, przeniesienie genów gwarantujących wzmożoną syntezę dwóch ważnych osmoprotektantów – mannitolu i sorbitolu do tytoniu pozwoliło uzyskać rośliny o zwiększonej odporności na stres solny [53]. Również bakteryjny gen *mtlD*, odpowiedzialny za wzmożoną syntezę mannitolu, zmniejszał inhibicję kiełkowania transgenicznych nasion *Ara-*

bidopsis thaliana w obecności 200 mmol·dm⁻³ NaCl [56].

Przypuszczalnie w najbliższych latach będą podejmowane próby polepszania, głównie metodami inżynierii genetycznej, gatunków roślin uprawnych szczególnie narażonych na suszę i zasolenie [3]. Niektórzy badacze uważają, że przenoszenie pojedynczych genów będzie dało tylko częściową odporność rośliny na określone rodzaje stresu środowiskowego. Wielką „karierę” przewiduje się dla eksperymentów, w wyniku których będzie się dokonywać transferu wielu genów zaangażowanych w całościową (systemową) odpowiedź rośliny na stres [3]. Dlatego poznanie możliwie jak najbogatszego zestawu genów determinujących biochemiczno-fizjologiczne przystosowania roślin do np. zwiększonego niedoboru wody ma ogromne perspektywy.

PODZIĘKOWANIA:

Autorzy pragną złożyć serdeczne podziękowania Panu prof. dr hab. Stanisławowi Więckowskiemu (Instytut Biologii Molekularnej UJ) za cenne uwagi w trakcie przygotowywania niniejszego artykułu. Praca była częściowo finansowana z grantów KBN 6P04C 105 12 i 6P04C 065 16.

LITERATURA

- [1] ADAMS P., THOMAS J. C., VERNON D. M., BOHNERT H. J. R., JENSEN G. 1992. Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol.* **33**: 1215–1223.
- [2] BOHNERT H. J., NELSON D. E., JENSEN R. G. 1995. Adaptation to environmental stresses. *The Plant Cell* **7**: 1099–1111.
- [3] BOHNERT H. J., GOLLDACK D., ISHITANI M., KAMASANI U. R., RAMMESMAYER G., SHEN B., SHEVELEVA E., JENSEN R. G. 1996. Salt tolerance engineering requires multiple gene transfers. *Engineering Plants for Comm. Prod. Appl.*, N. Y. Academy of Science, **729**: 115–125.
- [4] BREMBERGER C., LÜTTGE U. 1992. Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of crassulacean acid metabolism. *Planta* **188**: 575–580.
- [5] CHENG S.-H., EDWARDS G. E. 1991. Induction of Crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environ.* **14**: 271–278.
- [6] CHU C., DAI Z., KU M. S. B., EDWARDS G. E. 1990. Induction of crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* by abscisic acid. *Plant Physiol.* **93**: 1253–1260.
- [7] COCKBURN W., WHITELMAN G. C., SMITH J. 1996. The participation of phytochrome in the signal transduction pathway of salt stress responses in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *J. Exp. Bot.* **47**: 647–653.
- [8] CUSHMAN J. C., MEYER B., MICHALOWSKI C. M., SCHMITT J. M., BOHNERT H. J. 1989. Salt-stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during CAM induction in common ice plant. *The Plant Cell* **1**: 715–725.
- [9] CUSHMAN J. C., MICHALOWSKI C. B., BOHNERT H. J. 1990. Developmental control of crassulacean acid metabolism inducibility by salt stress in the common ice plant. *Plant Physiol.* **94**: 1137–1142.
- [10] CUSHMAN J. C. 1992. Characterization and expression of NADP-malic enzyme cDNA induced by salt stress from the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Eur. J. Biochem.* **208**: 259–266.
- [11] CUSHMAN J. C. 1993. Molecular cloning and expression of chloroplast NADP-malate dehydrogenase during Crassulacean acid metabolism induction by salt stress. *Photosynth. Res.* **35**: 15–27.
- [12] CUSHMAN J. C., BOHNERT H. J. 1997. Molecular genetics of crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol.* **113**: 667–676.
- [13] DAI Z., KU M. S. B., ZHANG D., EDWARDS G. E. 1994. Effects of growth regulators on the induction of crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta*, **192**: 287–294.
- [14] DEMMIG B., WINTER K. 1986. Sodium, potassium, chloride and proline concentrations of chloroplasts isolated from a halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* **168**: 421–426.
- [15] DIETZ K. J., ARBINGER B. 1996. cDNA sequence and expression of subunit E of the vacuolar H⁺-ATPase in the inducible Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1281**: 134–138.
- [16] EASTMOND P. J., ROSS D. J. 1997. Evidence that the induction of crassulacean acid metabolism by water stress in *Mesembryanthemum crystallinum* (L.) involves root signalling. *Plant Cell Environ.* **20**: 1559–1565.
- [17] ESTELLE M. A., SOMERVILLE C. R. 1986. The mutants of *Arabidopsis*. TIG – April, Elsevier Publishers B. V., Amsterdam, s. 89–93.
- [18] FISSLTHALER B., MEYER G., BOHNERT H. J., SCHMITT J. M. 1995. Age-dependent induction of pyruvate, orthophosphate dikinase in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* **196**: 492–500.
- [19] FLOWERS T. J., TROKE P. F., YEO A. R. 1977. The mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**: 89–121.
- [20] HARBORNE J. B. 1997. Ekologia biochemiczna. PWN, Warszawa.
- [21] HASCHKE H.-P., KAISER G., MARTINOIA E., HAMMER U., TEUCHER T., DORNE A. J., HEINZ E. 1990. Lipid

- profiles of leaf tonoplasts from plants with different CO₂-fixation mechanism. *Bot. Acta* **103**: 32–38.
- [22] HERPPICH W., HERPPICH M., VON WILLERT D. J. 1992. The irreversible C₃ to CAM shift in well-watered and salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum* is under strict ontogenetic control. *Bot. Acta* **105**: 34–40.
- [23] HEUN A.-M., GORHAM J., LÜTTGE U., WYN JONES R. G. 1981. Changes of water-relation characteristics and levels of organic cytoplasmic solutes during salinity induced transition of *Mesembryanthemum crystallinum* from C₃-photosynthesis to Crassulacean acid metabolism. *Oecologia* **50**: 66–72.
- [24] HOLTUM J. A. M., WINTER K. 1982. Activity of enzymes of carbon metabolism during the induction of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* **155**: 6–16.
- [25] JIAO J., CHOLLET R. 1991. Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₄ and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* **95**: 981–985.
- [26] KLIEMCHEN A., SCHOMBURG M., GALLA H. -J., LÜTTGE U., KLUGE M. 1993. Phenotypic changes in the fluidity of the tonoplast membrane of crassulacean-acid-metabolism plants in response to temperature and salinity stress. *Planta* **189**: 403–409.
- [27] KLUGE M., BÖHLKE C., QUERIOZ O. 1981. Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Kalanchoe*. Changes in intracellular CO₂ concentration during continuous light or darkness. *Planta* **152**: 87–92.
- [28] LEVITT J. 1980. Responses of plants to environmental stresses., vol. II, Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, s. 363–488.
- [29] LICHTENTHALER H. K. 1997. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant. Physiol.* **148**: 4–14.
- [30] LÖW R., ROCKEL B., KIRSCH M., RATAJCZAK R., HORTENSTEINER S., MARTINOIA E., LÜTTGE U., RAUSCH T. 1996. Early salt stress effects on the differential expression of vacuolar H⁺-ATPase genes in roots and leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **110**: 259–265.
- [31] LÜTTGE U., FISCHER E., STEUDLE E. 1978. Membrane potentials and salt distribution in epidermal bladders and photosynthetic tissue of *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant, Cell Environ.* **1**: 121–129.
- [32] LÜTTGE U., SMITH J. A. C. 1984. Mechanism of passive malic-acid efflux from vacuoles of the CAM plant *Kalanchoe daigremontiana*. *J. Membr. Biol.* **81**: 149–158.
- [33] LÜTTGE U. 1987. Carbon dioxide and water demand, Crassulacean acid metabolism (CAM), a versatile ecological adaptation exemplifying the need for integration in eco-physiological work. *New Phytol.* **106**: 593–629.
- [34] LÜTTGE U. 1993. The role of crassulacean acid metabolism (CAM) in the adaptation of plants to salinity. *New Phytol.* **125**: 59–71.
- [35] LÜTTGE U., RATAJCZAK R., RAUSCH T., ROCKEL B. 1995. Stress responses of tonoplast proteins: an example for molecular ecophysiology and the search for eco-enzymes. *Acta Bot. Neerl.* **44**: 343–362.
- [36] MAKOWIECKI S. 1927. Kwiaty ogrodowe. Nakładem Księgarni Polskiej B. Połonieckiego, Lwów, Warszawa, s. 258.
- [37] MCELWAIN E. F., BOHNERT H. J., THOMAS J. C. 1992. Light moderates the induction of phosphoenolpyruvate carboxylase by NaCl and abscisic acid in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **99**: 1261–1264.
- [38] MICHALOWSKI C. B., OLSON S. W., PIPENBROCK M., SCHMITT J. M., BOHNERT H. J. 1989. Time course of mRNA induction elicited by salt stress in the common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*). *Plant Physiol.* **89**: 811–816.
- [39] MICHALOWSKI C. B., BOHNERT H. J. 1992. Nucleotide sequence of a root-specific transcript encoding a germin-like protein from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* **100**: 537–538.
- [40] MISZALSKI Z., ŚLESIAK I., NIEWIADOMSKA E., BACZEK-KWINTA R., LÜTTGE U., RATAJCZAK R. 1998. Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C₃-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Environ.* **21**: 169–179.
- [41] OSMOND C. B. 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context., *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 379–414.
- [42] PAUL M. J., COCKBURN W. 1989. Pinitol, a compatible solute in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *J. Exp. Bot.* **40**: 1093–1098.
- [43] PETERS W., BECK E., PIPENBROCK M., LENZ B., SCHMITT J. 1997. Cytokinin as a negative effector of phosphoenolpyruvate carboxylase induction in *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Plant Physiol.* **151**: 362–367.
- [44] RATAJCZAK R., RICHTER J., LÜTTGE U. 1994. Adaptation of the tonoplast V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* to salt stress, C₃-CAM transition and plant age. *Plant Cell Environ.* **17**: 1101–1112.
- [45] RICHTER J. 1993. Die biochemische Anpassung der Tonoplasten-ATPase an die Stoffwechselumstellung von der C₃-Photosynthese zum CAM bei den Pflanzen *Mesembryanthemum crystallinum* und *Kalanchoe blossfeldiana*, praca doktorska, D17, Technische Hochschule Darmstadt
- [46] SCHMITT J. M., MICHALOWSKI C., BOHNERT H. J. 1988. Gene expression during CAM induction under salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum*: cDNA library and increased levels of mRNA for phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate orthophosphate dikinase. *Photosynth. Res.* **17**: 159–171.
- [47] SCHMITT J. M., PIPENBROCK M. 1992. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and crassulacean acid metabolism induction in *Mesembryanthemum crystallinum* L. by cytokinin. *Plant Physiol.* **99**: 1664–1669.
- [48] SHOMER-ILAN A., WAISEL Y. 1986. Effects of stabilizing solutes on salt activation of phosphoenolpyruvate

- carboxylase from various plant sources. *Physiol. Plant.* **67**: 406–414.
- [49] STARCK Z. 1993. Reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska. W: Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska. Wydawnictwo SGGW, W-wa, s. 9–23.
- [50] STEUDLE E., LÜTTGE U., ZIMMERMANN U. 1975. Water relations of the epidermal bladder cells of the halophytic species *Mesembryanthemum crystallinum*: direct measurements of hydrostatic pressure and hydraulic conductivity. *Planta* **126**: 229–246.
- [51] STRUVE I., LÜTTGE U. 1988. Biochemical and immunological properties of solubilized tonoplast ATPase of the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* in the C₃- and CAM state. *Bot. Acta* **101**: 39–44.
- [52] TAIZ L., ZEIGER E. 1991. Plant physiology. The Benjamin/Cummings Company, Inc.
- [53] TARCZYNSKI M. C., JENSEN R. G., BOHNERT H. J. 1993. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* **259**: 508–510.
- [54] THOMAS J. C., MC ELWAIN E. F., BOHNERT H. J. 1992. Convergent induction of osmotic stress-responses. Absciscic acid, cytokinin, and the effects of NaCl. *Plant Physiol.* **100**: 416–423.
- [55] THOMAS J. C., DE ARMOND R. L., BOHNERT H. J. 1992. Influence of NaCl on growth, proline, and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension culture. *Plant Physiol.* **98**: 26–631.
- [56] THOMAS J. C., SEPAHI M., ARENDALL B., BOHNERT H. J. 1995. Enhanced seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **18**: 801–806.
- [57] TSIAKANTIS M. S., BARTHOLOMEW D. M., SMITH J. A. C. 1996. Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H⁺-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.* **9**: 729–736.
- [58] VERNON D. M., OSTREM J. A., SCHMITT J. M., BOHNERT H. J. 1988. PPCase transcript levels in *Mesembryanthemum crystallinum* decline rapidly upon relief from salt stress. *Plant Physiol.* **86**: 1002–10.
- [59] VERNON D. M., BOHNERT H. J. 1992. Increased expression of a myo-inositol methyl transferase in *Mesembryanthemum crystallinum* is part of a stress response distinct from Crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol.* **99**: 1695–1698.
- [60] VERNON D. M., BOHNERT H. J. 1992. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* **11**: 2077–2085.
- [61] WEIGEND M. 1994. *In vivo* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase from the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Plant. Physiol.* **144**: 654–660.
- [62] WHITEHOUSE D. G., ROGERS W. J., TOBIN A. K. 1991. Photorespiratory enzyme activities in C₃ and CAM forms of the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *J. Exp. Bot.* **42**: 485–492.
- [63] WINICOW I., BASTOLA D. R. 1997. Salt tolerance in crop plants: new approaches through tissue culture and gene regulation. *Acta Physiol. Plant.* **19**: 435–449.
- [64] WINTER K., GADEMANN R. 1991. 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 Physiol.* **95**: 768–776.
- [65] WINTER K. 1979. Effect of different CO₂ regimes on the induction of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* **121**: 147–153.
- [66] WINTER K., LÜTTGE U. 1979. C₃-Photosynthese und Crassulacean-Säurestoffwechsel bei *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* **92**: 117–132.
- [67] WINTER K., LÜTTGE U., WINTER E., TROUGHTON J. H. 1978. Seasonal shift from C₃-photosynthesis to crassulacean acid metabolism in *M. crystallinum* growing in its natural environment. *Oecologia* **34**: 225–237.
- [68] WINTER K. 1974. NaCl-induzierter Crassulaceen-Säurestoffwechsel bei der Salzpflanze *Mesembryanthemum crystallinum*. Abhängigkeit des CO₂-Gaswechsels von der Tag/Nacht-Temperatur und von der Wasserversorgung der Pflanzen. *Oecologia* **15**: 383–392.
- [69] WINTER K. 1973. CO₂-Fixierungsreaktionen bei der Salzpflanze *Mesembryanthemum crystallinum* unter variierten Außenbedingungen. *Planta* **114**: 75–85.
- [70] YAMADA S., KATSUHARA M., KELLY W. B., MICHALOWSKI C. B., BOHNERT H. J. 1995. A family transcripts encoding water channel proteins tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* **7**: 1129–1142.