

ROLA WAPNIA W FUNKCJONOWANIU SYSTEMÓW INFORMACYJNYCH KOMÓRKI ROŚLINNEJ

The role of calcium in messenger system in plant cell

Jan BIAŁCZYK, Zbigniew LECHOWSKI

Summary. The action of free Ca^{2+} ions as a secondary factor in transmitting information in a cell is connected with rapid and transient changes of their level in basal cytoplasm, resulting from their quick, two-way transport. Both, apoplast and cell organelle (chiefly endoplasmatic reticulum and mitochondria) play the part of Ca^{2+} ion store. The free Ca^{2+} ion concentration in a cell cytoplasm before stimulation amounts from 0.1 to 1 μM and it can increase to about 10 μM after the action of external stimulus (eg. light, gravitation, electric stimulation or phytohormones). It is evident, from comparison of free Ca^{2+} ion concentration in apoplast and cell organelles, that their level, compared to cytoplasm is 1 to 10 thousand times higher in them. Significant differences, similar to those in Ca^{2+} ion concentration, occur also in the electrochemical potential (cytoplasm from -120 to -170 mV, vacuole about -90 mV).

It is evident from the above information that in a plant cell is abnormally high electrochemical gradient preferring passive transport of Ca^{2+} ions to cytoplasm. Maintaining a low level of free Ca^{2+} ions in cytoplasm requires a systematic removal of its excess to apoplast and cell organelle. The active Ca^{2+} -pumps (Fig. 1), situated in plasmalemma and in the membranes of cell organelles take part in the regulation of free Ca^{2+} ion level in cytoplasm. The level of free Ca^{2+} ions in cytoplasm determines the degree of protein phosphorylation and the activity of some enzyme, thus stimulating a suitable response. Therefore the level of Ca^{2+} ions is a kind of a bridge between the perception place of an external stimulus and a definite intracellular response. The metabolism of phosphoinositides changes enable the inclusion of Ca^{2+} ions into the cell's secondary information system (Fig. 2). The receptory system found within plasmalemma enables, after the action of an external stimulus, transmission of a signal, thus activating phospholipase C which hydrolyzes phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) to inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DG). Both products compose central metabolites incorporated into different ways mediating in information transmitting from the cell surface into its interior. IP_3 becomes tied with its specific receptor in the membranes of cell organelles, stimulating the excretion of Ca^{2+} ions into cytoplasm. In numerous reactions, in which calcium acts as a second messenger in a stimulus or chemical signal transmission, the response in a cell is not directly induced by Ca^{2+} ions but by the complex produced by its binding with a special class of proteins (calcium binding proteins, CBP). In a complex binding with Ca^{2+} ions, CBP undergo conformational changes which condition the ability to interaction with other proteins and also the growth of their chemical activity. Calmodulin (CaM) has been so far the most studied and the most generally shown CBP in controlling many biological processes. The increase of free Ca^{2+} concentration in cytoplasm from 1 to 10 μM enables originating Ca^{2+} -CaM complex as well as its biological activity. The active Ca^{2+} -CaM interreacting with an apoenzyme induces, in the consequence of this reaction, also its specific, conformational changes thus activating a definite enzyme. The other way is Ca^{2+} -CaM affecting on the regulatory system correlated with the protein kinase activation controlling the protein phosphorylation. The information from a signal flows from the cell surface to the interior through DG, another product of PIP_2 hydrolyze, was confirmed. In the presence of Ca^{2+} ions it activates protein kinase C, directly catalyzing the protein phosphorylation. The article deals with level modifications of free Ca^{2+} ions mediating in various photoreception systems in cytoplasm and their influence on different photomorphogenetic processes. There were also considered the effects made by phytohormones and gravitation on the level of Ca^{2+} free ions. Figure 3 illustrates that changes in cytoplasmic and nucleoplasmic level of free Ca^{2+} ions, together with a specific class of chromosomal CBP can exert a regulative influence on translation and transcription of mRNA. Stimulating action of free Ca^{2+} ions leads to increasing the phosphorylated CBP pool, interreacting with specific genes coding the transcription. The demand of Ca^{2+} ion influence on the gene expression in

plant cells is based on indirectly obtained information and it requires experimental confirmation. Periodic changes in the level of free Ca^{2+} ions in the cells cytoplasm thus constitute a considerable tie linking the place of stimulus perception with the modification of metabolic processes responsible for direct reaction of a cell.

Key words: calcium, calmodulin, phosphatidylinositols, second messenger

Dr Jan Białczyk, dr Zbigniew Lechowski, Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin, Uniwersytet Jagielloński, al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

Podstawowe znaczenie wapnia jako makroelementu we wzroście i rozwoju roślin znane jest od wielu dziesięcioleci. Wyniki badań uzyskane w ostatnich 10 latach pozwoliły na wykazanie jego szczególnej funkcji regulacyjnej. Działanie zewnętrznych czynników takich jak światło, fitohormony, przyciąganie ziemskie, indukują zmiany w poziomie wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie, stanowiąc ważny wewnątrzkomórkowy regulator licznych fizjologicznych i biochemicznych procesów [56, 83, 109, 113, 114, 115, 134]. Fizyko-chemiczne własności jonów Ca^{2+} umożliwiają u organizmów eukariotycznych przyjęcie przez nie roli wewnątrzkomórkowego nośnika pośredniczącego w przekazywaniu do komórki informacji odbieranych ze środowiska zewnętrznego [6]. Komórki roślinne wykazują wysoki stopień selektywności w pobieraniu jonów Ca^{2+} w porównaniu z innymi kationami np. Mg^{2+} , K^+ , Na^+ [6]. Występujące w komórkach różne pozablonowe ligandy: białka, nukleotydy adeninowe, szczawiany i cytryniany [83], wykazują preferencję wiązania jonów Ca^{2+} 10^5 razy wyższą w porównaniu do wiązania jonów Mg^{2+} [38, 70, 71]. Umożliwia to utrzymanie w cytoplazmie optymalnej a równocześnie bardzo niskiej koncentracji wolnych jonów Ca^{2+} . Jony te charakteryzują się także stosunkowo niską energią hydratacji, umożliwiającą ich specyficzne rozmieszczenie w obrębie różnych elementów strukturalnych komórki [82]. Stężenie jonów Ca^{2+} oznaczane w cytoplazmie jest bardzo niskie [10^{-6} - 10^{-8}M] i pozostaje pod stałą metaboliczną kontrolą. Stężenie innych kationów np. Mg^{2+} , K^+ może osiągać w cy-

toplazmie wartości rzędu milimoli. To ograniczenie stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie jest związane: a) z możliwością ewentualnego tworzenia się z nieorganicznymi fosforanami nierozpuszczalnych strąków, naruszających gospodarkę energetyczną komórki [38, 70, 71] (proces wiązania Ca^{2+} z fosforanami jest około 10 razy szybszy w porównaniu do innych kationów); b) ze specyficzną zdolnością dehydratacji koloidów komórkowych (około 100-krotnie wyższą w porównaniu do innych kationów). Stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie może okresowo ulegać podwyższeniu do wartości rzędu od 10^{-7} do 10^{-6}M (a wyjątkowo do 10^{-5}M), nie wywołując jednak istotnych zakłóceń w środowisku jonowym [6]. Dla porównania podobny wzrost stężenia w komórce roślinnej innych jonów dwuwartościowych np. Mg^{2+} lub jednowartościowych np. K^+ prowadziłby do podwyższenia ich stężenia w zakresie od 10^{-3} do 10^{-1}M . Tak wysokie stężenie jonów w istotny sposób naruszałoby w tym przypadku stosunki osmotyczne komórki, a także wynikający z wzajemnego stosunku kationów do anionów jej wewnętrzny stan elektryczny. Utrzymanie homeostazy wymagałoby również bardzo wysokiego nakładu energii. Podwyższenie w cytoplazmie stężenia wolnych jonów Ca^{2+} prowadzi w komórce do szeregu niekorzystnych procesów [56, 114], np. stymuluje aktywność licznych enzymów, w tym również hydrolytycznych, co w efekcie staje się przyczyną uszkodzeń różnych struktur komórkowych, a nawet śmierci komórki. Leshem i wsp. [80] sugerowali, że załamanie się wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia jonów Ca^{2+} ak-

tywuje fosfolipazę A, katalizującą reakcję uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych z błon komórkowych, prowadząc do ich destrukcji. W komórkach roślinnych obok licznych makrocząsteczek (najczęściej białek), występuje system aktywnych Ca^{2+} -pomp, umożliwiający usuwanie nadmiaru wolnych jonów Ca^{2+} z cytoplazmy [24]. Potwierdzenie występowania u roślin kalmoduliny (CaM)¹, białka wiążącego jony Ca^{2+} , oraz wykazanie stymulującego wpływu kompleksu Ca^{2+} - CaM na aktywność niektórych enzymów, potwierdziło istotne znaczenie jonów Ca^{2+} jako wewnątrzkomórkowego nośnika informacji o uniwersalnym znaczeniu (występowanie i aktywność kalmoduliny wykazano uprzednio w tkankach zwierzęcych). Przemijające zmiany w poziomie wolnych jonów Ca^{2+} stanowią zatem istotne ogniwo łączące miejsce percepcji bodźca poprzez specjalny receptor w plazmolemie, z włączeniem tych informacji w modyfikację procesów metabolicznych, odpowiedzialnych za bezpośrednią reakcję komórki.

LOKALIZACJA I DROGI TRANSPORTU WAPNIA W KOMÓRCIE ROŚLINNEJ

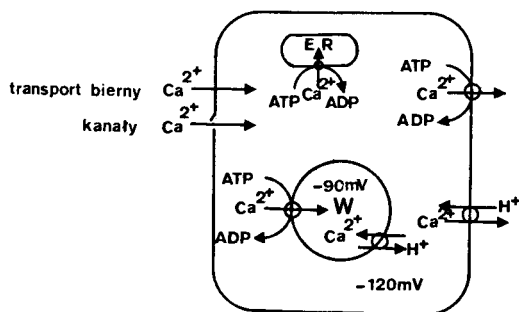
Koncentracja wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie podstawowej w okresie spoczynku wynosi od 0,1 do $1\mu\text{M}$ [9, 16, 47, 66,

157]. Wartość ta może ulegać kilkakrotnemu podwyższeniu po stymulacji zewnętrznej. Dla przykładu, w cytoplazmie komórek *Chara* po indukowanej elektrycznie depolaryzacji plazmolemy, stężenie wolnych jonów Ca^{2+} osiągało wartość $7\mu\text{M}$ [31]. Większość wewnętrznej puli wapnia występuje w postaci związanej z białkami błon plazmatycznych, jak również z nieorganicznymi i ograniczonymi anionami. Stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w porównaniu z cytoplazmą jest od 1 tys. do 10 tys. razy wyższe w apoplazmie. Podobnie wyższe stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w porównaniu z cytoplazmą obserwowano w obrębie różnych organelli komórkowych. W wakuolach, na przykład, stężenie wolnych jonów Ca^{2+} utrzymuje się na poziomie 10^{-4}M . Równie duże różnice jak w stężeniu jonów Ca^{2+} wykazane zostały w potencjale elektrochemicznym cytoplazmy (od -120 do -170 mV, a wakuoli około -90 mV [51, 52, 56, 83, 147]. Tak więc w komórce roślinnej występuje anormalnie duży gradient elektrochemiczny, preferujący transport jonów Ca^{2+} do cytoplazmy [142, 147, 157]. Gradienty stężenia jonów Ca^{2+} (wynikające z różnic ich zawartości w mikroobszarach komórki), jak i wartość potencjału elektrochemicznego, utrzymywane są poprzez system ich aktywnego transportu przy wykorzystaniu energii metabolicznej komórki [56, 89, 139]. Drogi transportu jonów Ca^{2+} oraz możliwości regulacji ich poziomu w komórce ilustruje w sposób uproszczony rycina 1.

Uzyskane doświadczalnie rezultaty wykazują, że jony Ca^{2+} są transportowane do komórek roślinnych biernie. Zostało to potwierdzone przez Mettlera i Leonarda [86], którzy nie uzyskali znaczących różnic w poziomie jonów Ca^{2+} w protoplastach *Nicotiana*, po uprzednim potraktowaniu ich jednym z inhibitorów (oligomycyną, DNP, antimycyną, DCCD), hamujących transport aktywny w porównaniu z kontrolą. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach przeprowadzonych na fragmentach koleoptyli i

¹Wykaz stosowanych skrótów: ABA – kwas abscysynowy; ATP – adenozynotrifosforan; B – światło niebieskie; cAMP – cykliczny adenozynomonofosforan; cGMP – cykliczny guanozynomonofosforan; CaM – kalmodulina; CBP – białka wiążące jony Ca^{2+} ; CTC – chlorotetracyklina; DCCD-N,N'-dicyklohexylcarbodiimid; DNP – dinitrofenol; EDTA – kwas etylenodwuaminocteroowy; EGTA – kwas etyleno-glikol-bis-(β -aminoetyl eter)-N,N,N',N'-ceteroowy; ER – retikulum endoplazmatyczne; FR – promieniowanie dalekiej czerwieni (710–730 nm); GA₃ – kwas giberellowy; IAA – kwas indolilo-3-octowy; PEPC – karboksylaza fosfoenolopirogronianowa; P_{fr} – forma fitochromu absorbująca promieniowanie dalekiej czerwieni; P_r – forma fitochromu absorbująca światło czerwone (około 670 nm); R – światło czerwone; Rubisco – karboksylaza 1,5-difosforanowa; UDP – urydynodifosforan; W – wakuola.

epikotyli *Avena sativa* [51, 52]. Indukowany działaniem bodźców zewnętrznych transport jonów Ca^{2+} do komórki jest konsekwencją przejściowego wzrostu przepuszczalności błon komórkowych [4, 97].



Ryc. 1. Uproszczony schemat głównych dróg transportu jonów Ca^{2+} w komórce roślinnej [wg 10, 17, 30, 49, 53, 124, 131]. Szczegółowe omówienie procesów transportu jonów Ca^{2+} w tekście.

Fig. 1. Simplified schema of Ca^{2+} - transport in plant cell [after 10, 17, 30, 49, 53, 124, 131].

Transport bierny jonów Ca^{2+} do komórki zachodzi poprzez selektywnie działające pory lub kanały zbudowane z białek zlokalizowanych w dwuwarstwie lipidowej [76, 130]. Otwarcie lub zamknięcie Ca^{2+} -kanałów jest konsekwencją zmian potencjału membranowego. W komórkach nie poddanych działaniu bodźców zewnętrznych, Ca^{2+} -kanały pozostają zamknięte, a możliwość ich otwarcia wzrasta wraz z depolaryzacją błony [76, 130]. Regulacja stopnia otwarcia Ca^{2+} -kanałów związana z potencjałem membranowym może zależeć także od stopnia fosforylacji białek, występujących w błonach stowarzyszonych z Ca^{2+} -kanałami [43, 103]. Kanały te w różnym stopniu i z różną specyficznością mogą ulegać zablokowaniu poprzez działanie jonów Co^{2+} , La^{3+} lub pewnych trucizn (np. verapamilu, D-600, diltiazemu lub dihydropirydyny) [76]. Sposób blokowania obydwoma rodzajami inhibitorów jest prawdopodobnie odmienny i dotyczy różnych elementów strukturalnych plazmo-

lemy [56]. Funkcjonowanie Ca^{2+} -kanałów w komórkach roślinnych jest słabo poznane. Rezultaty ostatnich prac Handsona i wsp. [53, 131] wykazały, że działanie związków depolaryzujących błony prowadziło do ich otwierania, natomiast związki repolaryzujące promowały ich zamykanie, a także, że stopień ich otwarcia może być regulowany zarówno poprzez poziom zewnętrznej puli wapnia, jak i stopień fosforylacji białek strukturalnie związanych z kanałami.

Dla utrzymania stałego niskiego poziomu wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie wymagane jest systematyczne usuwanie ich nadmiaru do apoplastu lub organelli komórkowych (głównie wakuoli, ER, chloroplastów i mitochondriów) [30, 49, 72]. Znacząca pula jonów Ca^{2+} jest magazynowana w obrębie jądra komórkowego, mitochondriów i chloroplastów. Z uwagi jednak na ograniczone możliwości szybkiego jej przemieszczania nie odgrywa ona zasadniczej roli w regulacji poziomu wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie podstawowej [30, 60]. W przypadku ER możliwości te są znacznie większe, zależą jednak od stanu rozwojowego komórki. W komórkach wykazujących egzocytózę (np. podczas wzrostu łagiewki pyłkowej) stwierdzono odkładanie znacznych ilości jonów Ca^{2+} w obrębie ER [129]. Występowanie w ER systemu wiązania jonów Ca^{2+} jest dobrze udokumentowane, a wysoką zdolność wiązania jonów Ca^{2+} potwierdza również fakt, że połówkowe wysycanie reakcji występuje przy stężeniu około $1 \mu\text{M}$. Wyniki te sugerują, że ER może odgrywać istotną rolę w utrzymaniu niskiego poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie [10, 17, 18]. System wiązania jonów Ca^{2+} w ER jest wrażliwy na działanie jonów wanadu [10, 17, 18] i inhibitorów CaM [10].

Działanie jonów Ca^{2+} jako wtórnego czynnika przekazywania informacji w komórce związane jest z szybkimi i przemijającymi zmianami jego poziomu w cytoplazmie podstawowej. Proces ten związany jest z łatwym i szybkim dwukierunkowym ich prze-

mieszczaniem. Rolę magazynu jonów Ca^{2+} pełni zarówno apoplast jak i organelle komórkowe (głównie ER i mitochondria) [41, 45, 118]. Zawartość jonów Ca^{2+} w wakuoli jest wysoka ale jej udział w systemie regulującym ich dystrybucję jest mało efektywny. Ich transport następuje z dużych objętości roztworu wakuolarnego do stosunkowo małej powierzchni cytoplazmy. Regulacja poziomu wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie następuje poprzez udział aktywnych Ca^{2+} -pomp, zlokalizowanych w plazmolemie i błonach organelli komórkowych [52, 83, 116]. Aktywność Ca^{2+} -ATPaz włączonych w funkcjonowanie Ca^{2+} -pomp regulowana jest poprzez Ca^{2+} -CaM [89, 139]. Ilość wydalaných jonów Ca^{2+} z cytoplazmy, przy udziale aktywnych Ca^{2+} -pomp zlokalizowanych głównie w plazmolemie, wynosi około 80–90% ogólnej ich puli [65]. Udział Ca^{2+} -pomp zlokalizowanych w tonoplaście i błonach ER w procesie regulacji poziomu wolnych jonów Ca^{2+} jest znacznie mniejszy, przeważa w nich natomiast aktywna wymiana $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (antiport) [124, 141]. Za takim założeniem przemawia także wysokie, wynoszące około 10 μM wysycenie połówkowe tej reakcji oraz jej wrażliwość na wewnątrzkomórkowe pH [17, 141]. Konieczność utrzymania gradientu H^+ w błonach organelli komórkowych umożliwiającego transport jonów Ca^{2+} wymaga nakładu energii generowanej przez H^+ -ATPazy [147]. Sze [147] uważa, że system ten, aczkolwiek w mniejszym stopniu może, występować również w plazmolemie.

ROLA WAPNIA W APOPLAŚCIE

Roztwór jonów wypełniający ściany komórkowe, jak również występujące pomiędzy nimi wolne przestrzenie, stanowi ich łatwo dostępny rezerwuuar dla komórki. Rossignol i wsp. [133] wykazali, że około 60% z całkowitej puli wapnia w tkance roślinnej zawiera ściana komórkowa. Wapń odgrywa ważną rolę w strukturalnej integra-

cji zarówno plazmolemy, poprzez wpływ na fosfolipidy i białka zewnętrznej powierzchni błony [42], jak również ściany komórkowej [28, 52]. W przypadku deficytu wapnia błony komórkowe tracą swoje własności półprzepuszczalne [82]. Stężenie jonów Ca^{2+} w zakresie od 1 do 5 mM w apoplaście uważa się za czynnik ochronny plazmolemy przed wieloma negatywnymi efektami, np. oddziaływania niskich wartości pH, zasolenia, jonów toksycznych oraz braku zbalansowania jonowego [52, 79]. W regionach bezpośrednio przyległych do plazmolemy występowanie jonów Ca^{2+} w milimolarnej koncentracji zabezpiecza ich niezbędną pulę dla symplastu. Ściana komórkowa pełniąca funkcję zewnętrznego szkieletu komórki roślinnej, odgrywa istotną rolę także we wzroście i rozwoju roślin. Jej własności elastyczne umożliwiają wzrost komórki (często stymulowany działaniem IAA). Niska koncentracja wapnia w ścianach komórkowych wynosząca około 1 μM wywiera na ten proces hamujący wpływ, natomiast wzrost do około 10–20 μM stanowi poziom ochraniający [21, 40]. Wysoka koncentracja jonów Ca^{2+} w ścianie komórkowej jest konieczna do utrzymania aktywności syntazy 1,3- β -glukanowej, włączonej w syntezę polimerów ściany komórkowej [28, 65]. Ray i Baker [125] wykazali wzrost wbudowywania UDP-(^{14}C)-glukozy w ścianę komórkową po uprzednim potraktowaniu tkanki roztworami zawierającymi jony Ca^{2+} . Wykazano również, że w organach spichrzowych, m. in. w owocach jabłek i pomidorów, ściany komórkowe pełnią funkcję głównego magazynu wapnia. Sztuczny wzrost poziomu jonów Ca^{2+} w apoplaście tych organów (np. poprzez infiltrację w próżni roztworami zawierającymi jony Ca^{2+}) obniżał przepuszczalność błon komórkowych, stymulując w komórkach wysokie stężenie chlorofilu i kwasu askorbinowego, przy równoczesnym obniżaniu produkcji etylenu i wydzielania CO_2 [101]. W owocach kontrolnych następowała natomiast w ścianach

komórkowych kumulacja 70 kDa polipeptydu, co prawdopodobnie związane jest z degradacją blaszki środkowej. Wyniki te sugerują, że pewne procesy biochemiczne związane z etapem starzenia się tkanek ulegają zahamowaniu w przypadku podwyższonego stężenia wapnia w ścianach ich komórek [108, 110]. Dotychczasowe rezultaty nie pozwalają jednak na określenie krytycznego poziomu apoplastycznego wapnia, stymulującego rozpoczęcie procesu starzenia się tkanek i organów roślinnych. Wapń utrzymuje strukturalną integralność ściany komórkowej. Spełnia on bardzo ważną rolę w adhezji komórek i spójności tkanki. Ten cementujący efekt związany jest z pektynianem wapnia występującym w blaszce środkowej [28, 134]. Wapń pełni tutaj rolę wewnątrzkomórkowego czynnika stabilizującego kompleks pektyna-białko [29]. W zawiesinie kultur tkankowych zastosowanie związków chelatujących jony Ca^{2+} (np. EDTA, EGTA) prowadziło do rozpadu tkanek [36]. Spadek poziomu wapnia w ścianie komórkowej aktywuje także niektóre enzymy (m. in. poligalakturonazę) powodując jej degradację [8].

WAPŃ JAKO ELEMENT SYSTEMU INFORMACYJNEGO KOMÓRKI ROŚLINNEJ

Percepcja bodźca zewnętrznego przez komórkę i włączenie go w regulację procesów biochemicznych prowadzących do indukcji odpowiedzi, stanowi istotny przedmiot zainteresowania fizjologów roślin. Odkrycie w komórkach roślinnych systemów, których aktywność uzależniona jest od poziomu wolnych jonów Ca^{2+} takich jak fosforylacja białek, aktywność niektórych enzymów uzależnionych od jonów Ca^{2+} lub kompleksu Ca^{2+} -CaM, doprowadziło (podobnie jak w komórkach zwierzęcych) do wykazania jego roli jako nośnika informacji [115, 134]. Poziom jonów Ca^{2+} stanowi więc rodzaj pomostu pomiędzy percepcją bodźca

zewnętrznego, a określoną wewnątrzkomórkową odpowiedzią [56, 84, 113, 114, 115, 116, 134]. Różne rodzaje bodźców zewnętrznych wywierają często przeciwstawne efekty. W naturalnych warunkach poziom jonów Ca^{2+} jest wypadkową ich równoczesnego oddziaływania. Jeżeli stężenie wolnych jonów Ca^{2+} pełni w komórce rolę wtórnego informatora lub, w dalszej kolejności, mediatora pierwotnych bodźców, to muszą być w niej spełnione następujące kryteria [115, 156]: a) cytoplazmatyczny poziom wolnych jonów Ca^{2+} musi zależeć od stymulacji zewnętrznej, a zmiany w ich koncentracji zawsze poprzedzają odpowiedź fizjologiczną; b) komórki muszą posiadać mechanizm regulujący zmiany stężenia wolnych jonów Ca^{2+} i c) zablokowanie działania jonów Ca^{2+} -wrażliwego systemu (np. przez zastosowanie inhibitorów Ca^{2+} -kanałów lub inhibitorów Ca^{2+} -ATPaz) musi hamować odpowiedź fizjologiczną na bodziec.

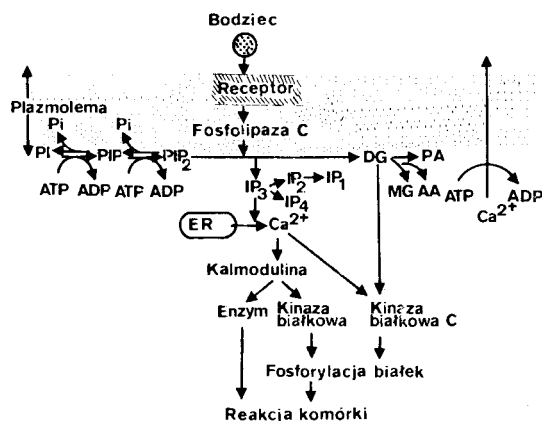
U podstawy włączenia jonów Ca^{2+} we wtórny system informacyjny komórki stoją przemiany fosforofosfatydyloinozytoli. Zostały one pierwotnie szczegółowo zbadane w różnych systemach zwierzęcych [4], a następnie potwierdzono ich występowanie także w komórkach roślinnych [90, 114, 115].

Schemat na ryc. 2 ilustruje cykl przemian fosforofosfatydyloinozytoli i mobilizację jonów Ca^{2+} , prowadzącą w efekcie do odpowiedzi fizjologicznej. Jak wykazano, bodźce takie jak światło, fitohormony czy przyciąganie ziemskie działają poprzez zlokalizowany w plazmolemie system receptorów komórki. Ich wzajemne oddziaływanie modyfikuje jej wrażliwość. Interakcja ta wywiera wpływ na stopień aktywności fosfolipazy C, indukującej cykl przemian 4,5-difosforofosfatydyloinozytoli (PIP_2) zlokalizowanego w wewnętrznej warstwie plazmolemy [4, 87, 114, 115]. Dotychczas nie udało się wyjaśnić w jaki sposób sygnał pochodzący od receptora zostaje włączony w aktywację fosfolipazy C [97]. Przyjmuje się, że aktywacja następuje poprzez białka

G (białka wiążące neukleotydy guanidynowe) [33, 46]. Z drugiej strony pewne rezultaty sugerują [85, 104], że aktywacja fosfolipazy C w tkankach roślinnych następuje poprzez wzrost poziomu jonów Ca^{2+} , a białka G nie odgrywają w nich stymulacyjnej roli jak ma to miejsce w tkankach zwierzęcych. Fosfolipaza C hydrolizuje PIP_2 (4,5-difosforofosfatydyloinozytol) prowadząc do powstania dwóch produktów: 1, 4, 5-trifosforinozytolu (IP_3) i diacyloglicerolu (DG) [4, 88, 89, 97]. Obydwa powstałe związki stanowią centralne metabolity włączone w dwie drogi przekazywania informacji pochodzących z powierzchni komórki, a prowadzących do jej wnętrza. Wyniki niektórych badań na komórkach zwierzęcych sugerują, że zarówno

arachidonowy (AA), monogliceryd (MG) czy kwas fosfatydowy (PA) [46, 59, 145], mogą być również włączone w dalsze, bardziej odległe systemy informacyjne.

IP_3 ulega związaniu z jego specyficznym receptorem w błonach cytoplazmatycznych organelli komórkowych, głównie ER [59, 145], stymulując wydalenie z nich wolnych jonów Ca^{2+} do cytoplazmy [128]. Wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie jest w tych warunkach zależny również od częściowego ich importu z apoplastu i wakuoli [156]. Badania przeprowadzone *in vitro* wykazały, że frakcja mikrosomów roślinnych po dodaniu do jej zawiesiny mikromolarnych koncentracji IP_3 wydalała szybko około 20–30% jonów Ca^{2+} . Część wydanych jonów Ca^{2+} ulegała w tych warunkach powtórnej reakumulacji do mikrosomów. Obecność fosforofosfatydyloinozytoli stwierdzono w zawieszinie komórek *Daucus carota* [7] i *Catharanthus roseus* [54], a także wykazano, że ich stężenie zależy od fazy wzrostu komórki. Wskazuje to na ich udział w proliferacji komórek. Zmiany poziomu poszczególnych form fosforofosfatydyloinozytoli wykazano również w przeciwnych partiach poduszeczki liściowej, w zależności od fazy ruchu nyktynastycznego listków *Samea saman* [91]. W tym przypadku, opisane zmiany mogłyby stanowić istotny element regulacji zegara biologicznego [32, 90].



Ryc. 2. Schemat indukowanych działaniem bodźca zewnętrznego przemian 4,5-difosforofosfatydyloinozytolu (PIP_2) oraz znaczenie jego produktów pośrednich w wewnątrzkomórkowym łańcuchu informacyjnym (wg 4, 90, 112, zmodyfikowano). Szczegółowe objaśnienie reakcji jak również stosowanych skrótów w tekście.

Fig. 2. Schematic illustration of external stimulus-induced turnover of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP_2) and the role of turnover products in the intracellular messenger system [after 4, 90, 112 modified].

IP_3 jak i DG podlegają dalszym przemianom metabolicznym, a produkty tych reakcji (np. 1, 3, 4, 5-tetrafosforinozytol (IP_4), kwas

Występowanie we frakcji plazmolemy aktywnych kinaz fosforinozytoli, a także fosfolipazy C [61] wykazano u różnych gatunków roślin. Powstały (po hydrolizie PIP_2) IP_3 ulega dalszej hydrolizie przy udziale fosforodiesteraz do 1,4-difosforinozytolu (IP_2), a następnie poprzez 1-monofosforinozytol (IP) do inozytolu (I). Ta pula inozytolu wraz z pochodzącym z syntezy *de novo*, w komórce wykorzystana jest w ER do resyntezy 1-monofosforinozytolu (PI), inkorporowanego następnie w plazmolemie, gdzie ulega fosforylacji w sposób przedstawiony na ryc. 2.

REGULACYJNA ROLA WAPNIA W FOSFORYLACJI BIAŁEK

W licznych reakcjach, w których wapń działa jako wtórny informator w przekazywaniu bodźców lub sygnałów chemicznych, odpowiedź w komórce nie jest indukowana bezpośrednio przez jony Ca^{2+} , ale poprzez kompleksy powstające z ich połączenia ze specjalnej klasy białkami (białka wiążące Ca^{2+} , ang.: calcium binding proteins, CBP) [70, 71]. Białka te wykazują wysokie powinowactwo do wapnia (określone w jednostkach liczby falowej wynosi od 10^{-8} do 10^{-6} kajzera, $1\text{K}=1 \times \text{cm}^{-2}$). W kompleksowym połączeniu z jonami Ca^{2+} , białka te ulegają zmianom konformacyjnym, wykazując także zdolność do interakcji z innymi białkami, co powoduje wzrost ich aktywności chemicznej [20]. Ich własności chemiczne określają wysoką preferencję wiązania jonów Ca^{2+} , a także wysoką selektywność (np. stosunek jonów $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ w komórce wynosi 1:1000). Ten specyficzny rodzaj białek (CBP) traci funkcjonalną aktywność w stanie niezwiązanym z wapniem.

CaM jest najlepiej do tej pory poznany i najbardziej rozpowszechniony CBP w komórkach eukariotycznych [20, 24, 68]. Inne CBP odgrywają mniejszą rolę w metabolizmie i często ich występowanie jest ograniczone do pewnych komórek lub tkanek. W tkankach roślinnych, jak to dotychczas wykazano, wapń kontroluje aktywność 10 enzymów, przy czym u połowy z nich, ich aktywność związana jest z kompleksem Ca^{2+} -CaM [114]. Wzrost stężenia wolnych jonów Ca^{2+} około 10 krotny (od 1 do $10\mu\text{M}$) w cytoplazmie przywraca inaktywowanym formom CaM ponownie ich aktywność. Własności fizyko-chemiczne CaM są podobne u wszystkich organizmów eukariotycznych, co świadczy o jego wysokim stopniu konserwatywności strukturalnej i funkcjonalnej. CaM jest białkiem kwaśnym o masie cząsteczkowej 17–19 kDa; posiada u wszystkich przebadanych dotychczas orga-

nizmów tą samą liczbę miejsc wiązania jonów Ca^{2+} (4 mol jonów Ca^{2+} na 1 mol CaM) oraz podobną, po zmianach konformacyjnych, strukturę wtórną [114, 132]. W świeżej masie tkanki roślinnej występuje w stężeniu $2\text{--}40\mu\text{mol kg}^{-1}$. Tak niskie stężenie nie ogranicza jego fizjologicznej aktywności. W komórce roślinnej występuje niski stosunek powierzchni cytoplazmy do wakuoli (1:10), co powoduje, że szacunkowa jego koncentracja w cytoplazmie podstawowej wynosi od 10^{-7} do 10^{-6}M . CaM w komórce roślinnej jest rozmieszczona nierównomiernie. Około 90% jej całkowitej puli występuje w cytoplazmie podstawowej, 5–9% w mitochondriach, 1–2% w chloroplastach i $< 1\%$ w mikrosomach [92]. Różnice w jej stężeniu występują również w poszczególnych tkankach i organach. Istnieje jednak pewna prawidłowość polegająca na większej jej zawartości w tkankach młodych lub szczególnie wrażliwych na działanie bodźców zewnętrznych.

Mechanizm aktywacji enzymów przy udziale CaM zachodzi w dwóch etapach [68, 84, 109]:

- a) jony Ca^{2+} wiążą się z CaM prowadząc do jej zmian konformacyjnych,
- b) powstały kompleks Ca^{2+} -CaM łączy się z apoenzymem idukując w nim również zmiany konformacyjne.

Zdaniem Klee [67], stopień występujących zmian konformacyjnych w kompleksie Ca^{2+} -CaM wywołany jest różną koncentracją jonów Ca^{2+} i może być rozpoznawany przez odmienne rodzaje białek, modyfikując w ten sposób odpowiedź komórki. Brak jest obecnie informacji dotyczących wpływu fosforylacji CaM na jej aktywność w komórkach roślinnych. W informacjach opartych o wyniki uzyskane na materiale zwierzęcym [158] sugerowano, że wiązanie Ca^{2+} -CaM zależy od stopnia fosforylacji CaM. Pełne ufosforylowanie CaM ograniczało jego interakcję z jonami Ca^{2+} . Aktywność enzymów uzależnionych od kompleksu Ca^{2+} -CaM może także ulegać ograniczeniu poprzez zastosowanie różnych syntetycznych pochod-

nych fenylotiazyny lub sulfonamidów naftalenu, jak również przez działanie endogennych inhibitorów. Ten ostatni sposób hamowania aktywności CaM jest szczególnie interesujący ze względu na możliwość regulowania na tej drodze jej wewnątrzkomórkowej aktywności. Do endogennych inhibitorów CaM należą różne pochodne (+)-katechiny i flawonoidów [101]. Stężenie tych związków, jak to wykazano eksperymentalnie, wzrasta w starzejących się organach roślin i może być częściowo ograniczone poprzez zewnętrzne zwiększenie w nich poziomu jonów Ca^{2+} [101, 102]. Hamowanie aktywności CaM poprzez traktowanie syntetycznymi inhibitorami nie jest jednak specyficzne i aktywność innych enzymów zależnych od jonów Ca^{2+} jest również przez nie ograniczana np. kinazy białkowej C (enzymu od CaM niezależnego) [97]. W świecie roślin wykazano do tej pory pięć enzymów, których aktywność jest regulowana poprzez oddziaływanie kompleksu Ca^{2+} -CaM, a należą do nich: NAD^{+} -kinaza [1, 93], Ca^{2+} -ATPaza [83], H^{+} -ATPaza [22, 160], chinowa- NAD^{+} oksydoreduktaza [106, 121] i kinazy białkowe [58, 106]. W dokładniej poznanych komórkach i tkankach zwierzęcych Wang i wsp. [153] wykazali udział Ca^{2+} -CaM w regulacji aktywności 24 enzymów. Kompleks Ca^{2+} -CaM może oddziaływać na dwóch drogach: bezpośrednio na system efektorowy lub pośrednio na system regulatorowy. Ta ostatnia możliwość jest skorelowana z aktywnością kinaz białkowych sterujących procesami fosforylacji białek. Zmiany konformacyjne białek wywołane stopniem ich ufosforylowania wpływają także na odmienne ich własności biologiczne. Amplifikacja i rozbieżność w działaniu pewnych sygnałów w komórkach osiągane są poprzez fosforylację i katalizowaną przez różnorodne fosfatazy, defosforylację białek [22, 95, 96].

Zewnątrzkomórkowe bodźce transmitowane są do wnętrza komórki bezpośrednio lub poprzez aktywację transmembranowego systemu sygnalizacji. Polega on na urucha-

mianiu syntezy niskocząsteczkowych związków chemicznych pełniących funkcję pośredników lub wtórnych informatorów (AA, MG, IP_4 , PA) [22, 120]. Produkty te mogą wpływać na regulację aktywności kinaz białkowych i fosfataz, zmieniając stan ufosforylowania wielu białek. Proces fosforylacji wywiera wpływ na aktywność licznych białek i układów enzymatycznych, np. kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej [123], H^{+} -ATPazy [11, 12, 160], chinowej- NAD^{+} oksydoreduktazy [121], PEPC [14, 96], kompleksu barwnik-białko zbierającego energię [2, 3], mniejszej podjednostki Rubisco [64, 94], białka wiążącego cytokininy [107], reduktazy glutanylo-hydroksymetylowej Co A [135], kinazy difosfopirogronianowej [35], fitochromów [159], a także czynnika eIF-2, inicjującego syntezę białek [122].

Drugim produktem powstającym podczas hydrolizy PIP_2 jest DG, aktywujący w obecności jonów Ca^{2+} kinazę białkową C. Kinaza białkowa C katalizuje w komórkach roślinnych bezpośrednio fosforylację białek (ryc. 2) [97, 98]. Z innych białek wiążących bezpośrednio jony Ca^{2+} poznano dobrze białko o masie cząsteczkowej 63 kDa, charakteryzujące się własnościami podjednostki chinowo- NAD^{+} oksydoreduktazy. Pełni ono również funkcję ochronną enzymu przed defosforylacją [48]. Jony Ca^{2+} mogą także bezpośrednio [151] (bez udziału CaM) stymulować reakcję fosforylacji innych białek, np. kinazy białkowej, katalizującej fosforylację małej podjednostki Rubisco [111]. W przypadku potraktowania obiektów EGTA lub fosfolipazą następuje hamowanie lub ograniczenie stopnia fosforylacji. Proces ten nie jest jednak wrażliwy na działanie inhibitorów CaM [94]. W tych warunkach enzym odzyskuje pełną aktywność poprzez dodanie jonów Ca^{2+} lub fosfolipidów.

ZNACZENIE WAPNIA W PROCESACH REGULOWANYCH PRZEZ FITOHORMONY

Fitohormony mogą posiadać istotne znaczenie w modyfikacji poziomu wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek roślinnych [78]. Cytokiny (CK) podnoszą poziom wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Znaczenie interakcji CK i jonów Ca^{2+} w opóźnianiu procesu starzenia się liści zostało dobrze udokumentowane [111]. Działanie CK pozostaje jednak bez wpływu na opóźnianie procesów starzenia w przypadku eliminacji jonów Ca^{2+} , np. poprzez równoczesne traktowanie liści EGTA [116]. Innym dobrze znanym przykładem interakcji CK i jonów Ca^{2+} jest formowanie pączka u *Funaria* [136, 137, 138]. Poprzez zastosowanie CTC, znanego chelatora wapnia wykazano, że następował wzrost koncentracji błonowo związanego wapnia w regionie komórek tarczowych (odpowiedzialnych po różnicowaniu za proces formowania pączka) [136]. Tworzenie pączka było natomiast indukowane poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} , w wyniku hodowli protonemy na podłożu zawierającym jony Ca^{2+} i jonofor wapniowy A 23187 [137]. W przypadku gdy transport jonów Ca^{2+} do protonemy był hamowany przez inhibitory Ca^{2+} -kanałów, nawet w obecności CK nie następowało formowanie pączka szczytowego [138]. Cytokiny są głównie odpowiedzialne za kontrolę podziałów komórkowych i, jak zostało to wykazane, intensywność podziałów jest skorelowana z poziomem wolnych jonów Ca^{2+} . Zastosowanie w tym przypadku inhibitorów Ca^{2+} -kanałów hamowało podziały na etapie metafazy [55]. W procesach podziału komórek obecność wapnia wykazano w obrębie wrzeciona kariokinetycznego [66].

Wpływ jonów Ca^{2+} na działanie IAA stwierdzono stosunkowo wcześniej [21, 23, 25, 37, 119], nie udało się jednak określić charakteru tego współdziałania. IAA indukuje

in vitro wydłużenie fragmentów hypocotyli wielu gatunków roślin. Wzrost ten ulega zahamowaniu poprzez zastosowanie chelatorów wapnia (EDTA, EGTA, CTC), a także inhibitorów Ca^{2+} -kanałów [25]. Działanie IAA w etiolowanym hypocotyli soi [13], epikotyli grochu i kukurydzy [63], jak również tkankach korzenia [114], stymulowało uwalnianie jonów Ca^{2+} z błon komórkowych, podnosząc jego poziom w cytoplazmie i aktywując enzymy zależne od kompleksu Ca^{2+} -CaM, w tym również kinazy białkowe [114]. Wpływ IAA poprzez CaM na zmianę stopnia fosforylacji *in vivo* badano przez zastosowanie inhibitorów CaM i, jak wykazano, hamowały one wydłużanie koleoptyli jak i hypocotyli kukurydzy [119].

Jony Ca^{2+} stymulują syntezę i sekrecję α -amylaz w traktowanych GA_3 warstwach komórek aleuronowych ziarniaków zbóż [62]. Rezultaty badań nad inkorporacją ^{35}S -metioniny sugerują jednak, że same jony Ca^{2+} mogą wywierać stymulujący efekt na aktywność α -amylaz [118]. Z przedstawionych wzajemnie sprzecznych informacji wynika, że wyjaśnienie mechanizmu ewentualnego współdziałania GA_3 i jonów Ca^{2+} w komórce roślinnej wymaga dalszych badań.

Hetherington i wsp. [57] obserwowali synergistyczne działanie ABA i jonów Ca^{2+} w utrzymaniu zamknięcia szparek. Ich zdaniem działanie ABA prowadzi do wzrostu przepuszczalności błon komórek szparkowych dla jonów Ca^{2+} . Wzrost poziomu wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie może w sposób istotny wpływać na szybkość przepływu innych jonów, determinując stan turgorescencji komórek szparkowych.

Obserwowane zmiany w transporcie jonów Ca^{2+} indukowane działaniem fitohormonów mogą być wynikiem aktywacji Ca^{2+} -ATPaz, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ wymiany (antiport) lub obydwu procesów równocześnie. Dalsze badania są niezbędne dla wyjaśnienia, który z procesów w sposób przeważający określa kierunek transportu jonów Ca^{2+} . Jeżeli fitohormony wywierają wpływ na zmiany

poziomu cytoplazmatycznego wapnia poprzez redystrybucję wewnątrz komórki (tj. pomiędzy organellami komórkowymi a cytoplazmą), to określenie tych zmian może nastąpić wyłącznie poprzez bezpośrednio wykonane pomiary poziomu jonów Ca^{2+} . Informacje dotyczące interakcji fitohormonów i jonów Ca^{2+} są niepełne i często uzyskane pośrednio. W większości podawanych przykładów pochodzą one jedynie z powierzchniowej obserwacji badanego materiału, umieszczonego w pożywkach o różnej koncentracji jonów Ca^{2+} i odpowiedniego fitohormonu. Pełne wyjaśnienie tych efektów wymaga zastosowania skomplikowanych technik pomiaru stężenia wapnia w różnych mikroobszarach komórki, i określenie także wzajemnego oddziaływania fitohormonu i jonów Ca^{2+} na procesy metaboliczne.

UDZIAŁ WAPNIA W PROCESACH FIZJOLOGICZNYCH KONTROLOWANYCH DZIAŁANIEM ŚWIATŁA

Efekty działania światła na procesy morfogenezy i ruchów roślin zależą od stosowanych zakresów spektralnych i wartości kwantowej. Fizjologiczna odpowiedź na bodziec świetlny jest związana ze zmianami poziomu wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie podstawowej komórek roślinnych. Dobrze udokumentowane informacje obejmują działanie światła czerwonego (R), dalekiej czerwieni (FR) i niebieskiego (B). Światło czerwone indukuje kiełkowanie spor *Onoclea*. Proces ten jest hamowany poprzez równoczesne napromieniowanie FR [154]. Indukująca w procesie zarodnikowania funkcja R polega na podwyższeniu poziomu wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie [155]. Napromieniowanie daleką czerwień wywiera natomiast efekt przeciwny. Obserwowane przeciwstawne działanie R i FR na poziom cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca^{2+} wskazuje na udział fitochromu w sterowaniu tą

reakcją [31, 83]. Dodatkowego potwierdzenia istotnej roli R w indukcji transportu jonów Ca^{2+} dostarczyły wyniki badań z zastosowaniem inhibitorów Ca^{2+} -kanałów [154, 155]. W obecności jonów La^{3+} , R nie indukuje kiełkowania. Jednakże potraktowanie spor jonami La^{3+} po uprzednim napromieniowaniu R nie ograniczało procesu kiełkowania. Efekt ten pozwala przypuszczać, że wbudowanie jonów Ca^{2+} koniecznych do indukcji kiełkowania jest reakcją następującą szybko po naświetleniu. Spory *Onoclea* mogą również kiełkować w ciemności jeżeli nastąpi wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, np. poprzez umieszczenie ich w pożywce zawierającej jony Ca^{2+} i jonofor wapniowy A 23187 [154]. Wpływ inhibitorów CaM zastosowanych w roztworach wywiera hamujące działanie na intensywność kiełkowania spor, może to sugerować udział w tym procesie CaM. Podobny efekt R i jego rolę w podwyższaniu cytoplazmatycznego poziomu wapnia, wykazano w indukcji ruchu chloroplastu *Mougeotia* do układu płaskiego. Źródłem jonów Ca^{2+} były w tym przypadku: apoplast, pożywka oraz organelle komórkowe [143]. Szczególną rolę w komórkach *Mougeotia* przypisuje się wakuolom taninowym, pełniącym funkcję wewnątrzkomórkowego rezerwuaru jonów Ca^{2+} .

Występowanie fitochromowej regulacji poziomu jonów Ca^{2+} w cytoplazmie stwierdzono w protoplastach wielu gatunków roślin [26, 131]. Poddanie komórek roślinnych działaniu hormonów zwierzęcych stymulujących hydrolizę PIP_2 , np. 5-hydroksytryptaminą, doprowadziło do uzyskania efektów zastępujących działanie R. Bazując na tych rezultatach sugerowano, że P_{fr} stymuluje hydrolizę PIP_2 , której produkty indukują w błonach komórkowych otwarcie Ca^{2+} -kanałów [131]. W przeciwieństwie do tych wyników, badania nad wbudowywaniem jonów Ca^{2+} do izolowanej frakcji mikrosomalnej z koleoptyli traw poddanych napromieniowaniu FR wykazały, że prowa-

dział on również do wzrostu wolnego cytoplazmatycznego wapnia [31, 83]. Z tych obserwacji wynika, że w pewnych tkankach FR może prowadzić także do wzrostu wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Uzyskane wyniki sugerują wyraźnie, że określony zakres spektralny może stymulować odmienne efekty w różnych tkankach roślinnych lub, że mogą być one uzależnione od ich wieku i stanu rozwojowego [114]. Poziom fosforylacji niektórych białek w jądrze komórkowym grochu jest promowany działaniem R przy równoczesnym wzroście zawartości jonów Ca^{2+} do rzędu mikromolarnych koncentracji. Reakcja ta jest odwracalna po zadziałaniu FR [27]. Stymulujące działanie R na intensywność fosforylacji białek oraz hamowanie tych procesów przez EGTA i inhibitory CaM sugerują, że R i CaM kontrolują jej przebieg. Wong i wsp. [159] wykazali w badaniach *in vitro*, że P_r jest dobrym substratem trzech kinaz białkowych ssaków: cAMP-kinazy białkowej, cGMP-kinazy białkowej i kinazy białkowej C. W przypadku cAMP kinazy białkowej, P_{fr} jest dla niej substratem, podczas gdy pozostałe rodzaje kinaz fosforylują P_{fr} w ograniczonym zakresie. Różnice występujące podczas procesu fosforylacji obydwu form fitochromu mogą wyjaśniać różną komórkową odpowiedź, wywołaną pośrednio biochemicznymi zmianami w reakcjach kontrolowanych przez fitochrom.

Światło niebieskie indukuje fototaktyczną odpowiedź komórek *Chlamydomonas* [99] i, jak wykazano to eksperymentalnie, reakcja ta wiąże się także ze wzrostem stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie. Efekt działania może być hamowany przez inhibitory Ca^{2+} -kanałów. Wyniki sugerują, że wapń również odgrywa rolę w transdukcji sygnału B. Hipoteza została dodatkowo potwierdzona poprzez rezultaty badań nad indukcją słabymi natężeniami B ruchu chloroplastu *Mougeotia*. Wagner i wsp. [152] wykazali w tych warunkach: wzrost poziomu wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie, wzrost

fosforylacji białek oraz hamowanie reakcji ruchowej chloroplastu przez zastosowanie inhibitorów CaM. Światło niebieskie wywiera stymulujący wpływ na szybkość ruchu cytoplazmy, promując w tym przypadku wydalanie z cytoplazmy podstawowej wolnych jonów Ca^{2+} . Dla uzasadnienia postawionej hipotezy, przeprowadzono eksperymenty z komórkami *Vallisneria*, wykazującymi ruch cytoplazmy wyłącznie w świetle. Ruch mógł być jednak indukowany również w ciemności poprzez dodanie do środowiska EGTA [148]. W innych komórkach roślinnych ruch cytoplazmy był blokowany w świetle poprzez wzrost koncentracji cytoplazmatycznego wapnia (w wyniku działania jonów Ca^{2+} i jonofosforu wapniowego A 23187) [34, 156, 157]. Podobny efekt uzyskano poprzez mikroiniekcję roztworu Ca^{2+} -EGTA (buforu zawierającego 10 μM wolnych jonów Ca^{2+}) do włosków występujących na pręcikach *Tradescantia*. W niezaburzonym naturalnym układzie we włoskach obserwuje się szybki ruch cytoplazmy, którego intensywność może ulegać zmianom w przypadku modyfikacji wewnętrznej zawartości wolnych jonów Ca^{2+} [34]. Dotychczas przedstawione rezultaty badań nie pozwalają na sformułowanie odpowiedzi czy działanie B i R wyraża się podobnymi zmianami w metabolizmie komórek roślinnych. Z rezultatów najnowszych badań wykonanych na poduszeczce liściowej *Samananea saman* wynika, że po napromienianiu B poziom DG wzrasta przejściowo w komórkach motorycznych partii prostownika, nie naruszając jego koncentracji w komórkach motorycznych partii zwieracza [90]. Rezultat ten sugeruje, że aktywny fotoreceptor absorbujący B może, poprzez wzrost poziomu DG, aktywować kinazę białkową C, prowadząc do wzrostu turgorescencji komórek motorycznych partii prostownika, a w konsekwencji stymulować otwieranie liścia. Istotne pytanie dotyczy również zagadnienia czy efekty słabego i silnego B są związane z tym samym, czy odmiennym łańcuchem reakcji. Korzenie większości ga-

tunków wykazują w warunkach ciemności geotropizm dodatni. W kilku odmianach kukurydzy korzenie ich reagowały jednak na siłę przyciągania ziemskiego pozytywnie, po krótkiej ekspozycji w świetle białym [39, 40]. Działanie światła nie indukowało w nich geotropicznego wygięcia jeżeli komórki korzenia pozbawione zostały wolnych jonów Ca^{2+} poprzez potraktowanie ich roztworami EGTA lub EDTA. Wynik ten wyraźnie sugeruje, że indukowana światłem wrażliwość geotropiczna jest pośredniczona poprzez udział jonów Ca^{2+} [88]. Przedstawione przykłady promowania podobnych efektów działaniem różnych zakresów spektralnych światła może być związane zarówno z rodzajem tkanki, jej wiekiem, a także równoczesną kontrolą różnorodnych procesów metabolicznych [26].

ROLA WAPNIA W PROCESACH INDUKOWANYCH DZIAŁANIEM SIŁY GRAWITACJI

W kilku pracach eksperymentalnych postulowano ewentualny udział jonów Ca^{2+} w transdukcji sygnału przyciągania ziemskiego w komórkach korzenia [73, 74, 75, 134]. W komórkach czapeczki korzenia stwierdzono wysoką koncentrację jonów Ca^{2+} [19], co może sugerować, że stężenie wapnia odgrywa istotną rolę w percepcji bodźca grawitacji [37, 73, 74, 75, 105]. Korzenie roślin hodowanych na pożywce zawierającej EGTA traciły zdolność odpowiedzi na grawitację. Przywrócenie normalnej reakcji następowało poprzez umieszczenie korzeni w pożywce zawierającej jony Ca^{2+} . Reakcji takiej nie uzyskano natomiast po dodaniu jonów Mg^{2+} . Zastosowane w dalszych badaniach inhibitory CaM i uzyskane rezultaty potwierdzają istotne znaczenie kompleksu Ca^{2+} -CaM w tym procesie [5]. Podobnie jak w przypadku działania innych bodźców środowiskowych również w przypadku odpowiedzi na grawitację jony Ca^{2+} wydają się pełnić funkcję wtórnego informatora w transmisji sygnału sterującego fizjologiczną odpo-

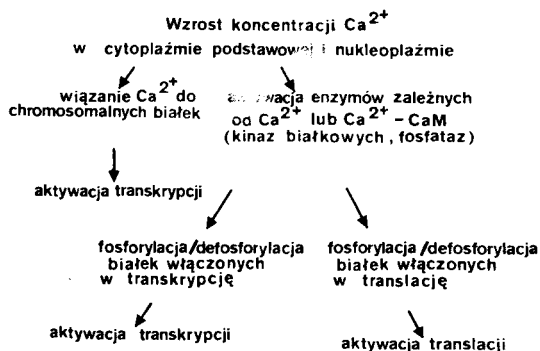
wieź korzenia. Prowadzone od wielu lat badania przez Gumińskiego i wsp. [50, 69, 77, 144] wykazały, że występujące w glebie związki próchniczne stanowią naturalne chelatory niektórych kationów, w tym także jonów Ca^{2+} . Można przypuszczać, że wywierają one wpływ na stężenie jonów Ca^{2+} w roztworze glebowym otaczającym system korzeniowy, a także na ich poziom *in vivo* w komórkach czapeczki korzenia, modyfikując w ten sposób jego odpowiedź geotropiczną.

REGULACYJNA ROLA WAPNIA W EKSPRESJI GENÓW KOMÓREK ROŚLINNYCH

Badania nad funkcją jonów wapnia w ekspresji genów były prowadzone prawie wyłącznie na komórkach zwierzęcych. Szereg wyników uzyskanych na różnych typach komórek zwierzęcych sugerowało jednoznaczny udział jonów Ca^{2+} w regulacji ekspresji genów [146]. Rezultaty te pozwoliły na zaproponowanie hipotetycznego modelu, obrazującego możliwość i sposób regulacji procesów transkrypcji i translacji (ryc. 3).

Potwierdzenie występowania także w komórkach roślinnych zmian stężenia jonów Ca^{2+} pozwala przypuszczać, że istnieje w nich podobny do komórek zwierzęcych mechanizm regulacji ekspresji genów. Postulat taki wymaga jednak doświadczalnego potwierdzenia. W oparciu o pośrednie informacje można przypuszczać, że w regulacji ekspresji genów jony Ca^{2+} odgrywają istotną rolę także w komórkach roślinnych:

- a) działanie fitohormonów pośredniczone przez poziom wolnych jonów Ca^{2+} wpływa na regulację funkcjonowania niektórych genów [149, 150],
- b) P_{fr} regulując ekspresję licznych genów może równocześnie modyfikować szybkość przepływu jonów Ca^{2+} w komórkach roślinnych lub ich organellach [44],
- c) fosforylacja białek może również wpływać na regulację ekspresji genów [117].



Ryc. 3. Hipotetyczny schemat udziału jonów Ca^{2+} w mechanizmie regulacji transkrypcji i translacji genów (wg 114, zmodyfikowano).

Fig. 3. Hypothetical scheme of Ca^{2+} participation in the regulating mechanism of transcription and translation of gene [after 114, modified].

Z przedstawionego na ryc. 3 schematycznego zestawienia wynika, że zmiany w cytoplazmatycznym i nukleoplazmatycznym poziomie wolnych jonów Ca^{2+} wraz ze specyficzną klasą chromosomowych CBP mogą wywierać regulacyjny wpływ na transkrypcję mRNA. CBP mogą pełnić funkcję stymulatorów lub represorów transkrypcji genów. Występowanie chromosomalnych CBP stwierdzono także w niektórych systemach zwierzęcych, sugerując ich udział w regulacji genów [140]. Uzyskane dotychczas rezultaty nie zezwalają na jednoznaczne wyjaśnienie roli CBP w tych procesach. Stymulujące działanie wolnych jonów Ca^{2+} prowadzi do podwyższenia puli ufosforylowanych CBP, interreagujących ze specyficznymi genami kodującymi transkrypcję. W przypadku białek roślinnych występowanie podobnego mechanizmu postulowano jedynie dla wrażliwego na działanie światła genu *rbcS* (Rubisco). W tym przypadku jony Ca^{2+} regulują aktywność kinazy białkowej, katalizującej odwracalne reakcje wiązania DNA-białko, modyfikując odpowiedź enzymu na działanie światła [44]. Wapń

może również kontrolować ekspresję genów, wpływając na stopień ufosforylowania białek na poziomie translacji. Znaczenie fosforylacji białek w regulacji translacji genów zostało dobrze udokumentowane zarówno w komórkach zwierzęcych jak i roślinnych [100, 122, 126, 127].

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione w artykule wyniki badań potwierdzają istotne znaczenie jonów Ca^{2+} jako czynnika pośredniczącego przenoszenie informacji ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórek roślinnych. Zmiany w koncentracji wolnego cytoplazmatycznego wapnia uruchamiają wiele biochemicznych i fizjologicznych ciągów reakcji modyfikujących metabolizm komórki, a także jej odpowiedź na działanie różnego rodzaju bodźców zewnętrznych. Poważnym ograniczeniem w zadowalającym wyjaśnieniu jego roli w tkankach roślinnych jest stosunkowo mała, w porównaniu z tkankami zwierzęcymi, liczba informacji opartych o badania eksperymentalne. Znaczenie wapnia w świecie roślin ograniczano do niedawna raczej do jego funkcji jako makroelementu, wywierającego wpływ na rozwój i budowę ich elementów strukturalnych. Jedną z przyczyn były trudności techniczne, uniemożliwiające precyzyjne dokonanie pomiaru niskich stężeń wolnych jonów Ca^{2+} występujących w różnych mikroobszarach komórki, przy równoczesności szybkich procesów prowadzących do ich wiązania. W skomplikowanym systemie transdukcji bodźców zewnętrznych w komórkach roślinnych wapń wydaje się pełnić istotną funkcję. Pełne wyjaśnienie sposobu jego oddziaływania w różnych reakcjach fizjologicznych komórki roślinnej wymaga jednak dalszych szczegółowych badań.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy serdecznie dziękują Panu Profesorowi Włodzimierzowi Korohodzie za prze-

czytanie manuskryptu i jego przedyskutowanie, a także Panu Profesorowi Stefanowi Gumińskiemu za udzielenie wielu cennych i pomocnych uwag.

Pracę wykonano w ramach problemu C.P.B.P.05.02.

LITERATURA

- [1] ANDERSON J. M., CHARBONNEAU H., JONES H. P., MCCANN R. O., CORMIER M. J. 1980. Characterization of plant nicotinamide adenine dinucleotide kinase activator protein and its identification as calmodulin. *Biochem.* **19**: 3113-3120.
- [2] BENNETT J. 1983. Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochem. J.* **212**: 1-13.
- [3] BENNETT J., STEINBACK K. E., ARNTZEN C. J. 1980. Chloroplast phosphoproteins: regulation of activation energy transfer of phosphorylation of thylakoid membrane polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 5253-5257.
- [4] BERRIDGE M. J., IRVINE R. F. 1984. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**: 315-321.
- [5] BIRO R. L., HALE C. C., WIEGAND D. F., ROUX S. J. 1982. Effects of chlorpromazine on gravitropism in *Avena* coleoptiles. *Ann. Bot.* **50**: 737-747.
- [6] BLAUSTEIN M. P. 1985. Intracellular calcium as a second messenger: what's so special about calcium? W: R. P. RUBIN, G. B. WEISS, J. E. PUTNEY (eds), *Calcium in Biological Systems*, ss. 23-42. Plenum Press, New York.
- [7] BOSS W. F., MASSEL M. O. 1985. Polyphosphoinositides are present in plant tissue culture cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**: 1018-1023.
- [8] BRADY C. J., MCGLASSON W. B., PEARSON J. A., MELDRUM S. K., KOPELIOVITCH E. 1985. Interactions between the amount and molecular forms of polygalacturonase, calcium, and firmness in tomato fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **110**: 245-258.
- [9] BROWNLEE C., WOOD J. W. 1986. A gradient of cytoplasmic free calcium in growing rhizoid cells of *Fucus serratus*. *Nature* **320**: 624-626.
- [10] BRULFERT J., VIDAL J., LEMARECHAL P., GADAL P., QUEIROZ O., KLUGE M., KRUGER I. 1986. Phosphorylation - dephosphorylation process as a probable mechanism for the diurnal regulatory changes of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**: 151-159.
- [11] BUCZEK J. 1975. The effect of calcium to magnesium ratio on adenosine triphosphatase from wheat roots. *Acta Soc. Bot. Pol.* **44**: 133-141.
- [12] BUCZEK J., BURZYŃSKI M., SUDER-MORAW A. 1981. Effect of calcium and magnesium ions on phosphatases from *Zea mays* L. roots. *Acta Physiol. Plant* **3**: 13-22.
- [13] BUCKHOUT T. J. 1984. Characterization of Ca^{2+} transport in purified endoplasmic reticulum membrane vesicles from *Lepidium sativum* L. roots. *Plant Physiol.* **76**: 962-967.
- [14] BUCKHOUT T. J., MOORE J. D., YOUNG K. A., LOW P. S. 1980. Response of isolated plant membranes to auxin: calcium release. *Bot. Gaz.* **141**: 418-421.
- [15] BUSH D. R., CORNEJO M. J., HUANG C. N., JONES R. L. 1986. Ca^{2+} -stimulated secretion of α -amylase during development in barley aleurone protoplast. *Plant Physiol.* **82**: 566-574.
- [16] BUSH D. R., JONES R. L. 1986. The control of α -amylase synthesis by calcium in the barley aleurone layers and protoplasts during Ca-stimulated amylase secretion. W: A. J. TREWAVAS (ed.), *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*, **104**: 335-338. Plenum Press, New York.
- [17] BUSH D. R., SZE H. 1986. Calcium transport in tonoplast and endoplasmic reticulum vesicles isolated from cultured carrot cells. *Plant Physiol.* **80**: 549-555.
- [18] CARAFOLI E. 1982. The transport of calcium across the inner membrane of mitochondria. W: E. CARAFOLI, *Membrane Transport of Calcium*, ss. 109-226. Academic Press, London - New York.
- [19] CHANDRA S., CHABOT J. F., MORRISON G. H., LEOPOLD A. C. 1982. Localization of calcium in amyloplasts of root-cap cells using ion microscopy. *Science* **216**: 1221-1223.
- [20] CHEUNG W. Y. 1980. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* **207**: 19-27.
- [21] CLEAND R. E., RAYLE D. J. 1977. Reevaluation of the effect of calcium ions on auxin-induced elongation. *Plant Physiol.* **60**: 709-712.
- [22] COHEN P. 1985. The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **151**: 439-448.
- [23] COHEN J. D., NADLER K. D. 1976. Calcium requirement for IAA-induced acidification by *Avena* coleoptiles. *Plant Physiol.* **57**: 347-350.
- [24] CORMIER M. J., JARRETT H. W., CHARBONNEAU H. 1982. Role of Ca^{++} -calmodulin in metabolic regulation in plants. W: S. KAKIUCHI, H. HADAKA, A. R. MEANS (eds), *Calmodulin and Intracellular Ca^{++} Receptors*, ss. 125-140. Plenum Press, New York.

- [25] CUNNINGHAME M. E., HALL J. L. 1986. The effect of calcium antagonists and inhibitors of secretory processes on auxin-induced elongation and fine structure of *Pisum sativum* stem segments. *Protoplasma* **133**: 149–155.
- [26] DAS R., SOPORY S. K. 1985. Evidence of regulation of calcium uptake by phytochrome in maize protoplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**: 1455–1460.
- [27] DATTA N., CHEN Y. R., ROUX S. J. 1985. Phytochrome and calcium stimulation of protein phosphorylation in isolated pea nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**: 1403–1408.
- [28] DEMARTY M., MORVAN C., THELLIER M. 1984. Calcium and the cell wall. *Plant Cell Environ.* **7**: 441–448.
- [29] DEY P. M., BRINSON K. 1985. Plant cell-walls. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **42**: 265–268.
- [30] DIETER P., MARMÉ D. 1980. Ca transport in mitochondrial and microsomal fractions from higher plants. *Planta* **150**: 1–8.
- [31] DIETER P., MARMÉ D. 1981. Far-red light irradiation of intact corn seedlings affects mitochondrial and calmodulin-dependent microsomal Ca^{2+} transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 749–755.
- [32] DIETER P., COX J. A., MARMÉ D. 1985. Calcium-binding and its effect on circular dichroism of plant calmodulin. *Planta* **166**: 216–218.
- [33] DILLENSCHNEIDER M., HETHERINGTON A., GRAZIANA A., ALIBER G., BERTA P., HAIECH J., RANJEVA R. 1986. The formation of inositol phosphate derivatives by isolated membranes for *Acer pseudoplatanus* is stimulated by guanine nucleotides. *FEBS Lett.* **208**: 413–417.
- [34] DOREE M., PICARD A. 1980. Release of Ca^{2+} from intracellular pools stops cytoplasmic streaming in *Tradescantia* staminal hairs. *Experientia* **36**: 1291.
- [35] EDWARDS G. E., NAKAMOTA H., BURNELL J. N., HATCH M. D. 1985. Pyruvate P_i dikinase and NADP-malate dehydrogenase in C₄ photosynthesis and mechanism of light/dark regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 255–286.
- [36] EL HINNAWAY E. 1974. Chelating compounds as cell wall-loosening agents in cell suspension cultures of *Melilotus alba* Desr. *Z. Pflanzenphysiol.* **71**: 207–219.
- [37] EVANS M. L. 1985. The action of auxin on plant cell elongation. *CRC Crit. Rev. Plant Sci* **2**: 317–365.
- [38] FARBER J. L. 1981. The role of calcium in cell death. *Life Sci.* **29**: 1289–1292.
- [39] FELDMAN L. J. 1981. Root cap inhibitor formation in isolated root caps of *Zea mays*. *J. Exp. Bot.* **32**: 779–788.
- [40] FELDMAN L. J. 1981. Light-induced inhibitors from intact and cultured caps of *Zea* roots. *Planta* **153**: 471–475.
- [41] FERGUSON I. B., REID M. S., ROMANI R. J. 1985. Effects of low temperature and respiratory inhibitors on calcium flux in plant mitochondria. *Plant Physiol.* **77**: 877–880.
- [42] FERGUSON J. B., DROBAK B. K. 1988. Calcium and the regulation of plant growth and senescence. *Hort. Sci.* **23**: 262–266.
- [43] FLOCKERZI V., OEKEN H.-J., HOFMANN F., PELZER D., CAVALIE A., TRAUTWEIN W. 1986. Purified dihydropyridine-binding site from skeletal muscle t-tubules is a functional calcium channel. *Nature* **323**: 66–71.
- [44] FLUHR R., KUHLEMEIER C., NAGY F., CHUA N.-H. 1986. Organ-specific and light-induced expression of plant genes. *Science* **232**: 1106–1112.
- [45] FUKUMOTO M., VENIS M. A. 1986. ATP-dependent Ca^{2+} transport in tonoplast vesicles from apple fruit. *Plant Cell Physiol.* **27**: 491–497.
- [46] GILMAN A. 1988. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 528–552.
- [47] GILROY S., HUGHES W. A., TREWAVAS A. J. 1986. The measurement of intracellular calcium levels in protoplasts from higher plant cells. *FEBS Lett.* **199**: 217–221.
- [48] GRAZIANA A., DILLENSCHNEIDER M., RANJEVA R. 1984. A calcium binding protein is a regulatory subunit of quinate: NAD⁺ oxidoreductase from dark-grown carrot cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**: 774–783.
- [49] GROSS J., MARMÉ D. 1978. ATP-dependent Ca^{2+} uptake into plant membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 1232–1236.
- [50] GUMIŃSKI S. 1986. Historia naszych badań nad mechanizmem efektów fitofizjologicznych wywołanych przez związki próchniczne. *Rocznik Glebozn.* **37**: 363–374.
- [51] HANSON J. B. 1983. The roles of calcium in plant growth. W: D. D. RANDALL, D. G. BLEVINS, R. LARSON (eds), *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, **1**: 1–24. University of Missouri Press, Columbia.
- [52] HANSON J. B. 1984. The function of calcium in plant nutrition. W: P. B. TINKER, A. LÄUCHLI (eds), *Advance in Plant Nutrition*, **1**: 149–208. Paeger, New York.
- [53] HANSON J. B., RINCON M., ROGERS S. A. 1986. Controls on calcium influx in corn root cells. W: A. J. TREWAVAS (ed.), *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*, **104**: 253–260. Plenum Press, New York.
- [54] HEIM S., WAGNER K. G. 1986. Evidence of phosphorylated phosphatidylinositols in the

- growth cycle of suspension cultured plant cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**: 1175-1181.
- [55] HEPLER P. K. 1985. Calcium restriction prolongs metaphase in dividing *Tradescantia* stamen hair cells. *J. Cell. Biol.* **100**: 1363-1368.
- [56] HEPLER P. K., WAYNE R. O. 1985. Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 397-439.
- [57] HETHERINGTON A. M., DESILVA D. L. R., COX R. C., MANSFIELD T. A. 1986. Absciscic acid, calcium ions and stomatal function. W: A. T. TREWAVAS (ed.), *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*, **104**: 387-388. Plenum Press, New York.
- [58] HETHERINGTON A. M., TREWAVAS A. 1982. Calcium-dependent protein in pea shoot membranes. *FEBS Lett.* **145**: 67-71.
- [59] HIRATA M., SASAGURI T., HAMACHI T., HASHIMOTO T., KUKITA M., KOGA T. 1985. Irreversible inhibition of Ca^{2+} release in saponin-treated macrophages by the photoaffinity derivative of inositol-1, 4, 5-trisphosphate. *Nature* **317**: 723-725.
- [60] HODGES T. K., HANSON J. B. 1965. Calcium accumulation by maize mitochondria. *Plant Physiol.* **40**: 101-109.
- [61] IRVINE R. F., LETCHER A. J., DAWSON R. M. C. 1980. Phosphatidylinositol phosphodiesterase in higher plants. *Biochem. J.* **192**: 279-283.
- [62] JONES R. L., DEIKMAN J., MELROY D. 1986. Role of Ca^{2+} in the regulation of α -amylase synthesis and secretion in barley aleurone. W: A. J. TREWAVAS (ed.), *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*, **104**: 49-56. Plenum Press, New York.
- [63] JUNISTYN B. 1973. Indol-3-essigsäure induzierte Calciumionenabgabe bei Maiskoleoptilylindern. *Z. Naturforsch.* **28C**: 777-780.
- [64] KAUL R., SALUJA D., SACHAR R. C. 1986. Phosphorylation of small subunit plays a crucial role in the regulation of RuBPCase in moss and spinach. *FEBS Lett.* **209**: 63-68.
- [65] KAUSS H., JEBLICK W. 1986. Influence of free fatty acids, lysophosphatidylcholine, platelet activating factor, acylcarnitine, and Echinocandin B on 1, 3- β -D-glucan synthase and callose synthesis. *Plant Physiol.* **80**: 7-13.
- [66] KEITH C. H., RATAN R., MAXFIELD F. R., BAJER A., SHELANSKI M. L. 1985. Local cytoplasmic calcium gradients in living mitotic cells. *Nature* **316**: 848-850.
- [67] KLEE C. B. 1980. Calmodulin: structure-function relationship. W: W. Y. CHEUNG (ed.), *Calcium and Cell Function*, **1**, chap. 4. Academic Press, New York.
- [68] KLEE C. B., CROUCH T. H., RICHMAN P. G. 1980. Calmodulin. *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 489-515.
- [69] KONARZEWSKI Z., GUMIŃSKI S. 1975. Der chemotropische effect einiger Kationen bei den Wurzeln von *Sinapis alba* L. mit Berücksichtigung mancher Factoren. *Biol. Plant.* **17**: 158.
- [70] KRETSINGER R. H. 1977. Evolution of the information role of calcium in eucaryotes. W: R. H. WASSERMAN, R. A. CORRADINO, E. CARAFOLI, R. KRETSINGER, D. H. MACLENNAN, F. L. SIEGEL (eds), *Calcium-Binding Proteins and Calcium Function*, ss. 63-75. North Holland, New York.
- [71] KRETSINGER R. H. 1981. Mechanism of selective signalling by calcium. *Neurosci. Res. Program Bull.* **19**: 211-216.
- [72] KUBOWICZ B. D., VENDERHOEF L. N., HANSON J. B. 1982. ATP-development calcium transport in plasmalemma preparations from soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* **69**: 187-191.
- [73] LEE J. S., MULKEY T. J., EVANS M. L. 1983. Reversible loss of gravitropic sensitivity in maize after tip application of calcium chelators. *Science* **220**: 1375-1376.
- [74] LEE J. S., MULKEY T. J., EVANS M. L. 1983. Gravity-induced polar transport of calcium across root tips of maize. *Plant Physiol.* **73**: 874-876.
- [75] LEE J. S., MULKEY T. J., EVANS M. L. 1984. Inhibition of polar calcium movement and gravitropism in roots treated with auxin-transport inhibition. *Planta* **160**: 536-542.
- [76] LEE J. S., TSIEN R. W. 1983. Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D 600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* **302**: 790-793.
- [77] LEONOWICZ-BABIAK K. 1975. Effectiveness of humic compounds in dependence on calcium content in water tomato cultures. *Acta Soc. Bot. Pol.* **44**: 615.
- [78] LEOPOLD A. C., POOVAIAH B. W., DELA FUENTE R. K., WILLIAMS R. J. 1974. Regulation of growth with inorganic solutes. W: *Plant Growth Substances*, ss. 780-788. Hirokawa Press, Tokyo.
- [79] LEOPOLD A. C., WILLING R. P. 1984. Evidence for toxicity effects of salt on membranes. W: R. C. STAPLES, G. H. TOENNIESSEN (eds), *Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvements*, ss. 67-80. John Wiley and Sons, New York.
- [80] LESHEM Y. Y., SRIDHARA S., THOMPSON J. E. 1984. Involvement of calcium and calmodulin in membrane deterioration during senescence of pea foliage. *Plant Physiol.* **75**: 329-335.
- [81] LEVINE B. A., WILLIAMS R. J. P. 1982. The chemistry of calcium ion and its biological relevance. W: L. J. ANGHILERI, A. M. TUFFET-ANGHILERI (eds), *The Role of Calcium in Biological Systems*, **1**: 3-18. CRC Press, Boca Raton, Fla.

- [82] MARINOS N. G. 1962. Studies on submicroscopic aspects of mineral deficiencies. I. Calcium deficiency in the shoot apex of barley. *Am. J. Bot.* **49**: 834-841.
- [83] MARMÉ D. 1983. Calcium transport and function. W: A. LAUCHLI, R. L. BIELSKI (eds), *Inorganic Plant Nutrition, Encyclopedia of Plant Physiology*, (NS), **15B**: ss. 599-625. Springer - Verlag, Berlin.
- [84] MARMÉ D., DIETER P. 1983. Role of Ca^{2+} and calmodulin in plants: W: W. Y. CHEUNG, (ed.), *Calcium and Cell Function*, **IV**: 263-282. Academic Press, New York.
- [85] MELIN P.-M., SOMMARIN M., SANDELIUS A. S., JERGIL B., 1987. Identification of Ca^{2+} -stimulated phosphoinositide phospholipase C in isolated plasma membranes. *FEBS Lett.* **223**: 87-91.
- [86] METTLER I. J., LEONARD R. T. 1979. Ion transport in isolated protoplasts from tobacco suspension cells. I. General characteristics. *Plant Physiol.* **63**: 183-190.
- [87] MICHELL B., KIRK C. 1986. G-protein control of inositol phosphate hydrolysis. *Nature* **323**: 112-113.
- [88] MIZYAKI A., KATSUMI K., ISHIZAKI S., FUJII T. 1986. Redistribution of phosphorus, sulfur, potassium and calcium in relation to light-induced gravitropic curvature in *Zea* roots. *Plant Cell Physiol.* **27**: 693-700.
- [89] MOORE A. L., PROUDLOVE M. D., ACKERMAN K. E. O. 1986. The role of intracellular organelles in the regulation of cytosolic calcium levels: W: A. J. TREWAVAS (ed.), *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*, ss. 277-284. Plenum Press, New York - London.
- [90] MORSE M. J., CRAIN R. C., COTÉ G. G., SATTER R. L. 1989. Light-stimulated inositol phospholipid turnover in *Samanea saman* pulvini. *Plant Physiol.* **89**: 724-727.
- [91] MORSE M. J., CRAIN R. C., SATTER R. L. 1986. Phosphatidylinositol turnover in *Samanea pulvini*: a mechanism of phototransduction. *Plant Physiol.* **80**: 92-97.
- [92] MUTO S. 1982. Distribution of calmodulin within wheat leaf cells. *FEBS Lett.* **147**: 161-164.
- [93] MUTO S., MIYACHI S. 1977. Properties of a protein activator of NAD kinase from plants. *Plant Physiol.* **59**: 55-59.
- [94] MUTO S., SHIMOWAGARA K. 1985. Calcium- and phospholipid-dependent phosphorylation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit by chloroplast envelope-bound protein kinase *in situ*. *FEBS Lett.* **193**: 88-92.
- [95] NAIRN A. C., HEMMINGS H. C., GREENGARD P. 1985. Protein kinases in the brain. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 931-976.
- [96] NIMMO G. A., NIMMO H. G., HAMILTON I. D., FEWSON C. A., WILKINS M. B. 1986. Purification of the phosphorylated night from and dephosphorylated day from of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Biochem. J.* **239**: 213-217.
- [97] NISHIZUKA Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**: 693-698.
- [98] NISHIZUKA Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312.
- [99] NULTSCH W. 1983. The photocontrol of movement of *Chlamydomonas*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **36**: 521-539.
- [100] OCHOA A. 1983. Regulation of protein synthesis in eukaryotes. *Arch. Biochem. Biophys.* **223**: 325-331.
- [101] PALIYATH G., POOVAIAH B. W. 1984. Calmodulin inhibitors in senescing apples and its physiological and pharmacological significance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 2065-2069.
- [102] PALIYATH G., POOVAIAH B. W. 1985. Calcium and calmodulin-promoted phosphorylation of membrane proteins during senescence in apples. *Plant Cell Physiol.* **27**: 977-986.
- [103] PAUPARDIN-TRITSCH D., HAMMOND C., GERSCHENFELD H. N., NAIRN A. C., GREENGARD P. 1986. cGMP-dependent protein kinase enhances Ca^{2+} current and potentiates the serotonin-induced Ca^{2+} current increase in snail neurones. *Nature* **323**: 812-814.
- [104] PFAFAMAN H., HARTMANN E., BRIGHTMAN A. O., MORRÉ D. J. 1987. Phosphatidylinositol specific phospholipase C of plant stems. *Plant Physiol.* **85**: 1151-1155.
- [105] PICAKARD B. G. 1985. Early events in geotropism of seedling shoots. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 55-75.
- [106] POLYA G. M., DAVIES J. R. 1982. Resolution of Ca^{2+} -calmodulin activated protein kinase from wheat germ. *FEBS Lett.* **150**: 167.
- [107] POLYA G. M., DAVIES J. R. 1983. Resolution and properties of a protein kinase catalyzing the phosphorylation of a wheat germ cytokinin-binding protein. *Plant Physiol.* **71**: 482-488.
- [108] POOVAIAH B. W. 1979. Role of calcium in ripening and senescence. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* **19**: 83-88.
- [109] POOVAIAH B. W. 1985. Role of calcium and calmodulin in plant growth and development. *Hort. Sci.* **20**: 347-352.
- [110] POOVAIAH B. W. 1986. Role of calcium in prolonging storage life of fruits and vegetables. *Food Technol.* **40**: 86-89.
- [111] POOVAIAH B. W. 1987. The role of calcium and calmodulin in senescence. W: W. W. THOMSON, E. A. NOTHNAGEL, R. C.

- HUFFAKER (eds), *Plant Senescence: its biochemistry and physiology*, ss. 182–189. Amer. Soc. of Plant Physiol., Rockville, Md.
- [112] POOVAIAH B. W. 1988. Molecular and cellular aspects of calcium action in plants. *Hort. Sci.* **23**: 267–271.
- [113] POOVAIAH B. W., MCFADDEN J. J., REDDY A. S. N. 1987. The role of calcium in gravity signal perception and transduction. *Physiol. Plant* **71**: 401–404.
- [114] POOVAIAH B. W., REDDY A. S. N. 1987. Calcium messenger system in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **6**: 47–103.
- [115] POOVAIAH B. W., REDDY A. S. N., MCFADDEN J. J. 1987. Calcium messenger system: role of protein phosphorylation and inositol phospholipids. *Physiol. Plant.* **69**: 569–573.
- [116] POOVAIAH B. W., VELUTHAMBI K. 1986. The role of calcium and calmodulin in hormone action in plants: importance of protein phosphorylation. W: A. J. TREWAVAS (ed.), *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*, 104: 83–90. Plenum Press, New York.
- [117] PURELLO F., BURNHAM D. B., GOLDFINE I. D. 1983. Insulin regulation of protein phosphorylation in isolated rat liver in nuclear envelopes: potential relationship to mRNA metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 1189–1194.
- [118] PUTNEY J. W. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**: 1–12.
- [119] RAGHOTHAMA K. G., MIZRAHI Y., POOVAIAH B. W. 1985. Effect of calmodulin antagonists on auxin-induced elongation. *Plant Physiol.* **79**: 28–33.
- [120] RANJEVA R., GRAZIANA A., RANTY B., CAVALIE G., BOUDET A. M. 1984. Phosphorylation of proteins in plants: a step in the integration of extra and intracellular stimuli. *Physiol. Vég.* **22**: 365–376.
- [121] RANJEVA R., REFENA G., BOUDET A. M., MARMÉ D. 1983. Activation of plant quinate; NAD⁺ 3-oxidoreductase by calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 5222–5224.
- [122] RANU R. S. 1980. Isolation of a translational inhibitor from wheat germ with protein kinase activity that phosphorylates initiation factor, eIF-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**: 1124–1132.
- [123] ROA K. P., RANDALL D. D. 1980. Plant pyruvate dehydrogenase complex. Inactivation and reactivation by phosphorylation and dephosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **200**: 461–466.
- [124] RASI-CALDOGNO F., DE MICHALIS M. I., PUGLIARELLO M. C. 1982. Active transport of Ca²⁺ in membrane vesicles from pea. Evidence for a H⁺/Ca²⁺ antiport. *Biochem. Biophys. Acta.* **693**: 287–295.
- [125] RAY P. M., BAKER D. B. 1965. The effect of auxin on synthesis of oat coleoptile cell wall constituents. *Plant Physiol.* **40**: 353–360.
- [126] REDDY A. S. N., GUNNERY S., DATTA A. 1983. Translational inhibition by a cAMP-independent protein kinase from barley embryos. *Biochem. Int.* **77**: 9–13.
- [127] REDDY A. S. N., GUNNERY S., DATTA A. 1986. Regulation of gene expression at the translational level in plant embryo. W: F. BURNS, A. C. UPTON, G. SILINI (eds), *Radiation Carcinogenesis and DNA Alteration*. Plenum Press, New York.
- [128] REDDY A. S. N., POOVAIAH B. W. 1987. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate induced calcium release from corn coleoptile microsomes. *J. Biochem.* **101**: 509–573.
- [129] REISS H. D., HERTH W., 1985. Nifedipine-sensitive calcium channels are involved in polar growth of lily pollen tubes. *J. Cell Sci.* **76**: 247–254.
- [130] REUTER H. 1983. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* **301**: 569–574.
- [131] RINCON M., HANSON J. B. 1986. Controls on calcium ion fluxes in injured or shocked corn root cells: importance of proton pumping and cell membrane potential. *Physiol. Plant Pathol.* **67**: 576–583.
- [132] ROBERTS D. M., LUKAS T. J., WATTERSON D. M. 1986. Structure, function, and mechanism of action of calmodulin. *Crit. Rev. Plant Sci.* **4**: 311–326.
- [133] ROSSIGNOL M., LAMANT D., SALSAC L., HELLER R. 1977. Calcium fixation by the roots of calcicole and calcifuge plants: the importance of membrane systems and their lipid composition. W: M. THELLIER, A. MONNIER, M. DEMARTY, J. DAINTY (eds), *Transmembrane Ionic Exchange in Plants*, ss. 483–498. Editions du CRNS, Paris et Editions de l'Universite, Rouen.
- [134] ROUX S. J., SLOCUM R. D. 1982. Role of calcium in mediating cellular functions important for growth and development in higher plants: W: W. Y. CHEUNG (ed.), *Calcium and Cell Function*, ss. 409–453. Academic, New York.
- [135] RUSSEL D. W., DIX W. D. 1981. *In vitro* inactivation of pea seedling microsomal 3-hydroxymethyl glutanyl CoA reductase. *Plant Physiol.* **67**: 152–157.
- [136] SAUNDERS M. J., HEPLER P. K. 1981. Localization of membrane-associated calcium following cytokinin treatment in *Funaria* using chlorotetracycline. *Planta* **152**: 272–281.
- [137] SAUNDERS M. J., HEPLER P. K. 1982. Calcium ionophore A 23187 stimulates cytokinin-like mitosis in *Funaria*. *Science* **217**: 943–945.

- [138] SAUNDERS M. J., HEPLER P. K. 1983. Calcium antagonists and calmodulin inhibitors block cytokinin-induced bud formation in *Fu-naria*. *Dev. Biol.* **99**: 41–48.
- [139] SCHATZMANN H. J. 1985. Calcium extrusion across the plasma membrane by the changes system. W: D. MARMÉ (ed.), *Calcium and Cell Physiology*, ss. 18–52. Springer-Verlag, Berlin.
- [140] SCHIBECI A., MARTONOSI A. 1980. Ca^{2+} -binding proteins in nuclei. *Eur. J. Biochem.* **113**: 5–14.
- [141] SCHUMAKER K. S., SZE H. 1986. Ca^{2+} transport into the vacuole of oat roots: characterization of $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity. *J. Biol. Chem.* **261**: 12172–12178.
- [142] SCHUMAKER K. S., SZE H. 1985. A $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiport system driven by the proton electrochemical gradient of a tonoplast H^+ -ATPase from oat roots. *Plant Physiol.* **79**: 1111–1117.
- [143] SERLIN B., ROUX S. 1984. Modulation of chloroplast movement in the green alga *Mougeotia* by the Ca^{2+} ionophore A23187 and by calmodulin antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 6368–6372.
- [144] SKINDER N. W., GUMIŃSKI S. 1976. Über die Ursache der Hemmwirkung der Humusstoffe auf der Populationszuwachs von *Oscillatoria sancta*. *Biol. Plant.* **18**: 344–350.
- [145] SPAT A., BRADFORD P. G., MCKINNEY J. S., RUBIN R. P., PUTNEY J. W. 1986. A saturable receptor for ^{32}P -inositol-1, 4, 5-trisphosphate in hepatocytes and neutrophils. *Nature* **319**: 514–516.
- [146] STRATOWA C., RUTTER W. J. 1986. Selective regulation of trypsin gene expression by calcium and by glucose starvation in a rat exocrine pancreas cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 4292–4296.
- [147] SZE H. 1985. H^+ -translocating ATPases: advances using membrane vesicles. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**: 175–208.
- [148] TAKAGI S., NAGAI R. 1983. Regulation of cytoplasmic streaming in *Vallisneria mesophyll* cells. *J. Cell Sci.* **62**: 385–405.
- [149] THEOLOGIS A. 1986. Rapid gene regulation by auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**: 407–438.
- [150] THEOLOGIS A., HUYNH T. V., DAVIS R. W. 1985. Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J. Mol. Biol.* **183**: 53–58.
- [151] VELUTHAMBI K., POOVAIAH B. W. 1986. *In vitro* and *in vivo* protein phosphorylation in *Avena sativa* L. coleoptiles: effects of Ca^{2+} , calmodulin antagonists and auxin. *Plant Physiol.* **81**: 836–841.
- [152] WAGNER G., GROLING F., ALTMÜLER D. 1987. Transduction chain on low irradiance response of chloroplast reorientation in *Mougeotia* in blue or red light. *Photochem. Photobiophys. Suppl.* 183–189.
- [153] WANG J. H., PALLAN C. J., SHARMA R. K., ADACHI A.-M., ADACHI K. 1985. The calmodulin regulatory system. *Curr. Topics Cell Reg.* **27**: 419–436.
- [154] WAYNE R., HEPLER P. K. 1984. The role of calcium ions in phytochrome-mediated germination of spores of *Onoclea sensibilis* L. *Planta* **160**: 12–20.
- [155] WAYNE R., HEPLER P. K. 1985. Red light stimulates an intracellular calcium in the spores of *Onoclea sensibilis*. *Plant Physiol.* **77**: 8–11.
- [156] WILLIAMSON R. E. 1981. Free Ca^{2+} concentration in the cytoplasm: a regulator of plant cell function. *What's New Plant Physiol.* **12**: 45.
- [157] WILLIAMSON R. E., ASHLEY C. C. 1982. Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in algae *Chara*. *Nature*. **296**: 647–651.
- [158] WOLFF D. J., BROSTROM C. O. 1974. Ca^{2+} -binding phosphoprotein from pig brain: identification as a Ca^{2+} -dependent regulator of brain cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 349–358.
- [159] WONG Y.-S., CHENG WALSH D. A., LAGARIAS J. C. 1986. Phosphorylation of *Avena* phytochrome *in vitro* as a probe of light induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* **261**: 12089–12097.
- [160] ZOCCHI G., ROGERS S. A., HANSON J. B. 1983. Inhibition of proton pumping in corn roots is associated with increased phosphorylation of membrane proteins. *Plant Sci. Lett.* **31**: 215–221.