

アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) 緑化カルスにおける 光合成の温度反応およびホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼと リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼの活性

石 丸 健*・齋 藤 和 幸・窪 田 文 武・縣 和 一

(九州大学農学部)

1996 年 7 月 10 日受理

要 旨: アイスプラントは塩ストレス等により光合成型を C_3 型から CAM 型に転換する。培地に 6-ベンジルアミノプリン (BAP) を添加することにより C_3 型および CAM 型の植物体の葉組織から効果的に緑化カルスを誘導することができた。誘導した緑化カルスの光合成は、 C_3 型由来のものでは低温適応型、CAM 型由来のものでは広範囲の温度に適応した光合成の温度反応を示した。また、 C_3 型に由来する緑化カルスのリブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ (RuBPCase) 活性は、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPCase) 活性に比べて高く、CAM 型由来のものでは、RuBPCase 活性に比べて PEPCase 活性が高い値を示した。この様に緑化カルスには元の植物体の酵素活性特性を維持する傾向が認められた。さらに、 C_3 型由来の緑化カルスに塩処理を課すと PEPCase 活性が増加し、元の植物体で測定した活性値とほぼ同水準に達した。しかし、緑化処理していないカルスでは、塩処理による PEPCase 活性の増加が認められなかった。

キーワード: アイスプラント, 光合成型転換, ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ, リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ, 緑化カルス。

Temperature Response of Photosynthesis and Activities of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Ribulose 1,5-bisphosphate Carboxylase in Greened Calli Induced from Iceplant, *Mesembryanthemum crystallinum* L., Leaves: Ken ISHIMARU, Kazuyuki SAITOU, Fumitake KUBOTA and Waichi AGATA (*Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashiku, Fukuoka 812, Japan*)

Abstract: Iceplant is a halophyte with two different photosynthetic modes of C_3 and crassulacean acid metabolism (CAM). Environmental stress, such as a high salinity condition, is known as a trigger for shifting the photosynthetic mode from C_3 to CAM in a plant. The application of 6-benzylaminopurine to cell culture medium was effective to induce green calli from leaves of C_3 and CAM plants. The photosynthesis of greened calli obtained from C_3 and CAM plant leaves showed low temperature abaptation and wide temperature adaptation, respectively. In the calli derived from the C_3 plant, the activity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RuBPCase) was higher than that of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase), while in the calli from the CAM plant, the activity of PEPCase was higher than that of RuBPCase. Thus, the greened calli showed the original levels of enzymatic activity in their donor plants. The activity of PEPCase in the greened calli obtained from the C_3 plant increased with the application of NaCl to the cell culture medium, but this effect was not detected on nongreened calli.

Key words: Crassulacean acid metabolism, Greened callus, *Mesembryanthemum crystallinum* L., Phosphoenolpyruvate carboxylase, Photosynthetic mode shift, Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase.

アイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) は地中海性気候の乾燥地帯に生育する好塩性植物である。この植物の特徴は光合成型が生育環境に応じて転換することであり、水ストレスや塩ストレス等の環境要因が転換の引き金となる。

アイスプラントの C_3 型植物を高塩濃度下で栽培すると光合成型が C_3 型から CAM 型に転換する現象が Winter と von Willert^{18,19)} によって報告され

て以来、本植物を材料に光合成型転換に関する研究が酵素活性の変化や浸透圧調節等との関連で数多く行われてきている^{3,20)}。最近では CAM 型光合成の鍵酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPCase) やリンゴ酸酵素等の遺伝子発現の分子生物学的解明も進められている^{4,5,10)}。

アイスプラントの水ストレスあるいは塩ストレスによる CAM 型光合成の誘導に関して、水ストレスあるいは塩ストレスが CAM 型光合成関連遺伝子の発現誘導における鈍粋なトリガーであるのか、あるいは、個体発生的にプログラムされた光合成型の転換を水ストレスあるいは塩ストレスが促進しただけ

* 現在: 農林水産省農業生物資源研究所, つくば市。
略語: HEPES, 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル] エタンスルホン酸; Tris, トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン。

なのかは興味深い問題である。しかし、十分に灌水してアイスプラントを生育させても蒸散による水ストレスがアイスプラントに負荷されるため、この問題に対する明確な結論は得られていない²²⁾。そこで、著者らはCAM型光合成の発現における生育段階の影響を検討するための材料としてカルスをを用いることにした。

Treichelら¹⁵⁾、Thomasら¹³⁾、Yenら²³⁾およびWillenbrinkとHusemann¹⁷⁾は、アイスプラントの細胞レベルでの水ストレスおよび塩ストレスに対する反応を検討するため、アイスプラントよりカルスを誘導した。しかし、いずれの研究もCAM型アイスプラントからはカルスを誘導しておらず、脱分化過程を経る中で光合成特性が維持されるのか否かについては明らかにされていない。また、Treichelら¹⁵⁾は、アイスプラントの従属栄養的培養カルスに塩ストレスを加えるとPEPCase活性が増加したと報告しているが、Yenら²³⁾は塩ストレスが従属栄養的培養カルスのPEPCase活性に影響を及ぼさなかったと報告しており、一致した結果が得られていない。

本研究では、まず、C₃型およびCAM型の葉組織からのカルスおよび緑化カルスの効率的な誘導法について検討した。次に、C₃型とCAM型のアイスプラントから得られた緑化カルスの光合成特性について、光合成の温度反応や炭酸固定酵素であるPEPCaseとリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ (RuBPCase) の活性を比較、検討した。さらに、塩ストレスの両酵素活性への影響についても検討した。

材料と方法

1. 植物の育成

メキシコのバハ・カルフォルニア半島の砂漠に自生するアイスプラント (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) から採取した種子を発芽させ、幼植物を水耕栽培した。水耕栽培は 3 mM KNO₃, 2 mM Ca(NO₃)₂, 0.5 mM MgSO₄, 0.5 mM (NH₄)₂HPO₄, 12.5 μM H₃BO₃, 1.0 μM MnSO₄, 1.0 μM ZnSO₄, 0.25 μM CuSO₄, 0.25 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ および 10 μM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム鉄 (III) を含む pH 6.5 の水耕液で行った。1週間間隔で水耕液を取り替え、12時間日長、植物体上の光強度 220 μmol m⁻² s⁻¹, 相対湿度 70%, 気温 25°C に設定したグロースキャビネ

ット内で 21 日間栽培して C₃ 型植物を得た⁹⁾。C₃ 型植物を 400 mM NaCl を含む水耕液で 3 週間栽培することによって CAM 型光合成へ変換させた⁹⁾。

2. カルス誘導

カルス誘導には 42 日間水耕栽培した C₃ 型および CAM 型の植物体の上から 2 番目の葉の一部を供試した。葉組織を 0.05% ツイン 20 を含む 1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で滅菌後、滅菌水で洗浄した。滅菌した葉組織をペトリ皿上で解剖刀を用いて約 3 mm×3 mm の大きさに切断し、カルス誘導培地に置床した。カルス誘導培地は、MurashigeとSkoogの培地 (MS 培地)⁸⁾ を基本培地として用い、0.2% グランガム、炭素源として 3% 蔗糖および 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を、0, 5, 8 および 10 mg L⁻¹ の 4 段階の濃度で添加した。シャーレを培養器とし、各シャーレにカルス誘導培地を 20 mL 注入した。25°C 暗黒条件下で置床後 50 日間培養したものを非緑化カルスの実験に用いた。

3. 緑化カルス誘導

30 日間培養したカルスを葉組織から切り放し、約 2 mm×2 mm の大きさに切断後、緑化誘導培地に移植した。緑化誘導培地は先の 0.2% グランガムおよび 3% 蔗糖を含む基本培地に 6-ベンジルアミノプリン (BAP) を加えたものである。BAP 濃度は 0, 0.5, 1, 5 および 10 mg L⁻¹ の 5 段階とした。移植後、室温 25°C、シャーレ上の光強度 220 μmol m⁻² s⁻¹, 12 時間日長で 30 日間培養した。得られた C₃ 型植物由来の緑化カルスに塩処理を行った。NaCl 濃度を 0, 85, 250, 350 mM の 4 段階に変えた培養液 (グランガムを含まない緑化誘導培地) で、室温 25°C、振とう速度 100 回転/分 (rpm), 12 時間日長、三角フラスコ上の光強度 220 μmol m⁻² s⁻¹ の条件で 14 日間培養した。

4. 光合成速度の測定

緑化カルスを切り取り、解剖刀で約 1 mm³ の大きさに切断した後脱気処理し、クラーク型酸素電極 (Rank Brothers 社, 英国) を用いて、水温 5 段階 (15, 20, 25, 30 および 35°C)、光飽和条件下で酸素放出速度を測定した。なお、測定緩衝液には 0.5 mM CaSO₄ を含む 50 mM HEPES-KOH (pH 7.7) を用い、基質には終濃度で 20 mM になるように NaHCO₃ を加え、反応を開始した。

5. RuBPCase と PEPCase 活性の測定

緑化カルスに 0.1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 10 mM MgCl₂, 5 mM ジチオスレイト

ール (DTT), 10 mM NaHCO_3 , 3.3% ポリビニルポリピロリドン (PVP) を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.7) を生体重と等量加え, 4°C に冷却した乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。磨砕液を 15,000 rpm で遠心分離後, 上清液を粗酵素抽出液として使用した。

RuBPCase 活性は以下の手順で測定した。25 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 20 mM $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ($0.061 \text{ Ci mol}^{-1}$), 100 mM Tris-HCl (pH 8.2) を反応液として, 反応液 440 μL に粗酵素抽出液 50 μL を加えた後, 20 mM リブコース 1,5-ビスリン酸 (RuBP) を加えて反応を開始させ, 1 分後に 2 N HCl 100 μL を加えて反応を停止させた。この液 80 μL をシンチレーション用のバイアルに移し乾燥させた後, シンチレータ (ACS-II, アマシャム) を 2 mL 加え, 液体シンチレーションカウンタ (Tricarb 2250CA, Packard, 米国) により放射線量を測定した。測定値から固定された CO_2 のモル数を算出し, 活性値とした。

PEPCase 活性の測定は, 5 mM MgCl_2 , 0.2 mM 還元型 β -ニコチンアミドアデニシジヌクレオチドニナトリウム (NADH), 6 ユニトリンゴ酸脱水素酵素, 4 mM DTT, 25 mM $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ($0.061 \text{ Ci mol}^{-1}$) を含む Tris-HCl (pH 8.0) を反応液とし, 反応液 350 μL に粗酵素抽出液 100 μL を加え, 30°C で行った。25 mM ホスホエノールピルビン酸 (PEP) 50 μL を加えて反応を開始させ, 1 分後に 2 N HCl 100 μL を注入して反応を停止させた。その後の放射線量の測定手順は RuBPCase 活性測定の場合と同じである。

6. 葉緑素の分析

葉緑素は, 80% アセトンで抽出し, Arnon の方法¹⁾に従って分析した。

結果と考察

C_3 型および CAM 型のアイスプラントの葉身から効率的にカルスを得るため, カルス形成に与える 2,4-D の効果を検討した。カルス誘導培地に含まれる 2,4-D の濃度を 4 段階に変え, これにともなうカルス形成率の変化を第 1 図に示した。形成率は, (2 mm² 以上の大きさのカルスが形成された葉片数)/(全置床葉片数) の百分率である。 C_3 型植物の葉組織を用いる場合では, 5~10 mg L⁻¹ の濃度の範囲で形成率にほとんど差が認められず, 65~70% の範囲であった。CAM 型植物の場合では, 5 mg

L⁻¹ 2,4-D の濃度条件で形成率が 100% 近くに達し, カルス誘導に及ぼす 2,4-D の濃度効果は C_3 型と CAM 型で異なっていることが明らかとなった。なお, 2,4-D を添加しなかった場合では, C_3 型および CAM 型の両植物体からのカルスの形成は認められなかった。

本研究では, C_3 型と CAM 型とも 2,4-D 濃度を 5 mg L⁻¹ に設定してカルスを誘導し, 以下の実験に用いた。

培養 30 日後に得られたカルスを使用して緑化誘導法を検討した。カルスの緑化には培地に BAP を添加することが有効であることが報告されている¹¹⁾。本研究においてもアイスプラントに対するその効果を確認するため, BAP を 5 段階の濃度条件とし, 12 時間日長の照射下でカルスを 30 日間培養した。

第 2 図に C_3 型および CAM 型由来のカルスに対する緑化効果をクロロフィル含有量を指標にして示した。 C_3 型および CAM 型植物由来の緑化カルスのクロロフィル含量は, C_3 型植物由来のものでは培地の BAP 濃度が 1 mg L⁻¹ の場合に最大となり, CAM 型植物由来のものでは培地の BAP 濃度が 5 mg L⁻¹ の場合に最大になった。また, CAM 型植物由来のカルスの緑化率は BAP 濃度を 10 mg L⁻¹ まで高めても大きな変化は見られなかったのに対して, C_3 型植物由来のカルスでは BAP 濃度の上昇とともにクロロフィル含量が急速に減少し, 緑化効果が低下した。このように, C_3 型と CAM 型植物

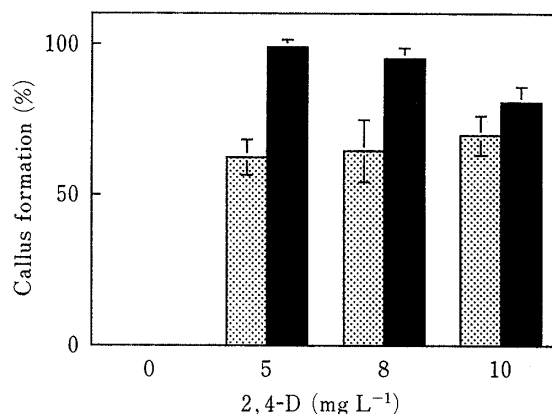


Fig. 1. Effects of 2,4-D application on the callus formation from the leaf segments of C_3 - and CAM-mode plants. Each point represents the mean value from three replicates, and vertical lines show the standard deviation.

▨, C_3 -mode. ■, CAM-mode.

由来のカルスで BAP に対する濃度反応が異なることが明らかとなった。

以下に述べる実験では、 C_3 型と CAM 型植物由来のいずれの場合も 1 mg L^{-1} の BAP を用いて緑化誘導したカルスを使用した。なお、 1 mg L^{-1} の BAP では C_3 型植物由来と CAM 型植物由来のカルスで緑化誘導期間における生長速度に差が認められず、また、 0.5 mg L^{-1} 以下の BAP 濃度では不定根の形成が見られた。

C_3 型植物および CAM 型植物に由来する緑化カルスについて光合成特性を比較するため、光飽和条件下の光合成速度を酸素電極法により測定した。第 3 図に、酸素電極反応槽の水温を 15 から 35°C までの 5 段階に変えた場合の緑化カルスの光合成速度をクロロフィル重量当たりの値で示した。 C_3 型植物由来と CAM 型植物由来の緑化カルスの光合成速度には明確な差が示され、 C_3 型植物由来の緑化カルスは CAM 型植物由来のものより高い光合成速度を示した。アイズプラントの個葉の明期における光合成速度も CAM 型に比べて C_3 型が高く⁹⁾、脱分化過程を経ても光合成速度における相対的な関係が維持されることが明らかとなった。

C_3 型植物由来と CAM 型植物由来の緑化カルスについて酸素放出速度の温度反応を比較すると、双方とも 25°C で酸素放出速度は最高値となった。しかし、両者の温度反応には明確な差が認められ、 C_3 型植物由来の緑化カルスの酸素放出速度は低温度域での低下が小さく、 15°C の値は 25°C の値の

60%であったが、高温度域の 35°C では 30%以下にまで低下した。これに対して、CAM 型植物由来の緑化カルスでは低温度域 (15°C) および高温度域 (35°C) での低下が小さかった。このように温度反応から見ると、 C_3 型植物由来の緑化カルスは適温が低温度域にある C_3 型光合成の一般的特徴²⁾を有し、また、CAM 型植物由来のものでは広範囲の温度に適應する CAM 型光合成の特徴²⁾を有していた。

次に、 C_3 型植物由来と CAM 型植物由来の緑化カルスにおける RuBPCase と PEPCase の活性を元の植物体の葉の酵素活性値と比較した (第 1 表)。まず、葉の酵素活性を見ると、 C_3 型植物の葉では RuBPCase の活性が PEPCase 活性に比べて約 17 倍高かった。これに対して、CAM 型植物の葉では PEPCase 活性が RuBPCase 活性に比べて約 3.5 倍高かった。 C_3 型植物に由来する緑化カルスでは PEPCase 活性に比較して RuBPCase の活性が高いものの、その差は小さかった。しかし、CAM 型植物から誘導した緑化カルスでは、RuBPCase 活性と PEPCase 活性の比は、母体で得られた割合と同様であった。つまり、光合成型が異なる植物体における両酵素活性の相対的な関係は、脱分化後に得られる緑化カルスにおいてもほぼ維持されることが明らかとなった。

本研究では、同じ期間生育させた C_3 型と CAM 型の植物体の上から 2 番目の葉をカルスの誘導に用い、また、 C_3 型と CAM 型でカルスの誘導に用い

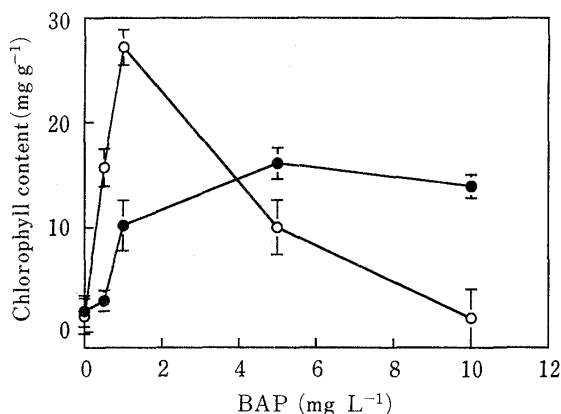


Fig. 2. Effects of BAP application on the chlorophyll content in the greened calli obtained from leaves of C_3 - and CAM-mode plants. Each point represents the mean value from three replicates, and vertical lines show the standard deviation. ○, C_3 -mode. ●, CAM-mode.

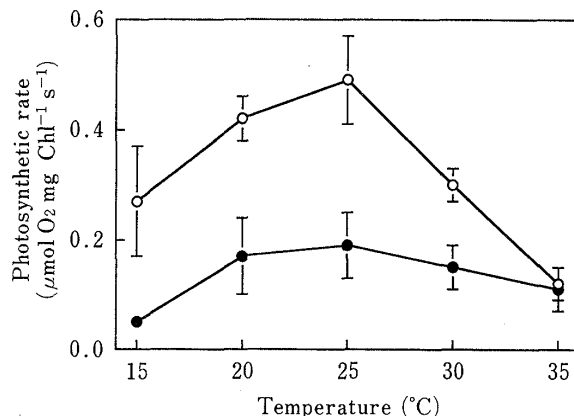


Fig. 3. Effects of temperature on the photosynthetic rate of the greened calli obtained from leaves of C_3 - and CAM-mode plants. Each point represents the mean value from three replicates, and vertical lines show the standard deviation. ○, C_3 -mode. ●, CAM-mode.

Table 1. Activities of RuBPCase and PEPCase in the leaves of C_3 - and CAM-mode plants and the greened calli obtained from those leaves.

	C_3		CAM	
	RuBPCase	PEPCase	RuBPCase	PEPCase
Leaf	0.121 ± 0.013	0.007 ± 0.002	0.085 ± 0.006	0.298 ± 0.021
Greened callus	0.110 ± 0.025	0.075 ± 0.010	0.023 ± 0.003	0.113 ± 0.023

The rates, $\mu\text{mol mg Chl}^{-1} \text{s}^{-1}$, are calculated from the amount of $^{14}\text{CO}_2$ incorporation per unit chlorophyll weight. The means and the standard deviation of results from three replicate experiments are shown.

Table 2. Effects of NaCl application on PEPCase activity in the greened calli obtained from the leaves of C_3 -mode plants.

NaCl concentration (mM)	PEPCase activity ($\mu\text{mol mg Chl}^{-1} \text{s}^{-1}$)
0	0.075 ± 0.025 (100)
85	0.281 ± 0.086 (375)
250	0.135 ± 0.032 (180)
350	0.095 ± 0.024 (127)

The means and the standard deviation of results from three replicate experiments are shown. Numerals in parentheses are values in percentage to the activity of PEPCase in calli grown in the absence of NaCl.

た植物体に出葉数の差が認められなかった。しかし、CAM型の植物体は、塩ストレスにより、 C_3 型の植物体に比べて個体発生プログラムが促進されていると考えることもできる。本研究で得られた結果が、カルスを誘導するのに用いた植物体の光合成型に起因するのか、あるいは、生育段階に起因するのか、今後、検討する必要がある。

C_3 型のアイスパラントの植物体を塩ストレス下に置くと、光合成型がCAM型に転換する。このような現象がカルス誘導下においても起こるか否かを次に検討した。Trichelら¹⁵⁾は、塩処理した従属栄養的培養カルス（緑化していないカルス）のPEPCase活性が無塩処理の従属栄養的培養カルスのPEPCase活性に比べて数倍高いことを報告している。本研究においても、 C_3 型植物の葉から誘導した緑化処理していないカルスをNaCl濃度を0~350 mMの範囲で2~3週間培養し、PEPCase活性を測定したが、明確な塩処理効果は認められなかった（結果は示していない）。しかし、カルスに緑化誘導処理を行い、その過程で塩処理を課すと酵素活性に明確な変化が生じた（第2表）。つまり、NaCl無添加区のPEPCase活性が $0.075 \mu\text{mol}$

$\text{mg Chl}^{-1} \text{s}^{-1}$ であったのに対して、85 mM NaCl濃度区ではそれが約4倍の $0.281 \mu\text{mol mg Chl}^{-1} \text{s}^{-1}$ に増加した。この値は第1表に示したCAM型植物のPEPCase活性と同水準の高い値である。

最近、Yenら²³⁾は、3%蔗糖を含む従属栄養的条件下で培養し、緑化処理しなかったアイスパラントのカルスは塩処理によってPEPCase活性が増加しないが、蔗糖の代わりに3%あるいは1%の可溶性デンプンを含む培養液で培養することによって緑化させたカルスは塩処理によってPEPCase活性が増加することを報告している。また、WillenbrinkとHusemann¹⁷⁾は、アイスパラントの光独立栄養カルス（培地に蔗糖が含まれていない）に塩処理を課すとCAM型光合成に関連した酵素の活性が増加することを報告した。トウモロコシでも、プロトプラストに蔗糖を与えるとPEPCase遺伝子の発現が抑えられる¹²⁾。つまり、以上の結果は、PEPCaseの塩処理による発現誘導には培地の蔗糖濃度を減らし、光独立栄養状態にすることが必要であることを示している。本研究においても、緑化処理しなかったカルスではPEPCaseの発現誘導に塩処理効果が認められず、緑化カルスで塩処理によってPEPCase活性が増加した。しかし、本研究では緑化カルスの誘導・培養に3%蔗糖を含む培養液を用いた。つまり、本研究の結果は、低蔗糖濃度が塩処理によるPEPCase活性の増加のための必須条件ではなく、葉緑体の発現が重要であることを示唆している。しかし、葉緑体の発達が塩処理によるPEPCaseの発現に直接関わっているのか、あるいは、カルスの緑化のために用いたBAP処理がPEPCaseの発現に関わっているのか、さらに詳細な検討が必要である。

アイスパラント植物体の光合成型が C_3 型からCAM型へ転換するとPEPCaseの活性が十倍から数十倍に上昇することが報告されている^{6,7,16)}。本研究においても植物体ではCAM型化にともなって

PEPCase 活性が 40 倍以上に増加した (第 1 表)。しかし、塩処理による緑化カルスの PEPCase の活性増加は数倍であった。これは、CAM 型植物の PEPCase 活性と塩処理した緑化カルスの PEPCase 活性とはほぼ同レベルの高い値であるのに対し、塩処理していない緑化カルスの PEPCase 活性は C_3 型植物の PEPCase 活性と比較して約 10 倍高い値であるため、塩処理による活性増加率として低く計算されたためである。アイスプラントでは、植物体に対するサイトカイニン処理によって PEPCase 活性が増加することが報告されている¹⁴⁾。塩処理していない緑化カルスの PEPCase 活性が高かった原因の一つとして、緑化カルスの誘導のために BAP を使用したことが考えられる。

アイスプラントにおける CAM 型光合成の誘導が個体あるいは葉の齢とは無関係に生じるか否かは興味ある問題である。本研究においては、CAM 型光合成の発現誘導を裏付ける有機酸の日変化について検討していないため、そのことへの直接的言及はできないが、緑化カルスで CAM 型光合成の鍵酵素である PEPCase の活性が塩処理により増大したことは興味深い、今後、緑化カルスはこの問題を解決するための有用な材料となると考えられる。

引用文献

1. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1—15.
2. Black, C.C. Jr. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO_2 uptake. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 253—286.
3. Bohnert, H.J., J.A. Ostrem, J.C. Cushman, C.B. Michalowsky, J. Rickers, R. Weyer, E.J. De Rocher, D.M. Vernon, M. Krueger, L. Vazquez-Moreno, J. Velten, R. Höfner and J.M. Schmitt 1988. *Mesembryanthemum crystallinum*, a higher plant model for the study of environmental induced changes in gene expression. Plant Mol. Biol. Rep. 6: 10—28.
4. Cushman, J.C., G. Meyer, C.B. Michalowski, J.M. Schmitt and H.J. Bohnert 1989. Salt stress leads to different expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. The Plant Cell 1: 715—725.
5. Cushman, J.C., C.B. Michalowski and H.J. Bohnert 1990. Developmental control of crassulacean acid metabolism inducibility by salt stress in the common ice plant. Plant Physiol. 94: 1137—1142.
6. Foster, J.C., G.E. Edwards and K. Winter 1982. Changes in levels of phosphoenolpyruvate carboxylase with induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L. Plant Cell Physiol. 23: 585—594.
7. Höfner, R., L. Vazquez-Moreno, K. Winter, H.J. Bohnert and J.M. Schmitt 1987. Induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* by high salinity: mass increase and *de novo* synthesis of PEP-carboxylase. Plant Physiol. 83: 915—919.
8. Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473—497.
9. Saitou, K., Y. Nakamura, Y. Kawamitsu, M. Matsuoka, M. Samejima and W. Agata 1991. Changes in activities and levels of pyruvate, orthophosphate dikinase with induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* L., Jpn. J. Crop Sci. 60: 146—152.
10. Saitou, K., W. Agata, Y. Masui, M. Asakura and F. Kubota 1994. Isoforms of NADP-malic enzyme from *Mesembryanthemum crystallinum* L. that are involved in C_3 photosynthesis and crassulacean acid metabolism. Plant Cell Physiol. 35: 1165—1171.
11. 佐藤文彦・山田康之 1978. 緑化培養細胞の光独立栄養性. 植物の化学調節 13: 75—86.
12. Sheen, J. 1994. Feedback control of gene expression. Photosynthesis Res. 39: 427—438.
13. Thomas, J.C., R.L. De Armond and H.J. Bohnert 1992. Influence of NaCl on growth, proline, and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. Plant Physiol. 98: 626—631.
14. Thomas, J.C., E.F. McElwain and H.J. Bohnert 1992. Convergent induction of osmotic stress-responses: abscisic acid, cytokinin, and effects of NaCl. Plant Physiol. 100: 416—423.
15. Treichel, S., H. Hettfleisch, S. Eilhardt, K. Faist and M. Kluge 1988. A possible induction of CAM by NaCl-stress in heterotrophic cell suspension cultures of *Mesembryanthemum crystallinum*. J. Plant Physiol. 133: 419—424.
16. von Willert, D.J., G.O. Kirst, S. Treichel and K. von Willert 1976. The effect of leaf age and salt stress on malate accumulation and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Sci. Lett. 7: 341—346.
17. Willenbrink, M.E. and W. Hüsemenn 1995. Photoautotrophic cell suspension cultures from *Mesembryanthemum crystallinum* and their response to salt stress. Bot. Acta 108: 497—504.
18. Winter, K. and D.J. von Willert 1972. NaCl-induzierter Crassulaceen-Säurestoffwechsel bei

- Mesembryanthemum crystallinum*. Z. Pflanzenphysiol. 67: 166—170.
19. Winter, K. 1973. CO₂-Fixierungsreaktionen bei der Salzpflanze *Mesembryanthemum crystallinum* unter variierten Außenbedingungen. Planta 114: 75—85.
 20. Winter, K. 1985. Crassulacean acid metabolism. In Barber, J. and N.R. Baker eds., Photosynthetic Mechanisms and the Environment. Elsevier, Amsterdam. 329—387.
 21. Winter, K. and R. Gademann 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.
 22. Winter, K. and J.A.C. Smith 1996. Crassulacean acid metabolism: current status and perspectives. In Winter, K. and J.A.C. Smith eds., Crassulacean Acid Metabolism. Springer-Verlag, Berlin, 389—426.
 23. Yen, H.E., H.D. Grimes and G.E. Edwards 1995. The effects of high salinity, water-deficit, and abscisic acid on phosphoenolpyruvate carboxylase activity and proline accumulation in *Mesembryanthemum crystallinum* cell cultures. J. Plant Physiol. 145: 557—564.
-