

SIGNIFICATION BIOGEOGRAPHIQUE DES PROCESSUS D'ADAPTATION PHOTOSYNTHETIQUE. I : L'EXEMPLE DES *KALANCHOE* MALGACHES

Jeanne BRULFERT ¹, Didier RAVELOMANANA ², Hans GEHRIG ³,
& Manfred KLUGE ³

¹ CNRS / URA 1128, Institut de Biotechnologie des Plantes, Université de Paris-Sud, 91405 Orsay, FRANCE

² Département de Physiologie végétale, Université de Madagascar, Antananarivo, MADAGASCAR

³ Institut für Botanik der Technischen Hochschule, D-64287 Darmstadt, ALLEMAGNE

ABSTRACT.- Crassulacean Acid Metabolism (CAM) represents a mode of photosynthesis performed by plants facing climatic water stress. CAM is characterized by the ability to fix external CO₂ (via the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) mainly during the night, but also during the day (via the enzyme ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco). These properties are associated with a specific behaviour of the stomata which open mainly at night (favouring PEPC activity) and can close during the day when high temperatures could endanger the water status of the leaf tissues. Thus CAM can be considered as an adaptative metabolic pathway, whose distribution among species should mirror their biogeographical repartition. Depending on the climatic environment of the plants, the relative activities of PEPC (night CO₂ fixation) and of Rubisco (day fixation) are different. Because the 2 carboxylative enzymes discriminate between the carbon stable isotopes (¹²C and ¹³C), the carbon isotope composition of the biomass ($\delta^{13}\text{C}$ value) reflects the relative contribution of the 2 enzymes to the diel carbon gain of a plant. This powerful technique was used to screen the photosynthetic mode of the Malagasy species of *Kalanchoe*. Results showed that, in the genus *Kalanchoe*, 1) all species were able to perform CAM, 2) the CAM pattern was generally very flexible, suggesting a close correlation with the climatic environment and/or the habitat of the analyzed sample, 3) CAM flexibility among the species clearly reflected the taxonomic classification inside the genus, 4) the centre of adaptive radiation of the genus was situated in Madagascar. Recent screening of multiple *Kalanchoe* species using DNA fingerprinting confirmed these findings.

KEY-WORDS.- Crassulaceae, Crassulacean Acid Metabolism (CAM), *Kalanchoe*, Photosynthesis, Stable carbon isotope composition

RESUME.- Le Métabolisme Acide des Crassulacées (CAM) est un type de photosynthèse présenté par les plantes qui ont dans les conditions naturelles à faire face à une contrainte hydrique. Il est caractérisé par la capacité de fixer le CO₂ externe pendant la nuit (via la phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC) mais aussi pendant le jour (via la ribulose biphosphate carboxylase oxygénase, Rubisco). Ces propriétés sont associées à un comportement particulier des stomates qui sont ouverts la nuit (favorisant l'absorption de CO₂) mais peuvent se fermer le jour quand les températures élevées sont susceptibles de déséquilibrer l'état hydrique des cellules. Ainsi, le CAM constitue une voie métabolique adaptative dont la distribution parmi les espèces pourrait refléter leur répartition géographique. Selon l'environnement climatique des plantes, les activités relatives de la PEPC (fixation nocturne) et de la Rubisco (fixation diurne) sont en proportion différente. A cause des propriétés de discrimination des 2 enzymes en ce qui concerne les 2 isotopes stables du carbone, (¹²C et ¹³C), la composition isotopique de la biomasse foliaire pour cet élément (¹³C) reflète la contribution relative des 2 enzymes au gain journalier de

carbone de la plante considérée. Cette technique a été utilisée pour examiner le mode de photosynthèse utilisé par les *Kalanchoe* malgaches. Les résultats ont montré 1) la capacité par toutes les espèces de *Kalanchoe* de fonctionner selon le mode CAM, 2) une grande flexibilité photosynthétique pour certaines espèces en relation étroite avec l'environnement climatique et/ou le mode de vie de l'espèce analysée, 3) une corrélation entre la flexibilité du CAM et la classification taxonomique des espèces selon P.Boiteau, d'où l'on peut déduire que le centre de spéciation du genre *Kalanchoe* s'est situé à Madagascar. Ces résultats ont été confirmés par une récente analyse comparative des ADN de nombreuses espèces de *Kalanchoe*.

MOTS-CLES.- Composition isotopique pour le carbone, Crassulacées, *Kalanchoe*, Métabolisme Acide des Crassulacées (CAM), Photosynthèse

INTRODUCTION

L'importance de la place occupée par le genre *Kalanchoe* dans la flore malgache n'est plus à démontrer (ALLORGE-BOITEAU, ce volume) et la récente publication des observations, jusqu'ici inexploitées, de P.Boiteau (BOITEAU & ALLORGE-BOITEAU, 1995) matérialise les arguments en faveur de l'exceptionnel intérêt de ces plantes, non seulement pour la connaissance de la flore malgache, mais aussi pour des recherches fondamentales sur les processus photosynthétiques adaptatifs et le rôle qu'ils jouent dans la répartition géographique des espèces. Au plan écophysio-logique, cet intérêt repose tout d'abord sur le fait que les espèces de *Kalanchoe* montrent des formes de vie très variées: presque toutes succulentes, elles présentent des formes herbacées, buissonnantes ou même lianescentes, terrestres, épiphytiques ou épilithiques. De plus, toutes les observations ont montré qu'elles sont réparties sur l'ensemble du territoire malgache, ce qui signifie une grande faculté d'adaptation à un large éventail de climats et de situations contraignantes dans lesquels leur cycle de développement doit s'effectuer. Ce sont ces caractéristiques qui ont motivé nos recherches.

LA PHOTOSYNTHESE DE TYPE CAM (METABOLISME ACIDE DES CRASSULACEES)

Un problème majeur, pour une espèce végétale vivant dans des conditions de climat aride ou semi-aride, est la régulation des ses échanges gazeux (CO₂ et vapeur d'eau). L'importance de ces derniers est réglée par le degré d'ouverture des stomates, cellules par lesquelles s'effectuent les échanges gazeux plante-atmosphère. Il est évident que les stomates doivent être ouverts pour permettre l'entrée de CO₂ photosynthétique dans la plante, mais que l'ouverture des stomates signifie également perte d'eau par efflux transpiratoire, ce qui peut pour la plante poser un problème de survie, particulièrement en cas de température de jour élevée.

Un type de photosynthèse existe qui permet aux plantes de résoudre ce problème. Il a été découvert sur une espèce de *Kalanchoe*, le *K.pinnata*, dès le 19^{ème} siècle et porte pour cette raison le nom de Métabolisme Acide des Crassulacées ou CAM (KLUGE & TING, 1978; WINTER, 1985). Peu à peu décrite pendant la première moitié du 20^{ème} siècle, cette voie métabolique, remarquable exemple d'adaptation écologique de la photosynthèse, est depuis devenue un centre d'intérêt à tous les niveaux de recherche en biologie végétale. La figure 1 permet une comparaison sommaire des photosynthèses de

type « C₃ » (processus le plus fréquent sous les latitudes tempérées) et de type CAM. Signalons tout de suite qu'un 3ème type de photosynthèse, dit « en C₄ » ne sera pas considéré ici, car il n'est pas opérationnel, ni chez les *Kalanchoe*, ni chez les orchidées (KLUGE *et al.*, ce volume). La photosynthèse est dite « en C₃ » lorsque chaque molécule de CO₂ externe, après fixation sur une molécule à 5 atomes de carbone est dirigée vers la production de sucres via la formation d'un **premier produit à 3 atomes de carbone**. L'absorption de CO₂ est uniquement diurne, lorsque les stomates sont ouverts, et s'effectue grâce à l'activité de l'enzyme de fixation ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco). L'assimilation photosynthétique du CO₂, telle qu'elle vient d'être décrite, existe aussi dans la voie CAM et en constitue l'ultime bloc métabolique (Fig.1). Mais une différence essentielle réside dans **l'origine du CO₂ assimilé qui est interne** et non plus atmosphérique (externe). En effet, pour les plantes CAM, c'est **la nuit** que les stomates sont ouverts (Fig.1), que le CO₂ externe est absorbé et stocké sous forme d'une **molécule à 4 atomes de carbone**, l'acide malique (Fig.1). L'enzyme de fixation est dans ce cas la phosphoÉnolpyruvate carboxylase (PEPC). L'acide malique est, dès sa formation, compartimenté dans la vacuole, évitant ainsi une acidification du milieu cytoplasmique, et s'accumule pendant toute la période nocturne, constituant une réserve interne de carbone. Le jour suivant, c'est aux dépens de cette réserve que le CO₂ interne est produit puis assimilé selon la voie de la Rubisco, dépendante de la lumière (Fig.1). L'assimilation du CO₂, le jour, peut se dérouler derrière des stomates fermés: la plante CAM est donc capable de lutter contre les pertes d'eau par transpiration. La figure 1 schématise les rythmes stomatiques des plantes à photosynthèse de type C₃ ou CAM.

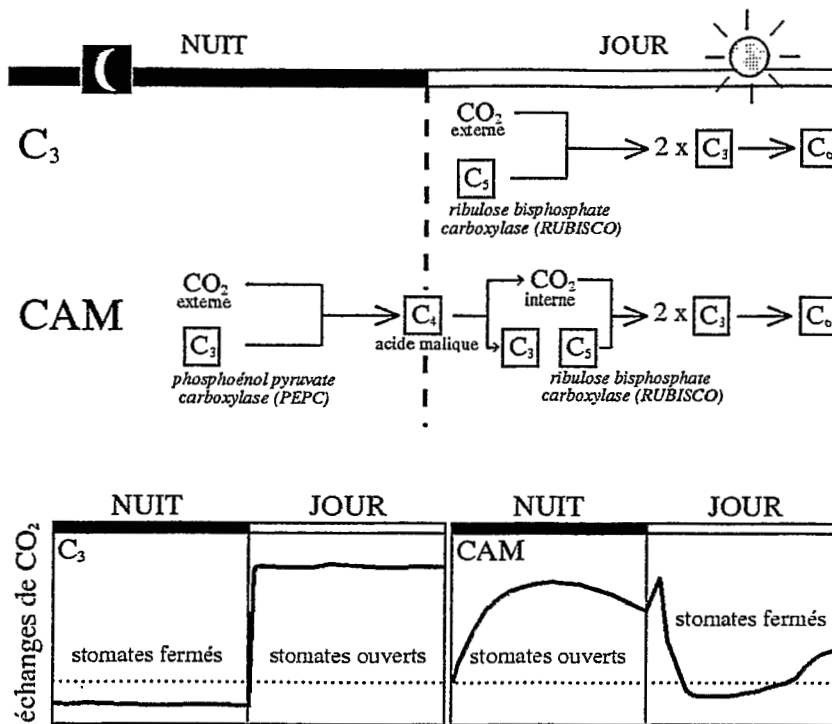


Fig. 1. Schémas des voies d'assimilation photosynthétique du carbone par les végétaux, dites "en C₃" et CAM (Métabolisme Acide des Crassulacées), respectivement (voir texte). Schémas des échanges de CO₂ entre la plante et l'atmosphère et rythmes d'ouverture des stomates, dans les 2 types de photosynthèse.

Tous les intermédiaires entre le comportement « C₃ » (stomates ouverts le jour) et le CAM extrême (stomates ouverts la nuit) existent (Fig. 2, échanges de CO₂) (KLUGE & TING, 1978) et se différencient par les rapports des quantités de CO₂ fixées la nuit et le jour, avec comme conséquence immédiate des flux transpiratoires très différents (Fig. 2). Il en résulte que l'économie d'eau, réalisée par les plantes concernées est d'autant plus grande (Fig. 2) que le type de photosynthèse est proche du CAM extrême, c'est-à-dire que la fixation de CO₂ externe est uniquement nocturne. C'est la capacité qu'ont certaines espèces de moduler le « timing » de la fixation de CO₂ qui constitue leur **flexibilité photosynthétique** et leur possibilité d'adaptation à des environnements particuliers.

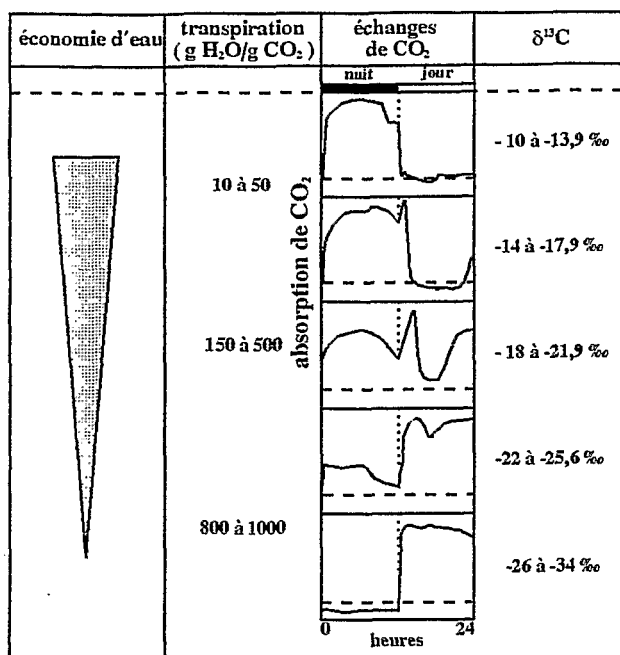


Fig. 2. Schémas des différents comportements photosynthétiques des espèces à haute flexibilité C₃-CAM. Echanges de CO₂ entre la plante et l'atmosphère: de bas en haut, comportement C₃ typique (voir Fig. 1), intermédiaires C₃-CAM avec des rapports jour-nuit d'absorption de CO₂ externe décroissant, enfin CAM extrême. Les pertes d'eau subies par les plantes, en relation avec leur type de photosynthèse sont matérialisées par la quantité d'eau transpirée (g H₂O) par g de CO₂ absorbé. De l'importance de cette transpiration et en liaison avec l'établissement du CAM, dépend l'économie d'eau réalisée par les plantes. A cause des propriétés des carboxylases primaires (Rubisco et PEPC) de "discriminer" les isotopes stables du carbone de l'air, les compositions isotopiques pour le carbone de la biomasse sont différentes et dépendent du type de photosynthèse présenté par la plante. L'écart à un standard (δ¹³C) indique donc le mode photosynthétique d'absorption du CO₂ externe. Les valeurs de δ¹³C les plus négatives sont indicatrices d'un comportement C₃, les valeurs les moins négatives sont celles du CAM.

La connaissance du type d'échanges gazeux d'une plante, dans des conditions de laboratoire, demande un équipement spécialisé, basé sur l'enregistrement continu de la composition atmosphérique de l'air d'une chambre respiratoire dans laquelle est placée la plante étudiée. Sur le terrain, ce type d'appareillage est difficile à manipuler; l'expérimentateur a recours à une autre technique, utilisable sur des échantillons

desséchés et qui est basée sur des propriétés différentes des 2 enzymes de carboxylation primaire, la Rubisco et la PEPC (OSMOND *et al.*, 1975). En effet, les 2 carboxylases n'acceptent pas de la même façon les molécules de $^{12}\text{CO}_2$ et de $^{13}\text{CO}_2$ contenues dans l'air et correspondant à l'existence de 2 isotopes stables du carbone (l'isotope le plus lourd, le ^{13}C , représente 1,1% du carbone total de l'air). La Rubisco « discrimine » entre les 2 molécules de CO_2 et **accepte moins le $^{13}\text{CO}_2$ que la PEPC**. Le résultat de ce comportement enzymatique se répercute sur la composition isotopique des éléments carbonés de la biomasse végétale. L'analyse de la composition isotopique pour le carbone des tissus végétaux renseigne donc sur la voie de fixation du CO_2 externe, soit par la Rubisco (type C3) soit par la PEPC (type CAM), soit mixte (intermédiaires C3/CAM, voir Fig.2). La flexibilité photosynthétique observée au niveau des échanges gazeux peut être évaluée par des valeurs de composition isotopique pour le carbone ($\delta^{13}\text{C}$) des tissus foliaires. La figure 2 indique une correspondance entre les types d'échanges gazeux obtenus par l'analyse de composition atmosphérique et les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$. Les détails techniques n'ont pas à être exposés ici. Il convient de remarquer seulement que aux valeurs les moins négatives correspond un type de photosynthèse CAM extrême, pour lequel la fixation de CO_2 externe (via la PEPC) est uniquement nocturne. Inversement les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ les plus négatives sont indicatives d'une photosynthèse de type C3. Les compositions isotopiques intermédiaires reflètent des rapports différents de fixation diurne et nocturne de CO_2 par les plantes. A l'intérêt de cette technique, s'ajoute la possibilité d'utiliser des échantillons d'herbier (KLUGE *et al.*, 1993).

LE CAM CHEZ LES *KALANCHOE* MALGACHES

Les techniques décrites ont été utilisées pour analyser du point de vue de leur flexibilité photosynthétique, près de 80 espèces de *Kalanchoe* malgaches (KLUGE *et al.*, 1991). Soit la composition isotopique pour le carbone a été déterminée sur des échantillons prélevés *in situ* ou provenant de l'Herbier du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, soit le type de photosynthèse a été directement analysé en laboratoire, par analyse de CO_2 , (KLUGE & BRULFERT, 1996; BRULFERT *et al.*, 1996) cette méthodologie permettant en outre de moduler les paramètres de l'environnement et d'en mesurer l'impact sur le comportement des plantes.

L'ensemble des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ a été réparti en 6 classes numériques (Fig.3), les moins négatives représentant un fonctionnement CAM et les plus négatives un fonctionnement en C3. L'origine des échantillons a été placée sur une carte bioclimatique de Madagascar (Fig.3). Il est aisé de constater la corrélation existant entre le type de photosynthèse présenté par la plante et son origine bioclimatique: la figure 3 montre en effet que toutes les plantes provenant de la zone du bush du sud sont réparties dans les 3 classes de $\delta^{13}\text{C}$ caractérisant une photosynthèse de type CAM, ou CAM extrême, avec une forte capacité d'économie d'eau. Par contre, dans les autres zones climatiques, particulièrement dans les forêts de pluie du centre et de l'est, apparaît une flexibilité photosynthétique des espèces de *Kalanchoe*, les $\delta^{13}\text{C}$ des échantillons analysés recouvrant toutes les classes de valeurs. La composition isotopique pour le carbone des tissus foliaires constitue donc bien un marqueur de l'origine biogéographique des espèces et de leur capacité d'adaptation photosynthétique à leur environnement naturel (KLUGE *et al.*, 1991).

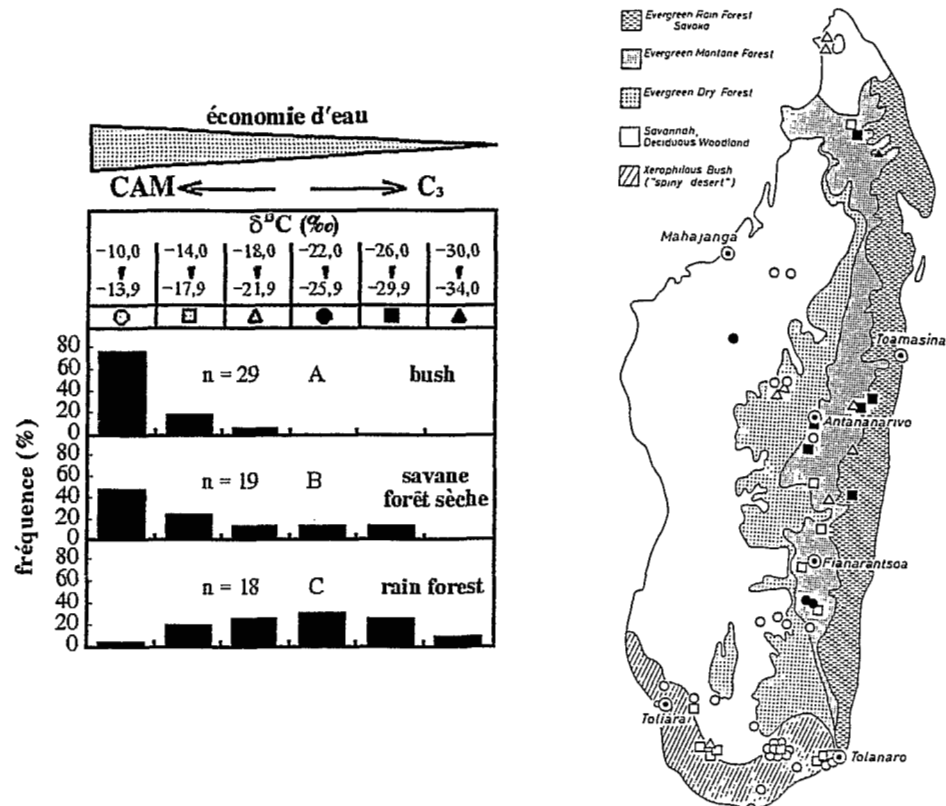
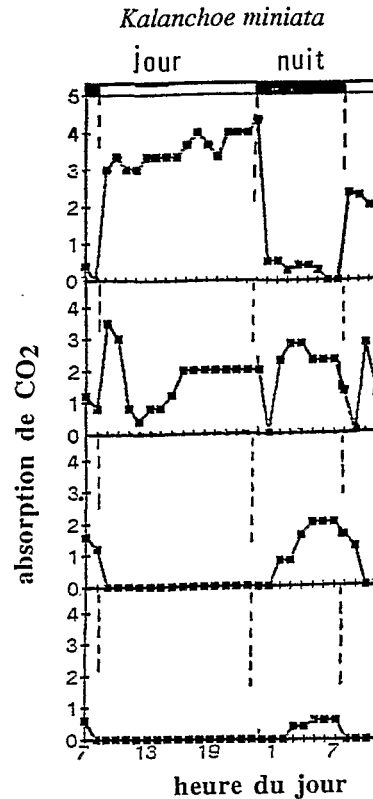


Fig. 3. Mesures de $\delta^{13}\text{C}$ de tissus foliaires de différentes espèces de *Kalanchoe* dont l'origine a été portée sur une carte bioclimatique de Madagascar. Pour une clarification des résultats, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ ont été divisées en 6 classes indicatrices d'un comportement CAM ou C₃ avec les intermédiaires décrits précédemment, en corrélation avec l'économie d'eau réalisée par les plantes concernées. Les zones bioclimatiques de Madagascar ont été réunies en 3 catégories. Le mode photosynthétique des espèces constitue un marqueur de leur origine biogéographique; les espèces originaires des zones humides montrent le plus de flexibilité photosynthétique.

Cette flexibilité photosynthétique est non seulement inter- mais aussi intra-spécifique. A titre d'exemple, des travaux effectués en environnement contrôlé ont montré (KLUGE & BRULFERT, 1996; BRULFERT *et al.*, 1996) que le *Kalanchoe miniata* était capable de moduler très rapidement son type de photosynthèse sous l'effet d'une contrainte hydrique (Fig.4). De type C₃ en conditions d'humidité atmosphérique élevée (70%) et d'arrosage optimal, les plantes montrent, après seulement 2 jours de sécheresse (suppression des arrosages, humidité relative 50%) un fonctionnement CAM avec fixation mixte de CO₂ externe jour/nuit; puis lorsque la contrainte hydrique se poursuit, la fixation diurne de CO₂ s'annule (jour 9 du traitement), la fixation nocturne elle-même diminue (jour 21) annonçant le passage au « CAM-idling » (SZAREK *et al.*, 1973) pour lequel il n'y a plus aucun échange entre la plante et l'atmosphère bien que la fixation nocturne de CO₂ soit cependant maintenue aux dépens du CO₂ respiratoire.

Fig. 4. Flexibilité photosynthétique de *Kalanchoe miniata*: en conditions de laboratoire; rôle de la contrainte hydrique dans la modification des échanges de CO₂ plante-atmosphère. De haut en bas, plantes cultivées en conditions d'arrosage optimal, 70% d'humidité atmosphérique, 16h d'éclairage journalier (300 $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$), thermopériode 27°/17° jour/nuit, puis soumises à contrainte hydrique (arrêt des arrosages, 50% d'humidité atmosphérique) pendant 2, 9 et 21 jours. Le mode photosynthétique évolue du type C₃ au CAM extrême.

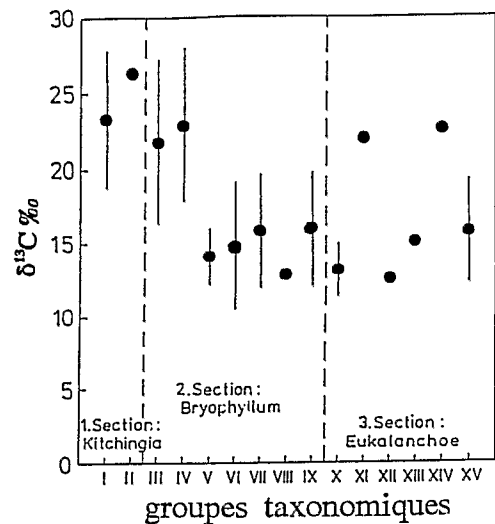


La sécheresse est donc de première importance en tant que candidat pour induire un changement de mode de photosynthèse. Ceci se confirme si l'on considère les différentes formes de vie présentées par les espèces de *Kalanchoe*, en particulier l'épiphytisme. Cet habitat est caractérisé par une alternance fréquente de (courtes) périodes de sécheresse et d'humidité exacerbées, au plan de la contrainte que subit la plante, par l'absence de sol. On s'attend donc à ce que les espèces épiphytes soient les plus capables de flexibilité métabolique (GRIFFITHS, 1989). Les résultats acquis sur le *K. porphyrocalyx* confirment cette hypothèse (BRULFERT *et al.*, 1995, 1996). Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ trouvées pour des individus récoltés dans différents sites climatiques se répartissent de -15,68 à -30,06‰, ce qui signifie un balayage de tous les intermédiaires entre le CAM et la photosynthèse de type C₃; les plantes montrant un comportement CAM typique étaient celles récoltées dans une forêt sèche, donc ayant probablement subi une contrainte hydrique, alors que les individus provenant des forêts de pluie dont l'humidité autorisait une ouverture stomatique diurne, montraient un fonctionnement de type C₃. Les plantes conservées en jardin botanique et que l'on supposait de ce fait convenablement arrosées étaient également proches du fonctionnement C₃.

GROUPES TAXONOMIQUES ET FLEXIBILITE PHOTOSYNTHETIQUE

C'est sur la base de critères taxonomiques que P.Boiteau a tenté une classification des espèces de *Kalanchoe* (BOITEAU & ALLORGE-BOITEAU, 1995.). Si l'on attribue aux 15 groupes botaniques les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ résultant de toutes nos analyses (Fig.5) (KLUGE *et al.*, 1993), il apparaît que les espèces comportant une dominance du mode C3 en même temps que les plus susceptibles de flexibilité dans leur comportement photosynthétique sont situées dans les premiers groupes (section *Kitchingia* et premiers groupes de la section *Bryophyllum*). Dans ces groupes se trouvent les espèces épiphytes et celles vivant dans les régions humides montagneuses centrales et les régions est. Pour les espèces des groupes suivant, rassemblant les plantes des zones sèches et du « bush » xérophytique du sud, à part quelques exceptions insuffisamment pourvues d'ailleurs en nombre d'échantillons, le comportement CAM strict devient évident et la flexibilité photosynthétique diminue. L'hypothèse pourrait alors être faite (KLUGE *et al.*, 1993) que le centre de rayonnement adaptatif pour les espèces de *Kalanchoe* est situé dans les zones humides de Madagascar, d'où le genre a évolué et envahi les régions sèches et du sud, en même temps qu'apparaissait le CAM, comme système photosynthétique adaptatif et de survie (KLUGE *et al.*, 1992).

Fig. 5. Corrélation entre les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ de la biomasse des espèces de *Kalanchoe* et les groupes taxonomiques de P.Boiteau (Boiteau et Allorge-Boiteau, 1995). La plus haute flexibilité photosynthétique inter- et intra-spécifique est observée dans les espèces des premiers groupes qui sont principalement originaires des zones climatiques humides (voir Fig.3). Il est plausible que ces zones puissent constituer le centre de dispersion des espèces, dont le comportement photosynthétique pourrait alors rendre compte.



Pour terminer, ajoutons qu'une étude est en cours visant à comparer les ADN d'un maximum d'espèces de *Kalanchoe* et que les résultats (non publiés) semblent pouvoir être corrélés avec la classification taxonomique de Boiteau et permettre une interprétation phylogénétique du genre.

CONCLUSION

Les résultats présentés ici, contribuent en premier lieu à une meilleure connaissance du genre *Kalanchoe* et de son évolution. Ils confirment, par des études écophysiologicals, les données des taxonomistes, mais ont également montré que la répartition des espèces sur le territoire malgache était basée sur l'existence d'un mode photosynthétique adaptatif qui a de plus permis la colonisation d'habitats arides ou soumis à contrainte hydrique. Il semble en outre que ce soit la première fois qu'un genre entier est étudié à tous les niveaux, depuis la taxonomie, écophysiological, biochimie, jusqu'aux ADN. Mais cette étude constitue également un exemple, et pourrait s'appliquer à tout autre genre botanique: notre message concerne aussi le fait que nous possédons maintenant des techniques permettant de dépasser le simple stade de description des espèces et autorisant une interprétation des distribution et évolution en termes d'adaptation physiologique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLORGE-BOITEAU, L., 1996. Madagascar centre de spéciation et d'origine du genre *Kalanchoe* (Crassulaceae). In: W.R. Lourenço (éd.). Biogéographie de Madagascar, pp. 137-145. Editions de l'ORSTOM, Paris.
- BOITEAU, P. & L. ALLORGE-BOITEAU, 1995. *Kalanchoe* (Crassulacées) de Madagascar. Systématique, écophysiological et phytochimie. Karthala, Paris, 252 p, 47pl.
- BRULFERT, J., D. RAVELOMANANA & M. KLUGE, 1995. Ecophysiological des *Kalanchoe*. Le Métabolisme Acide des Crassulacées (CAM), une voie photosynthétique adaptative. In: *Kalanchoe* (Crassulaceae) de Madagascar. Systématique, écophysiological et phytochimie. Karthala, Paris, 207-218.
- BRULFERT, J., D. RAVELOMANANA, S. GUÇLU & M. KLUGE, 1996. Ecophysiological studies in *Kalanchoë porphyrocalyx* (Baker) and *K. miniata* (Hils et Bojer), two species performing highly flexible CAM. Photosynthesis Research (sous presse).
- GRIFFITHS, H., 1989. Carbon dioxide concentrating mechanisms and the evolution of CAM in vascular epiphytes. In: Vascular plants as epiphytes. Evolution and ecophysiological. Ecological studies, 76, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 42-86.
- KLUGE, M. & J. BRULFERT, 1996. Crassulacean acid metabolism in the genus *Kalanchoe*: ecological, physiological and biochemical aspects. In: Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiological and Evolution, Ecological studies, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, sous presse.
- KLUGE, M. & I.P. TING, 1978. Crassulacean Acid Metabolism. Analysis of an ecological adaptation. Ecological studies, 30, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 209.
- KLUGE, M., J. BRULFERT, J. LIPP, D. RAVELOMANANA & H. ZIEGLER, H., 1993. A comparative study by $\delta^{13}\text{C}$ -analysis of Crassulacean Acid Metabolism (CAM) in *Kalanchoe* (Crassulaceae) species of Africa and Madagascar. Bot. Acta, 106:320-324.

- KLUGE, M., J. BRULFERT, D. RAVELOMANANA, J. LIPP & H. ZIEGLER, 1991. Crassulacean acid metabolism in *Kalanchoe* species collected in various climatic zone of Madagascar: a survey by $\delta^{13}\text{C}$ analysis. *Oecologia*, 88:407-414.
- KLUGE, M., B. RAZANOELISOA, D. RAVELOMANANA & J. BRULFERT, 1992. *In situ* studies of Crassulacean Acid Metabolism in *Kalanchoe beharensis* Drake del Castillo, a plant of the semi-arid southern region of Madagascar. *New Phytol.*, 12:323-334.
- OSMOND, C.B., B.G. ALLAWAY, B.G. SUTTON, J.H. TROUGHTON, O. QUEIROZ & U. LÜTTGE, 1975. Carbon isotope discrimination in photosynthesis: environmental control of photosynthetic options in plants capable of crassulacean acid metabolism. *Nature*, 246:41-42.
- SZAREK, S.R., H.B. JOHNSON & I.P. TING, I.P., 1973. Drought adaptation in *Opuntia basilaris*. *Plant Physiol.*, 52:539-541.
- WINTER, K., 1985. Crassulacean Acid Metabolism. *In: photosynthetic mechanisms and the environment*, 8, Elsevier Sc Publ., New York, 329-387.