

W jaki sposób rośliny pobierają i asymilują azot?

Magdalena Zboińska

DOI: 10.24131/3247.180203

Streszczenie:

Dostępność azotu w glebie jest jednym z głównych czynników limitujących wzrost i rozwój roślin, ponieważ pierwiastek ten buduje tak podstawowe dla funkcjonowania komórek związki jak kwasy nukleinowe, białka czy chlorofil. Rośliny pobierają azot z roztworu glebowego przede wszystkim w postaci azotanów i jonów amonowych, ale także mocznika, aminokwasów, a nawet krótkich oligopeptydów. Ponadto, niektóre gatunki w procesie ewolucji przystosowały się do wzrostu na glebach o niskiej zawartości przyswajalnych form azotu. Są to rośliny tworzące układy symbiotyczne z bakteriami zdolnymi do wiązania azotu atmosferycznego oraz gatunki mięsożerne. W prezentowanej publikacji podsumowano wiedzę dotyczącą pobierania i asymilacji azotu przez rośliny.

Słowa kluczowe: pobieranie azotu, transport przez błonę, asymilacja azotu, rośliny mięsożerne, rośliny motylkowe

otrzymano: 18.04.2018; przyjęto: 27.05.2018; opublikowano: 31.08.2018



mgr Magdalena Zboińska: Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

Wprowadzenie

Azot jest składnikiem mineralnym potrzebnym roślinom w największych ilościach (Kraiser i wsp., 2011). Wchodzi on w skład aminokwasów, a więc peptydów i białek, oraz stanowi składnik organicznych zasad azotowych. Zasady te budują nukleotydy, które są nie tylko monomerami kwasów nukleinowych (RNA, DNA), lecz służą także przenoszeniu energii (ATP, GTP, elektronów i kationów wodorowych (NADH, NADPH, FADH₂) czy reszt acylowych (koenzym A). Ponadto azot jest składnikiem innych niezwykle istotnych dla komórki roślinnej związków, takich jak chlorofil, cytochromy, cytokininy niektóre witaminy. Azot zawiera także część metabolitów wtórnych: alkaloidy, betalainy, olejki gorczyczne czy glikozydy cyjanogenne (Czerwiński 1976; Kopcewicz i Lewak, 2007). Pierwiastek ten bierze więc udział w niemal wszystkich przemianach zachodzących w komórkach roślinnych.

Azot występuje w glebie w wielu formach, lecz większość z nich to złożone związki organiczne będące niedostępnym dla roślin źródłem azotu (Jones i wsp., 2005). Ponieważ korzenie są w stanie pobierać jedynie niewielkie cząsteczki rozpuszczone w roztworze glebowym, rośliny korzystają przede wszystkim z mineralnych form azotu: azotanów (Dechorgnat i wsp., 2011) i jonów amonowych (Yuan i wsp., 2007) oraz z prostych związków organicznych, czyli mocznika (Liu i wsp., 2003; Wang W-H i wsp., 2012), aminokwasów (Svennerstam i wsp., 2011) i ewentualnie oligopeptydów (Komarova i wsp., 2008; Hill i wsp., 2011). Nieliczne gatunki roślin przystosowały się do wzrostu na glebach szczególnie ubogich w azot, dzięki możliwości korzystania z alternatywnych źródeł tego pierwiastka. Są to rośliny mięsożerne (Krasuska i wsp., 2012) oraz te, które żyją w symbiozie z organizmami prokariotycznymi wiążącymi azot atmosferyczny (Prell i Poole, 2006; Oldroyd

i wsp., 2011). Celem niniejszej pracy jest przybliżenie czytelnikowi podstawowych informacji dotyczących pobierania i (w mniejszym stopniu) asymilacji azotu przez rośliny.

Dlaczego naukowcy są zainteresowani procesem pobierania i asymilacji azotu przez rośliny?

Niedostateczna ilość przyswajalnych form azotu w glebach uprawnych stanowi ogromne wyzwanie ekonomiczne i ekologiczne dla współczesnego rolnictwa. Ze względu na bardzo duże zapotrzebowanie roślin na azot, jego dostępność stanowi często główny czynnik limitujący wzrost i rozwój roślin (Elser i wsp., 2007; Kraiser i wsp., 2011), dlatego na pola uprawne corocznie wprowadza się ponad 110 milionów ton azotu (raport FAO 2017). Światowe, roczne zużycie nawozów azotowych zwiększyło się prawie 9-krotnie w ciągu ostatnich 50 lat i pochłania obecnie około 1% wykorzystywanej przez ludzi energii (McAllister i wsp., 2012). Niestety, w zależności od sposobu uprawy, uprawianego gatunku, warunków atmosferycznych czy aktywności mikroorganizmów glebowych od 50 do ponad 80% tej ogromnej ilości azotu dostarczanego na pola nie jest asymilowane przez rośliny, lecz trafia do hydrosfery lub zostaje przekształcone w materię organiczną przez mikroorganizmy glebowe (Smil, 2011; McAllister i wsp., 2012). Jak się szacuje, doprowadziło to do dwukrotnego zwiększenia ilości azotu krążącego w biosferze (Elser i wsp., 2007) i niesie za sobą długofalowe skutki dla środowiska, wśród których wymienia się powiększenie dziury ozonowej, przyspieszenie efektu cieplarnianego oraz zmniejszenie różnorodności biologicznej (Elser i wsp., 2007; Smil, 2011; Sutton i wsp., 2011; McAllister i wsp., 2012; Good 2018).

Walka z negatywnymi efektami stosowania nawozów azotowych jest niezwykle trudna i kosztowna.

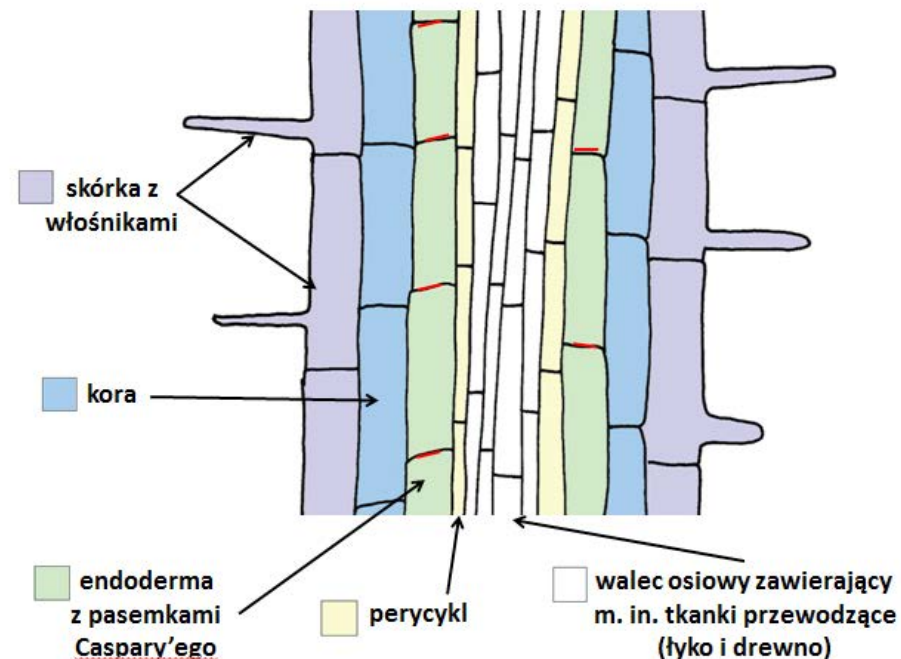
W 2011 roku koszty te w Unii Europejskiej szacowane były na 70 do 320 miliardów euro (Sutton i wsp., 2011). Co więcej, badania Sebito i wsp. (2013) z użyciem znakowanego izotopowo azotu pokazały, że w naszym klimacie skutki jednorazowej aplikacji standardowej ilości nawozu azotanowego na pole uprawne będą możliwe do zmierzenia jeszcze przez około 100 lat (Sebito i wsp., 2013). Jednocześnie szacuje się, że całkowite zaprzestanie stosowania nawozów azotowych doprowadziłoby do niemożności wykarmienia 45% populacji ludzkiej (Smil, 2011), a jej liczebność ciągle rośnie i w 2050 roku osiągnie prawdopodobnie około 9,1 miliarda (Blanco, 2011). Stwierdzono również, że tak znaczny przyrost naturalny będzie skutkował 70–110% wzrostem produkcji żywności i w zależności od dynamiki tych zmian (tj. zmian w powierzchni upraw oraz w wydajności nawożenia) pociągnie za sobą konieczność zwiększenia produkcji nawozów o 50 do 100 % w latach 2005–2050 (Blanco, 2011). Z drugiej strony, aż 85% azotu znajdującego się w zbożach jest konsumowane nie przez ludzi, lecz przez zwierzęta wykorzystywane do produkcji mleka, mięsa i jajek. Dlatego przejście Europejczyków na dietę wegańską zmniejszyłoby zużycie nawozów azotowych aż o 70% (Sutton i wsp., 2011).

Z tych powodów ostatnimi laty znacząco wzrosło zainteresowanie stworzeniem roślin uprawnych, lepiej przystosowanych do korzystania z dostępnego w glebie azotu (NUE, ang. *nitrogen use efficient*). Naukowcy intensywnie badają procesy pobierania, akumulacji, remobilizacji¹ i asymilacji związków azotu przez rośliny, poszukując genów, które można by poddać ukierunkowanym modyfikacjom genetycznym mającym na celu stworzenie roślin wydajniej pobierających azot z gleby lub o wydajniejszym metabolizmie azotowym.

1 Remobilizacja azotu – wycofywanie związków azotu ze starych, zamierających organów rośliny (przede wszystkim liści) i ich transport do młodych, rozwijających się organów.

Rys. 1. Przekrój podłużny przez korzeń

Czerwonym kolorem w sposób schematyczny zaznaczono pasemka Caspariego. Zmodyfikowano z: Näsholm i wsp., 2009.



Dzięki temu zmniejszeniu uległoby stosowanie nawozów, a tym samym zanieczyszczenie środowiska (Kant i wsp., 2011; McAllister i wsp., 2012; Wang Y-Y i wsp., 2012; Krapp, 2015; Gojon, 2017; Wang Y-Y i wsp., 2018).

W jaki sposób rośliny pobierają azot?

Pobieranie przez rośliny związków odżywczych z roztworu glebowego zachodzi dzięki obecności specjalnych białek transporterowych w błonach komórkowych komórek korzenia. Rośliny w tym procesie muszą konkurować o azot i inne pierwiastki między sobą oraz z mikroorganizmami glebowymi, których znaczna liczba bytuje w ryzosferze². Obszar ten obfituje bowiem

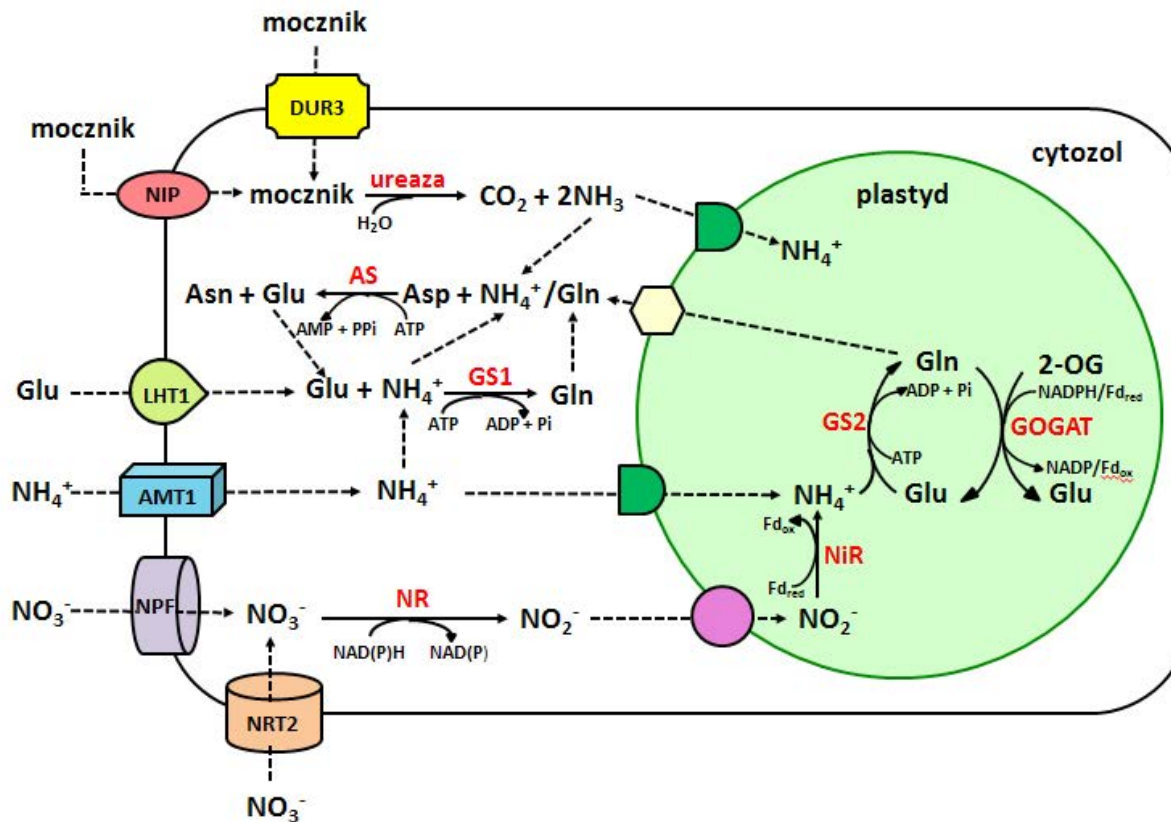
2 Ryzosfera – część gleby znajdująca się w bezpośrednim sąsiedztwie systemu korzeniowego i podlegająca jego wpływom.

w łatwo dostępne substancje pokarmowe, jakimi są obumierające fragmenty korzeni, a także wydzielane przez roślinę do gleby kwasy organiczne, polisacharydy i aminokwasy (Lambers, 2008). Aby jak najlepiej wykorzystać znajdujący się w glebie azot i plastycznie odpowiadać na zmiany zachodzące w środowisku rośliny wykształciły kilkanaście białek nośnikowych odpowiedzialnych za pobieranie z gleby różnych form tego pierwiastka. Transportery te charakteryzują się odmienną specyficznością substratów, powinowactwem do przenoszonych związków lub lokalizacją w tkankach korzenia (Miller i Cramer, 2004; Kraiser i wsp., 2011; Nacry i wsp., 2013).

Jony i proste cząsteczki organiczne są pobierane bezpośrednio z ryzosfery przez komórki skórki, w tym komórki włosnikowe bądź wnikają wraz z wodą szla-

kiem apoplastycznym (wzdłuż ścian komórkowych i przestrzeni międzykomórkowych) do głębiej położonych tkanek (kory, endodermy) (Rys. 1). Tam są pobierane do wnętrza komórek przez odpowiednie białka transporterowe. Ponieważ w ścianach komórkowych endodermy obecne są zgrubienia przesycone posiadającymi hydrofobowy charakter suberyną i ligninami (tzw. pasemka Caspary'ego), dalszy transport wody wraz z rozpuszczonymi w niej substancjami szlakiem apoplastycznym nie jest możliwy. Dlatego endoderma jest najgłębiej położoną tkanką korzenia, która może brać udział w pobieraniu związków azotu z roztworu glebowego (Tegeđer 2014; Krapp 2015). Jak wspomniano we Wprowadzeniu, do związków tych należą: jony amonowe, azotany, mocznik, aminokwasy oraz oligopeptydy.

Prócz zdolności do pobierania odmiennych form azotu i zróżnicowanej lokalizacji w korzeniu, białka transporterowe posiadają różne powinowactwo do przenoszonych substancji. Jest to istotne, gdyż zawartość związków azotu w glebie może wahać się silnie w krótkim okresie czasu lub na niewielkiej przestrzeni. Widać to szczególnie wyraźnie na przykładzie azotanów, których stężenie w roztworze glebowym może osiągać wartości od kilku μM do ponad 70 mM na glebach nawożonych (Dechorgnat i wsp., 2011; Nacry i wsp., 2013). W przypadku jonów azotanowych badania fizjologiczne wykazały istnienie dwóch systemów transportu: systemu wysokiego powinowactwa HATS (ang. *high-affinity transport system*) oraz systemu niskiego powinowactwa LATS (ang. *low-affinity transport system*). Transportery azotanów należące do systemu HATS odpowiadają za transport jonów przy ich niskich, mikromolowych stężeniach w roztworze glebowym. Ich właściwe funkcjonowanie jest szczególnie istotne dla przeżycia roślin w czasie niedoboru azotu w glebie. Transportery te działają jednak bardzo wolno i szybko ulegają wysyceniu (Crawford i Glass, 1998).



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie procesów pobierania i asymilacji azotu w komórce roślinnej

Przerwanymi strzałkami oznaczono procesy transportu, ciągłymi przemiany enzymatyczne. Czerwone napisy odnoszą się do nazw enzymów. Użycie znaku „/” oznacza, że dany enzym może wykorzystywać do reakcji dwa różne substraty (w przypadku AS) lub też istnieją dwie izoformy enzymu, które korzystają z odmiennych substratów (w przypadku GOGAT). Użyte skróty: NR – reduktaza azotanowa, NiR – reduktaza azotynowa, GS1 i GS2 – izoformy syntetazy glutaminowej, GOGAT – syntaza glutaminianowa, AS – syntetaza asparaginowa. Asn – asparagina, Asp – kwas asparaginowy, Gln – glutamina, Glu – kwas glutaminowy, 2-OG – 2-oksoglutaran, Fd_{red} – ferredoksyna zredukowana, Fd_{ox} – ferredoksyna utleniona.

Opracowanie własne na podstawie publikacji cytowanych w tekście.

Gdy stężenie jonów azotanowych w glebie przekroczy 1 mM, istotny staje się działający z dużą wydajnością system transportu niskiego powinowactwa. Dodatkowo, w obu systemach można odnaleźć białka, których

geny ulegają wzmożonej transkrypcji w odpowiedzi na obecność azotanów (czyli są indukowane azotanami – białka iHATS oraz iLATS, ang. *inducible*) oraz takie, których ekspresja jest od ich obecności niezależna (tzw.

system konstytutywny cHATS i cLATS, ang. *constitutive*) (Crawford i Glass, 1998; Nacry i wsp., 2013). Podobnie, dwa systemy transportu opisano w przypadku jonów amonowych (Yuan i wsp., 2007).

Asymilacja związków azotu w komórkach roślinnych

Związki azotu pobrane przez komórki korzenia, w zależności od ich rodzaju, gatunku rośliny oraz jej zapotrzebowania metabolicznego, mogą zostać zmagazynowane w niezmienionej formie w wakuolach lub ulec asymilacji. Oba procesy zachodzą mogą zarówno w korzeniu, jak i w częściach nadziemnych rośliny, do których azot transportowany jest przede wszystkim ksylemem (Crawford i Glass, 1998). Akumulowanie w wakuoli azotu, głównie w formie NO_3^- , jest nie tylko gwarancją stałego dostępu do tego pierwiastka w przypadku jego chwilowego niedoboru w środowisku, lecz pełni również ważną funkcję w utrzymaniu turgoru komórki oraz w regulacji cytoplazmatycznego stężenia tych jonów, które powinno pozostać stałe (Wojtaszek i wsp., 2008). Asymilacja azotu to natomiast proces jego przyswajania. Polega on na wytworzeniu z prostych form azotu złożonych cząsteczek organicznych, niezbędnych do funkcjonowania ustroju, czyli na włączeniu pobranego azotu w struktury komórkowe (Baturó, 2005).

Asymilacja jonów azotanowych jest procesem kilkuetapowym, który przebiega w dwóch przedziałach komórkowych: cytoplazmie i plastydach. Pobrane do wnętrza komórki azotany (jony azotanowe V) są wprawdzie przekształcane do azotynów (jonów azotanowych III) przez obecną w cytoplazmie reduktazę azotanową, a powstałe w tym procesie toksyczne dla komórki jony NO_2^- transportowane są do plastydów. W tym organelum dzięki działaniu reduktazy azotynowej jony NO_2^-

są redukowane do jonów amonowych. Ostatni etap procesu polega na włączeniu NH_4^+ w strukturę szkieletów węglowych i wytworzeniu aminokwasów w tzw. cyklu GS-GOGAT (syntetazy glutaminowej-syntazy glutaminianowej) (Masclaux-Daubresse i wsp., 2010; Krapp, 2015) (Rys. 2.). Jak widać, ten cykl przemian łączy się ze szlakiem asymilacji innych przyswajanych przez rośliny form azotu glebowego, tj. jonów amonowych i aminokwasów, ale także mocznika. Ten ostatni związek po pobraniu do komórek hydrolizowany jest bowiem w cytoplazmie przez ureazę do dwutlenku węgla i amoniaku (Witte, 2011). Powstałe w tym procesie jony amonowe mogą zostać przetransportowane do plastydów i włączone w cykl GS-GOGAT lub zostać przekształcone do glutaminy przez cytoplazmatyczną izoformę³ syntetazy glutaminowej (GS1), a następnie do asparaginy i kwasu glutaminowego dzięki syntetazie asparaginowej (Witte, 2011; Krapp, 2015; Pinton i wsp., 2016) (Rys. 2.).

Pobieranie związków azotu dostępnych w roztworach glebowych

Mineralne formy azotu

Azotany i jony amonowe stanowią podstawowe źródło azotu glebowego. Ich stężenie w roztworach glebowych zależy od równowagi pomiędzy procesami mineralizacji, nityfikacji i denityfikacji, prowadzonymi przez mikroorganizmy glebowe i silnie uzależnionymi od warunków środowiska: pH, natlenienia, dostępności źródeł węgla, temperatury (Lambers i wsp., 2008). Mineralizacja to dekompozycja łatwo rozkładających się związków organicznych do prostych związków nie-

³ Izofomy enzymu (izoenzymy) – różne postacie tego samego enzymu, katalizujące tę samą reakcję, lecz różniące się właściwościami fizykochemicznymi, np. strukturą lub powinowactwem do substratu. Izoenzymy są kodowane przez odrębne geny, które często ulegają ekspresji w różnych tkankach organizmu.

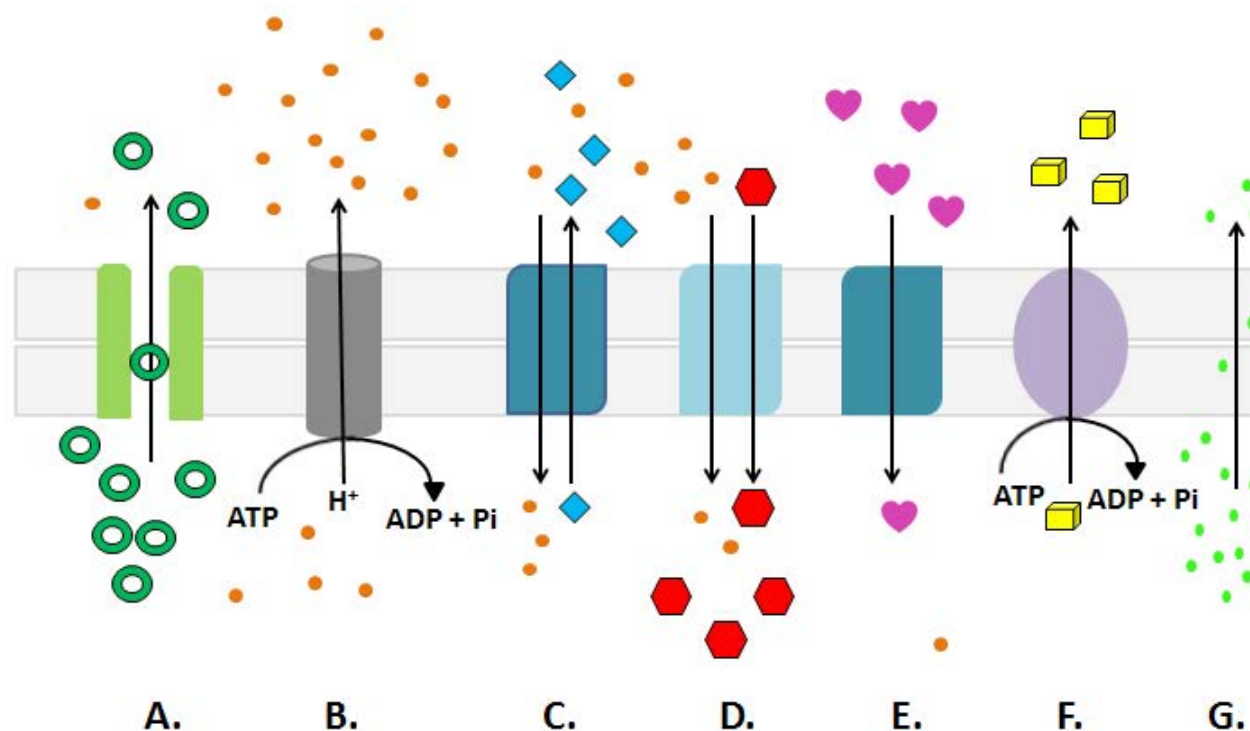
organicznych, takich jak dwutlenek węgla, woda, siarkowódór i amoniak (Czerwiński, 1976). W glebie jest ona prowadzona głównie przez grzyby i promieniowce (Błaszczuk, 2010), których aktywność jest stosunkowo stabilna w zmiennych warunkach środowiska (Miller i Cramer, 2004). Uwolnione w procesie mineralizacji jony amonowe mogą zostać utlenione do azotanów przez bakterie nityfikacyjne. Proces ten jest dwuetapowy (najpierw powstają jony azotanowe III), które utleniane są do azotanów V przez inną grupę bakterii, a oba etapy są bardzo czułe na panujące w glebie warunki: wymagają neutralnego pH, dobrego natlenienia gleby, a jednocześnie odpowiedniej jej wilgotności (Paul i Clark, 2000).

Dlatego, w przypadku gleb uprawnych, które z reguły są wilgotne, o pH zbliżonym do obojętnego i dobrze natlenione, dominującą formą azotu i głównym jego źródłem dla roślin są azotany. Natomiast na glebach kwaśnych, np. leśnych nityfikacja zostanie zahamowana i najpowszechniejszą formę stanowić będzie jon amonowy (Miller i Cramer, 2004). To samo dotyczy gleb zasadowych (Lambers i wsp., 2008) oraz podmokłych pól uprawnych, na których uprawiany jest np. ryż (Britto i Kronzucker, 2002). Ponadto bakterie nityfikacyjne są bardziej wrażliwe na niską temperaturę i suszę niż mikroorganizmy prowadzące mineralizację resztek organicznych, stąd przewaga NH_4^+ na glebach suchych lub chłodnych, ale natlenionych (Błaszczuk, 2010). Jeśli jednak w środowisku obecne są obydwie formy azotu mineralnego, to jak wykazały doświadczenia, wiele gatunków roślin najpierw wykorzystuje jony NH_4^+ (Miller i Cramer, 2004).

Pobieranie znacznych ilości kationów amonowych, gdy są one dostępne oraz ich preferencyjne wykorzystywanie w stosunku do azotanów wcale nie przemawia na korzyść tych pierwszych. Niektórzy autorzy porównują tę preferencję roślin do ujemnych skutków objadania się

przez dzieci słodyczami (Miller i Cramer, 2004). Jony amonowe w większym stężeniu są bowiem toksyczne, a większość roślin uprawnych (z rodziny psiankowatych, dyniowatych, kapustowatych, bobowatych czy różowatych) należy do gatunków szczególnie wrażliwych na ich działanie. (Britto i Kronzucker, 2002). Nawet bardziej odporne gatunki przy wysokich stężeniach NH_4^+ wykazują symptomy jego toksyczności: zahamowanie wzrostu, chlorozę, więdnienie. Wydaje się, że jony amonowe nie są toksyczne same w sobie, lecz generują procesy niekorzystne dla metabolizmu roślin: zakwaszenie ryzosfery, obniżenie pH cytoplazmy komórek korzenia oraz zaburzenie równowagi jonowej rośliny (Britto i Kronzucker, 2002; Miller i Cramer, 2004).

Z drugiej strony, większość roślin uprawnych rozwija się najlepiej na glebach zawierających zarówno azotany, jak i kationy amonowe. Do optymalnego wzrostu pomidorów stosunek azotanów do kationów amonowych w glebie powinien wynosić 3:1, a dopiero przy wyższych stężeniach NH_4^+ w stosunku do NO_3^- rośliny charakteryzują się osłabionym wzrostem (Crawford i Glass, 1998). Bardzo wysokie stężenia azotanów w podłożu również wpływają negatywnie na rośliny. Dla przykładu, kukurydza uprawiana przez 45 dni przy stężeniu NO_3^- większym niż 5 mM charakteryzuje się zmniejszoną masą i powierzchnią liści, a zwiększonym stężeniem cytokinin i substancji będącej prekursorem stresowego hormonu etylenu (Saiz-Fernández i wsp., 2015). Podsumowując powyższe, dla optymalnego wzrostu roślin najważniejsze jest zachowanie równowagi pomiędzy zawartością azotanów i jonów amonowych w podłożu. Ponadto, zgodnie z prawem Liebiga, zarówno zbyt niskie jak i zbyt wysokie stężenie któregośkolwiek z tych jonów będzie wpływać na rośliny negatywnie, z powodu niedostatecznej ilości azotu w podłożu lub też toksycznego efektu zbyt wysokich stężeń NO_3^- i NH_4^+ .



Rys. 3. Mechanizmy transportu przez błony biologiczne

Transport substancji przez błony może być bierny (A., E. i G.) lub zachodzić z nakładem energii – transport aktywny (B., C., D. i F.). Transport bierny substancji dotyczy przemieszczania się cząsteczek zgodnie z gradientem ich stężenia w poprzek błony. Do tego typu transportu należy dyfuzja prosta, czyli samoistne przemieszczanie się substancji przez błonę (G.) oraz tzw. dyfuzja ułatwiona, w którą zaangażowane są białka błonowe o charakterze kanałów (A.) lub przenośników (permeaz, E.). Permeazy wiążą substancje po jednej stronie błony, a następnie uwalniają je po stronie przeciwnej (uniport). Do transporterów aktywnych zalicza się transportery pierwotne napędzane ATP (B. i F.), pirofosforanem (PP_i) lub światłem (te ostatnie występują u bakterii) oraz transportery wtórne (C. i D.). Przykładem transporterów pierwotnych są pompy protonowe, czyli białka przenoszące protony - jony H^+ (przedstawione na rysunku jako małe, pomarańczowe kółka) w poprzek błony wbrew gradientowi stężenia tych jonów (B.). W wyniku ich działania dochodzi do asymetrycznego rozmieszczenia jonów wodorowych po obu stronach błony, czyli generowany jest gradient potencjału elektrochemicznego protonów. Jony H^+ powracając przez nośniki błonowe do komórki zgodnie z gradientem stężenia, napędzają transport innych substancji przez błonę (C. i D.). Ten sposób transportu klasyfikowany jest jako transport aktywny wtórny i może mieć on charakter symportu (D.) lub antyportu (C.). W pierwszym przypadku zarówno proton, jak i transportowana substancja przemieszczają się w tym samym kierunku (D.), natomiast antyport polega na dyfuzji H^+ i odwrotnie ukierunkowanym przenoszeniu jonów lub cząsteczek przez błonę (C.). W komórkach zwierzęcych siłą napędową transportu wtórnego stanowi gradient elektrochemiczny jonów Na^+ .

Opracowanie własne.

Zakres tolerancji poszczególnych gatunków będzie się jednak między sobą różnił.

Pobieranie azotanów

Białka błonowe odpowiedzialne za pobieranie azotanów ze środowiska należą do białek symporterowych. Oznacza to, że transportują one do wnętrza komórki jony NO_3^- wspólnie z protonem (jonem H^+ , Rys. 3C.), a siła protonomotoryczna (gradient elektrochemiczny protonów)⁴ potrzebna do tego procesu generowana jest przez plazmolemową H^+ -ATPazę (Rys. 3B.) (Tsay i wsp., 2007). Transportery azotanowe obecne w błonie komórkowej korzeni należą do dwóch rodzin: rodziny NRT2 (ang. *nitrate transporter 2*) oraz rodziny NPF (ang. *nitrate transporter 1 (NRT1)/peptide transporter (PTR) family*) (Rys. 4.) (Léran i wsp., 2014; Wang Y-Y i wsp., 2018).

Białka NRT2 to transportery wysokiego powinowactwa do azotanów. Najprawdopodobniej w większości przypadków występują one w formie heterotetramerów, zawierających obok dwóch monomerów NRT2 dwa monomery NAR2 (Kotur i wsp., 2012; Kotur i Glass, 2015). Białko AtNAR2.1 (ang. *nitrate assimilation related*, nazywane także AtNRT3.1) było intensywnie badane u modelowej rośliny rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*). Stwierdzono, że nie uczestniczy ono bezpośrednio w transporcie azotanów, ale wydaje się niezbędne do wbudowania białek AtNRT2 w błonę komórkową, a możliwe także, że stabilizuje już obecne z błonie cząsteczki transporterów (Laugier i wsp., 2012). Z tego powodu, u mutantów *Arabidopsis* z niefunkcyjnym genem *NAR2.1* pobieranie azotanów do komórek korzenia, przy ich niskim stężeniu w środowisku, praktycznie nie zachodzi (Okamoto i wsp., 2006).

4 Siła protonomotoryczna (inaczej gradient elektrochemiczny protonów) – różnica stężeń jonów H^+ (liczby jonów i ich ładunków) po obu stronach błony biologicznej.

U rzodkiewnika w pobieranie NO_3^- z gleby zaangażowane są cztery białka NRT2: AtNRT2.1, AtNRT2.2, AtNRT2.4 i AtNRT2.5 (Rys. 4.) (Wang Y-Y i wsp., 2012; Lezhneva i wsp., 2014), ale ich udział w tym procesie nie jest równocenny. Transportery AtNRT2.1 i AtNRT2.2 są elementami systemu indukowanego obecnością azotanów (iHATS), choć badania sugerują, że odgrywają one także pewną rolę w systemie cHATS (Orsel i wsp., 2006; Kotur i Glass, 2015). W przypadku mutacji genu *NRT2.1* dochodzi do zmniejszenia pobierania NO_3^- przez roślinę aż o 72%, podczas gdy mutanty *atnrt2.2* charakteryzuje 19% redukcja, a u roślin z jednoczesną mutacją obu genów aktywność systemu iHATS osiąga jedynie 20% kontroli (Li i wsp., 2007; patrz także niżej). Białka AtNRT2.4 i AtNRT2.5 należą natomiast do systemu konstytutywnego i charakteryzują się większym powinowactwem do azotanów niż dwa wcześniej wymienione transportery (Kiba 2012; Kotur i Glass, 2015; Lezhneva i wsp., 2014). Oznacza to, że w przypadku długotrwałego niskiego stężenia azotanów w środowisku za jego dostarczanie do rośliny odpowiadają przede wszystkim transportery AtNRT2.4 i AtNRT2.5, których geny są silnie stymulowane głodzeniem azotowym i hamowane obecnością azotanów bądź kationów amonowych. Można więc przypuszczać, że AtNRT2.4 i AtNRT2.5 umożliwiają roślinie szybkie pobranie azotanów z roztworu glebowego w przypadku ich długotrwałego braku w środowisku, a jony, które zostaną tą drogą przetransportowane do komórek korzeni rośliny wpłyną na wzrost ekspresji bardziej wydajnych, ale cechujących się mniejszym powinowactwem do NO_3^- białek iHATS (Kiba i wsp., 2012; Kotur i Glass, 2015; Lezhneva i wsp., 2014). Współdziałanie wszystkich wymienionych białek AtNRT2 jest niezwykle istotne dla adaptacji rośliny do zmiennych warunków środowiska. Jak pokazują badania, zmutowanie genów *AtNRT2.1* i *AtNRT2.2* przyczynia się do zmniejszenia masy ro-

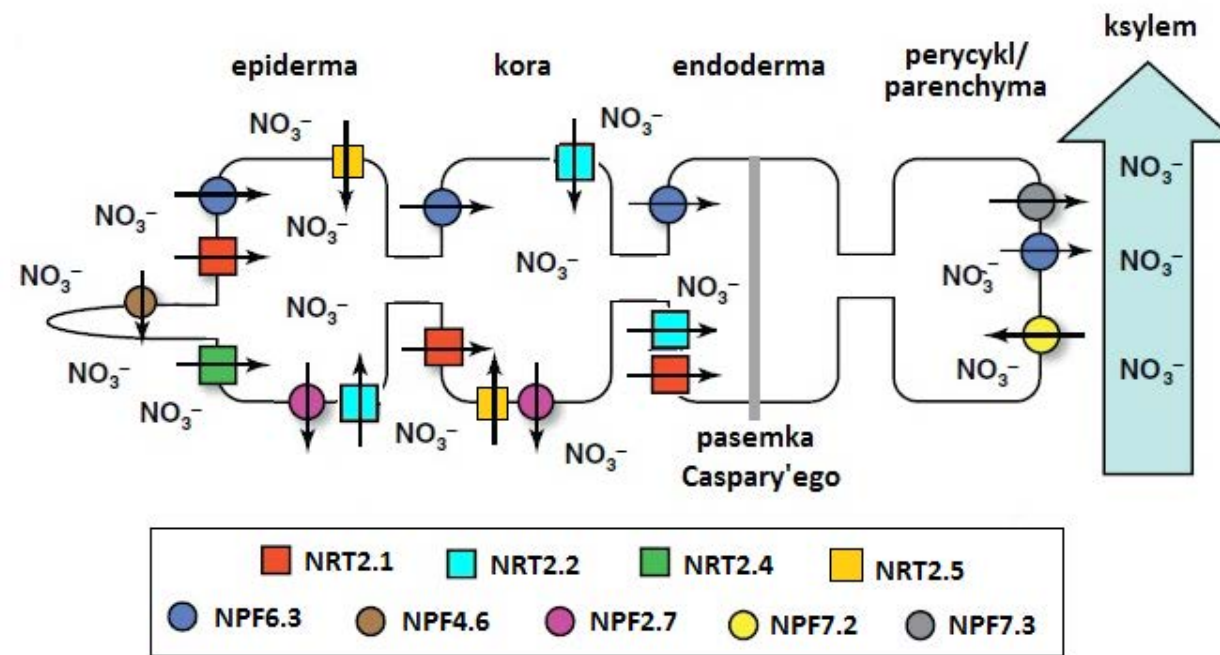
ślin (uprawianych przez miesiąc przy 0,5 mM stężeniu azotanów) aż o 80%; potrójny mutant *nrt2.1-nrt2.2-nrt2.5* charakteryzuje się masą wynoszącą 10% masy roślin kontrolnych, natomiast zmutowanie wszystkich czterech genów *AtNRT2* pociąga za sobą dalszą redukcję masy roślin, które osiągają jedynie 2,2% masy roślin typu dzikiego (Lezhneva i wsp., 2014). Do transporterów HATS odpowiedzialnych za pobieranie azotanów z gleby, prócz białek NRT2, należy białko AtNPF6.3 (dawniej AtNRT1.1 lub CHL1 od ang. *chlorate resistance mutant 1*), aczkolwiek jego udział w tym procesie nie jest tak znaczny jak AtNRT2.1 i AtNRT2.2 (Glass i Kotur, 2013). Transporter ten jest o tyle nietypowy, że jego powinowactwo do jonów NO_3^- uzależnione jest od modyfikacji posttranslacyjnej, a dokładniej od fosforylacji treoniny w pozycji 101. Km (stała Michaelisa) dla białka pozbawionego reszty fosforanowej wynosi 4 mM, a dla formy ufosforylowanej 50 μM . Fosforylacja zachodzi przy niskim zewnętrznym stężeniu jonów azotanowych, przy wysokim stężeniu następuje proces odwrotny (Tsay i wsp., 2007). Drugim białkiem *Arabidopsis* należącym do systemu LATS jest AtNPF4.6 (wcześniej AtNRT1.2). NPF6.3 występuje w ryzodermie oraz w komórkach kory i endodermy, a ekspresja jego genu podlega indukcji azotanami, choć w przypadku długotrwałego traktowania NO_3^- dochodzi do spadku ilości transkryptu. Ekspresja *NPF4.6* jest natomiast konstytutywna i zachodzi w komórkach skórki korzenia (Rys. 4.). Stąd AtNPF6.3 klasyfikowany jest jako transporter o podwójnym powinowactwie i element dwóch systemów: iHATS i iLATS, natomiast białko AtNPF4.6 do systemu cLATS (Tsay i wsp., 2007; Wang Y-Y i wsp., 2012).

Jak wspomniano we wcześniejszej części pracy, pobrane przez korzenie jony azotanowe mogą zostać zasymilowane, zmagazynowane w wakuoli lub przetransportowane do innych organów rośliny. Za daleki

transport azotanów i ich dalszą dystrybucję w roślinie odpowiadają transportery z rodziny NPF, z których niektóre przedstawiono na Rysunku 4. Ponadto, w niektórych sytuacjach, zwłaszcza w przypadku stresów środowiskowych, pobrane przez roślinę jony mogą zostać z powrotem wydalone do apoplastu. W procesie tym u rzodkiewnika pośredniczy białko AtNPF2.7 (wcześniej NAXT1 od ang. *nitrate excretion transporter 1*) zlokalizowane w błonie komórkowej komórek epidermy i kory korzenia (Kollist i wsp., 2011). Badania sugerują także, że za wypływ azotanów z komórek może odpowiadać NPF6.3, który jest zdolny do dwukierunkowego transportu NO_3^- . Z tego powodu uważa się, że białko to, wspólnie z transporterem AtNPF7.3 (AtNRT1.5) może być odpowiedzialne za załadunek ksylemu. Jednak, o ile transport NO_3^- przez to białko do wnętrza komórek jest uzależniony od siły protonomotorycznej, to transport azotanów poza komórkę, czyli np. do naczyń, przebiega na drodze niezależnej od gradientu pH w poprzek błony (Léran i wsp., 2013). Rozmieszczenie plazmolemowych białek transportujących azotany w korzeniu rzodkiewnika przedstawiono na Rysunku 4.

Jony amonowe

Tak jak w przypadku azotanów, rośliny posiadają dwa systemy umożliwiające pobieranie jonów amonowych z roztworu glebowego: wysokiego i niskiego powinowactwa do kationu. Pierwszy system opowiadający za absorpcję jonów amonowych z gleby przy niskim stężeniu stanowią transportery z rodziny AMT/MEP/Rh (ang. *ammonium transporter/ methyloammonium permease/ rhesus*). W genomie *A. thaliana* wykryto pięciu przedstawicieli podrodziny AMT (białka AtAMT1.1 – AtAMT1.5) oraz przedstawiciela podrodziny MEP - AtAMT2.1 (Rys. 5). Białka AMT działają jako uniportery NH_4^+ (co przedstawiono schematycznie na Rys. 3E) lub kotransportery NH_3/H^+ , czyli transportują do ko-



Rys. 4. Rozmieszczenie plazmolemowych białek transportujących azotany w korzeniu *Arabidopsis thaliana*

Na rysunku przedstawiono białka odpowiedzialne za pobieranie azotanów z gleby, wypływ NO_3^- do środowiska oraz za załadunek ksylemu i jego rozładunek. Transportery NRT2.1, NRT2.2, NRT2.4 i NRT2.5 należą do białek wysokiego powinowactwa do azotanów, NPF6.3 charakteryzuje się zmiennym powinowactwem, a pozostałe białka są elementami systemu LATS.

Zmodyfikowano z: Wang Y-Y i wsp., 2012.

mórki jony NH_4^+ lub jednocześnie amoniak wspólnie z protonem (Rys. 3C). AtAMT2.1 jest natomiast białkiem kanałowym (Rys. 3A). Z wymienionych białek jedynie gen transportera AMT1.4 nie ulega ekspresji w systemie korzeniowym, natomiast w przypadku AtAMT2.1, mimo obecności białka w korzeniach, nie stwierdzono jego udziału w pobieraniu jonów amonowych przez roślinę (Yuan i wsp., 2007).

Za bezpośrednie pobieranie jonów NH_4^+ z gleby odpowiadają białka AtAMT1.1, AtAMT1.3 oraz AtAMT1.5. Wszystkie one lokują się błonie komórkowej

komórek włósnikowych i są indukowane w warunkach deficytu jonów amonowych. Poza włósnikami ekspresję genów *AtAMT1.1* i *AtAMT1.3* odnotowano również w komórkach kory pierwotnej korzeni i to te dwa białka wydają się mieć największy udział w pobieraniu kationów amonowych z gleby. Każde z nich odpowiadają za pobieranie około 30-35% jonów NH_4^+ , podczas gdy transport zależny od *AtAMT1.5* to jedynie 10% jonów amonowych pozyskanych przez roślinę. Transporter ten cechuje się jednak wyjątkowo wysokim powinowactwem ($K_m = 4,5 \mu\text{M}$). Funkcją białka *AtAMT1.2* zlo-

kalizowanego w błonie komórek endodermy oraz komórek kory jest najprawdopodobniej kierowanie jonów amonowych znajdujących się w apoplacie (w ścianach komórkowych) na szlak symplastyczny (biegnący przez żywe elementy komórek) oraz asymilacja jonów amonowych powstających jako produkt uboczny metabolizmu w starszych tkankach korzenia (Yuan i wsp., 2007) (Rys. 5).

Przy wysokim stężeniu kationów amonowych w glebie za ich pobieranie odpowiada system o niskim powinowactwie, ale wysokiej wydajności, oparty o białka kanałowe. Natura tych białek nie jest poznana. Niektórzy badacze uważają, że są to akwaporyny przewodzące NH_4^+ i/lub NH_3 lub specyficzne kanały potasowe przepuszczalne także dla jonów amonowych (Yuan i wsp., 2007). Inni (Szczerba i wsp. 2008), postulują udział w tym procesie nieselektywnych kanałów kationowych oraz niezidentyfikowanych jeszcze kanałów specyficznych dla NH_4^+ .

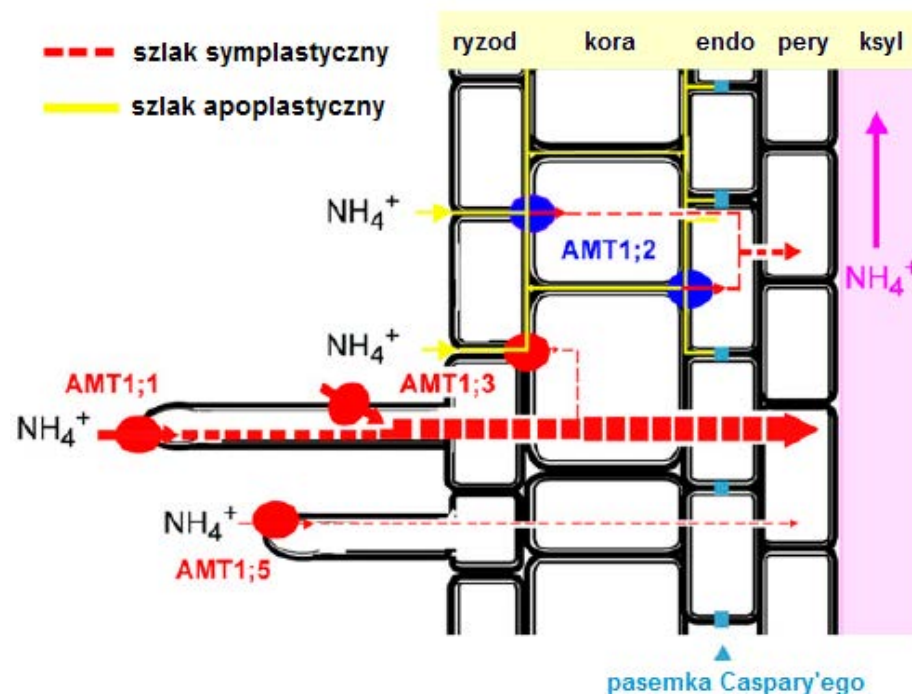
Istotną różnicą pomiędzy systemami wysokiego i niskiego powinowactwa dla jonów amonowych jest sposób regulacji. Transkrypcja genów kodujących transportery AMT jest hamowana przez glutaminę, pierwszy produkt asymilacji amonu (Yuan i wsp., 2007). Także jony amonowe mogą bezpośrednio inaktywować białko AtAMT1.1 poprzez indukcję jego fosforylacji (Lanquar i wsp., 2009). W przypadku białek systemu LATS nie wykazano negatywnej regulacji (Yuan i wsp., 2007; Szczerba i wsp., 2008).

Organiczne formy azotu

Kwasy humusowe, białka, aminokwasy i inne związki organiczne stanowią ponad 90% azotu obecnego w glebie. Znaczna większość tej puli jest jednak niedostępna dla roślin. Wynika to ze zbyt złożonej struktury tych związków lub ich adsorpcji na koloidach glebowych, a stąd niemożności ich pobrania przez system

Rys. 5. Lokalizacja i udział białek AMT1 w transporcie jonów amonowych w korzeniu rzodkiewnika

Użyte skróty: ryzod – ryzoderma, endo – endoderma, pery – perycykl, ksyl – ksylem. Zmodyfikowano z: Yuan i wsp., 2007.



korzeniowy. Z drugiej strony, w wielu ekosystemach charakteryzujących się niską temperaturą, zwłaszcza na glebach kwaśnych, poziom mineralizacji związków organicznych jest za niski, aby mógł zapewnić roślinom przeżycie bez bezpośredniego wykorzystania organicznych form azotu (Jones i wsp., 2005). Ponadto wszystkie zbadane do tej pory rośliny, w tym gatunki uprawne, wykazały zdolność do poboru wolnych aminokwasów z roztworu glebowego (Miller i Cramer, 2004; Näsholm i wsp., 2009), a dla kilku z nich zdołano opisać białka przenośnikowe zaangażowane w ten proces (Tegeer i Rentsch, 2010). Dlatego przyjmuje się, że organiczne związki azotu mogą być pobierane i wykorzystywane przez rośliny, ale nie stanowią dla nich podstawowego źródła tego pierwiastka.

Jedynym organicznym związkiem azotu stosowanym jako nawóz jest mocznik. Jego stężenie w glebach nawożonych może wynosić nawet $70 \mu\text{M}$, a w miejscach nienawożonych jest około 30-krotnie mniejsze (Kojima i wsp., 2006). Mocznik ulega w glebie szybkiej degradacji dzięki ureazom wydzielanym przez bakterie glebowe, a w wyniku tego rozkładu uwalniane są jony NH_4^+ stanowiące, jak już wspomniano, jedno z głównych źródeł azotu dla roślin. Rośliny są również w stanie pobierać mocznik bezpośrednio z gleby i metabolizować go w komórkach dzięki własnej, endogennej ureazie (Witte i wsp., 2011; Yang i wsp., 2015). Do białek odpowiedzialnych za pobieranie mocznika z roztworu glebowego należą transportery wysokiego powinowactwa DUR3 oraz akwagliceroporyny NIP (ang. NOD26-like

intrinsic protein) (Liu i wsp., 2003, Kojima i wsp. 2007; Yang i wsp., 2015; Zhang i wsp., 2016) (Rys. 2.). Roślinne transportery DUR są białkami symporterowymi, których działanie napędzane jest siłą protonomotoryczną (Liu i wsp. 2003), białka NIP są natomiast białkami kanałowymi (Zhang i wsp. 2016).

Transportery odpowiedzialne za pobieranie aminokwasów z gleby, zostały dobrze scharakteryzowane u rzodkiewnika, u którego zidentyfikowano kilka białek zaangażowanych w ten proces. Należą do nich transportery CAT6 i CAT8 (ang. *cationic amino acid transporter*), AAP1 i AAP5 (ang. *amino acid permease*), LTH1 i LHT6 (ang. *lysine-histidine-like transporter*) oraz ProT2 (ang. *proline transporter*) (Rentsch i wsp., 2007, Tegeder i Rentsch, 2010, Yang i wsp., 2010, Perchlik i wsp., 2014). AAP1 może przenosić wszystkie aminokwasy białkowe oprócz lizyny, argininy i kwasu asparaginowego (Lee i wsp., 2007), ale działa przy wysokich, rzadko spotykanych w roztworze glebowym stężeniach aminokwasów (Svennerstam i wsp., 2011). Przy niskich stężeniach substratu zastępują go cechujące się wysokim powinowactwem do aminokwasów neutralnych i kwaśnych transportery LHT1 i LHT4 (Svennerstam i wsp., 2007; Svennerstam i wsp., 2011; Perchlik i wsp., 2014), a także oba białka CAT specyficzne wobec glutaminy (Hammes i wsp., 2006, Yang i wsp., 2010). AAP5 jest natomiast transporterem aminokwasów zasadowych: argininy i lizyny (Svennerstam i wsp., 2008; Svennerstam i wsp., 2011), a ProT2 proliny (Lehmann i wsp., 2011). Oprócz transporterów aminokwasowych w tkankach korzenia rzodkiewnika wykryto również transporter dipeptydów - AtPTR1 (Dietrich i wsp., 2004). Aminokwasy transportowane są pomiędzy organami rośliny zarówno strukturami ksylemu, jak i floemu (Tegeder, 2014).

6. Alternatywne źródła azotu

6.1. Rośliny mięsożerne

Rośliny mięsożerne to specyficzna grupa roślin, które w procesie ewolucji wykształciły liście pułapkowe umożliwiające przywabianie i łapanie drobnych zwierząt, a następnie ich trawienie i wchłanianie powstałych w wyniku rozkładu związków. Jest to adaptacja umożliwiająca im wzrost w środowiskach szczególnie ubogich w substancje mineralne, gdyż tą drogą gatunki mięsożerne uzupełniają niedobory azotu oraz innych makro- i mikroelementów. Do gatunków mięsożernih należą nasze rodzime rosiczki i tłustosze, znane wszystkim amerykańskie muchołówki oraz kapturnice (Rys. 6.), azjatyckie dzbaneczniki czy występujące w wodach słodkich całego świata pływacze (Johnson, 2005; Adamc, 2011; Król i wsp., 2012).

Rozkład substancji organicznych zawartych w ciele ofiary, a więc uwolnienie zawartego w niej azotu następuje dzięki wydzielaniu przez roślinę do wnętrza pułapki enzymów trawiennych, przede wszystkim proteaz. Uwolnione w procesie rozkładu związki są następnie wchłaniane przez liście (Eilenberg i Zilberstein, 2008). Zarówno wydzielanie enzymów, jak i wchłanianie substancji zachodzi przez specjalne gruczoły, gdyż stanowią one jedyne miejsca w liściach pułapkowych, które nie są pokryte hydrofobową kutikulą (Adlasing i wsp., 2012). W gruczołach dzbanecznika stwierdzono obecność transporterów jonów amonowych AMT, natomiast transportery aminokwasów z rodziny AAP oraz transporter peptydów z rodziny NRT1 (PTR) odnaleziono dopiero w wewnętrznych elementach liścia pułapkowego (Schulze i wsp., 1999). Dlatego sugeruje się, że przynajmniej u niektórych gatunków białka i peptydy dostają się do wnętrza komórek gruczołów na



Rys. 6. Kapturnica żółta

Gatunek ten należy do roślin mięsożernih i wytwarza pułapki w kształcie długich lejków, do których wpadają zwabione nektarem owady.

drodze endocytozy, gdzie ulegają trawieniu w fagolizosomach (Adlasing i wsp., 2012). Z drugiej strony pobieranie aminokwasów bezpośrednio z pułapki opisano np. u kapturnicy purpurowej (Karagatzides i wsp., 2009). W trawieniu zwierząt, rośliny mięsożerne są niekiedy wspomagane przez symbiotyczne bakterie zamieszkujące pułapki. U niektórych gatunków stwierdzono także obecność gatunków wiążących azot atmosferyczny (Adlasing i wsp., 2011). Adaptacje umożliwiające roślinom

mięsożernym łapanie i trawienie zwierząt, a także inne drogi pozyskiwania przez nie azotu dzięki istnieniu liści pułapkowych opisano szczegółowo w pracy opublikowanej w numerze 2/2017 Edukacji Biologicznej i Środowiskowej (Zboińska, 2017).

Symbioza z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny

Najbardziej powszechną formę azotu obecną w środowisku stanowi azot atmosferyczny, którego rośliny nie są w stanie samodzielnie asymilować. Niektóre gatunki „znalazły” jednak sprytnie wyjście z tej sytuacji i zawiązują obopólnie korzystną relację z bakteriami wiążącymi N_2 . W tym „układzie” diazotrofy dostarczają roślinie azot w przyswajalnej dla niej formie, natomiast gospodarz zapewnia im źródło węgla (Prell i Poole, 2006).

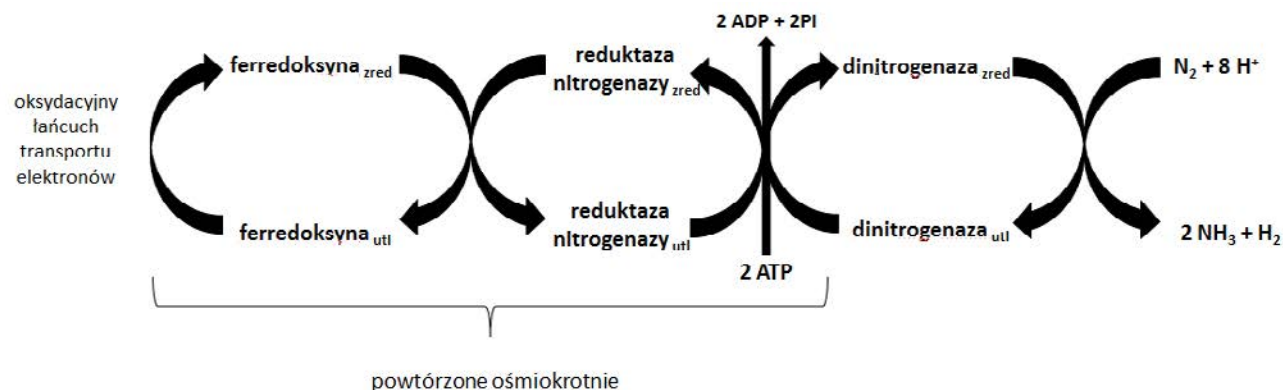
Do najszerzej poznanych symbioz tego typu należą relacje między kojarzonymi z powstawaniem brodawek korzeniowych rizobiami (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* i in.) i ich gospodarzami - roślinami motylkowymi, ale rozwój brodawek może być też indukowany przez promieniowce z rodzaju *Frankia*, które infekują drzewa i krzewy, m.in. olszę, rzewnię, woskownicę czy oliwnik. Ponadto opisano związki cyjanobakterii *Nostoc* z gatunkami *Gunnera*, które prowadzą do powstania zgrubienia łodygi zwanego gruczołem lub brodką, a także udział innej sinicy, *Anabaena azollae*, w dostarczaniu azotu wodnej paproci *Azolla*. Znane są też nietypowe asocjacje *Azospirillum* z jednoliściennymi: trzciną cukrową, kukurydzą, ryżem, pszenicą i innymi gatunkami. Bakterie te przylegają do korzeni, penetrują warstwę korową, ale nigdy nie wnikają do tkanek rośliny (Paul i Clark, 2000).

Infekcja roślin motylkowych przez rizobia zaczyna się od wymiany cząsteczek sygnałowych między bakterią i jej przyszłym gospodarzem. Przywabia to bakterie do korzenia oraz uruchamia kaskadę zapisanych

w genomie roślinnym przemian. Po adhezji rizobiów do powierzchni włókników roślina zaczyna tworzyć tzw. nić infekcyjną – tunel, którym bakterie zostaną wprowadzone do zawiązanego wcześniej w korze korzenia primodium brodawki. W tym miejscu bakterie są uwalniane, w wyniku czego w cytoplazmie komórki roślinnej powstają obłonione struktury zwane symbiosomami (Prell i Poole, 2006; Oldroyd i wsp., 2011). Wewnątrz symbiosomu komórki bakteryjne ulegają przekształceniu z formy pałeczkowatej w formę rozgałęzioną zwaną bakteroidem (Kopcewicz i wsp., 2007). Przekształceniu w bakteroid towarzyszą zmiany w ekspresji wielu genów bakteryjnych związanych z przejściem przez bakterię nowej funkcji, jaką jest wiązanie N_2 (Prell i Poole, 2006; Terpolilli i wsp., 2012).

W procesie wiązania N_2 w brodawkach uczestniczy bakteroidowy kompleks enzymatyczny nitrogenazy. W jego skład wchodzi dwie metaloproteiny: zawierająca Fe i Mo dinitrogenaza, która odpowiada za sześć-elektronową redukcję N_2 oraz niezwykle wrażliwa na tlen reduktaza nitrogenazy z klastrem żelazowo-siarko-

wym 4Fe-4S, dostarczająca dinitrogenazie niezbędne do redukcji elektrony. Ich źródłem jest zredukowana ferredoksyna. Ponadto do działania białko to wymaga ATP i jonów magnezu. Proces redukcji jednej cząsteczki N_2 prowadzi do powstania dwóch cząsteczek amoniaku oraz jednej cząsteczki gazowego wodoru, stąd też sumaryczna reakcja wiązania azotu wymaga aż ośmiu elektronów ($N_2 + 8 e^- + 16 ATP + 8 H^+ \rightarrow 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 P_i$) (Rys. 7). Wodór zostaje szybko utleniany przez obecne w komórce hydrogenazy (Kopcewicz i wsp., 2007; Hames i Hooper, 2006), natomiast wydzielany z symbiosomu amoniak jest asymilowany w komórce roślinnej, w wyniku czego tworzy się glutamina i asparagina. W przypadku roślin motylkowych strefy umiarkowanej, aminokwasy te trafiają do sąsiednich, niezainfekowanych komórek, a stamtąd do ksylemu. U roślin pochodzących z obszarów tropikalnych eksportowaną formą azotu są ureidy syntetyzowane w niezainfekowanych komórkach z azotu dostarczonego z komórek zawierających bakteroid (Prell i Poole, 2006; Kopcewicz i wsp., 2007; White i wsp., 2007). Wydaje się,



Rys. 7. Mechanizm działania kompleksu nitrogenazy prowadzący do redukcji N_2 i wytworzenia NH_3 i gazowego wodoru

Podczas reakcji zużywane jest 16 cząsteczek ATP. Zastosowane skróty: utl - forma utleniona, zred - forma zredukowana. Na podstawie: Hames i Hooper, 2006.

że oprócz amoniaku z symbiosomu do komórki trafiają też inne związki azotu: alanina i kwas asparaginowy (Prell i Poole, 2006; White i wsp., 2007). Natomiast komórka roślinna dostarcza do symbiosomu źródło węgla w postaci jabłczanu, niezbędne do działania kompleksu nitrogenazy jony (Fe^{2+} , MoO_4^{2-} , SO_4^{2-} , Mg^{2+}), homocystynian (potrzebny dinitrogenazie), niektóre aminokwasy, a także inne związki (Oldroyd i wsp., 2011).

Stworzenie dowolnych roślin uprawnych mogących samodzielnie asymilować powszechnie dostępny azot cząsteczkowy stanowi jednocześnie ogromne wyzwanie dla współczesnej biotechnologii oraz ogromną nadzieję dla przyjaznego środowiska i tańszego rolnictwa. Pierwotnie koncepcja ta zrodziła się ponad 100 lat temu mając w zamyśle zaindukowanie rozwoju układu symbiotycznego między bakteriami brodawkowymi i roślinami, które w normalnych warunkach nie tworzą symbiozy. Rozwój inżynierii genetycznej przyczynił się jednak do zmiany podejścia do tego problemu i obecnie prowadzone badania opierają się na próbie wprowadzenia do roślinnych genomów chloroplastowych lub mitochondrialnych bakteryjnych genów nitrogenazy. Choć w latach 2016-2018 naukowcy poczynili znaczne postępy na tej drodze (Good, 2018), od powszechnej uprawy pszenicy lub kukurydzy asymilującej N_2 dzieli nas zapewne jeszcze wiele lat pracy.

Podsumowanie

W trakcie ewolucji rośliny wykształciły mechanizmy umożliwiające im korzystanie z różnorodnych źródeł azotu dostępnych w środowisku. Jest to cała gama białek transporterowych przystosowanych do przenoszenia przez błony różnych form azotu, zarówno nieorganicznych, jak i organicznych, a także szereg enzymów umożliwiających jego asymilację. Ponadto, rośliny mięsożerne, czyli gatunki zasiedlające gleby

(oraz wody) o niskiej zawartości przyswajalnych form azotu, posiadają zmodyfikowane liście, umożliwiające im przywabianie, łapanie, trawienie i wchłanianie substancji, w tym związków azotu z ciał małych zwierząt, przede wszystkim owadów. Inne gatunki, jak np. rośliny motylkowe, wchodzą w asocjacje z diazotrofami i tą drogą pozyskują potrzebny im azot.

Dokładne poznanie podłoża wymienionych procesów stwarza możliwość praktycznego wykorzystania tej wiedzy w agronomii i biotechnologii roślin. Jest to niezwykle istotne w dobie niedoborów żywności i znacznego zanieczyszczenia środowiska związkami azotu (Masclaux-Daubresse i wsp., 2010; Kant i wsp., 2011; McAllister i wsp., 2012). Niniejsza publikacja nie porusza jednak wielu skomplikowanych zagadnień, m. in. molekularnych podstaw przekazywania informacji o dostępności poszczególnych form azotu w środowisku oraz ich wpływu na fizjologię i rozwój roślin. Dlatego szczególnie zainteresowanych czytelników odsyłam do fachowej literatury anglojęzycznej (Ho i Tsay, 2010; Vidal i wsp., 2010; Canales i wsp., 2014; Krapp i wsp., 2014; Medici i Krouk, 2014; Ruffel i wsp., 2014; Vidal i wsp., 2014; Vidal i wsp., 2015; Wang i wsp., 2018).

Literatura

- Adamec L (2010). Ecophysiological look at plant carnivory. In: Seckbach J, Dubinsky Z, eds. *All flesh is grass*. Netherlands: Springer; 455–489.
- Adlansnig W, Koller-Peroutka M, Bauer S, Koshkin E, Lendl T, Lichtscheidl IK (2012). Endocytotic uptake of nutrients in carnivorous plants. *Plant J*. 71:303-13.
- Adlansnig W, Peroutka M, Lendl T (2011). Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity and mutualistic activities. *Ann. Bot*. 107:181–194.
- Baturo W (2005). *Biologia. Encyklopedia szkolna PWN*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Blanco M (2011). Report: Supply of and access to key nutrients NPK for fertilizers for feeding the world in 2050. Dostępny na: https://www.researchgate.net/publication/236272173_Supply_of_and_access_to_key_nutrients_NPK_for_fertilizers_for_feeding_the_world_in_2050

- of_and_access_to_key_nutrients_NPK_for_fertilizers_for_feeding_the_world_in_2050. Dostęp: 7.07.2018
- Błaszczak MK (2010). *Mikrobiologia środowisk*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002). NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol*. 159:567–584.
- Canales J, Moyano TC, Villarroel E, Gutiérrez RA (2014). Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about *Arabidopsis* root response to nitrate treatments. *Front Plants Sci*. 5:1-14.
- Crawford NM, Glass ADM (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci*. 3:389–395.
- Czerwiński W (1976). *Fizjologia roślin*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Dechorgnat J, Nguyen CT, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S, Daniel-Vedele F (2011). From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *J Exp Bot*. 62:1349-1359.
- Dietrich D, Hammes U, Thor K, Suter-Grotemeyer M, Flückiger R, Slusarenko AJ, Ward JM, Rentsch D (2004). AtPTR1, a plasma membrane peptide transporter expressed during seed germination and in vascular tissue of *Arabidopsis*. *Plant J*. 40:488–499.
- Eilenberg H, Zilberstein A (2008). Carnivorous pitcher plants—towards understanding the molecular basis of prey digestion. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology. advances and topical issues*. Isleworth: Global Science Books; 287-294.
- Elser JJ, Backen MES, Cleland EE, Gruner DS, Harpole WS, Hillebrand H, Ngai JT, Seabloom EW, Shurin JB, Smith JE (2007). Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*. 10:1135–1142.
- Glass ADM, Kotur Z (2013). A Reevaluation of the Role of *Arabidopsis* NRT1.1 in High-Affinity Nitrate Transport. *Plant Physiol*. 163:1103–1106.
- Gojon A (2017). Nitrogen nutrition in plants: rapid progress and new challenges. *J Exp Bot*. 68:2457–2462.
- Good A (2018). Toward nitrogen-fixing plants. A concerted research effort could yield engineered plants that can directly fix nitrogen. *Science*. 359:869–870.
- Hames BD, Hooper NM (2006). *Krótkie wykłady. Biochemia*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Hammes U, Nielsen E, Honaas L, Taylor C, Schachtman D (2006). AtCAT6, a sink-tissue-localized transporter for essential amino acids in *Arabidopsis*. *Plant J*. 48:414–426.
- Hill P, Farrar F, Roberts P, Farrell M, Grant H, Newsham K, Hopkins D, Bardgett R, Jones D (2011). Vascular plant success in a warming Antarctic may be due to efficient nitrogen acquisition. *Nat. Clim. Change*. 1:50–53.
- Ho C-H, Tsay Y-F (2010). Nitrate, ammonium, and potassium sens-

- ing and signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 13:604–610.
- Johnson PD (2005). Carnivorous Plants and Their Prey, Pollinators, and Peculiar Partners. <https://www.yumpu.com/en/document/view/12263620/carnivorous-plants-and-their-prey>. Dostęp: 22.03.2017.
- Jones DL, Healey JR, Willetta VB, Farrar JB, Hodge A (2005). Dissolved organic nitrogen uptake by plants—an important N uptake pathway? *Soil Biol Biochem.* 37:413–42.
- Kant S, Bi Y-M, Rothstein SJ (2011). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *J Exp Bot.* 62:1499–1509.
- Karagatzides JD, Butler JL, Ellison AM (2009). The pitcher plant *Sarracenia purpurea* can directly acquire organic nitrogen and short-circuit the inorganic nitrogen cycle. *PLoS One.* 4:e6164.
- Kiba T, Feria-Bourrellier AB, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H, Krapp A (2012). The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell.* 24:245–258.
- Kojima S, Bohner A, Gassert B, Yuan L, von Wirén N (2007). AtDUR3 represents the major transporter for high-affinity urea transport across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *Plant J.* 52:30–40.
- Kojima S, Bohner A, von Wirén N (2006). Molecular mechanisms of urea transport in plants. *J Membr Biol.* 212:83–91.
- Kollist H, Jossier M, Laanemets K, Thomsen S (2011). Anion channels in plant cells. *FEBS J.* 278:4277–4292.
- Komarova NY, Thor K, Gubler A, Mejer S, Dietrich D, Weichert A, Suter Grottemeyer M, Tegeder M, Rentsch D (2008). AtPTR1 and AtPTR5 transport dipeptides in planta. *Plant Physiol.* 148:856–869.
- Kopcewicz J, Lewak S, Gabryś H, Kacperska A, Starck Z, Strzałka K, Trętyn A (2007). *Fizjologia roślin*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Kotzur Z, Glass ADM (2015). A 150 kDa plasma membrane complex of AtNRT2.5 and AtNAR2.1 is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ.* 38:1490–1502.
- Kotzur Z, Mackenzie N, Ramesh S, Tyerman SD, Kaiser BN, Glass ADM (2012). Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytol.* 194:724–731.
- Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA (2011). A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J Exp Bot.* 62:1455–66.
- Krasuska U, Glinka A, Gniazdowska A (2012). Menu roślin mięsożernych. *Kosmos.* 61:635–646.
- Król E, Płachno BJ, Adamec L, Stolarz M, Dziubińska H, Trębacz K (2012). Quite a few reasons for calling carnivores ‘the most wonderful plants in the world. *Ann Bot.* 109:47–64.
- Krapp A (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr Opin Plant Biol.* 25:115–122.
- Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A-S, Chaillo S, Ferrario-Méry S, Christian Meyer C, Daniel-Vedele F (2014). Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 65:789–798.
- Lambers H, Chapin FS III, Pons TL (2008). *Plant Physiological Ecology*. 2nd ed. New York: Springer.
- Lanquar V, Loqué D, Hörmann F, Yuan L, Bohner A, Engelsberger WR, Lalonde S, Schulze WX, von Wirén N, Frommer WB (2009). Feedback inhibition of ammonium uptake by a phosphor-dependent allosteric mechanism in Arabidopsis. *Plant Cell.* 21:3610–3622.
- Laugier E, Bouguyon E, Mauriès A, Tillard P, Gojon A, Lejay L (2012). Regulation of high-affinity nitrate uptake in roots of Arabidopsis depends predominantly on posttranscriptional control of the NRT2.1/NAR2.1 transport system. *Plant Physiol.* 158:1067–1078.
- Lee YH, Foster J, Chen J, Voll LM, Weber AP, Tegeder M (2007). AAP1 transports uncharged amino acids into roots of Arabidopsis. *Plant J.* 50:305–19.
- Lehmann S, Gumy C, Blatter E, Boeffel S, Fricke W, Rentsch D (2011). In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. *J Exp Bot.* 62:787–796.
- Léran S, Varala K, Boyer J-C, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B, Gassmann W, Geiger D, Gojon A, Gong J-M, Halkier BA, Harris JM, Hedrich R, Limami AM, Rentsch D, Seo M, Tsay Y-F, Zhang M, Coruzzi G, Lacombe B (2014). A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends Plant Sci.* 19:5–9.
- Léran S, Muñoz S, Brachet S, Tillard P, Gojon A, Lacombe B (2013). Arabidopsis NRT1.1 Is a Bidirectional Transporter Involved in Root-to-Shoot Nitrate Translocation. *Mol Plant.* 6:1984–1987.
- Lezhneva L, Kiba T, Feria-Bourrellier AB, Lafouge F, Boutet-Mercey S, Zoufan P, Sakakibara H, Daniel-Vedele F, Krapp A (2014). The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J.* 80:230–241.
- Li W, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY, Glass ADM (2007). Dissection of the AtNRT2.1: AtNRT2.2 Inducible High-Affinity Nitrate Transporter Gene Cluster. *Plant Physiol.* 143:425–433.
- Liu LH, Ludewig U, Frommer WB, von Wirén N (2003). AtDUR3 encodes a new type of high-affinity urea/H⁺ symporter in Arabidopsis. *Plant Cell.* 15:790–800.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechognat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot.* 105:1141–1157.
- McAllister CH, Beatty PH, Good AG (2012). Engineering nitrogen use efficient crop plants: the current status. *Plant Biotech J.* 10:1011–1025.
- Medici A, Krouk G (2014). The Primary Nitrate Response: a multifaceted signalling pathway. *J Exp Bot.* 65: 5567–5576.
- Miller AJ, Cramer MD (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil.* 274: 1–36.
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A (2013). Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant Soil.* 370:1–29.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol.* 182:31–48.
- Okamoto M, Kumar A, Li W, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass AD (2006). High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT3.1. *Plant Physiol.* 140:1036–46.
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet.* 45:119–144.
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller AJ (2006). Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol.* 142:1304–1317.
- Paul EA, Clark FE (2000). *Mikrobiologia i biochemia gleb*. Lublin: Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej.
- Perchlik M, Foster J, Tegeder M (2014). Different and overlapping functions of Arabidopsis LHT6 and AAP1 transporters in root amino acid uptake. *J Exp Bot.* 65:5193–5204.
- Pinton R, Tomasi N, Zanin L Pinton (2016). Molecular and physiological interactions of urea and nitrate uptake in plants. *Plant Signal Behav.* 11: e1076603.
- Prell J, Poole P (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14:161–168.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017). World fertilizer trends and outlook to 2020. Summary report. <http://www.fao.org/3/a-i6895e.pdf>. Dostęp: 6.06.2018.
- Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Lett.* 581:2281–2289.
- Ruffel S, Gojon A, Lejay L (2014). Signal interactions in the regulation of root nitrate uptake. *J Exp Bot.* 65:5509–5517.
- Saiz-Fernández I, De Diego N, Sampedro MC, Mena-Petite A, Ortiz-Barredo A, Lacuesta M (2015). High nitrate supply reduces growth in maize, from cell to whole plant. *J Plant Physiol.* 173:120–129.
- Schulze W, Frommer WB, Ward JM (1999). Transporters for ammo-

- nium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *Plant J.* 17:637-646.
- Sebilo M, Mayer B, Nicolardot B, Pinay G, Mariotti A (2013). Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. *PNAS.* 110:18185-18189.
- Smil V (2011). Nitrogen cycle and world food production. *World Agriculture* 2:9-1.
- Sutton MA, Oenema O, Erisman JW, Leip a, van Grinsven H, Winwarter W (2011). Too much of a good thing. *Nature.* 472:159-161.
- Svennerstam H, Ganeteg U, Bellini C, Näsholm T (2007). Comprehensive screening of Arabidopsis mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiol.* 143:1853-1860.
- Svennerstam H, Ganeteg U, Näsholm T (2008). Root uptake of cationic amino acids by Arabidopsis depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytol.* 180:620-630.
- Svennerstam H, Jämtgård S, Ahmad I, Huss-Danell K, Näsholm T, Ganeteg U (2011). Transporters in Arabidopsis roots mediating uptake of amino acids at naturally occurring concentrations. *New Phytol.* 191:459-467.
- Szczerba MW, Britto DT, Balkos KD, Kronzucker HJ (2008). Alleviation of rapid, futile ammonium cycling at the plasma membrane by potassium reveals K⁺-sensitive and -insensitive components of NH₄⁺ transport. *J Exp Bot.* 59:303-313.
- Tegeder M, Rentsch D (2010). Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Mol Plant.* 3:997-1011.
- Tegeder (2014). Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: opportunities for crop improvement. *J Exp Bot.* 65:1865-1878.
- Terpolilli JJ, Hood GA, Poole PS (2012). What determines the efficiency of N₂-fixing Rhizobium-legume symbioses? *Adv Microb Physiol.* 60:325-389.
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett.* 581:2290-2300.
- Vidal EA, Álvarez JM, Moyano TC, Gutiérrez RA (2015). Transcriptional networks in the nitrate response of Arabidopsis thaliana. *Curr Opin Plant Biol.* 27:125-132.
- Vidal EA, Moyano TC, Canales J, Gutiérrez RA (2014). Nitrogen control of developmental phase transitions in Arabidopsis thaliana. *Curr Opin Plant Biol.* 65:5611-5618.
- Vidal EA, Tamayo KP, Gutiérrez RA (2010). Gene networks for N-sensing, signaling and response in Arabidopsis thaliana. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2:683-693.
- Wang WH, Köhler B, Cao FQ, Liu GW, Gong YY, Sheng S, Song QC, Cheng XY, Garnett T, Okamoto M, Qin R, Mueller-Roeber B, Tester M, Liu LH (2012). Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in Arabidopsis. *New Phytol.* 193:432-444.
- Wang YY, Hsu PK, Tsay YF (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci.* 17:458-467.
- Wang Y-Y, Cheng Y-H, Chen K-E, Tsay Y-F (2018). Nitrate Transport, Signaling, and Use Efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69:85-122.
- White J, Prell J, James EK, Poole P (2007). Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* 144:604-614.
- Witte CP (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Sci.* 180:431-438.
- Wojtaszek P (red.), Woźny A (red.), Ratajczak L (red.), Guzicka G, Jackowski G, Jarmuszkiewicz W, Małuszyńska J, Samardakiewicz S, Tretyn A, Zagórska-Marek B (2008). *Biologia komórki roślinnej. Tom 1 Struktura.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Yang H., Bogner M., Stierhof Y-D., Ludewig U., (2010). H⁺-independent glutamine transport in plant root tips. *PLoS One.* 5:e8917.
- Yang H., Menz J., Häussermann I., Benz M., Fujiwara T., Ludewig U., (2015). High and low affinity urea root uptake: involvement of NIP5;1. *Plant Cell Physiol.* 56:1588-1597.
- Yuan L, Loqué D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E, Takahashi H, von Wirén N (2007). The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell.* 19:2636-2652.
- Zboińska M (2017). Niezwykły sposób pozyskiwania azotu przez rośliny mięsożerne. *Edukacja biologiczna i środowiskowa.* 2:10-19.
- Zhang L, Yan J, Vatamaniuk O, Du X (2016). CsNIP2;1 is a plasma membrane transporter from Cucumis sativus that facilitates urea uptake when expressed in Saccharomyces cerevisiae and Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 57:616-29.

How plants uptake and assimilate nitrogen?

Magdalena Zboińska

Nitrogen availability in the soil is one of the main factors limiting plant growth and development. Nitrogen builds such important for cell functioning compounds as nucleic acids, proteins and chlorophyll. Plants uptake nitrogen from the soil solution mainly in the nitrate and ammonium form, but also as urea, amino acids and even small oligopeptides. Moreover, some species during the evolution adapted to growth in the low nitrogen concentration. These are plants creating symbiotic relationships with nitrogen-fixing bacteria and carnivorous plants. This paper summarizes the knowledge about nitrogen uptake and assimilation by plants.

Key words: nitrogen uptake, transport across the membrane, nitrogen assimilation, carnivorous plants, legumes