

MAGDALENA ZBOIŃSKA

*Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski
Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław
E-mail: magdalena.zboinska@uwr.edu.pl*

WYBRANE ASPEKTY ADAPTACJI ROŚLIN DO WARUNKÓW NIEDOBORU FOSFORU W ŚRODOWISKU GLEBOWYM

WPROWADZENIE

Niedobór fosforu jest jednym z głównych czynników limitujących wzrost roślin, zarówno w warunkach naturalnych, jak i na polach uprawnych (LAMBERS i współaut. 2008). Szacuje się, że wydajność produkcji z ponad 40% światowych upraw ograniczona jest właśnie zawartością dostępnych dla roślin form tego pierwiastka w glebie (VAN-CE 2001). Wynika to z pobierania przez rośliny wyłącznie wolnych, rozpuszczonych w roztworze glebowym jonów $H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-} , określanymi jako Pi (fosforan nieorganiczny, ang. inorganic phosphate) (ŻEBROWSKA i CIERESZKO 2007), podczas gdy od 30 do 70% fosforu w glebach uprawnych to związki organiczne, a w glebach leśnych lub chłodnych glebach tundry mogą one stanowić nawet 80–99% (LAMBERS i współaut. 2008). Ponadto, rozpuszczalność nieorganicznych form fosforu uzależniona jest silnie od pH gleby. W glebach kwaśnych fosforany tworzą nierozpuszczalne związki z glinem, żelazem i manganem, a w glebach zasadowych wiązane są przez jony wapnia i magnezu (CZERWIŃSKI 1976, ŻEBROWSKA i CIERESZKO 2007). Skutkuje to zazwyczaj immobilizacją od 80 do 90% fosforu dostarczonego z nawozem (LAMBERS i współaut. 2006). Dlatego też stężenie fosforanów w roztworze glebowym jest bardzo niskie i wynosi średnio $1 \mu M$ (VAN-CE 2001), a najwyższe wartości stężenia Pi rzadko przekraczają $10 \mu M$ (NUSSAUME i

współaut. 2011). Jednocześnie, stężenie wolnych jonów fosforanowych w komórce roślinnej to aż 1–10 mM, a ponadto fosforany wchodzi w skład wielu związków, np. ATP, kwasów nukleinowych czy fosfolipidów (NATH i TUTEJA 2015).

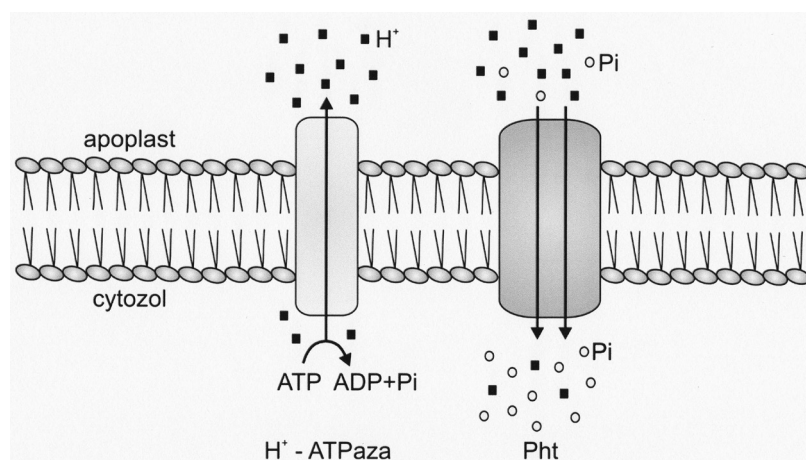
Niska zawartość Pi w roztworze glebowym i kluczowa rola fosforu w metabolizmie komórki spowodowała wykształcenie u roślin szeregu przystosowań umożliwiających adaptację do warunków deficytu tego pierwiastka. Przystosowania te możemy podzielić na dwie grupy: (i) strategię pozwalającą roślinie efektywniej pobierać Pi przez system korzeniowy oraz (ii) na adaptacje, dzięki którym roślina wydajniej wykorzystuje fosfor już obecny w jej organizmie (CIERESZKO 2005, LIANG i współaut. 2014). Obie grupy przystosowań podlegają ścisłej i wielostopniowej regulacji, która może mieć charakter lokalny i/lub systemowy (PÉRET i współaut. 2011, ZHANG i współaut. 2014). Do pierwszej grupy, czyli zmian pozwalających roślinie wydajniej wykorzystywać fosfor glebowy, zaliczane są: aktywacja specyficznych białek transporterowych odpowiedzialnych za pobieranie fosforanów z roztworu glebowego, modyfikacje architektury systemu korzeniowego, wydzielanie przez korzenie do ryzosfery kwasów organicznych i enzymów, które uwalniają Pi z obecnych w glebie związków organicznych i nieorganicznych, oraz symbioza z grzybami mikoryzowymi (CIERESZKO 2005, LAMBERS i współaut. 2006, ZHANG i współaut. 2014).

Strategie dostosowawcze roślin umożliwiające wydajniejsze wykorzystywanie posiadanych rezerw fosforu i utrzymanie dzięki temu homeostazy w organizmie, obejmują natomiast: zahamowanie wzrostu i rozkrzewianie części nadziemnej rośliny, związane z odtransportowywaniem syntezowanych związków organicznych do rozwijających się korzeni (PÉRET i współaut. 2011), modyfikacje szlaków metabolicznych ograniczające zużycie fosforanów, a także remobilizację fosforanów i ich redystrybucję w obrębie rośliny przy udziale fosfataz oraz wewnątrzkomórkowych i plazmolemowych transporterów fosforanowych Pht (ang. phosphate transporter) (ŻEBROWSKA i CIERESZKO 2007, LIANG i współaut. 2014, ZHANG i współaut. 2014). Niniejsza praca omawia pierwszą grupę przystosowań.

UDZIAŁ TRANSPORTERÓW FOSFORANOWYCH I PLAZMOLEMOWEJ H^+ -ATPazy W POBIERANIU P_i Z ROZTWORU GLEBOWEGO

Jedną z reakcji rośliny na niedobór fosforu w środowisku jest wzrost ekspresji genów kodujących transportery Pht1 - symportery zlokalizowane w błonie komórkowej, które do transportu fosforanów wykorzystują gradient protonów generowany przez plazmolemową H^+ -ATPazę (Ryc. 1). Większość z nich to transportery wysokiego powinowactwa ($K_m = 2,5-12,3 \mu M$), choć u niektórych gatunków postuluje się także istnienie transporterów Pht1 o niskim powinowactwie do fosforanów (K_m od 50 do 300 μM) (NUSSAUME i współaut. 2011, BAKER i współaut. 2015). U rzodkiewnika aż 8 z 9 genów kodujących te białka ulega ekspresji w korzeniu (MUDGE i współaut. 2002, SHIN i współaut. 2004). W pobieranie P_i z roztworu glebowego zaangażowane są jednak przede wszystkim cztery

białka: Pht1;1, Pht1;2, Pht1;3 i Pht1;4 (AYADI i współaut. 2015). Ekspresja kodujących je genów zachodzi głównie w epidermie (w tym w komórkach włosnikowych) oraz w czapeczce korzenia, mniejszą ekspresję obserwuje się w korze i w komórkach walca osiowego. Ich transkrypcja wzrasta bardzo silnie (nawet 70-krotny wzrost ilości mRNA) jeżeli roślina podlega głodzeniu fosforanowemu, natomiast przy wysokim stężeniu fosforu w podłożu, w tkankach korzenia wykrywany jest praktycznie wyłącznie transkrypt Pht1;1 (MUDGE i współaut. 2002, AYADI i współaut. 2015). Udział białek Pht1;1-Pht1;4 w pobieraniu fosforanów przez *Arabidopsis* został potwierdzony eksperymentalnie (MISSON i współaut. 2004, SHIN i współaut. 2004, AYADI i współaut. 2015). Największe znaczenie w tym procesie mają transportery Pht1;1 i Pht1;4. Przy niskim stężeniu P_i w podłożu (2 μM) mutanty *pht1;1* i *pht1;4* pobierają odpowiednio o 9–27% i o 16–50% mniej (w zależności od mutantu) fosforanów. Mutacja genów kodujących obydwie białka przyczynia się natomiast do redukcji pobierania P_i średnio o 57%. Podwójny mutant wykazuje także silniejszy fenotyp związany z głodzeniem fosforanowym niż typ dziki czy pojedyncze mutanty (SHIN i współaut. 2004). Wyniki opublikowane przez AYADI i współaut. (2015) potwierdziły te rezultaty i pokazały, że przy niskim stężeniu fosforu białko Pht1;1 odpowiada za pobieranie 15–20% fosforanów, białka Pht1;2 i Pht1;3 odpowiadają wspólnie za pobieranie około 30% P_i , więc pozostałe 50% wynika z aktywności Pht1;4. Natomiast, w pobieraniu fosforanów przy ich wysokim stężeniu (500 μM) jest zaangażowane przede wszystkim białko Pht1;1, ponieważ jego brak przyczynia się



Ryc. 1. Mechanizm transportu jonów fosforanowych z gleby do komórek korzenia: gradient protonów generowany przez plazmolemową H^+ -ATPazę wykorzystywany jest do przeniesienia P_i do wnętrza komórki przez wtórny transporter Pht (ŻEBROWSKA i CIERESZKO 2007, za zgodą Wydawnictwa).

do zmniejszenia pobierania Pi o około 60%. Mutacja *pht1;4* nie skutkuje zmniejszeniem, lecz zwiększeniem transportu fosforanów, najprawdopodobniej dzięki kompensacji braku *Pht1;4* przez *Pht1;1*. Brak obu transporterów obniża natomiast pobieranie Pi aż o 71% (SHIN i współaut. 2004). Jest to wynik o tyle ciekawy, że ekspresja genu *Pht1;4* w warunkach dostępności Pi jest praktycznie niezauważalna (MUDGE i współaut. 2002, AYADI i współaut. 2015). Białka *Pht1;2* i *Pht1;3* nie uczestniczą w pobieraniu fosforanów, gdy ich stężenie w środowisku jest wysokie (AYADI i współaut. 2015).

Innym białkiem, pośrednio zaangażowanym w pobieranie fosforanów (Ryc. 1), którego aktywność wzrasta w przypadku stresu niedoboru fosforu jest plazmolemowa H^+ -ATPaza. W korzeniach ryżu (*Oryza sativa*) niski poziom fosforu powoduje wzrost aktywności H^+ -ATPazy o 30%, wzrost transportu protonów o 70%, a także wzrost V_{max} enzymu przy niewielkim wzroście poziomu białka. Dlatego ZHANG i współaut. (2011) sugerują, że zmiany te mogą wynikać w dużej mierze z potranslacyjnych modyfikacji tego transportera. Obserwację tę potwierdzają wyniki badań uzyskane dla roślin pomidora (*Solanum lycopersicum*), gdzie w warunkach niedoboru fosforu wzrasta ilość białka 14-3-3 TFT7, zaangażowanego najprawdopodobniej w aktywowanie w tych warunkach plazmolemowej H^+ -ATPazy (XU i współaut. 2012).

MODYFIKACJE MORFOLOGICZNE SYSTEMU KORZENIOWEGO

Zmiany morfologiczne korzeni obserwowane u roślin poddanych stresowi niedoboru fosforu prowadzą do wykształcenia płytkiego, rozgałęzionego systemu korzeniowego o dużej powierzchni. Ma to umożliwić roślinie eksplorowanie górnych warstw gleby, gdzie stężenie związków fosforu, uwalnianych w trakcie rozkładu leżącej na powierzchni ziemi materii organicznej, jest największe. Tego typu modyfikacje systemu korzeniowego obejmują zazwyczaj kilkakrotny wzrost gęstości oraz długości korzeni bocznych i włośników, a także skrócenie korzenia głównego (LÓPEZ-BUCIO i współaut. 2002, VANCE 2008, PÉRET i współaut. 2011). Poszczególne aspekty tych zmian są jednak charakterystyczne dla gatunku, a nawet odmiany rośliny. Ograniczenia wzrostu korzenia głównego nie zaobserwowano np. u ryżu i kukurydzy (*Zea mays*) (ZHANG i współaut. 2014) oraz u 21 z 73 przebadanych akcesji rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) (CHEVALIER i współaut. 2003). Podobnie, nie wszystkie gatunki zdolne są do wydłużania i wzrostu liczby włośników; nie obserwowano tego procesu np.

u *Podocarpus totara* (LAMBERS i współaut. 2006), czyli zastrzalina totara, endemicznego drzewa Nowej Zelandii (New Zealand Plant Conservation Network <http://www.nzpcn.org.nz>). Ponadto, w przypadku uprawy rzodkiewnika przy 1 μ M stężeniu fosforanów, w porównaniu z roślinami uprawianymi przy stężeniu 1 mM, u prawie 60% akcesji zaobserwowano zmniejszenie, a nie zwiększenie liczby korzeni bocznych. Natomiast aż u 25% roślin nie odnotowano zmian zarówno w długości korzenia głównego, jak i w liczbie korzeni bocznych (CHEVALIER i współaut. 2003). Analogiczne wnioski, dotyczące wpływu niedoboru fosforu na liczbę i długość włośników korzeniowych *A. thaliana*, opublikował ostatnio niemiecki zespół uczonych (STETTER i współaut. 2015). Po przebadaniu aż 166 akcesji tego gatunku pochodzących z całego świata, wykazali oni dużą zmienność w reakcji roślin na niedobór tego pierwiastka, niezależną od pochodzenia geograficznego roślin, co może świadczyć o genetycznym podłożu procesu. W większości przypadków rośliny reagowały w powszechnie opisywany sposób, zwiększając długości i gęstości włośników, lecz te, które naturalnie charakteryzowały się długimi włośnikami, zwiększały tylko ich liczbę. Odnotowano także kilka akcesji o długich i gęstych włośnikach, które na niedobór fosforu nie reagowały lub też wytwarzały krótsze i/lub rzadziej rozmieszczone włośniki. Ostatnia z opisanych reakcji może świadczyć o transporcie przez roślinę limitowanych w tych warunkach związków organicznych, np. do intensywnie rozwijających się korzeni bocznych. W oparciu o te obserwacje zasugerowano, że rośliny podczas stresu wykształcają system korzeniowy o możliwie optymalnej budowie, ograniczając w ten sposób straty energii. Powyższy wniosek potwierdzają także badania na liniach o różnej ploidalności. Tetraploid Col-1 charakteryzuje się dłuższymi włośnikami niż diploid, ale po umieszczeniu w podłożu pozbawionym fosforu linia diploidalna zwiększa długość włośników, natomiast linia tetraploidalna zmniejsza ich długość (STETTER i współaut. 2015).

Do specyficznych zmian wywołanych niskim stężeniem fosforu, obserwowanych tylko u niektórych gatunków roślin, należy wykształcenie korzeni o nietypowej morfologii (ang. root clusters), które charakteryzują się niezwykle gęsto rozmieszczonymi, występującymi w rzędach, krótkimi korzeniami bocznymi wyższego rzędu o ograniczonym (zdeterminowanym) wzroście, tzw. korzonkami (ang. rootlets). Powstają one zazwyczaj u gatunków niemikoryzowych, ale w niektórych przypadkach mikoryza może obejmować nawet te specyficzne struktury korzeniowe, jak

obserwowano to u *Hakea verrucosa* (SHANE i LAMBERS 2005, LAMBERS i współaut. 2006, LAMBERS i SHANE 2007). Stwierdzono, że u *Leucadendron laureolum* wytworzenie tego typu struktur może zwiększyć powierzchnię chłonną korzenia nawet 140 razy, a objętość gleby penetrowanej przez system korzeniowy aż 288 razy (LAMONT 2003). Jest to niezwykle istotne dla wydajnego pobierania Pi w warunkach jego deficytu, ponieważ, głównie ze względu na wiązanie fosforanów przez składniki gleby, współczynnik dyfuzji Pi w roztworze glebowym jest bardzo niski, wielokrotnie niższy niż współczynniki dla jonów azotanowych czy potasowych (LAMBERS i współaut. 2008).

Termin *root clusters* można przetłumaczyć jako pęki, zgrupowania, skupiska, grona lub po prostu klastry korzeniowe. Jednak w polskiej literaturze naukowej struktury te opisywane były do tej pory jedynie w kontekście korzeni „marchewkowształtnych” (BĄCZEK-KWINTA 2015) oraz korzeni proteoidowych (ang. proteoid roots) (CIERESZKO 2005, ADAMCZYK i GODLEWSKI 2010), czyli klastrow korzeniowych specyficznego typu (LAMBERS i współaut. 2006, LAMBERS i SHANE 2007). Należy jednak zaznaczyć, że istnieje także termin *cluster roots* (którego nie należy mylić z *root clusters*), funkcjonujący zwykle jako synonim korzeni proteoidowych (LAMBERS i współaut. 2006, PLAYSTED i współaut. 2006, ABRAHÃO i współaut. 2014). Pojęcie klastrow korzeniowych jest jednak najszersze i obejmuje korzenie proteoidowe oraz inne, morfologicznie i fizjologicznie zbliżone struktury, pojawiające się u niektórych gatunków roślin efemerycznie, przy niedoborze fosforu (połączonym z niedoborem azotu) lub też niedoborze żelaza w glebie (LAMONT 1982, 2003; ROSENFELD i współaut. 1991; WATERS i BLEVINS 2000; SHANE i LAMBERS 2005; LAMBERS i SHANE 2007). Niejednolite nazewnictwo tych struktur wynika z kolejności ich odkryć - po raz pierwszy zostały one bowiem opisane u przedstawicieli Proteaceae (srebrnikowatych), a dopiero później u innych rodzin. Ponadto, najwięcej danych posiadamy właśnie na temat korzeni proteoidowych. Inne typy klastrow korzeniowych to wspomniane już korzenie marchwiokształtne [lub „marchewkowształtne” (BĄCZEK-KWINTA 2015)] (ang. dauciform od łacińskiej nazwy marchwi - *daucus*) oraz korzenie włosowate (ang. capillaroid roots). Niektórzy badacze wyróżniają dodatkowo czwarty typ, korzenie klastropodobne (ang. cluster-like roots) (LAMBERS i współaut. 2006, LAMBERS i SHANE 2007). Wszystkie te formy opisano szerzej w Tabeli 1. Zdjęcia tych struktur i ich poszczególnych stadiów rozwojowych są natomiast przedstawione w wielu cytowanych tu

pracach (SHANE i LAMBERS 2005; LAMBERS i współaut. 2006, 2008, 2012). Klastry korzeniowe występują powszechnie u gatunków zasiedlających ubogie w fosfor gleby Australii i Afryki Południowej, ale spotykane są także u gatunków śródziemnomorskich, np. łąbinu białego (*Lupinus albus*), strefy umiarkowanej (przedstawiciele Cyperaceae) oraz u Proteaceae z Ameryki Południowej (LAMBERS i współaut. 2006, 2012).

MOBILIZACJA Pi Z NIEORGANICZNYCH GLEBOWYCH ZWIĄZKÓW FOSFORU

Inną strategią pozwalającą roślinom przetrwać w warunkach deficytu fosforu jest wydzielanie przez korzenie substancji, które ułatwiają uwalnianie Pi z obecnych w glebie, trudno rozpuszczalnych związków. Do tego typu substancji należą: kwasy organiczne, związki fenolowe i śluzu oraz fosfatazy i inne enzymy (LAMBERS i współaut. 2006). Kwasy organiczne wydzielane przez rośliny to przede wszystkim kwasy: cytrynowy, jabłkowy i szczawiowy, ale także malonowy, fumarowy, bursztynowy i mlekowy (LAMBERS i współaut. 2006, ABRAHÃO i współaut. 2014). Wydzielane są one do gleby w postaci zjonizowanej: proton transportowany jest przez plazmolemową H^+ -ATPazę z udziałem energii pochodzącej z ATP, natomiast anion przemieszcza się biernie przez obecny w błonie komórkowej kanał białkowy. Działanie karboksylanów (anionów kwasów organicznych) opiera się na ich zdolności wiązania kationów metali, dzięki czemu mogą rozpuszczać sole, które żelazo, glin, wapń, magnez i mangan, tworzą z jonami fosforanowymi. Dodatkowo, dzięki swojej anionowej naturze, karboksylany współzawodniczą z fosforanami o miejsca wiążące na strukturach gleby, co ogranicza adsorpcję jonów $H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-} na jej powierzchni (PLAXTON i TRAN 2011). Uważa się, że podobne do kwasów organicznych, lecz słabsze właściwości wykazują związki fenolowe i śluzu wydzielane przez niektóre gatunki przy niedoborze fosforu (LAMBERS i współaut. 2006). Zwłaszcza te ostatnie zdolne są do chelatowania jonów glinu, żelaza czy wapnia (WATT i EVANS 1999) oraz do powlekania grudek gleby i zasłaniania potencjalnych miejsc wiążących Pi (GRIMAL i współaut. 2001). Trzeba jednocześnie zauważyć, że niekiedy wydzielanie kwasów organicznych może okazać się niekorzystne dla roślin, gdyż rozpuszczalność nieorganicznych soli fosforowych jest silnie uzależniona od pH gleby. Z tego względu zakwaszenie ryzosfery sprzyja pobieraniu Pi tylko w przypadku gleb zasadowych, gdzie wspomaga rozpuszczanie fosforanów wapnia i magnezu. Na glebach o odczynie neutralnym bądź kwaśnym ułatwia jednak tworzenie kompleksów

Tabela 1. Rodzaje klastrow korzeniowych.

Na podstawie: [1] (LAMBERS i współaut. 2006), [2] (LAMONT 2003), [3] (SHANE i LAMBERS 2005), [4] (LAMONT 1982), [5] (LAMONT 1974), [6] [7] (SHANE i współaut. 2006), [8] (LAMBERS i współaut. 2015), [9] (HOCKING i JEFFERY 2004), [10] (ROSENFELD i współautors. 1991), [11] (WATERS i BLEVINS 2000), [12] (LAMBERS i SHANE 2007). *Klastry korzeniowe wytwarzane przez gatunki należące do tych rodzin są niekiedy opisywane jako korzenie klastropodobne [1, 9, 12], a w innych opracowaniach zaliczane do korzeni proteoidowych [2, 3, 10, 11], dlatego w tabeli zostały zaklasyfikowane do obu typów.

Typ korzeni	Wygląd	Wielkość	Występowanie	Uwagi
Korzenie proteoidowe/klastrowe proste (ang. simple proteoid/cluster roots) lub złożone (ang. compound proteoid/cluster roots)	Gęsta sieć korzonków rosnących w równoległych rzędach. U formy złożonej korzonki odchodzące od głównej osi korzenia posiadają własne rozgałęzienia [1]. Typowo na 1 cm korzenia przypada 250–500 korzonków, ale może być również 10–1000 [2]. Gęstość włóśników to około 800/mm ² . Klastry mają kształt elipsoidalny [3].	Klastry mają zazwyczaj 2–75 mm długości i 1–34 mm szerokości. Największe, osiągające 20 x 7 cm, spotykane są u <i>Hakea prostrata</i> . Korzonki mierzą 0,6–35 mm, włóśniki 0,1–2 mm [2].	Proteaceae (1600 gatunków) oraz u niektórych gatunków Fabaceae (np. <i>Lupinus albus</i>), Betulaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Cucurbitaceae*, Elaeagnaceae, Moraceae* [1, 3] i Mimosaceae [4].	Wydzielają duże ilości karboksylanów w wyniku wybuchu wydzielnicy, a także protony, wodę, związki fenolowe i kwaśne fosfaty. Ich rozwój hamowany jest przez wysokie stężenie fosforu lub azotu w glebie oraz przez suszę [2]. Pobierają około 10 razy więcej fosforu niż zwykle korzenie [3].
Korzenie marchwiokształtne (ang. dauciform roots)	Niewielka liczba korzonków (6–20 na cm korzenia) w kształcie korzenia marchwi, osadzonych na niewielkich trzoneczkach. Korzonki nie tworzą rzędów [5].	Występują zazwyczaj w grupach. Klastry osiągają do 2,4 cm długości, korzonki 2–9 mm, włóśniki 1–2,4 mm [5].	Cyperaceae i dwa gatunki Juncaceae [1].	Metabolizm podobny do korzeni proteoidowych [1, 4, 6, 7].
Korzenie włosowate (ang. capillaroid roots)	Długie włóśniki pokrywające korzeń i odchodzące od niego korzonki [4].	Na centymetr bieżący klastra przypada 40 korzeni bocznych o długości około 3 cm posiadających 5 mm korzonki i 1,3–2 mm włóśniki [4].	Restionaceae, Anarthriaceae (u <i>Lyginia barbata</i>) [8].	Włóśniki chłoną duże ilości wody. Pozostałe procesy są najprawdopodobniej zbliżone do opisanych u korzeni proteoidowych [1, 4].
Korzenie klastropodobne (ang. cluster-like roots)	Niewielka liczba korzonków w klastrze: u dyni zwyczajnej (<i>Cucurbita pepo</i>) 5–10, u fikusa benjamina (<i>Ficus benjamina</i>) do 30, ale u łubinu wąskolistnego (<i>Lupinus angustifolius</i>) więcej [9, 10, 11].	Korzonki mają około 1 cm długości [10, 11].	Niektórzy przedstawiciele Fabaceae (np. <i>Lupinus angustifolius</i>), Cucurbitaceae* (np. <i>Cucurbita pepo</i>), Moraceae (np. <i>Ficus benjamina</i>)* [2, 9, 10, 11].	Typ wyszczególniany tylko przez niektórych autorów [1, 9, 12]. Obejmuje korzenie nieposiadające wszystkich cech korzeni proteoidowych, rozwijające się przy niskim stężeniu żelaza [10, 11] lub przy wysokim stężeniu azotu [9] w glebie.

Pi z tlenkami żelaza i glinu, a więc zwiększa immobilizację fosforu. Dlatego uważa się, że wydzielanie do ryzosfery protonów wspólnie z karboksylanami jest procesem, który w dużej mierze wynika z konieczności zachowania równowagi ładunków pomiędzy kationami i anionami w korzeniu (LAMBERS i współaut. 2015).

Karboksylany uwalniane są do podłoża przez wiele roślin. Choć u niektórych gatunków, np. u ciecierzycy (*Cicer arietinum*), wydzielane są one na niezmiennym poziomie, w większości przypadków głodzenie fosforowe wpływa znacząco na wzrost ich produkcji (LAMBERS i współaut. 2006, ABRAHÃO i współaut. 2014). Wyjątkowo dobrym tego

przykładem są klastry korzeniowe, struktury wyspecjalizowane w pozyskiwaniu fosforu nie tylko dzięki swojej ogromnej powierzchni, ale także dzięki wydzielaniu dużych ilości kwasów organicznych w tzw. wybuchu wydzielniczym (ang. exudative burst) (SHANE i LAMBERS 2005, LAMBERS i współaut. 2006, PLAYSTED i współaut. 2006). Klastry korzeniowe żyją krótko, zazwyczaj około jednego do trzech tygodni, a faza wydzielnicza trwa zaledwie 1 do 3 dni (WATT i EVANS 1999, LAMONT 2003, LAMBERS i SHANE 2007). W tym krótkim okresie korzenie proteoidowe łubinu białego wydzielają aż 40, 20 i 5 razy więcej odpowiednio cytrynianu, jabłczanu i bursztynianu niż zwyczajne korzenie łubinu w warunkach dostępności fosforu (LAMBERS i współaut. 2008). Szacuje się, że ilość kwasu cytrynowego wydzielanego przez korzenie może stanowić nawet 23% całej masy rośliny (LAMONT 2003). Natomiast dla *Bankia prunotes* wykazano, że uwalnianie przez roślinę kwasów organicznych przyczynia się do zwiększenia dostępności Pi w ryzosferze aż o 250% (LAMBERS i SHANE 2007). Oprócz kwasów organicznych korzenie proteoidowe wydzielają także inne substancje ułatwiające pozyskiwanie fosforu z gleby: śluz, związki fenolowe, kwaśne fosfatazy i wodę. Ta ostatnia, wydzielana podczas nocy, a następnie pobierana przez klastry korzeniowe w ciągu dnia, miałaby ułatwiać transport składników mineralnych przez korzenie, a także wpływać na wydłużenie żywotności klastrów korzeniowych, które wytwarzane są tylko w odpowiednio wilgotnym środowisku (WATT i EVANS 1999, LAMONT 2003). Podobne do korzeni proteoidowych właściwości fizjologiczne, polegające na wydzielaniu kwasów organicznych i fosfataz, wykazują korzenie marchwiokształtne (PLAYSTED i współaut. 2006). Brak jest natomiast danych dla korzeni włosowatych, choć przypuszcza się, że funkcjonują one na analogicznej zasadzie (LAMBERS i współaut. 2006). Niedawno opublikowano wyniki badań korzeni wiążących piasek (ang. sand-binding roots), wytwarzanych przez *Discocactus placeutiformis*. Struktury te nie są zaliczane do klastrów korzeniowych, jednak tak jak korzenie proteoidowe i korzenie marchwiokształtne, są wyspecjalizowane w pozyskiwaniu fosforu z gleby, gdyż wydzielają znaczne ilości śluzów oraz kwasów organicznych (ABRAHÃO i współaut. 2014).

UWALNIANIE FOSFORANÓW Z OBECNYCH W GLEBIE ORGANICZNYCH ZWIĄZKÓW FOSFORU

Kwasy organiczne zwiększają rozpuszczalność nieorganicznych soli fosforanowych, a

także uwalniają fosforany zaadsorbowane na powierzchni koloidów glebowych. Ich działanie jest niezwykle wydajne; w niektórych przypadkach mogą zwiększyć stężenie Pi w rozworze glebowym nawet tysiącrotnie. Dodatkowo, zwiększają one rozpuszczalność organicznych związków fosforu oraz ich podatność na rozkład enzymatyczny. Kwasy organiczne nie mają natomiast wpływu na uwalnianie fosforanów z obecnych w glebie fosfolipidów, fosforylowanych cukrów, kwasów nukleinowych czy fityny, by rośliny mogły wykorzystać fosfor z tych źródeł (PLAXTON i TRAN 2011). Wykorzystanie fosforu zawartego w związkach organicznych może być jednak bardziej istotne dla roślin niż pozyskiwanie go ze związków nieorganicznych, gdyż w niektórych glebach, np. na obszarze tundry, organiczne formy fosforu mogą stanowić nawet 99% fosforu glebowego (LAMBERS i współaut. 2008). Choć odnotowano przypadki pobierania przez włósniki krótkich cząsteczek DNA (PAUNGFOO-LONHIENNE i współaut. 2010) oraz białek na drodze endocytozy (PAUNGFOO-LONHIENNE i współaut. 2008), a więc nie można wykluczyć pobierania tą drogą innych większych cząsteczek organicznych bez ich uprzedniego rozkładu, ten sposób pobierania składników odżywczych przez rośliny jest mało wydajny i ma niewielkie znaczenie. Aby wykorzystać fosfor zawarty w materii organicznej gleby, ortofosforany muszą zostać odłączone od obecnego w glebie związku organicznego, a następnie, w rozpuszczalnej formie jonów $H_2PO_4^-$ lub HPO_4^{2-} , pobrane przez roślinę z użyciem transporterów Pht1. Z tego względu rośliny obok kwasów organicznych uwalniają do ryzosfery szereg enzymów hydrolizujących organiczne związki fosforu: fosfatazy, nukleazy, fosfodiesterazy i fitazy. Stwierdzono, że aktywność tych enzymów jest znaczna, gdyż *Arabidopsis* jest w stanie rosnąć na organicznym źródle fosforu, np. w postaci 3-fosfoglicerolu (ROBINSON i współaut. 2012) lub RNA (PLAXTON i TRAN 2011), równie dobrze jak na nieorganicznych fosforanach. Wykazano także, że dzięki hydrolazom uwalnianym przez pszenicę (*Triticum aestivum*) stężenie organicznych związków fosforu w bezpośrednim sąsiedztwie korzeni tej rośliny obniża się aż o 86% (LAMBERS i współaut. 2008). Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za proces produkcji i wydzielania enzymów rozkładających organiczne formy fosforu stwarza więc interesujące perspektywy wykorzystania tej wiedzy w biotechnologii roślin i tym samym wskazuje nowe kierunki badań związane z kwaśnymi fosfatazami.

Fosfomonoesterazy, nazywane krócej fosfatazami (EC 3.1.3), to grupa enzymów hydrolizujących monoestry kwasu fosforowego

(V) z uwolnieniem nieorganicznych fosforanów. Zaliczane są one do podklasy esteraz (EC 3.1) i klasy hydrolaz (EC 3). Kwaśne fosfatazy (EC 3.1.3.2) to fosfomonoesterazy charakteryzujące się optimum działania w zakresie pH kwaśnego oraz, w przeciwieństwie do wielu innych fosfataz, zazwyczaj niską specyficzną substratową (NC-IUBMB <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Występują one powszechnie u roślin, ale także u zwierząt i mikroorganizmów. W genomie *Arabidopsis* zidentyfikowano ponad 50 genów przypuszczalnie kodujących kwaśne fosfatazy. Aż 29 z nich to geny kwaśnych purpurowych fosfataz PAP (ang. purple acid phosphatase) i tylko jeden nie jest transkrypcyjnie aktywny (TRAN i współaut. 2010a). U innych gatunków geny PAP występują nie mniej licznie; u kukurydzy odnaleziono ich 33, u ryżu 26, u soi (*Glycine max*) 35 (GONZÁLEZ-MUÑOZ i współaut. 2015). PAP są nie tylko silnie zaangażowane w gospodarkę fosforową roślin, ale także w odpowiedź na patogeny i abiotyczne czynniki stresowe (niedobór wody, zasolenie), w procesy związane ze starzeniem się rośliny, autolizą komórek, syntezą askorbinianu, syntezą celulozy, przekazywaniem informacji z udziałem kwasu abscysynowego, homeostazą manganu, żelaza i cynku oraz, dzięki aktywności peroksydazy, jaką wykazują niektóre z nich, w metabolizm reaktywnych form tlenu. Stąd, właśnie ta grupa enzymów cieszy się szczególnie dużym zainteresowaniem badaczy (ŻEBROWSKA i CIERESZKO 2009, SCHENK i współaut. 2013).

Ekspresja genów wielu kwaśnych purpurowych fosfataz wzrasta w odpowiedzi na niedobór fosforu. Dotyczy to zarówno enzymów działających wewnątrzkomórkowo, jak i zewnątrzkomórkowo, w całej roślinie lub tylko miejscowo, w danym jej organie, np. w korzeniach. Ich rola w aklimatyzacji rośliny do warunków niedoboru fosforu polega przede wszystkim na uwalnianiu Pi ze związków organicznych, zarówno glebowych, jak i tych zmagazynowanych w wakuoli lub apoplacie komórki (TRAN i współaut. 2010a, WANG i współaut. 2014). Dzięki szerokiej specyficzności substratowej kwaśne purpurowe fosfatazy są zdolne do hydrolizy wielu monoestrów kwasu fosforowego, co umożliwia roślinie pozyskanie Pi z tak różnorodnych źródeł jak: fosfoenolopirogronian, nukleotydy, aminokwasy z przyłączoną resztą fosforanową (fosfoseryna, fosfotreonina), fosforylowane cukry (3-fosfoglicerynian, fosforyboza, fosfoheksozy) czy polifosforany. Osobną grupę PAP stanowią enzymy o aktywności fitazy, zdolne do hydrolizy kwasu fitynowego, będącego składnikiem fityny – zapasowego związku fosforu roślin, występującego

w szczególnie dużej ilości w nasionach (TRAN i współaut. 2010b, WANG i współaut. 2011). Uwalnianie do gleby kwaśnych fosfataz stwierdzono u wielu roślin uprawnych, m.in. u pomidora (*Lycopersicon esculentum*), soi, fasoli (*Phaseolus vulgaris*), łubinu białego, rzodkiewnika i tytoniu (*Nicotiana tabacum*), a także u jednoliściennych: kukurydzy, owsa (*Avena sativa*), ryżu, pszenicy i jęczmienia (*Hordeum vulgare*) (ŻEBROWSKA i CIERESZKO 2009, TRAN i współaut. 2010a). Badania nad rzodkiewnikiem wykazały, że kwaśne purpurowe fosfatazy odpowiedzialne za mobilizację Pi ze związków organicznych obecnych w glebie mogą działać w ryzosferze bądź też na powierzchni korzenia, jeżeli po wydzieleniu pozostają silnie związane ze ścianą komórkową ryzodermy. Takie rozwiązanie najprawdopodobniej optymalizuje pozyskiwanie fosforu przez roślinę. Ze względu na wyjątkowo niską mobilność w glebie, Pi uwolniony do roztworu glebowego przez enzymy roślinne, nawet w niewielkiej odległości od systemu korzeniowego, może nie zostać przez roślinę pobrany, ale np. związany przez kationy metali (WANG i współaut. 2011).

AtPAP12 i AtPAP26 to dwie główne PAP rzodkiewnika uwalniane do ryzosfery, natomiast AtPAP10 to prawdopodobnie jedyna kwaśna purpurowa fosfataza związana z powierzchnią korzeni tej rośliny. AtPAP12 i AtPAP26 zostały wcześniej oczyszczone z hodowli komórek *Arabidopsis* (TRAN i współaut. 2010b), a następnie analiza podwójnego mutantu *atpap26/atpap12* pokazała, że odpowiadają one wspólnie za ponad 60% aktywności kwaśnych fosfataz wydzielanych przez korzenie (ROBINSON i współaut. 2012). Choć enzymy te posiadają podobną specyficzność substratową, okazały się być w różny sposób regulowane. W odpowiedzi na niedobór fosforu zaobserwowano znaczący wzrost ilości transkryptu *AtPAP12*, ale nie *AtPAP26*. Z drugiej strony, *AtPAP26* podlega glikozylacji, której nie stwierdzono u *AtPAP12* (TRAN i współaut. 2010b). Czasochłonna analiza setek tysięcy siewek rzodkiewnika przeprowadzona przez zespół Wanga (WANG i współaut. 2011) pokazała natomiast, że wszystkie rośliny, które nie wykazywały aktywności kwaśnej fosfatazy na powierzchni systemu korzeniowego to mutanty tego samego genu – *AtPAP10*. *AtPAP10* ulega ekspresji w wielu organach rośliny: w korzeniu, pędzie, liściach, kwiatach, łuszczynie. W korzeniu, w warunkach optymalnego żywienia fosforowego, ekspresja *AtPAP10:GUS* zachodzi głównie w merystemach oraz wiązkach przewodzących, jednak przy niedoborze fosforu obejmuje wszystkie tkanki, także ryzodermę i komórki włóśnikowe. Mimo silnej ekspresji, mutacja tego genu nie wpływa znacząco na

ogólną aktywność kwaśnych fosfataz obecnych w tkankach, choć przekłada się na zmniejszenie świeżej masy rośliny o 15 do 30%, w porównaniu z typem dzikim. Można stąd wnioskować, że białko pełni funkcję głównie na powierzchni korzeni. Ponadto, ze względu na zmiany w morfologii systemu korzeniowego obserwowane u roślin z nadekspresją *AtPAP10* oraz u mutantów *atpap10*, sugeruje się, że *AtPAP10* może być zaangażowana w kontrolę architektury systemu korzeniowego w odpowiedzi na zmieniającą się zawartość fosforu w glebie, analogicznie do *NtPAP12* z tytoniu, białko o bardzo podobnej do *AtPAP10* sekwencji aminokwasowej, także związane ze ścianą komórkową, jest zdolne do aktywowania na drodze defosforylacji enzymów biorących udział w przebudowie ściany komórkowej, takich jak α -ksylozydaza czy β -glukorozydaza (WANG i współaut. 2011). Należy zaznaczyć, że choć zawartość fityny w glebie może być znaczna, żaden z trzech opisanych enzymów *Arabidopsis* nie posiada wystarczającej aktywności fitazy, aby uwalniać Pi z tego źródła. Aktywność *AtPAP10* wobec fityny jest bardzo niska, natomiast *AtPAP12* i *AtPAP26* zerowa, a ogólna aktywność fitaz wydzielanych przez korzenie rzodkiewnika to jedynie 0,8 % całkowitej aktywności fosfomonoesteraz (TRAN i współaut. 2010b, WANG i współaut. 2011).

MIKORYZA

Wśród wyróżnianych rodzajów mikoryzy szczególnie dużym zainteresowaniem w kontekście fosforowego żywienia roślin cieszy się mikoryza arbuskularna i ektomikoryza. Mikoryza arbuskularna występuje u 80% roślin lądowych i jest tworzona wyłącznie przez grzyby z typu Glomeromycota (SMITH i SMITH 2012, BUSCOT 2015). Korzenie zakażone tymi grzybami zewnętrznie nie różnią się od niezakażonych, gdyż grzybnia zewnętrzkorzeniowa nie tworzy struktur oplatających korzenie. Strzępki grzyba wnikają natomiast do wnętrza komórek kory korzenia, gdzie, nie naruszając ciągłości protoplastu, rozgałęziają się tworząc tzw. arbuskule. Procesowi tworzenia arbuskul towarzyszą zmiany w funkcjonowaniu roślinnej błony komórkowej, która otacza je i przekształca się w błonę periarbuskularną, będącą miejscem wymiany składników odżywczych pomiędzy grzybem i rośliną (BUCHER 2007, GU i współaut. 2011). Drugi rodzaj mikoryzy, ektomikoryza, występuje u większości drzew tajgi i strefy klimatu umiarkowanego oraz u niektórych gatunków drzew tropikalnych i tworzony jest przez grzyby należące do Basidiomycota lub Ascomycota (BUSCOT 2015). Charakteryzu-

je się on występowaniem tzw. mufki, czyli zwartego płaszcza strzępek otaczających korzeń, z którego wyrasta rozległa grzybnia zewnętrzkorzeniowa, a także sieci Hartiga, czyli systemu strzępek pomiędzy komórkami kory korzenia. Strzępki grzybów ektomikoryzowych nie penetrują wnętrza komórek korzenia (BECQUER i współaut. 2014).

W zależności od gatunku i warunków środowiska, roślina może tworzyć symbiozę z grzybem i pozyskiwać część fosforu lub praktycznie cały potrzebny jej fosfor ze strzępek grzyba bądź też nie wytwarzać układu symbiotycznego z grzybem i pobierać fosfor wyłącznie z gleby (JAVOT i współaut. 2007). Grzyby ektomikoryzowe dostarczają roślinie fosfor wydajniej niż grzyby mikoryzy arbuskularnej, prawdopodobnie dzięki znacznie większej powierzchni grzybni zewnętrzkorzeniowej (PLASSARD i DELL 2010). Niestety w obu przypadkach podłoże molekularne i dokładny mechanizm tego procesu nie są do końca wyjaśnione. Wydaje się, że jednym z głównych czynników wpływających na tworzenie symbiozy jest dostępność fosforu w glebie, która przekłada się na stężenie fosforu w tkankach rośliny. Jak pokazano dla grzybów mikoryzy arbuskularnej, przy wysokim stężeniu fosforu roślina zmniejsza transport cukrów do strzępek grzyba, co hamuje proces mikoryzy (JAVOT i współaut. 2007). Ponadto, wysokie stężenie fosforu obniża ekspresję genów syntezy karotenoidów, z których powstają strigolaktyny, fitohormony wydzielane do gleby przez korzenie roślin i zaangażowane w proces inicjacji mikoryzy (GU i współaut. 2011). Po pobraniu, znaczne ilości fosforu są początkowo akumulowane w postaci polifosforanu (od trzech do tysięcy reszt fosforanowych połączonych wiązaniem wysokoenergetycznym) w wakuolach grzybni zewnętrzkorzeniowej, a u grzybów ektomikoryzowych także w mufce. Najprawdopodobniej w postaci polifosforanów, fosfor transportowany jest dalej, do grzybni wewnętrzkorzeniowej, gdzie podlega enzymatycznemu rozkładowi, a następnie, już jako Pi, zostaje przeniesiony do komórek roślinnych (JAVOT i współaut. 2007, BECQUER i współaut. 2014). Uwolnione w korzeniu fosforany transportowane są przez błonę komórkową do cytozolu komórek przy udziale transporterów fosforanowych *Pht1*. Ekspresja genów kodujących te białka ulega istotnym zmianom pod wpływem kolonizacji korzeni grzybami mikoryzy arbuskularnej. Ilość niektórych białek *Pht1*, zwłaszcza ryzodermalnych, maleje (ponieważ maleje pozyskiwanie przez roślinę Pi bezpośrednio z ryzosfery), rośnie natomiast ilość innych. Ponadto, zaczynają być transkrybowane geny transporterów specyficznie indukowanych mikoryzą. Ich produkty biał-

kowe lokują się w błonie periarbuskularnej komórek z dojrzałymi arbuskulami lub głównie w tych komórkach, co świadczy o ich udziale w transporcie fosforanów z przestrzeni periarbuskularnej do protoplastu komórki roślinnej (JAVOT i współaut. 2007). W przypadku grzybów ektomikoryzy do chwili obecnej nie znaleziono żadnych transporterów specyficznie indukowanych mikoryzą. U topoli opisano natomiast dwa geny *Pht1*, których ekspresja wzrasta po kolonizacji korzeni grzybem, stąd przypuszcza się, że są one zaangażowane w dostarczanie fosforanów do komórek rośliny po ich uwolnieniu przez sieć Hartiga do przestrzeni apoplastu (BECQUER i współaut. 2014).

PERSPEKTYWY

Zmniejszenie zużycia nawozów fosforowych jest niezwykle trudne, gdyż większość, nawet ponad 90%, obecnego w glebie fosforu występuje w formie organicznej i nie jest bezpośrednio dostępna dla roślin (LAMBERS i współaut. 2008). Dlatego coraz większe nadzieje wiąże się z genetycznie modyfikowanymi roślinami, które wydajniej pobierają fosfor z gleby lub są bardziej odporne na niedobór fosforu w środowisku, gdyż potrzebują go mniej niż inne gatunki (ZHANG i współaut. 2014). Dodatkowe możliwości stwarza także stosowanie szczepionek mikoryzowych (JEFFRIES i współaut. 2003), bądź odpowiednich szczepów ryzobakterii, które zwiększają dostępność fosforanów w glebie poprzez wydzielanie kwasów organicznych (BHARDWAJ i współaut. 2014).

Jednym z najprostszych do zastosowania rozwiązaniem jest jednoczesna lub naprzemienna uprawa na jednym polu gatunków wydzielających do gleby duże ilości kwasów organicznych lub enzymów, obok gatunków, które takiej zdolności nie posiadają (LI i współaut. 2003, 2007, LAMBERS i współaut. 2006, 2012). Dla przykładu uprawa kukurydzy razem z bobem (*Vicia faba*) na glebie ubogiej w fosfor, ale bogatej w azot skutkuje zwiększeniem masy zebranego ziarna kukurydzy nawet o 49%, a bobu o 22%, natomiast czteroletnia naprzemienna uprawa tych dwóch gatunków powoduje wzrost plonowania kukurydzy o 37% i bobu o 29% w porównaniu z ich uprawą w monokulturze. Wynika to z przynajmniej dziesięciokrotnego zwiększenia dostępności fosforu w podłożu dzięki jego zakwaszeniu przez kwasy cytrynowy i jabłkowy wydzielane przez bób, kiedy korzenie kukurydzy wykazują tendencję do alkalizacji ryzosfery. Bób natomiast, dzięki równoległej uprawie z kukurydzą zmniejsza konkurencję wewnątrzgatunkową, ponieważ jego korzenie rozwijają się na innej głęboko-

ści niż korzenie kukurydzy, a ponadto rośnie on intensywnie w okresie, kiedy wzrost kukurydzy jest niewielki (LI i współaut. 2007). Podobnie, odnotowano wzrost pobierania fosforu przez pszenicę, gdy była ona uprawiana z wydzielającym kwas cytrynowy lubinem białym, natomiast uprawa ciecierzycy pospolitej i pszenicy na organicznym źródle fosforu w postaci fityny zwiększa pobieranie Pi przez pszenicę, prawdopodobnie dzięki fitazom wydzielanym przez ciecierzycę (LI i współaut. 2003). Na nieco odmiennym, aczkolwiek zbliżonym założeniu, opiera się także pomysł wzbogacanie gleb w fosfor dzięki uprawie gatunków, które wydajnie pobierają fosfor z gleby, ale nie posiadają sprawnego systemu remobilizacji fosforanów ze starzejących się liści. Stąd ściółka powstała z liści tych roślin znacząco wzbogaca glebę w fosforany. Tego typu właściwości charakteryzują np. przedstawiciele Proteaceae zasiedlających obszar Chile (LAMBERS i współaut. 2012).

Inne badania obejmują uzyskanie odmian o odpowiedniej architekturze systemu korzeniowego, także z zastosowaniem manipulacji genetycznych, obok klasycznych metod selekcji. W ostatnich latach prowadzonych jest coraz więcej obiecujących badań związanych z mapowaniem grup loci cech ilościowych QTL (ang. quantitative trait loci) odpowiedzialnych za morfologię korzeni, których wyniki mogą zostać wykorzystane w stworzeniu roślin o korzystniejszej dla pozyskiwania fosforu z gleby architekturze systemu korzeniowego (LÓPEZ-ARREDONDO i współaut. 2014, BAKER i współaut. 2015, MANAVALANI i współaut. 2015). Podejście to zdołano skutecznie wykorzystać przy stworzeniu kilku odmian soi (WANG i współaut. 2014) oraz fasoli, która charakteryzowała się silnie rozgałęzioną górną częścią systemu korzeniowego (VANCE 2008). LAMBERS i współaut. (2006) postulują natomiast poznanie podłoża genetycznego procesu rozwoju kłastrów korzeniowych i wprowadzenie zidentyfikowanych genów do roślin uprawnych, pod kontrolą promotorów specyficznych dla korzenia i indukowanych głodzeniem fosforanowym.

Genetyczna modyfikacja roślin związana ze wzrostem ekspresji genów transporterów fosforanowych nie jest jeszcze dobrze rozwinięta. W przypadku nadekspresji w ryżu genu transportera *OsPht1;1* wzrost zawartości fosforu w roślinie odnotowywano tylko przy optymalnym lub wysokim stężeniu Pi w podłożu, a w warunkach jego deficytu nie zaobserwowano żadnych zmian (SUN i współaut. 2012). Podobnie, nadekspresja *OsPht1;8* w warunkach deficytu fosforu nie przyniosła pozytywnych rezultatów, natomiast u ryżu uprawianego na podłożu zawierającym 300 μM Pi spowodowała zahamowanie wzrostu

wywołane zbyt wysoką zawartością fosforu w roślinach (JIA i współaut. 2008). Zadowalające efekty zaobserwowano natomiast w przypadku zwiększenia ilości plazmolemowej H^+ -ATPazy u *Arabidopsis* (NGUYEN i współaut. 2015).

Bardziej zaawansowane są badania polegające na wprowadzaniu do genomu roślin dodatkowych genów kodujących białka zaangażowane w syntezę i wydzielanie karboksylanów, kwaśnych fosfatyz i fitaz. Mogą to być geny pochodzenia bakteryjnego, grzybowego lub z innych gatunków roślin (ZHANG i współaut. 2014). W przypadku roślin transgenicznych, które miałyby uwalniać do gleby więcej kwasów organicznych, naukowcy obierają jeden z dwóch celów: (i) wzrost syntezы karboksylanów bądź też (ii) wzrost ich wydzielania do ryzosfery (LÓPEZ-ARREDONDO i współaut. 2014). Przykładem pierwszego podejścia są rośliny z transgenem syntazy cytrynianowej, np. marchew (*Daucus carota*), do której wprowadzono gen z rzodkiewnika (CIERESZKO 2005), a także rośliny tytoniu z genem kodującym dehydrogenazę jabłczanową z *Penicillium oxalicum*. W tym ostatnim przypadku, po wprowadzeniu grzybowego genu do genomu tytoniu, udało się uzyskać rośliny o dwukrotnie większej biomacie i gromadzące ponad trzy razy więcej fosforu niż rośliny nietransformowane. Wzrost wydzielania karboksylanów uzyskuje się natomiast poprzez nadekspresję genów kodujących odpowiednie transportery (LÓPEZ-ARREDONDO i współaut. 2014). Częściej stosuje się jednak modyfikacje oparte na wprowadzaniu do roślin genów wydzielniczych fitaz lub kwaśnych fosfatyz o aktywności fitaz (ZHANG i współaut. 2014). Rośliny te charakteryzują się zdecydowanie lepszym wzrostem na podłożu zawierającym fitynę niż typ dziki. W przypadku rzodkiewnika z fitazą MtPHY1 z *Medicago truncatula* osiągnięto np. 12 do 16 razy większą aktywność fitaz w apoplacie korzenia, co przełożyło się na trzy do czterokrotnie większą wysokość roślin transformowanych w stosunku do kontroli (XIAO i współaut. 2005). Niestety, obserwacje *in vitro* często nie przekładają się na zwiększenie wzrostu rośliny w środowisku naturalnym, gdy konkuruje ona o źródła fosforu z mikroorganizmami glebowymi (LÓPEZ-ARREDONDO i współaut. 2014). Dlatego w dziedzinie genetycznych modyfikacji roślin mających na celu zwiększenie wydajności pobierania P_i z gleby wiele pozostaje jeszcze do zrobienia.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję Pani prof. Grażynie Kłobus za poprawienie manuskryptu pracy, a także Pani prof. Iwonie Ciereszko, Pani dr Ewie Żebrowskiej oraz Redakcji Postę-

pów Biologii Komórki za zgodę na przedruk Ryciny 1.

STRESZCZENIE

Wiele gleb, także uprawnych, charakteryzuje się bardzo niskim stężeniem rozpuszczonych w roztworze glebowym jonów fosforanowych, które są jedyną formą fosforu pobieraną przez rośliny. Jednocześnie, znaczną pulę fosforu glebowego stanowią organiczne formy tego pierwiastka, a dodatkowo duża frakcja fosforanów immobilizowana jest przez składniki gleby. Z tego powodu rośliny wykształciły wiele przystosowań ułatwiających im wydajne korzystanie z ograniczonych zasobów fosforu glebowego. Są to m.in. zmiany w budowie systemu korzeniowego mające na celu zwiększenie jego powierzchni chłonnej, tworzenie relacji symbiotycznych z grzybami mikoryzowymi, wzrost aktywności lub ilości białek odpowiedzialnych za pobieranie fosforanów z gleby, a także wydzielanie przez korzenie enzymów i kwasów organicznych, które uwalniają fosforany z obecnych w glebie związków organicznych i nieorganicznych. Celem niniejszej pracy jest omówienie wspomnianych przystosowań.

LITERATURA

- ABRAHÃO A., LAMBERS H., SAWAYA A. C., MAZZAFERA P., OLIVEIRA R. S., 2014. *Convergence of a specialized root trait in plants from nutrient-impooverished soils: phosphorus-acquisition strategy in a nonmycorrhizal cactus*. *Oecologia* 176, 345-355.
- ADAMCZYK B., GODLEWSKI M., 2010. *Różnorodność strategii pozyskiwania azotu przez rośliny*. *Kosmos* 59, 211-222.
- AYADI A., DAVID P., ARRIGHI J.F., CHIARENZA S., THIBAUD M. C., NUSSAUME L., MARIN E., 2015. *Reducing the genetic redundancy of Arabidopsis PHOSPHATE TRANSPORTER1 transporters to study phosphate uptake and signaling*. *Plant Physiol.* 167, 1511-1526.
- BAKER A., CEASAR S. A., PALMER A. J., PATERSON JB, Q. I. W., MUENCH S. P., BALDWIN S. A., 2015. *Replace, reuse, recycle: improving the sustainable use of phosphorus by plants*. *J. Exp. Bot.* 66, 3523-3540.
- BĄCZEK-KWINTA B., 2015. *Korzenie-szczotki, liście na baczność, echolokacja – jak szczegóły budowy zewnętrznej pozwalają roślinom na dostosowanie się do środowiska*. *Kosmos* 308, 485-499.
- BECQUER A., TRAP J., IRSHAD U., ALI M. A., CLAUDE P., 2014. *From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association*. *Front. Plant Sci.* 5, 548.
- BHARDWAJ D., ANSARI M. W., SAHOO R. K., TUTEJA N., 2014. *Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity*. *Microb. Cell Fact.* 13, 66.
- BUCHER M., 2007. *Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces*. *New Phytol.* 173, 11-26.
- BUSCOT F., 2015. *Implication of evolution and diversity in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses*. *J. Plant. Physiol.* 172, 55-61.
- CHEVALIER F., PATA M., NACRY P., DOUMAS P., ROSSIGNOL M., 2003. *Effects of phosphate availability on the root system architecture: large-scale analysis of the natural variation between Arabidopsis accessions*. *Plant Cell Environ.* 26, 1839-1850.

- CIERESZKO I., 2005. Czy można usprawnić pobieranie fosforu przez rośliny? *Kosmos* 54, 391-400.
- CZERWIŃSKI W., 1976. *Fizjologia roślin*. Polskie Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- GONZÁLEZ-MUÑOZ E., AVENDAÑO-VÁZQUEZ A. O., MONTES R. A., DE FOLTER S., ANDRÉS-HERNÁNDEZ L., ABREU-GOODGER C., SAWERS R. J., 2015. The maize (*Zea mays* ssp. *mays* var. B73) genome encodes 33 members of the purple acid phosphatase family. *Front. Plant Sci.* 6, 341.
- GRIMAL J. Y., FROSSARD E., MOREL J. L., 2001. Maize root mucilage decreases adsorption of phosphate on goethite. *Biol. Fertil. Soils* 33, 226-230.
- GU M., CHEN A., DAI X., LIU W., XU G., 2011. How does phosphate status influence the development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Plant Signal Behav.* 6, 1300-1304.
- HOCKING P. J., JEFFERY S., 2004. Cluster-root production and organic anion exudation in a group of old-world lupins and a new-world lupin. *Plant Soil* 258, 135-150.
- JAVOT H., PUMPLIN N., HARRISON M. J., 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.* 30, 310-322.
- JEFFRIES P., GIANINAZZI S., PEROTTO S., TURNAU K., BAREA J. M., 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol. Fertil. Soils* 37, 1-16.
- JIA H., REN H., GU M., ZHAO J., SUN S., ZHANG X., CHEN J., WU P., XU G., 2011. The Phosphate Transporter Gene *OsPht1;8* Is Involved in Phosphate Homeostasis in Rice. *Plant Physiol.* 156, 1164-1175.
- LAMBERS H., SHANE M. W., 2007. Role of root clusters in phosphorus acquisition and increasing biological diversity in agriculture. [W:] *Scale and complexity in plant systems research: gene-plant-crop relations*. SPIERTZ J. H. J., STRUIK P. C. VAN LAAR H. H. (red.). Springer, New York, 237-250.
- LAMBERS H., SHANE M. W., CRAMER M. D., PEARSE S. J., VENEKLAAS E. J., 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching morphological and physiological traits. *Ann. Bot.* 98, 693-713.
- LAMBERS H., CHAPIN III F. S., PONS T. L., 2008. *Plant physiological ecology*. Springer Science+Business Media LLC, Philadelphia.
- LAMBERS H., BISHOP J. G., HOPPER S. D., LALIBERTE E., ZUÑIGA-FEEST A., 2012. Phosphorus-mobilization ecosystem engineering: the roles of cluster roots and carboxylate exudation in young P-limited ecosystems. *Ann. Bot.* 110, 329-348.
- LAMBERS H., MARTINOIA E., RENTON M., 2015. Plant adaptations to severely phosphorus-impooverished soils. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25, 23-31
- LAMONT B., 1982. Mechanisms for enhancing nutrient uptake in plants, with particular reference to mediterranean South Africa and Western Australia. *Bot. Rev.* 48, 597-689.
- LAMONT B., 2003. Structure, ecology and physiology of root clusters – a review. *Plant Soil* 248, 1-19.
- LAMONT B., 1974. The biology of dauciform roots in the sedge *Cyathochaete avenacea*. *New Phytol.* 73, 985-996.
- LI L., TANG C., RENGEL Z., ZHANG F., 2003. Chickpea facilitates phosphorus uptake by intercropped wheat from an organic phosphorus source. *Plant Soil* 248, 297-303.
- LI L., LI S. M., SUN J. H., ZHOU L. L., BAO X. G., ZHANG H. G., ZHANG F. S., 2007. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 11192-11196.
- LIANG C., WANG J., ZHAO J., TIAN J., LIAO H., 2014. Control of phosphate homeostasis through gene regulation in crops. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 59-66.
- LÓPEZ-ARREDONDO D. L., LEYVA-GONZÁLEZ M. A., GONZÁLEZ-MORALES S. I., LÓPEZ-BUCIO J., HERRERA-ESTRELLA L., 2014. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Ann. Rev. Plant Biol.* 65, 95-123.
- LÓPEZ-BUCIO J., HERNÁNDEZ-ABREU E., SÁNCHEZ-CALDERÓN L., NIETO-JACOBO M. F., SIMPSON J., HERRERA-ESTRELLA L., 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* 12, 244-256.
- MANAVALAN L. P., PRINCE S. J., MUSKET T. A., CHAKY J., DESHMUKH R., VUONG T. D., SONG L., CREGAN P. B., NELSON J. C., SHANNON J. G., SPECHT J. E., NGUYEN H. T., 2015. Identification of novel QTL governing root architectural traits in an interspecific soybean population. *PLoS One* 10, e0120490.
- MISSON J., THIBAUD M. C., BECHTOLD N., RAGHOTHAMA K., NUSSAUME L., 2004. Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis Pht1;4*, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol. Biol.* 55, 727-741.
- MUDGE S. R., RAE A. L., DIATLOFF E., SMITH F. W., 2002. Expression analysis suggests novel roles for members of the *Pht1* family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31, 341-353.
- NATH M., TUTEJA N., 2015. *NPKS uptake, sensing, and signaling and miRNAs in plant nutrient stress*. *Protoplasma* DOI 10.1007/s00709-015-0845-y.
- NEW ZEALAND PLANT CONSERVATION NETWORK. Protokół dostępu: http://www.nzpcn.org.nz/flora_details.aspx?ID=1176; data dostępu: 27.11.2015.
- NGUYEN G. N., ROTHSTEIN S. J., SPANGENBERG G., KANT S., 2015. Role of microRNAs involved in plant response to nitrogen and phosphorous limiting conditions. *Front. Plant Sci.* 6, 629.
- NUSSAUME L., KANNO S., JAVOT H., MARIN E., POUCHON N., AYADI A., NAKANISHI T. M., THIBAUD M. C., 2011. Phosphate Import in Plants: Focus on the *PHT1* Transporters. *Front. Plant Sci.* 2, 83.
- PAUNGFUO-LONHIENNE C., LONHIENNE T. G., RENTSCH D., ROBINSON N., CHRISTIE M., WEBB R. I., GAMAGE H. K., CARROLL B. J., SCHENK P. M., SCHMIDT S., 2008. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 4524-4529.
- PAUNGFUO-LONHIENNE C., LONHIENNE T. G., MUDGE S. R., SCHENK P. M., CHRISTIE M., CARROLL B. J., SCHMIDT S., 2010. DNA is taken up by root hairs and pollen, and stimulates root and pollen tube growth. *Plant Physiol.* 153, 799-805.
- PÉRET B., CLÉMENT M., NUSSAUME L., DESNOS T., 2011. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends Plant Sci.* 16, 442-450.

- PLASSARD C., DELL B., 2010. *Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees*. *Tree Physiol.* 30, 1129-1139.
- PLAXTON W. C., TRAN H. T., 2011. *Metabolic adaptations of phosphate-starved plants*. *Plant Physiol.* 156, 1006-1015.
- PLAYSTED C. W., JOHNSTON M. E., RAMAGE C. M., EDWARDS D. G., CAWTHRAY G. R., LAMBERS H., 2006. *Functional significance of dauciform roots: exudation of carboxylates and acid phosphatase under phosphorus deficiency in *Cyperus blakei* (Cyperaceae)*. *New Phytol.* 170, 491-500.
- ROBINSON W. D., PARK J., TRAN H. T., DEL VECCHIO H. A., YING S., ZINS J. L., PATEL K., MCKNIGHT T. D., PLAXTON W. C., 2012. *The secreted purple acid phosphatase isozymes AtPAP12 and AtPAP26 play a pivotal role in extracellular phosphate-scavenging by *Arabidopsis thaliana**. *J. Exp. Bot.* 63, 6531-6542.
- ROSENFELD C. L., REED D. W., KENT M. W., 1991. *Dependency of iron reduction on development of a unique root morphology in *Ficus benjamina* L.* *Plant Physiol.* 95, 1120-1124.
- SCHENK G., MITIĆ N., HANSON G. R., COMBA P., 2013. *Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme*. *Coord. Chem. Rev.* 257, 473-482.
- SHANE M. W., LAMBERS H., 2005. *Cluster roots: a curiosity in context*. *Plant Soil* 274, 101-125.
- SHANE M. W., CAWTHRAY G. R., CRAMER M. D., KUO J., LAMBERS H., 2006. *Specialized 'dauciform' roots of Cyperaceae are structurally distinct, but functionally analogous with 'cluster' roots*. *Plant Cell Environ.* 29, 1989-1999.
- SHIN H., SHIN H. S., DEWBRE G. R., HARRISON M. J., 2004. *Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments*. *Plant J.* 39, 629-642.
- SMITH S. E., SMITH F. A., 2012. *Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth*. *Mycologia* 104, 1-13.
- STETTER M. G., SCHMID K., LUDEWIG U., 2015. *Uncovering genes and ploidy involved in the high diversity in root hair density, length and response to local scarce phosphate in *Arabidopsis thaliana**. *PLoS One* 10, e0120604.
- SUN S., GU M., CAO Y., HUANG X., ZHANG X., AI P., ZHAO J., FAN X., XU G., 2012. *A constitutive expressed phosphate transporter, OsPht1;1, modulates phosphate uptake and translocation in phosphate-replete rice*. *Plant Physiol.* 159, 1571-1581.
- TRAN H. T., HURLEY B. A., PLAXTON W. C., 2010. *Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition*. *Plant Sci.* 179, 14-27.
- TRAN H. T., QIAN W., HURLEY B. A., SHE Y. M., WANG D., PLAXTON W. C., 2010. *Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana**. *Plant Cell Environ.* 33, 1789-1803.
- VANCE C. P., 2008. *Plants without arbuscular mycorrhizae*. [W:] *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions*. WHITE P. J. HAMMOND J. P. (red.). Springer Science, Business Media B.V., Dordrecht, 117-142.
- VANCE C. P., 2001. *Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant Physiol.* 127, 390-397.
- WANG L., LI Z., QIAN W., GUO W., GAO X., HUANG L., WANG H., ZHU H., WU J. W., WANG D., LIU D., 2011. *The *Arabidopsis* purple acid phosphatase AtPAP10 is predominantly associated with the root surface and plays an important role in plant tolerance to phosphate limitation*. *Plant Physiol.* 157, 1283-1299.
- WANG L., LU S., ZHANG Y., LI Z., DU X., LIU D., 2014. *Comparative genetic analysis of *Arabidopsis* purple acid phosphatases AtPAP10, AtPAP12, and AtPAP26 provides new insights into their roles in plant adaptation to phosphate deprivation*. *J. Integr. Plant Biol.* 56, 299-314.
- WATERS B. M., BLEVINS D. G., 2000. *Ethylene production, cluster root formation, and localization of iron (III) reducing capacity in Fe deficient squash roots*. *Plant Soil* 225, 21-31.
- WATT M., EVANS J. R., 1999. *Proteoid roots. Physiology and development*. *Plant Physiol.* 121, 317-323.
- XIAO K., HARRISON M. J., WANG Z. Y., 2005. *Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis**. *Planta* 222, 27-36.
- XU W., SHI W., JIA L., LIANG J., ZHANG J., 2012. *TFT6 and TFT7, two different members of tomato 14-3-3 gene family, play distinct roles in plant adaptation to low phosphorus stress*. *Plant Cell Environ.* 35, 1393-1406.
- ZHANG R., LIU G., WU N., GU M., ZENG H., ZHU Y., XU G., 2011. *Adaptation of plasma membrane H⁺ ATPase and H⁺ pump to P deficiency in rice roots*. *Plant Soil* 349, 3-11.
- ZHANG Z., LIAO H., LUCAS W. J., 2014. *Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants*. *J. Integr. Plant Biol.* 56, 192-220.
- ŻEBROWSKA E., CIERESZKO I., 2007. *Pobieranie i transport fosforanów w komórkach roślin*. *Post. Biol. Kom.* 34, 283-298.
- ŻEBROWSKA E., CIERESZKO I., 2009. *Udział kwasnych fosfatyz w gospodarce fosforanowej komórek roślinnych*. *Post. Biol. Kom.* 36, 583-599.

KOSMOS Vol. 65, 3, 419–431, 2016

SOME ASPECTS OF PLANTS ADAPTATIONS TO PHOSPHORUS DEFICIENCY IN THE SOIL ENVIRONMENT

MAGDALENA ZBOIŃSKA

*Department of Plant Molecular Physiology, Institute of Experimental Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Wrocław,
Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław, e-mail: magdalena.zboinska@uwr.edu.pl*

Summary

Inorganic phosphates are the only form of phosphorus which plants can take up. Unfortunately, in most soils, including agricultural soils, concentration of phosphate ions in soil solutions is very low. On the other hand, considerable part of soil phosphorus pool is present in the form of phosphoroorganic compounds and a great fraction of phosphates is immobilized by soil particles. For these reasons, plants have developed many adaptations which facilitate more efficient use of the limited soil phosphates sources. These adaptations include changes in the root system architecture to enlarge the sorption area, formation of mycorrhizal associations, increase of activity or abundance of proteins responsible for phosphate ions uptake, as well as secretion of enzymes and organic acids which release phosphate ions from organic and inorganic phosphorous compounds. The goal of this paper is to outline the current state of knowledge about these adaptations.