

POBIERANIE JONÓW AMONOWYCH PRZEZ ROŚLINY WYŻSZE

Uptake of ammonium ions by higher plants

Genowefa KUBIK-DOBOSZ

Summary: This review describes the current investigations concerning the uptake and transport of NH_4^+ into root cells. During the past few years the mechanisms of ammonium uptake by higher plants have been characterised. It was found that uptake of ammonium is mediated by two functionally distinct plasma membrane-bound transport systems. One of them operates at low external concentrations of NH_4^+ (<1 mM) and transports ammonium into cells against its electrochemical gradient. The electrical potential gradient is maintained by the activity of plasma membrane H^+ -ATPase that provides the driving force for the transport of NH_4^+ . Recently, a gene encoding a high affinity transport system (HATS) was identified in *Arabidopsis thaliana*. It was found that this protein carrier is conserved over a broad range of organisms (bacteria, yeast, plants and animals). A passive, electrogenic, low affinity transport system (LATS) operates at high ammonium concentrations (>1 mM) and is mediated probably by ion channels.

Key words: ammonium uptake, flux through plasma membrane, NH_4^+ transport systems.

Dr Genowefa Kubik-Dobosz, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki, Uniwersytet Wrocławski, ul. Kanonia 6/8, 50–328 Wrocław.

WSTĘP

Azot należy do podstawowych składników mineralnych warunkujących wzrost i rozwój organizmów roślinnych. Najbardziej obfitym źródłem azotu jest atmosfera, jednakże tylko nieliczne gatunki roślin, zdolne do symbiozy z mikroorganizmami glebowymi, mogą wykorzystywać azot gazowy. Pozostałe rośliny pobierają azot mineralny z roztworu glebowego.

Gleby różnią się pomiędzy sobą nie tylko zasobnością w azot, ale i formą jego występowania. W żyznych, dobrze natlenionych glebach uprawnych, dominującą formą azotu są jony azotanowe (NO_3^-), powstające w wyniku procesu nityfikacji organicznego azotu. Jony amonowe (NH_4^+), wytwarzane w procesie amonifikacji lub też dostarczane w trakcie nawożenia, są szybko utleniane przez mikroorganizmy nityfikacyjne do azotanów. Jednakże przy zbyt niskim pH gleby, przy obniżonej temperaturze,

jak również przy niedostatku tlenu w glebie, proces nityfikacji jest zahamowany i w roztworze glebowym gromadzą się jony amonowe [81].

W tkankach fotosyntetyzujących roślin C_3 ważnym źródłem NH_4^+ jest przemiana glicyny w szlaku fotorespiracyjnym. Przepływ NH_4^+ w tym szlaku jest 8–10 razy większy niż w szlaku pierwotnej biosyntezy aminokwasów [30]. Na terenach zanieczyszczonych ekologicznie, liście roślin mogą pobierać z atmosfery znaczące ilości gazowego NH_3 , a także emitować go do atmosfery w takiej samej formie [15, 25, 40, 71]. Miejscem wymiany gazowego NH_3 są szparki liściowe. Obliczono, że przy zwiększeniu z 14 do 709 $\mu\text{g m}^{-3}$ zawartości NH_3 w powietrzu, udział NH_3 pobranego przez liście w całkowitej puli azotu w roślinie wzrasta z 4% do 77% [53].

Dla rozwoju większości gatunków roślin odpowiedniejszą formą azotu są jony azotanowe, natomiast wiele gatunków traw, turzyc, przedstawicieli rodziny *Ericaceae* czy drzew iglastych

tych, rosną lepiej w środowisku zasobniejszym w jony amonowe [32]. Jony NH_4^+ są pobierane chętnie przez wszystkie rośliny, jednakże w warunkach, w których tempo pobierania jest większe niż metaboliczna asymilacja NH_4^+ , w roślinach gromadzą się wolne jony amonowe wywołując charakterystyczne toksyczne objawy [8, 55]. Rośliny asymilujące jony amonowe w korzeniach charakteryzują się większą tolerancją na NH_4^+ niż rośliny przemieszczające je do części nadziemnych [2].

Przyczyn toksycznego oddziaływania nadmiaru jonów NH_4^+ doszukiwano się przede wszystkim w zakwaszaniu środowiska wynikającym z pobierania NH_4^+ , ponieważ podczas asymilacji NH_4^+ w cytoplazmie, uwalnia się 1–1,6 cząsteczek H^+ na cząsteczkę pobranego NH_4^+ [14, 64]. Zaobserwowano jednak, że uprawa roślin w kontrolowanych warunkach, zapobiegających zakwaszaniu środowiska, umożliwia wzrost roślin na NH_4^+ podobny do osiąganego w obecności azotanów [75]. Powyższe obserwacje doprowadziły do sformułowania poglądu, że nie same jony NH_4^+ lecz wzrastająca kwasowość, związana z pobieraniem tych kationów, jest odpowiedzialna za objawy toksyczności [66]. Doświadczenia przeprowadzone na siewkach *Pinus silvestris*, charakteryzujących się naturalną odpornością na niskie pH wykazały jednak, że samo obniżenie pH środowiska nie wywołuje charakterystycznych deformacji części merystematycznych korzeni [82] i problem pozostaje nadal otwarty. Optymalnym dla wzrostu roślin wydaje się układ, w którym rośliny pobierają równocześnie NO_3^- i NH_4^+ [61, 82], ponieważ eliminowane są zmiany odczynu roztworu (odpowiednio alkalizacja lub zakwaszenie) związane z pobieraniem tych jonów.

Utrzymanie równowagi ładunków po obu stronach plazmolemy i stabilizacja cytoplazmatycznego pH wymaga usunięcia protonów poza obręb cytoplazmy, do ryzosfery. Transport protonów do soku wakuoli ma tu niewielkie znaczenie z powodu jego niskiego pH [64]. Przy niskich wartościach zewnętrznego pH stosunek usuwanego H^+ do pobranego NH_4^+ znacząco się obniża, osiągając wartość 0,1 przy pH 3,5, natomiast przy pH 8,0 jego wartość wynosi 3,1 [14].

Tempo pobierania poszczególnych form azotu zależy od ogólnej zawartości mineralnego azotu w glebie. Przy niskich stężeniach azotu, jony amonowe pobierane są szybciej niż jony azotanowe, natomiast przy wyższych stężeniach, rośliny absorbują więcej NO_3^- [4]. U większości roślin głównym miejscem asymilacji pobranego NH_4^+ są korzenie, a przemieszczanie wolnych jonów amonowych do części nadziemnych jest niewielkie [9, 62, 72]. Azot amonowy transportowany jest do pędów w soku ksylemu lub floemu, w postaci aminokwasów, amidów lub ureidów [64].

Pobieranie jonów amonowych przez korzenie roślin wyższych obejmuje następujące fazy o różnej kinetyce:

1. Adsorpcję NH_4^+ na powierzchni korzenia,
2. Wnikanie NH_4^+ do ścian komórkowych (wolnej przestrzeni Donnana) i transport przez plazmolemę do cytoplazmy,
3. Fazę cytoplazmatyczną, związaną z asymilacją NH_4^+ w komórce.

Adsorpcja jonów NH_4^+ na powierzchni komórek zachodzi na drodze sorpcji wymiennej z jonami H^+ i jest procesem niemetyabolicznym. Ujemny ładunek ścian komórkowych, wynikający z obecności zjonizowanych reszt karboksylowych, umożliwia masowy przepływ lub dyfuzję NH_4^+ do apoplastu. Białkowo-lipidowa plazmolema stanowi natomiast barierę uniemożliwiającą swobodną dyfuzję NH_4^+ do cytoplazmy.

Faza cytoplazmatyczna polega na metabolizowaniu NH_4^+ do aminokwasów przy udziale systemu dwu enzymów (syntetazy glutaminowej i syntazy glutaminianowej). Przy nadmiarze NH_4^+ w środowisku, jony amonowe są asymilowane przez dehydrogenazę glutaminianową. Wytworzone aminokwasy pozostają w korzeniu lub są transportowane do pędu.

Połowiczny czas wymiany NH_4^+ ($t_{1/2}$) w wymienionych wyżej fazach przyjmuje zbliżone wartości dla różnych gatunków roślin i wynosi odpowiednio 2–3 sek., 30 sek.-1 min i 8–14 min [33, 83]. Nie zależy on przy tym od wysokości zewnętrznego stężenia NH_4^+ , mimo że rośliny rosnące wcześniej w środowisku pozbawionym azotu, po przeniesieniu do roztworu NH_4^+ po-

bierają więcej jonów amonowych niż rośliny pretraktowane jonami NH_4^+ lub NO_3^- [44, 46, 57].

PRZEPLYW PRZEZ BŁONY

Błona białkowo-lipidowa nie stanowi barierę dla drobnych, pozbawionych ładunku cząsteczek, które wnikać do komórki na zasadzie dyfuzji prostej. Cząsteczki obdarzone ładunkiem mogą przenikać przez błonę białkowo-lipidową na zasadzie dufuzji ułatwionej, a w ich przenoszeniu uczestniczą kanały jonowe bądź nośniki (transportery) zlokalizowane w błonie. Przez wiele lat akceptowano teorię o swobodnym przenikaniu przez plazmolemę małej, lipofilnej cząsteczki NH_3 . Według niej amoniak wnikałby do komórek korzeni wyłącznie w postaci polarnej, elektrycznie obojętnej cząsteczki. Taka cząsteczka może łatwo przechodzić przez dwuwarstwową błonę białkowo-lipidową na zasadzie dyfuzji prostej. Jednakże cząsteczka NH_3 w środowisku wodnym zachowuje się jak słaba zasada i po przyłączeniu protonu przechodzi w formę NH_4^+ , a pK tej reakcji wynosi 9,25. Poniżej pH 6,0 tylko 0,06% amonu pozostaje w postaci NH_3 i dopiero powyżej pH 8,0 znaczące ilości NH_3 mogłyby dyfundować do komórki [19]. Przy wartościach pH występujących w ryzosferze i komórkach korzeni (odczyn kwaśny i obojętny) powyższa teoria nie znajduje potwierdzenia, ponieważ w takich warunkach dochodzi do przyłączenia protonu, a cząsteczka NH_4^+ nie jest zdolna do dyfuzji prostej przez błonę białkowo-lipidową. W warunkach fizjologicznych dyfuzja prosta NH_3 przez plazmolemę ma zatem jedynie marginesowe znaczenie.

Przeptyw NH_4^+ przez błony jest dwukierunkowy i obejmuje dwa przeciwstawne procesy, takie jak wnikanie do komórki (ang. influx) oraz wypływ na zewnątrz (ang. efflux). Na pobieranie netto jonów amonowych przez rośliny składa się zatem skierowane do wewnątrz i na zewnątrz przemieszczanie NH_4^+ w poprzek plazmolemy komórek korzenia [27, 57, 76, 84]. W sprzyjających warunkach komórki korzeni pobierają duże ilości NH_4^+ , wynoszące 6–22 $\mu\text{moli godz}^{-1} \text{g}^{-1}$ świeżej masy korzeni roślin traktowanych 0,1–2mM NH_4^+ [11, 49, 50, 54, 63].

Wraz ze wzrostem stężenia NH_4^+ w środowisku, zwiększa się ilość pobieranych jonów NH_4^+ , chociaż nie obserwuje się tu ściśle proporcjonalności. Kronzucker i wsp. [33] przeprowadzili interesujące doświadczenie, w którym mierzyli szybkość wnikania NH_4^+ oraz stężenie tych jonów w wolnej przestrzeni Donnana i cytoplazmie komórek korzeni siewek jodły różnicowanych pod względem zaopatrzenia w azot podczas wstępnej fazy wzrostu roślin. Cytowani autorzy stwierdzili, że szybkość wnikania jonów NH_4^+ do komórek korzeni jodły nie pretraktowanej wcześniej azotem wynosi 0,96 $\mu\text{mola g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$ (pobieranie mierzono przy 10 μM NH_4^+), podczas gdy w roślinach uprawianych przy stałym dostępie NH_4^+ wynoszącym 10, 100 μM lub 1,5 mM, do korzeni wnika odpowiednio 0,21; 1,96 i 6,45 $\mu\text{mola NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$. Równocześnie z komórek korzeni jodły rosnącej uprzednio bez azotu wypływa 9% pobranych jonów amonowych, a z traktowanej 10, 100 μM lub 1,5 mM NH_4^+ odpowiednio 10%, 28% i 35%. Stężenie NH_4^+ w wolnej przestrzeni Donnana tych komórek, w zależności od stężenia NH_4^+ stosowanego podczas uprawy roślin (0, 10 μM , 100 μM lub 1,5 mM), wynosi 84, 50 μM oraz 0,7 i 8 mM. Cytoplazmatyczne stężenie NH_4^+ w korzeniach jodły nie traktowanej wcześniej azotem wynosi 6 mM, a w roślinach rosnących przy 10 μM , 100 μM lub 1,5 mM NH_4^+ osiąga odpowiednio 2, 14 oraz 33 mM.

Nadmierna akumulacja jonów NH_4^+ w cytoplazmie stymuluje usuwanie tych jonów z komórek [27, 42, 45]. Dla poszczególnych kompartmentów połowiczny czas wymiany jonów NH_4^+ wypływających z komórki przyjmuje różne wartości. Obliczono, że dla cytoplazmy, wolnej przestrzeni Donnana, wolnej przestrzeni wodnej i powierzchni komórek korzeni cebuli wynosi on odpowiednio 68,6; 12,2; 1,93 i 0,31 min, a dla tych samych kompartmentów komórek korzeni jodły połowiczny czas wymiany osiąga 14 min, 30 sek. i 2 sek. [34, 50]. Przeptyw NH_4^+ z wakuoli do cytoplazmy komórek cebuli zachodzi z szybkością $5,57 \times 10^9 \text{ mola m}^{-2} \text{sek.}^{-1}$, a z cytoplazmy do środowiska zewnętrznego z szybkością $0,62 \times 10^9 \text{ mola m}^{-2} \text{sek.}^{-1}$.

Przy różnicy potencjału elektrycznego w poprzek plazmolemy wynoszącej 32 mV, a w poprzek tonoplastu 0 mV, przepływ NH_4^+ przez plazmolemę i tonoplast wynosi $3,33$ i $8,43 \times 10^9$ mola $\text{m}^{-2} \text{sek}^{-1}$. Stężenie NH_4^+ w cytoplazmie i wakuoli osiąga odpowiednio 75,8 i 10,9 mM przy stężeniu NH_4^+ na zewnątrz komórek wynoszącym 2 mM [50].

SYSTEMY TRANSPORTUJĄCE

Mechanizm transportu NH_4^+ przez plazmolemę jest procesem nie do końca wyjaśnionym. Fakt, że w zakresie pH charakterystycznym dla większości gleb amoniak jest obdarzony ładunkiem i nie jest zdolny do swobodnego przechodzenia przez błony, nasunął przypuszczenie istnienia specyficznych kanałów lub nośników dla NH_4^+ .

Kinetyczne badania związane z pobieraniem jonów amonowych dostarczyły informacji, że ten proces może przebiegać zgodnie z pojedynczym, dwufazowym lub wielofazowym wzorem tworzonym przez przynajmniej dwa składniki: nasycający się system transportowy zależny od nośnika, funkcjonujący przy niskich stężeniach NH_4^+ i liniowy, dyfuzyjny system, aktywny przy wysokich stężeniach jonów amonowych [17, 29, 77]. Powyższe dane sugerowały, że w pobieranie netto NH_4^+ zaangażowany jest więcej niż jeden system transportujący. W obrębie stężeń 0–1 mM pobieranie NH_4^+ odpowiadało kinetyce typu Michaelis-Menten z tylko jedną K_m [3, 5, 47, 88].

Kompleksowe badania przeprowadzone w ostatnich latach na siewkach ryżu dowiodły, że w błonach komórkowych roślin istnieją dwa systemy transportujące jony NH_4^+ [84]. Pierwszy z nich to system o wysokim powinowactwie do NH_4^+ , nazwany HATS (ang. high-affinity transport system), funkcjonujący przy niskich zakresach stężeń jonów amonowych (poniżej 1 mM). Natomiast drugi, to system o niskim powinowactwie, LATS (ang. low-affinity transport system), który jest efektywny w wyższych zakresach stężeń NH_4^+ (od 1 mM do 40 mM). Wykazano, że działanie systemu HATS w korzeniach ryżu umożliwia absorbowanie wystarczających

ilości jonów amonowych, nawet przy bardzo niskim stężeniu tego jonu w ryzosferze [84]. Przy wyższym zakresie egzogennych stężeń jonów amonowych, w pobieraniu NH_4^+ przez korzenie ryżu uczestniczy także system LATS. Przepływ NH_4^+ przez system HATS, zachodzący prawdopodobnie przy udziale nośnika, ma charakter nasycający się, zgodny z kinetyką Michaelis-Menten, natomiast przez LATS – liniowy, przebiegający prawdopodobnie za pośrednictwem kanałów jonowych. Pobieranie NH_4^+ przez system HATS i w mniejszym stopniu przez LATS jest procesem zależnym od energii metabolicznej [84].

Powyższe dane zostały potwierdzone w badaniach przeprowadzonych na siewkach jodły, w których zidentyfikowano także dwa systemy o różnej kinetyce, zaangażowane w pobieranie NH_4^+ . W zakresie stężeń 2,5–350 μM NH_4^+ działa system o wysokim powinowactwie (HATS), reprezentujący kinetykę typu Michaelis-Menten. V_{\max} dla HATS wynosi 1,9–2,4 $\mu\text{mola g}^{-1} \text{godz}^{-1}$, a K_m 20–40 μM . Przy stężeniach NH_4^+ wynoszących od 0,5 do 50 mM funkcjonuje liniowy system, o niskim powinowactwie do NH_4^+ (LATS). Kronzucker i wsp. [35] sugerują, że zarówno HATS jak i LATS są systemami konstytucyjnymi.

Rozwój technik genetycznych umożliwił wbudowanie genów kodujących roślinny system HATS do mutantów drożdży nie zawierających własnego systemu transportującego NH_4^+ [60], co pozwoliło ustalić aminokwasową sekwencję wysoce hydrofobowego białkowego nośnika NH_4^+ *Arabidopsis thaliana* (AMT1). Składa się on z 501 aminokwasów i jest prawdopodobnie zakotwiczony w błonie za pośrednictwem 9–12 regionów. Wykazuje wysokie powinowactwo do jonów amonowych, jednakże jest również zdolny do przenoszenia metyloaminy (analoga NH_4^+). Transport metyloaminy przez AMT1 jest kompetycyjnie hamowany przez NH_4^+ , ale nie przez jony K^+ , nawet w 5-krotnym nadmiarze. Fakt ten umożliwia wyraźne odróżnienie systemu AMT1 od innych systemów przenoszenia kationów, takich jak kanał potasowy, przez który jony NH_4^+ transportowane są z 30% wydajnością w stosunku do K^+ [69]. Inne aminy, jak dimetyloamina, trimetyloamina czy

etyloamina nie hamują pobierania metyloaminy, co potwierdza sugestię, że system AMT1 jest wysoce specyficznym nośnikiem jonów NH_4^+ . Okazało się, że białko roślinnego AMT1 jest w znacznym stopniu homologiczne z odpowiednimi białkami transportującymi NH_4^+ u bakterii, drożdży czy zwierząt co wskazuje, że ten typ nośnika jest wysoce konserwatywny u wielu organizmów [60]. Ostatnio wykazano, że sekwencje aminokwasowe białka AMT1 z korzeni *Arabidopsis thaliana* i LeAMT1 z włośników korzeni pomidora są homologiczne w 80% [41]. Transkrypcja mRNA dla LeAMT1 jest specyficznie związana z korzeniami, a ekspresja LeAMT1 we włośnikach jest znacznie większa niż w pozostałych częściach korzenia.

Inhibitory modyfikujące białka zlokalizowane na powierzchni błon plazmatycznych (mersalil i p-chlorortęciobenzenosulfonian – pCMBs) w zbliżonym stopniu hamują pobieranie NH_4^+ przez systemy HATS i LATS [84].

TRANSPORT NH_4^+ DO KOMÓRKI BIERNY CZY AKTYWNY?

Istnieją dwa typy transportu jonów przez membrany. Transport bierny polega na przeniesieniu jonów zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym. W transporcie aktywnym, na przeniesienie jonów przez błony wbrew gradientowi elektrochemicznemu zużywana jest energia zmagazynowana w ATP. Do tej pory nie uzyskano jednoznacznego potwierdzenia, czy transport NH_4^+ do komórek jest procesem aktywnym czy biernym. Wcześniej postulowano wielokrotnie, że jony amonowe wnikają do komórek roślinnych na zasadzie uniportu, polegającym na jednokierunkowym biernym transporcie przez błony danego jonu, a w przeniesieniu pośredniczą specyficzne nośniki [31]. Według przeważających opinii, transport NH_4^+ uznawano za zależny od energii lecz termodynamicznie bierny [20]. Cytoplazma komórek jest ujemnie naładowana i różnica w transmembranowym potencjale elektrycznym, wynosząca zwykle ok. – 114 mV stanowi siłę umożliwiającą pobieranie NH_4^+ . Ustalono, że potencjał błonowy jest wystarczający do uzyskania 100-krotnej różnicy

stężeń NH_4^+ w poprzek plazmolemy [42]. Przyjmuje się, że obecność syntetazy glutaminowej w cytoplazmie, zapewniającej szybkie wiązanie NH_4^+ i tym samym eliminującej wolne jony amonowe, nie dopuszcza do akumulacji NH_4^+ w komórkach [67]. Sytuacja zmienia się jednak znacząco, jeżeli stężenie NH_4^+ w środowisku osiąga niskie wartości. Dokładna analiza z użyciem znakowanego azotu umożliwiła określenie stężenia NH_4^+ w cytoplazmie komórek korzeni ryżu uprawianego przy 2 μM NH_4^+ [84]. Wynosiło ono 3,7 mM. Wang i wsp. [84] sugerują, że dla osiągnięcia takich wartości, pobieranie NH_4^+ powinno być aktywne. Obliczono, że w zależności od stężenia NH_4^+ w środowisku podczas wstępnej fazy wzrostu siewek ryżu (2 lub 100 μM), aktywny transport NH_4^+ do korzeni mógłby zachodzić poniżej 42 lub 655 μM [84]. Zakres ten jest zbliżony do wartości postulowanej wcześniej przez Ullrich i wsp. [77] dla komórek *Lemna* (<67 μM).

Jeśli zewnętrzne stężenie NH_4^+ przekracza 1 mM, w pobieraniu jonów amonowych pośredniczy system transportowy napędzany przez gradient potencjału elektrochemicznego, na który składa się gradient potencjału chemicznego NH_4^+ pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem zewnętrznym oraz gradient potencjału elektrycznego, tworzony częściowo przez transport protonów w poprzek błony [85]. Przy wyższych zatem stężeniach NH_4^+ pobieranie tych jonów jest bierne i zachodzi zgodnie z ich gradientem potencjału elektrochemicznego, najprawdopodobniej na zasadzie elektrogenicznego uniportu, w odpowiedzi na gradient elektryczny [31, 77, 85]. Bierne pobieranie NH_4^+ mogłoby następować przez specyficzny kanał jonowy lub też niespecyficzny kanał przenoszący kationy K^+ . Obecność takiego kanału wykryto w siewkach *Arabidopsis thaliana* [69]. Szereg kanałów K^+ innych gatunków roślin jest przepuszczalnych także dla NH_4^+ [7, 18, 69, 78]. Jony K^+ i NH_4^+ mają identyczną wielkość oraz podobne właściwości chemiczne i oddziałują kompetycyjnie w czasie transportu, co zostało dowiedzione na podstawie hamowania pobierania K^+ przez NH_4^+ [46, 79]. U wielu gatunków roślin jony amonowe hamują pobieranie potasu, natomiast

przeciwna zależność obu jonów jest mniejsza [46, 56, 65, 70]. Efektywność pobierania K^+ jest całkowicie przywracana po usunięciu NH_4^+ [70]. Niezależny od napięcia kanał K^+ , przepuszczalny także dla NH_4^+ , został wykryty w błonie plazmatycznej korzeni żyta. Obliczono, że pobieranie NH_4^+ za pośrednictwem tego kanału byłoby możliwe przy egzogennym stężeniu NH_4^+ wynoszącym $> 100 \mu M$ i dotyczyłoby dobrze nawożonych gleb [86].

Istnieją dane wskazujące na uzależnienie transportu NH_4^+ przez system HATS od procesów energetycznych zachodzących w komórce. Stwierdzono, że system AMT1 *Arabidopsis thaliana* jest hamowany przez protonofory i wykazuje zależność od syntezy ATP, bowiem komórki transgeniczne drożdży z wbudowanym systemem AMT1, hodowane na podłożu z glukozy, charakteryzują się wysokim tempem pobierania metyloaminy [60]. Doświadczenia z zastosowaniem cykloheksimidu (inhibitora syntezy białka) wykluczyły możliwość wykorzystania węgla pochodzącego z rozkładu egzogennej glukozy do syntezy białek zaangażowanych w transport metyloaminy przez AMT1, co zdaniem autorów potwierdzało hipotezę wskazującą na glukozę jako źródło ATP. Wrażliwość Amt1 na protonofory oraz jego zależność od syntezy ATP mogą wskazywać, że ten system jest zależny od aktywności plazmolemowej ATPazy. Aktywność H^+ -ATPazy pozwoliłaby komórce wyrównać depolaryzację potencjału błonowego wywołaną napływem dodatnio naładowanych jonów amonowych. Depolaryzacja membran może stymulować plazmolemową H^+ -ATPazę zwiększając tempo rozkładu ATP do ADP. Przemiany glukozy uzupełniałyby poziom ATP w komórce i w ten sposób mogłaby być wyjaśniona zależność systemu pobierania jonów amonowych od źródła energii. Pobieranie NH_4^+ byłoby zatem procesem wtórnie aktywnym [60]. Taki wniosek popierają obserwacje wskazujące, że inhibitory plazmolemowej H^+ -ATPazy: dicykloheksylokarbodiimid (DCCD) i dietylostilbestrol (DES) silnie hamują transport jonów przez AMT1. Jeśli siła protonomotoryczna zostaje rozprężona przez karbonylocyjaniido-m-chlorofenylhydrozazon (CCCP) czy 2,4-di-

nitrofenol (DNP), pobieranie metyloaminy przez AMT1 zostaje znacznie ograniczone, co wskazuje na zaangażowanie w pobieranie NH_4^+ wtórnego systemu transportowego zależnego od potencjału elektrochemicznego plazmolemy. Protonofory – CCCP i DNP, a także inhibitory oddechowe, takie jak kwas salicylohydroksamianowy (SHAM), podany łącznie z jonami cyjankowymi, czy azydek sodu znacząco obniżają pobieranie NH_4^+ przez system HATS, natomiast wpływ tych inhibitorów na system LATS jest mniejszy [38, 84]. DES hamuje wyłącznie przepływ NH_4^+ przez system HATS [84].

Dane uzyskane na podstawie badań z użyciem inhibitorów metabolicznych należy jednak interpretować z pewną ostrożnością, ponieważ zależność energetyczna systemu HATS nie musi koniecznie oznaczać, że pobieranie NH_4^+ jest procesem aktywnym. Akumulacja jonów amonowych wbrew gradientowi stężeń może być osiągana przez mechanizm bierny, wynikający z przepływu jonów w poprzek błony w odpowiedzi na gradient elektryczny [84]. Stosowany często inhibitor plazmolemowej ATPazy (DCCD) nie jest w pełni specyficzny, ponieważ łatwo wiąże się z różnymi grupami karboksylowymi, sulfhydrylowymi i fenolowymi [22, 74]. Generuje on wyraźną depolaryzację błon plazmatycznych [31] i jego wpływ na pobieranie NH_4^+ może być pośredni. Niedawno stwierdzono, że DCCD wyraźnie stymuluje wpływ jonów amonowych z komórek korzeni grochu polnego (39). Związek pomiędzy transportem NH_4^+ do komórki a aktywnością plazmolemowej pompy protonowej (H^+ -ATPazy) wydaje się jednakże być wystarczająco udokumentowany (60, 85). Istnieją ponadto dane sugerujące uzależnienie tempa pobierania jonów NH_4^+ od aktywności plazmolemowych systemów oksydacyjno-redukcyjnych, odpowiedzialnych za przenoszenie elektronów w poprzek plazmolemy [38, 39].

Związki wysokoenergetyczne potrzebne są nie tylko do utrzymania potencjału elektrochemicznego plazmolemy. Asymilacja NH_4^+ w komórce, modyfikująca wartość gradientu chemicznego NH_4^+ w poprzek plazmolemy, wymaga dopływu do korzeni niezbędnych metabo-

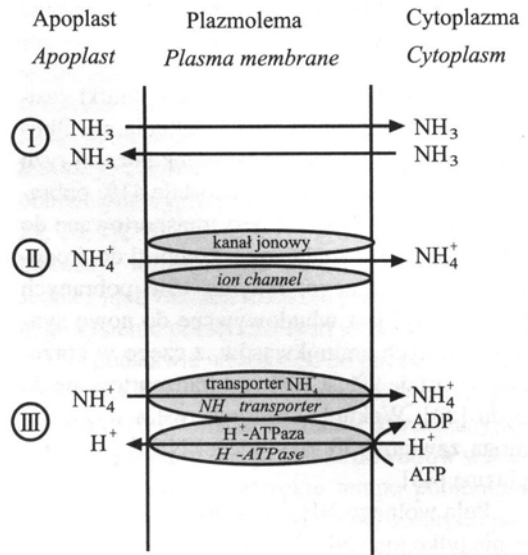
litów. Pochodzą one z fotosyntezy lub z rozkładu materiałów zapasowych roślin i dostarczają szkieletów węglowych oraz energii do syntezy aminokwasów [36, 68].

Mechanizm postulowanego aktywnego transportu jonów amonowych pozostaje nieznanym. Wang i wsp. [85] sugerują, że aktywne pobieranie NH_4^+ przez HATS mogłoby zachodzić przy udziale specyficznej NH_4^+ -ATPazy lub wtórnego systemu transportowego, takiego jak symport $\text{NH}_4^+:\text{H}^+$, napędzanego przez transport protonów przez plazmolemę. Hipotezy te wymagają jednakże potwierdzenia.

Ryc 1. przedstawia mechanizmy, za pośrednictwem których NH_3 i NH_4^+ mogłyby wnikać do komórek roślinnych. Mechanizm I obejmuje dwukierunkową dyfuzję cząsteczki NH_3 , mechanizm II polega na elektrogenicznym uniporcie NH_4^+ przez kanał jonowy specyficzny dla NH_4^+ lub wspólny dla K^+/NH_4^+ , a mechanizm III – aktywny transport NH_4^+ za pośrednictwem transportera NH_4^+ , zachodzący wbrew gradientowi stężeń NH_4^+ i zależny od aktywności plazmolemowej H^+ -ATPazy. Rola tego enzymu sprowadzałaby się do wytwarzania odpowiedniego gradientu elektrochemicznego protonów, umożliwiającego transport NH_4^+ do komórek.

ZMIANY POTENCJAŁU BŁONOWEGO ZWIĄZANE Z POBIERANIEM NH_4^+

Potencjał błonowy plazmolemy ($\Delta\psi$) przyjmuje zazwyczaj wartości od -120 do -140 mV. Po ekspozycji roślin na jony amonowe zaczyna się depolaryzacja plazmolemy komórek epidermy i kory osiągając nową wartość w ciągu kilku minut [1, 85]. Stwierdzono, że dla siewek ryżu traktowanych odpowiednio 2 lub 100 μM NH_4^+ , $\Delta\psi$ przyjmuje wartość -116 lub -89 mV [84, 85]. Depolaryzacja ma charakter dwufazowy, zgodny z kinetyką pobierania NH_4^+ . Dla niskich zakresów NH_4^+ (<1 mM) stosuje się do nasycającego wzoru, zwiększając się w miarę wzrostu stężenia wprowadzonych jonów amonowych. Powyżej 0,2 lub 0,4 mM NH_4^+ , w zależności od gatunku roślin, nie obserwuje się dalszej depolaryzacji [1, 77, 85], a pomiędzy 1 i 40 mM NH_4^+ depolaryzacja ma charakter liniowy [85].



Ryc. 1. Możliwe mechanizmy transportu NH_3 i NH_4^+ przez plazmolemę komórek korzeni.

Fig. 1. Possible mechanisms of NH_3 and NH_4^+ transport through plasma membrane of root cells.

Podczas pobierania NH_4^+ równowaga ładunków po obu stronach plazmolemy jest utrzymywana poprzez usuwanie K^+ i H^+ z komórki [57, 59]. Wartość potencjału błonowego zostaje przywrócona w ciągu 15–20 minut po usunięciu jonów amonowych [1]. Przywracanie potencjału błonowego może być spontaniczne także w obecności jonów amonowych i rozpoczyna się po upływie kilkunastu minut, w miarę jak pompa protonowa usuwa jony H^+ uwalniane w trakcie asymilacji jonów amonowych [1]. W obecności protonoforów, inhibitorów syntezy ATP i inhibitorów ATPazy zachodzi redukcja depolaryzacji powodowanej przez przepływ NH_4^+ przez system HATS lecz nie LATS [85]. Ullrich i wsp. [77] oraz Wang i wsp. [85] stwierdzili, że K_m dla pobierania NH_4^+ przez nasycający się system (HATS) jest taka sama jak wartość K_m dla depolaryzacji potencjału błonowego. Takiej zależności wyżej cytowani autorzy nie obserwowali dla liniowego, dyfuzyjnego systemu transportowego (LATS).

WEWNĄTRZKOMÓRKOWE ROZMIESZCZENIE JONÓW AMONOWYCH

Jony amonowe wnikające do komórki zasilają pulę cytoplazmatyczną i wakuolarną. Obliczono, że w cytoplazmie komórek korzeni ryżu w postaci wolnego NH_4^+ pozostaje 41% pobranych jonów, około 20% jest transportowane do wakuoli, a 20% wydalone z komórki do środowiska zewnętrznego. Jedynie 19% pobranych jonów NH_4^+ jest wbudowywane do nowo syntetyzowanych aminokwasów, z czego w korzeniu pozostaje 9%, a 10% jest transportowane do pędu [83]. Wakuole komórek roślin wyższych mogą zawierać 30-razy więcej NH_4^+ niż cytoplazma [45].

Puła wolnego NH_4^+ w cytoplazmie obejmuje nie tylko jony NH_4^+ pobrane przez roślinę, ale także pochodzące z rozkładu organicznych związków azotowych zakumulowanych w komórkach korzeni. Przy użyciu znakowanego NH_4^+ wykazano bowiem, że ilość NH_4^+ wypływającego z korzeni może być większa niż całkowita ilość NH_4^+ obecna w korzeniach na początku eksperymentu [57, 58].

NIEKTÓRE CZYNNIKI ZEWNĘTRZNE REGULUJĄCE POBIERANIE NH_4^+

ŚWIATŁO

Istnieją jedynie nieliczne dowody wiążące pobieranie NH_4^+ z obecnością światła. W krótkoterminowych (do 24 godz.) eksperymentach wykazano, że akumulacja NH_4^+ w liściach gorczyicy nie zależy od fotosyntezy, stopnia uszkodzeń chloroplastów oraz światła, a jedynie słabo (i prawdopodobnie pośrednio) zależy od światła w długoterminowych doświadczeniach [23]. Przedłużająca się ekspozycja roślin w ciemności powoduje zmniejszenie pobierania NH_4^+ , przy czym duże ograniczenie dotyczy tempa wnikania jonów amonowych do komórki, przy małym zahamowaniu ich wpływu na zewnątrz [49].

TEMPERATURA

Reakcja systemów pobierających NH_4^+ na zmieniającą się temperaturę nie jest jednakowa.

Znaczącą zależność pobierania NH_4^+ przez system HATS od temperatury zaobserwowano w korzeniach ryżu. Krótkotrwałe zmiany temperatury w zakresie 5–10°C podwyższyły do > 2,4 wartość Q_{10} (stosunek tempa pobierania NH_4^+ przy temperaturach różniących się o 10°C), natomiast przy zmianach temperatur w zakresie 20–30°C, wartość Q_{10} obniżała się do 1,25. System LATS jest mniej wrażliwy na zmiany temperatury, ponieważ nie obserwuje się znaczących różnic Q_{10} dla tego systemu [84]. We wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na siewkach ryżu wykazano wyraźny spadek ilości pobranych jonów NH_4^+ po 1 godz. ekspozycji roślin na temperaturę +5°C oraz po 2 godz. przetrzymywania ich w temp. +15°C [68]. U dwu gatunków *Lolium* nie stwierdzono natomiast wpływu zmian temperatury na pobieranie jonów amonowych [12]. Krótkotrwałe obniżenie temperatury z 32°C do 18°C nie wpływało też w znaczący sposób na tempo pobierania NH_4^+ przez siewki soi [52]. Podwyższenie temperatury z 10°C do 35°C nieznacznie stymulowało pobieranie NH_4^+ przez siewki *Ceratonia siliqua* i dopiero przy 40°C tempo pobierania gwałtownie rośnie [13].

U roślin zaaklimatyzowanych do niskich temperatur, systemy transportujące jony amonowe charakteryzują się mniejszą wrażliwością na wahania temperatury niż w roślinach niezaaklimatyzowanych [5, 12, 48], co wskazuje na ich zdolność do adaptowania się do warunków wzrostu roślin. Krótkie, bo 4-godzinne wystawienie na niską temperaturę odmiany pomidora wrażliwej na niskie zakresy temperatur, nieodwracalnie hamuje absorpcję NH_4^+ przez przynajmniej 6 godzin, natomiast absorpcja tych jonów u odmiany niewrażliwej na niskie temperatury jest odzyskiwana bezpośrednio po podwyższeniu temperatury do wyjściowej wartości [73].

ODCZYN ŚRODOWISKA (pH)

Zależność pobierania jonów NH_4^+ od pH wynika z odwracalności reakcji $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3$ sterowanej odczynem roztworu glebowego [64]. Wcześniejsze badania sugerowały, że pomiędzy pH 4,3 i 6,0 nie występują znaczące zmiany

tempa pobierania NH_4^+ , a wzrastająca stymulacja absorpcji jonów amonowych zaznacza się dopiero powyżej pH 6,0 lub pH 8,0 [14, 80]. Jednakże kolejne badania udowodniły, że niskie zakresy pH obniżają tempo pobierania NH_4^+ . Dla przykładu, pobieranie NH_4^+ przez siewki soi przy pH 5,1 jest o 25% niższe niż przy pH 6,1, a przy pH 4,1 o 50% niższe niż przy pH 6,1. Poniżej pH 3,5 pobieranie NH_4^+ może być całkowicie zahamowane [52, 75]. Zaobserwowano, że przy niskim pH znacząco maleje stosunek pomiędzy wydzielanymi protonami a pobieranymi jonami NH_4^+ [14]. Zmiany te nie wynikają z hamowania aktywności H^+ -ATPazy, lecz ze zwiększonego biernego pobierania H^+ , co w konsekwencji prowadzi do zmiany gradientu potencjału elektrochemicznego dla protonów w poprzek plazmolemy oraz zmniejszenia pobierania różnych kationów [87]. Optimum pobierania NH_4^+ znajduje się powyżej pH 8,0 [14]. Wysokie tempo absorpcji amonu obserwowane w zasadowym zakresie pH wynika prawdopodobnie z biernej dyfuzji gazowego NH_3 .

Systemy transportujące NH_4^+ do komórki (HATS i LATS) charakteryzują się zróżnicowaną wrażliwością na pH środowiska. Zaobserwowano, że poniżej pH 4,5 pobieranie NH_4^+ przez system HATS korzeni ryżu jest silnie redukowane, natomiast w zakresie pH od 4,5 do 9,0 nie występują żadne zmiany. Pobieranie jonów amonowych przez LATS obniża się znacząco poniżej pH 6,0 [84]. Optymalne pobieranie metyloaminy przez system HATS *Arabidopsis thaliana* zachodzi przy pH 7,0, natomiast przy pH 5,0 i 9,0 aktywność systemu spada do 50% [60].

Odczyn środowiska jedynie nieznacznie reguluje ilość NH_4^+ wypływającego z komórek. Stwierdzono mianowicie, że wzrastające zakwaszenie (od pH 6,0 do pH 4,0) jedynie w niewielkim stopniu zmienia intensywność wypływu NH_4^+ z komórek kukurydzy i sorgo [16].

STĘŻENIE AZOTU

Obliczono, że powyżej 0,6 mM pobieranie NH_4^+ jest niezależne od stężenia [80]). Jednakże intensywność pobierania jonów amonowych w znaczący sposób zależy od tego, czy rośliny rosły w środowisku zasobnym w azot. Pobiera-

nie NH_4^+ przez rośliny uprawiane wcześniej w obecności NO_3^- czy NH_4^+ jest mniej efektywne niż u roślin rosnących bez dostępu azotu [58]. W siewkach uprawianych bez azotu, po podaniu NH_4^+ obserwuje się odpowiedź w postaci zwiększonego pobierania NH_4^+ , przy równocześnie obniżonym wypływie tych jonów z komórki [6, 24, 26, 28, 35, 44, 46, 51, 57, 58]. Istnieją dwie hipotezy wyjaśniające powyższe zależności. Jedna z nich zakłada indukcję przez NH_4^+ wtórnego systemu pobierania tych jonów [21, 51].

Na podstawie wysokiego od początku tempa pobierania NH_4^+ wnioskowano, że systemy pobierające NH_4^+ mają charakter konstytucyjny [58, 77]. Dostarczono jednakże dowodów wskazujących na to, że wysokie tempo pobierania NH_4^+ wynika raczej z gwałtownej absorpcji powierzchniowej i napełniania pozornie wolnej przestrzeni ścian komórkowych [51]. Problem uznania systemów transportujących NH_4^+ za indukcyjne bądź konstytucyjne nie został do tej pory ostatecznie rozstrzygnięty. W ostatnich latach uznano za konstytucyjny system LeAMT1, transportujący jony NH_4^+ do włókników korzeni pomidora, mimo że jego ekspresja w roślinach żywionych azotanami była wyraźnie mniejsza [41]. Mäck i Tischner [51] wnioskuje natomiast, że nasycający się system pobierania NH_4^+ jest konstytucyjny i indukcyjny. Czynnikiem wywołującym indukcję może być NH_4^+ pochodzący z rozkładu puli zapasowych związków azotowych.

Druga hipoteza wyjaśniająca mniejszą efektywność pobierania NH_4^+ przez rośliny uprawiane wcześniej w obecności azotu opiera się na wrażliwości systemu transportującego NH_4^+ na cytoplazmatyczne lub wakuolarne aktywatory bądź represory [57, 77]. Czynnikiem stymulującym pobieranie jonów amonowych mogłoby być niskie endogenne stężenie NH_4^+ , natomiast produkty (lub produkt) asymilacji NH_4^+ byłyby odpowiedzialne za represję pobierania [58]. W oparciu o wyniki uzyskane dla systemu AMT1 można przyjąć, że jony NH_4^+ raczej nie stanowią represora pobierania, ponieważ aktywność tego systemu nie jest obniżana przez nadmiar NH_4^+ [60]. Wielokrotnie wykazano natomiast, że sulfoksymina metioniny (MSO), inhibitor

syntetazy glutaminowej, katalizującej syntezę glutaminy podczas asymilacji NH_4^+ w komórce, stymuluje pobieranie netto NH_4^+ [10, 44, 46, 58]. Metabolitem wywołującym negatywne sprzężenie zwrotne w procesie pobierania NH_4^+ byłyby zatem glutamina [10, 37, 42, 43].

Praca była finansowana z grantu KBN nr PB 393/PO4/95/08

LITERATURA

- [1] AYLING M. 1993. The effect of ammonium ions on membrane potential and anion flux in roots of barley and tomato. *Plant Cell Environ.* **16**: 297–303.
- [2] BARKER A. V., MILLS H. A. 1980. Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. *Hortic. Rev.* **2**: 395–423.
- [3] BECKING J. H. 1956. On the mechanism of ammonium uptake by maize roots. *Acta Bot. Neerl.* **5**: 2–79.
- [4] BLOOM A. J. 1988. Ammonium and nitrate as nitrogen sources for plant growth. *ISI Atlas of Science.* **1**, 55–59.
- [5] BLOOM A. J., CHAPIN F. S. 1981. Differences in steady-state net ammonium and nitrate influx by cold and warm adapted barley varieties. *Plant Physiol.* **68**: 1064–1067.
- [6] BOWMAN D. C., PAUL J. L. 1988. Uptake and assimilation of NO_3^- and NH_4^+ by nitrogen-deficient perennial ryegrass turf. *Plant Physiol.* **88**: 1303–1309.
- [7] CAO Y., WARD J. M., KELLY W. B., ICHTIDA A. M., GABER R.F., ANDERSON J. A., UOZUMI N., SCHROEDER J. I., CRAWFORD N. M. 1995. Multiple genes, tissue specificity, and expression-dependent modulation contribute to the function diversity of potassium channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **109**: 1093–1106.
- [8] CHAILLOU S., VESSEY J. K., MORROT-GAUDRY J. F., RAPER JR. C. D., HENRY L. T., BOUTIN J. P. 1991. Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *J. Exp. Bot.* **42**: 189–196.
- [9] CLARKSON D. T., GOJON A., SAKER L. R., WOERSEMA P. K., PURVES J. V., TILLARD P., ARNOLD G. M., PAANS A. J. M., VAALBURG W., STULEN I. 1996. Nitrate and ammonium influxes in soybean (*Glycine max*) roots: direct comparison of ^{13}N and ^{15}N tracing. *Plant Cell Environ.* **19**: 859–868.
- [10] CLARKSON D. T., LÜTTGE U. 1991. Mineral nutrition: inducible and repressible nutrient transport systems. *Prog. Bot.* **52**: 61–83.
- [11] CLARKSON D. T., SAKER I. R., PURVES J. V. 1989. Depression of nitrate and ammonium transport in barley plants with diminished sulphate status. Evidence of co-regulation of nitrogen and sulphate intake. *J. Exp. Bot.* **40**: 953–963.
- [12] CLARKSON D. T., WARNER A. 1979. Relationships between root temperature and transport of ammonium and nitrate ions by Italian and perennial ryegrass (*Lolium multiflorum* and *Lolium perenne*). *Plant Physiol.* **64**: 557–561.
- [13] CRUZ C., LIPS S. H., MARTINS-LOUÇAO M. A. 1993. Uptake of ammonium and nitrate by cardob (*Ceratonia siliqua*) as affected by root temperature and inhibitors. *Physiol. Plant.* **89**: 532–543.
- [14] DYHR-JENSEN K., BRIX H. 1996. Effects of pH on ammonium uptake by *Typha latifolia* L. *Plant Cell Environ.* **19**: 1431–1436.
- [15] FARGUHAR G. D., FIRTH P. M., WETSELAAR R., WEIR B. 1980. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment. Determination of the ammonia compensation point. *Plant Physiol.* **66**: 710–714.
- [16] FENG J., VOLK R. J., JACKSON W. A. 1994. Inward and outward transport of ammonium in roots of maize and sorghum: contrasting effects of methionine sulphoximine. *J. Exp. Bot.* **45**: 429–439.
- [17] FRIED M. F., ZSOLDOS F., VOSE P. B., SHATOKHIN I. L. 1965. Characterizing the NO_3^- and NH_4^+ uptake process of rice roots by use of ^{15}N labelled NH_4NO_3 . *Physiol. Plant.* **18**: 313–320.
- [18] GASSMANN W., SCHROEDER J. I. 1994. Inward-rectifying K^+ channels in root hairs of wheat. A mechanism for aluminium-sensitive low-affinity K^+ uptake and membrane potential control. *Plant Physiol.* **105**: 1399–1408.
- [19] GERENDAS J., RATCLIFFE R. G., SATTELMACHER B. 1990. ^{31}P nuclear magnetic resonance evidence for differences in intracellular pH in the roots of maize seedlings grown with nitrate or ammonium. *J. Plant Physiol.* **137**: 125–128.
- [20] GLASS A. D. M. 1988. Nitrogen uptake by plant roots. *Atlas of Science: Animal and Plant Sciences*, s. 151–156.
- [21] GOYAL S. S., HUFFAKER R. C. 1986. The uptake of NO_3^- , NO_2^- and NH_4^+ by intact wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. I. Induction and kinetics of transport systems. *Plant Physiol.* **82**: 1051–1056.
- [22] HASSINEN L. E., VOUKILA P. T. 1993. Reaction of dicyclohexylcarbodiimide with mitochondrial protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1144**: 107–124.
- [23] HECHT U., MOHR H. 1990. Factors controlling nitrate and ammonium accumulation in mustard (*Sinapis alba*) seedlings. *Physiol. Plant.* **78**: 379–387.
- [24] HENRIKSEN G. H., RAMAN D. R., WALKER L. P., SPANSWICK R. M. 1992. Measurement of net fluxes of ammonium and nitrate at the surface of barley roots using ion-selective microelectrodes. II. Patterns of uptake along the root axis and evaluation of the microelectrode flux estimation technique. *Plant Physiol.* **99**: 734–747.
- [25] HUSTED S., SCHJOERRING J. K. 1995. Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* **109**: 1453–1460.
- [26] IVANKO S., INGVERSEN J. 1971. Investigation on the assimilation of nitrogen by maize roots and the transport

- of some major nitrogen compounds by the xylem sap. I. Nitrate and ammonia uptake and assimilation in the major nitrogen fractions of nitrogen-starved maize roots. *Physiol. Plant.* **24**: 59–65.
- [27] JACKSON W. A., CHAILLOU S., MOROT-GAUDRY J. F., VOLK R. J. 1993. Endogenous ammonium generation in maize roots and its relationship to other ammonium fluxes. *J. Exp. Bot.* **44**: 731–739.
- [28] JACKSON W. A., VOLK R. J. 1992. Nitrate and ammonium uptake by maize: adaptation during relief from nitrogen suppression. *New Phytol.* **122**: 439–446.
- [29] JOSEPH R. A., VAN HAI T., LAMBERT J. 1975. Multiphasic uptake of ammonium by soybean roots. *Physiol. Plant.* **34**: 321–325.
- [30] KEYS A. J., BIRD I. F., CORNELIUS M. J., LEA P. J., WALLSGROVE R. M., MIFLIN B. J. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741–743.
- [31] KLEINER D. 1981. The transport of NH_3 and NH_4^+ across biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **639**: 41–52.
- [32] KRONZUCKER H. J., SIDDIGI M. Y., GLASS A. D. M. 1995. Compartmentation and flux characteristics of nitrate in spruce. *Planta* **196**: 674–682.
- [33] KRONZUCKER H. J., SIDDIGI M. Y., GLASS A. D. M. 1995. Compartmentation and flux characteristics of ammonium in spruce. *Planta* **196**: 691–698.
- [34] KRONZUCKER H. J., SIDDIGI M. Y., GLASS A. D. M. 1995. Analysis of $^{13}\text{NH}_4^+$ efflux in spruce roots. A test case for phase identification in compartmental analysis. *Plant Physiol.* **119**: 481–490.
- [35] KRONZUCKER H. J., SIDDIGI M. Y., GLASS A. D. M. 1996. Kinetics of NH_4^+ influx in spruce. *Plant Physiol.* **110**: 773–779.
- [36] KUBIK-DOBOSZ G., BAKIEWICZ M., BUCZEK J. 1998. The importance of root carbohydrate abundance in ammonium uptake and metabolism (w druku).
- [37] KUBIK-DOBOSZ G., BUCZEK J. 1998. Regulation of ammonium and potassium uptake by glutamine and asparagine in *Pisum arvense* plants (w druku).
- [38] KUBIK-DOBOSZ G., KAZANECKA M., BUCZEK J. 1998. Regulation of NH_4^+ transport pathways in *Pisum arvense* roots (w druku).
- [39] KUBIK-DOBOSZ G., TURSKA A., LEKACZ H., KARZEW., BUCZEK J. 1994. The effect of inhibitors of plasma membrane H^+ -ATPase and oxidoreductases on NH_4^+ uptake by *Pisum arvense* roots. *Acta Soc. Bot. Pol.* **63**: 287–292.
- [40] LANGFORD A. O., FEHSENFELD F. C. 1992. Natural vegetation as a source or sink for atmospheric ammonia: a case study. *Science* **255**: 581–583.
- [41] LAUTER F.-R., NINEMANN O., BUCHER M., RIESMEIER J. W., FROMMER W. B. 1996. Preferential expression of an ammonium transporter and two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8139–8144.
- [42] LEE R. B., AYLING S. M. 1993. The effect of methionine sulphoximine on the absorption of ammonium by maize and barley roots over short periods. *J. Exp. Bot.* **44**: 53–63.
- [43] LEE R. B., LEWIS M. J. 1994. Synthesis and ^{15}N -labeling of glutamine and glutamate in maize roots during early stages of ^{15}N -ammonium assimilation. *J. Exp. Bot.* **45**: 747–777.
- [44] LEE R. B., PURVES J. V., RATCLIFFE R. G., SAKER L. R. 1992. Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption in maize roots. *J. Exp. Bot.* **43**: 1385–1396.
- [45] LEE R. B., RATCLIFFE R. G. 1991. Observations on the subcellular distribution of the ammonium ion in maize root tissue using in vivo ^{14}N -nuclear resonance spectroscopy. *Planta* **183**: 359–367.
- [46] LEE R. B., RUDGE K. A. 1986. Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants. *Ann. Bot.* **57**: 471–486.
- [47] LYCKLAMA J. C. 1963. The absorption of ammonium and nitrate by perennial ryegrass. *Acta Bot. Neerl.* **12**: 361–423.
- [48] MACDUFF J. H., HOPPER M. J., WILD A. 1987. The effect of root temperature on growth and uptake of ammonium and nitrate by *Brassica napus* L. in flowing solution culture. II. Uptake from solutions containing NH_4NO_3 . *J. Exp. Bot.* **38**: 53–66.
- [49] MACDUFF J. H., JACKSON S. B. 1992. Influx and efflux of nitrate and ammonium in Italian ryegrass and white clover roots: Comparison between effects of darkness and defoliation. *J. Exp. Bot.* **43**: 525–535.
- [50] MACKLON A. E. S., RON M. M., SIM A. 1990. Cortical cell fluxes of ammonium and nitrate in excised root segments of *Allium cepa* L.; studies using ^{15}N . *J. Exp. Bot.* **41**: 359–370.
- [51] MÄCK G., TISCHNER R. 1994. Constitutive and inducible net NH_4^+ uptake of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.* **144**: 351–357.
- [52] MARCUS-WYNER L., RAINS D. W. 1982. Simultaneous measurement of NH_4^+ absorption and N_2 fixation by *Glycine max* L. *Plant Physiol.* **69**: 460–464.
- [53] MARSCHNER H. 1995. *Mineral nutrition in higher plants*, Academic Press, Harcourt Brace and Company, Publishers, London, 889.
- [54] MCNAUGHTON G. S., PRESLAND M. R. 1983. Whole plant studies using radioactive 13-nitrogen. I. Techniques for measuring the uptake and transport of nitrate and ammonium ions in hydroponically grown *Zea mays*. *J. Exp. Bot.* **34**: 880–892.
- [55] MEHRER I., MOHR H. 1989. Ammonium toxicity: description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its causation. *Physiol. Plant.* **77**: 545–554.
- [56] MENGEL K., VIRO M., HEHL G. 1976. Effect of potassium on uptake and incorporation of ammonium nitrogen of rice plants. *Plant and Soil* **44**: 547–558.
- [57] MORGAN M. A., JACKSON W. A. 1988. Suppression of ammonium uptake by nitrogen supply and its relief during nitrogen limitation. *Physiol. Plant.* **73**: 38–45.
- [58] MORGAN M. A., JACKSON W. A. 1988. Inward and outward movement of ammonium in root systems: transient responses during recovery from nitrogen deprivation in the presence of ammonium. *J. Exp. Bot.* **39**: 179–191.
- [59] MORGAN M. A., JACKSON W. A. 1989. Reciprocal ammonium transport into and out of plant roots: modi-

- cations by plant nitrogen status and elevated root ammonium concentration. *J. Exp. Bot.* **40**: 207–214.
- [60] NINNEMANN O., JAUNIAUX J. C., FROMMER W. B. 1994. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *EMBO J.* **13**: 3464–3471.
- [61] OTA K., YAMAMOTO Y. 1989. Promotion of assimilation of ammonium ions by simultaneous application of nitrate and ammonium ions in radish plants. *Plant Cell Physiol.* **30**: 365–371.
- [62] PATE J. S. 1980. Transport and partitioning nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**: 313–340.
- [63] PRESLAND M. R., MCNAUGHTON G. S. 1986. Whole plant studies using radioactive ^{13}N -nitrogen. IV. A compartmental model for the uptake and transport of ammonium ions by *Zea mays*. *J. Exp. Bot.* **37**: 1619–1632.
- [64] RAVEN J. A., SMITH F. A. 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* **76**: 415–431.
- [65] RUFTY T. W., JACKSON W. A., RAPER C. D. 1982. Inhibition of nitrate assimilation in roots in the presence of ammonium: the moderating influence of potassium. *J. Exp. Bot.* **33**: 1122–1137.
- [66] RUFTY T. W., RAPER C. D., JACKSON W. A. 1983. Growth and nitrogen assimilation of soybean in response to ammonium and nitrate nutrition. *Bot. Gaz.* **114**: 466–470.
- [67] SALSAC L., CHAILLON S., MOROT-GUARDY J-F., LESANT C., JOLIVET E. 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **25**: 805–812.
- [68] SASAKAWA H., YAMAMOTO Y. 1978. Comparison of the uptake of nitrate and ammonium by rice seedlings. Influences of light, temperature, oxygen concentration, exogenous sucrose and metabolic inhibitors. *Plant Physiol.* **62**: 665–669.
- [69] SCHACHTMAN D. P., SCHROEDER J. I., LUCAS W. J., ANDERSON J. A., GABER R. F. 1992. Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis* KAT1 cDNA. *Science* **258**: 1654–1658.
- [70] SCHERER H. W., MACKOWN C. T., LEGGETT J. E. 1984. Potassium-ammonium uptake interactions in tobacco seedlings. *J. Exp. Bot.* **35**: 1060–1070.
- [71] SCHJOERRING J. K., KYLLINGSBAEK A., MORTENSEN J. V., BYSKOV-NIELSEN S. 1993. Field investigations of ammonia exchange between barley plants and the atmosphere. I. Concentration profiles and flux densities of ammonia. *Plant Cell Environ.* **16**: 161–167.
- [72] SCHOBERT C., KOMOR E. 1992. Transport of nitrate and ammonium into the floem and the xylem of *Ricinus communis* seedlings. *J. Plant Physiol.* **140**: 306–309.
- [73] SMART D. R., BLOOM A. J. 1991. Influence of root NH_4^+ and NO_3^- content on the temperature response of net NH_4^+ and NO_3^- uptake in chilling sensitive and chilling resistant *Lycopersicon* taxa. *J. Exp. Bot.* **42**: 331–338.
- [74] SOLIOZ M. 1984. Dicyclohexylcarbodiimide as a probe for proton translocating enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **9**: 309–312.
- [75] TOLLEY-HENRY L., RAPER C. D. Jr. 1986. Utilization of ammonium as a nitrogen source. Effects of ambient acidity on growth and nitrogen accumulation by soybean. *Plant Physiol.* **82**: 54–60.
- [76] TOLLEY-HENRY L., RAPER C. D. Jr. 1989. Cyclic variations in nitrogen uptake of soybean plants. Ammonium as a nitrogen source. *Plant Physiol.* **91**: 1345–1350.
- [77] ULLRICH W. R., LARSSON M., LARSSON C-M., LESCH S., NOVACKY A. 1984. Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes and inhibition of anion uptake. *Physiol. Plant.* **61**: 369–376.
- [78] UOZUMI N., GASSMANN W., CAO Y., SCHROEDER J. I. 1995. Identification of strong modifications in cation selectivity in an *Arabidopsis* inward rectifying potassium channel by mutant selection in yeast. *J. Biol. Chem.* **270**: 24276–24281.
- [79] VALE F. R., VOLK R. J., JACKSON W. A. 1988. Simultaneous influx of ammonium and potassium into maize roots: kinetics and interactions. *Planta* **173**: 424–431.
- [80] VAN DEN HONERT T. H., HOOYMANS J. J. M. 1961. Diffusion and absorption of ions in plant tissue. *Acta Bot. Neerl.* **10**: 261–273.
- [81] VITOUSEK P. M., MATSON P. A., VAN CLEVE K. 1989. Nitrogen availability and nitrification during succession: Primary, secondary, and old-field seres. *Plant Soil* **115**: 229–239.
- [82] VOLLBRECHT P., KASEMIR H. I. 1992. Effects of exogenously supplied ammonium on root development of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Bot. Acta* **105**: 306–312.
- [83] WANG M. Y., SIDDIGI M. Y., RUTH T. J., GLASS A. D. M. 1993. Ammonium uptake by rice roots. I. Fluxes and subcellular distribution of $^{13}\text{NH}_4^+$. *Plant Physiol.* **103**: 1249–1258.
- [84] WANG M. Y., SIDDIGI M. Y., RUTH T. J., GLASS A. D. M. 1993. Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma. *Plant Physiol.* **103**: 1259–1267.
- [85] WANG M. Y., GLASS D. M., SHAFF J. E., KOCHIAN L. V. 1994. Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. *Plant Physiol.* **104**: 899–906.
- [86] WHITE P. J. 1996. The permeation of ammonium through a voltage-independent K^+ channel in the plasma membrane of rye roots. *J. Membr. Biol.* **152**: 89–99.
- [87] YAN F., SCHUBERT S., MENGEL K. 1992. Effect of low root medium pH on proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.* **99**: 415–421.
- [88] YOUNGDAHL L. J., PACHECO R., STREET J. J., VLEK P. L. G. 1982. The kinetics of ammonium and nitrate: uptake by young rice plants. *Plant Soil* **69**: 225–232.