

TRANSPORT AZOTANÓW I JEGO REGULACJA W KOMÓRKACH ROŚLIN WYŻSZYCH

Nitrate uptake and its regulation in higher plants

Grażyna KŁOBUS

Summary: Uptake of nitrate by roots followed by assimilation in plant cells is the main rout of mineral N conversion into organic N. Since nitrate, like other mineral nutrients required for optimal plant growth, is taken up from relatively low concentrated soil solutions, plants have developed high-performance uptake systems in root cells. Activity of nitrate uptake systems are regulated on transcriptional and posttranscriptional levels. Current knowledge about this regulation is discussed in presented paper.

Key words: nitrate uptake, genetic regulation, endogenous limiting factors.

Dr hab. Grażyna Kłobus, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki, Uniwersytet Wrocławski, ul. Kanonia 6/8, 50–328 Wrocław.

WSTĘP

Azot jest jednym z podstawowych pierwiastków warunkujących prawidłowy wzrost i rozwój roślin. Poza stosunkowo niewielką grupą organizmów roślinnych współżyjącą z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny, większość roślin wyższych korzysta z mineralnych form tego pierwiastka obecnych w glebie. Nieorganiczne związki azotu występujące w glebie to azotany i sole amonowe. Wykorzystywanie jednej bądź drugiej formy azotu nieorganicznego przez rośliny zależy głównie od stężenia tych jonów w środowisku. Z kolei poziom NH_4^+ i NO_3^- w podłożu jest wypadkową aktywności glebowych bakterii ammonifikacyjnych i nityfikacyjnych, których aktywność i występowanie w glebie kształtowane są przez warunki glebowe. I tak, bakterie należące do grupy ammonifikatorów, odpowiedzialne za produkcję NH_4^+ , w przeciwieństwie do bakterii nityfikacyjnych, są mało wrażliwe na ekstremalne parametry glebowe, takie jak niska temperatura, niskie pH czy

niskie stężenie tlenu w glebie. Generalnie więc, tylko gleby ubogie, charakteryzujące się niskim pH są bardziej zasobne w związki amonu niż w azotany i ta forma azotu jest pobierana przez rośliny. Natomiast w glebach zasobnych w związki organiczne i mineralne, wykazujących obojętne bądź lekko zasadowe pH, z uwagi na powszechną obecność edaficznych bakterii nityfikacyjnych z grupy *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*, bardziej rozpowszechnioną i dostępną dla roślin formą są jony azotanowe. Tak więc, dla większości roślin, zwłaszcza dla roślin uprawnych, azotany stanowią główne źródło azotu, a ich pobieranie jest pierwszym etapem regulującym wzrost i w konsekwencji plonowanie.

MOLEKULARNE PODSTAWY REGULACJI TRANSPORTU AZOTANÓW

Dotychczasowe, prawie dwudziestoletnie badania dotyczące pobierania azotanów dowiodły obecności w roślinach przynajmniej dwóch systemów transportujących NO_3^- , róż-

niących się właściwościami kinetycznymi. Jeden z nich to system wykazujący niskie powinowactwo do azotanów (low-affinity NO_3^- transport system, LATS), podczas gdy drugi systemem charakteryzuje się wysokim powinowactwem do azotanów (high-affinity NO_3^- transport system, HATS) [16, 23, 49]. Pierwszy ma charakter konstytucyjny, funkcjonuje przy wysokich (powyżej 1 mM) stężeniach anionu, ma wysoką wartość K_m , wynoszącą zazwyczaj około 0,5 mM lub wyższą i nie podlega wysyceniu [2, 3, 26, 27]. Drugi z systemów, zwany często indukcyjnym, wymaga dla swej aktywności pretraktowania roślin azotanami [9, 21, 27]. Jego aktywność przeważa w warunkach niskich (do 1 mM) egzogennych stężeń NO_3^- , charakteryzuje się niską wartością K_m wynoszącą od 10 do 300 μM i ulega wysyceniu [1].

Indukcja systemu o wysokim powinowactwie do azotanów odbywa się na poziomie transkrypcji i translacji, gdyż jest hamowana zarówno przez inhibitory syntezy mRNA jak i posttranskrypcyjne inhibitory syntezy białka [26, 27, 36]. Najprawdopodobniej indukcja systemu HATS wymaga także jednoczesnej syntezy lipidów [36]. W preparatach plazmolemy otrzymanych z korzeni kukurydzy wykazano obecność kilku polipeptydów indukowanych azotanami, z których dwa (47–49 kDa i 30–33 kDa) wydają się być integralnymi białkami błonowymi [15, 43]. Do tej pory brak jednak jakichkolwiek dowodów na to, że proteiny te pośrednio lub bezpośrednio zaangażowane są w transport azotanów.

Białkowe nośniki azotanów o wysokim powinowactwie do anionu zostały zidentyfikowane za pomocą badań genetycznych w komórkach *Procarvota* oraz w komórkach grzybów i glonów. I tak, w komórkach *Synechococcus* sp. CC7942 wykryto cztery geny (*NrtA*, *nrtB*, *NrtC* i *NrtD*) odpowiedzialne za syntezę transportera NO_3^- złożonego z peptydów 72,3 kDa, 30,2 kDa i 30,3 kDa [44]. Ten błonowy nośnik NO_3^- należy do rodziny aktywnych transporterów wiążących ATP (tzw. typ ABS) i wykazuje dużą homologię z peptydami NasF, NasE i NasD transportera azotanów znalezionej w komórkach *Klebsiella pneumoniae* [44].

Białka transportujące azotany funkcjonujące w komórkach *Procarvota* wydają się być zupełnie różne od transporterów znalezionych w komórkach *Eucaryota*, o czym świadczy brak jakichkolwiek podobieństw sekwencyjnych. W eukariotycznych komórkach *Chlamydomonas reinhardtii* ekspresja systemu transportującego azotany wymaga aktywności dwóch spośród trzech genów: *Nar2* i *Nar3* lub *Nar4* [46]. Delecja tych genów całkowicie blokuje pobieranie azotanów przy stężeniu 50 μM , co wskazuje, iż kodują one system HATS. Ustalona sekwencja nukleotydowa hydrofobowych białek NAR3 i NAR4 wykazuje bardzo wysoką, bo 80% homologię. Obydwa białka w 27 do 31% są także identyczne z sekwencją błonowego białka kodowanego przez gen *CrnA*. Gen *CrnA* koduje także białkowy transporter azotanów o wysokim powinowactwie do anionu (K_m 200 μM) w komórkach *Aspergillus nidulans* [8, 59], bowiem odporne na chlorany mutanty *crnA* pobierają do 80% mniej azotanów od form dzikich grzyba [11].

W roślinach wyższych udało się do tej pory zidentyfikować dwa geny odpowiedzialne za syntezę białka zaangażowanego w transport azotanów. Jeden z nich (*pBCH1*) klonowano z komórek korzeni jęczmienia [56]. Koduje on białko transbłonowe o ciężarze 55kDa, identyczne w 32% w białkiem CRNA *Aspergillus nidulans* oraz w 50% z białkiem NAR3 *Chlamydomonas reinhardtii*. Egzogenne azotany wzmagają wyraźnie transkrypcję genu, co sugerowałoby, że koduje on transporter typu HATS.

Drugi gen kodujący białko transportujące azotany (*Chl1*) znaleziono w komórkach *Arabidopsis thaliana*. W wyniku jego ekspresji syntetyzowane jest integralne białko błonowe złożone z 590 aminokwasów, o ciężarze cząsteczkowym wynoszącym 65 kDa i zawierającym najprawdopodobniej 12 transmembranowych odcinków [57]. Synteza *Chl1* mRNA ma miejsce głównie w korzeniach *Arabidopsis* i jest wyraźnie stymulowana egzogennymi azotanami. Wprowadzenie *Chl1* mRNA do oocytów *Xenopus* powodowało zwiększoną absorpcję NO_3^- oraz zależną od pH depolaryzację błony. Powyższe wyniki sugerują, że gen *Chl1* koduje indu-

cyjny system transportujący azotany. Kinetyczna charakterystyka tego systemu wskazywała jednak na jego niskie powinowactwo do NO_3^- (K_m około 8 mM) [57]. Pozostaje to w dużej sprzeczności z wynikami doświadczeń przeprowadzonych na nienaruszonych roślinach. Z badań tych wynika bowiem, że system indukcyjny jest systemem o wysokim powinowactwie do azotanów, podczas gdy niskie powinowactwo do azotanów charakteryzuje system konstytucyjny. Niektórzy badacze uważają więc, że gen *Chl1* koduje konstytucyjny, a nie indukcyjny system transportujący azotany [13, 14]. Ponadto, znacznie niższe pobieranie chloru i potasu przez mutanty nie zawierające genu *Chl1* [17, 48] sugeruje, iż białko kodowane przez gen *Chl1* zaangażowane jest także bezpośrednio lub pośrednio w transport innych jonów. Należy więc raczej przypuszczać, że gen *Chl1* koduje białko(a) regulujące aktywność szeregu transporterów, a nie specyficzny transporter azotanów. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że gen *Chl1* należy do rodziny genów zidentyfikowanych u *Arabidopsis*, obejmującej przynajmniej cztery inne spokrewnione geny. Jeden z nich, *AtPTR2*, w 25% identyczny z *Chl1*, wykazuje wysoką komplementarność z genem kodującym w komórkach drożdży 12. hydrofobowych łańcuchów transbłonowych transportera peptydów [53]. Znamienne, że również geny kodujące transportery peptydów zawierające regiony obejmujące 12. transbłonowych odcinków, zidentyfikowane w komórkach zwierzęcych (gen *PepT1*) oraz w komórkach bakterii (rodzina genów *PTR* i *POT*) wykazują wysoką komplementarność z genem *Chl1* [19, 45, 53].

ENDOGENNE CZYNNIKI REGULUJĄCE POBIERANIA AZOTANÓW

Pobieranie azotanów podlega bardzo precyzyjnej i różnorodnej regulacji. Zmierza ona do koordynacji pobierania NO_3^- z ich asymilacją i w konsekwencji z produkcją biomasy. Mechanizm procesów regulatorowych, jak i czynniki regulatorowe są słabo poznane. Generalnie, niezależnie od gatunku, zmieniają one w taki sposób absorpcję jonu, by stosunek N do C w tkan-

kach utrzymywany był na mniej więcej stałym poziomie [25, 29]. Badania kinetyczne prowadzone na całych roślinach i zawieszinach komórek wykazały, że obydwa systemy transportujące NO_3^- , tzn. konstytucyjny i indukcyjny, podlegają czulej regulacji poprzez sprzężenie zwrotne: lepsze zaopatrzenie tkanek w azot obniża intensywność pobierania NO_3^- [30]. Ta negatywna regulacja pobierania azotanów odpowiada zarówno za zmiany szybkości pobierania NO_3^- występujące podczas ontogenezy organizmów roślinnych [28, 60] jak i za zmiany wynikające z okresowych fluktuacji czynników środowiskowych, takich jak odżywianie azotowe, natlenienie gleby, intensywność światła, temperatura czy czynniki stresowe [5, 20, 37, 47]. Regulacja odbywa się zarówno w korzeniach jak i częściach nadziemnych. Jest oczywiste, że procesy regulacyjne zlokalizowane w częściach nadziemnych wymagają czynnika „informującego” korzenie o zapotrzebowaniu na azot. Czynniki takie powinien podlegać szybkiej translokacji, a jego stężenie w cytosolu komórek korzenia powinno zmieniać aktywność bądź syntezę nośnika odpowiedzialnego za absorpcję azotanów. Potencjalnymi kandydatami są tu aminokwasy i kwasy karboksylowe.

Niewątpliwie aminokwasy regulują zmiany intensywności pobierania azotanów podczas ontogenetycznego rozwoju roślin. Wykazano bowiem, że szybkość pobierania NO_3^- rośnie podczas fazy wegetatywnego wzrostu, osiągając maksimum we wczesnych stadiach reprodukcyjnych, a następnie drastycznie spada podczas zawiązywania owoców i dojrzewania nasion [28]. Szybszemu pobieraniu azotanów towarzyszy akumulacja białek zapasowych w liściach, natomiast spadek szybkości zachodzi równoległe z rozkładem tych białek [52]. Jednocześnie, w sposób odwrotny niż szybkość absorpcji NO_3^- , zmienia się stężenie wolnych aminokwasów we floemie. Tak więc, aminokwasy powstałe z rozkładu białek zapasowych w liściach, podlegające łatwej translokacji do korzeni mogą spełniać rolę bezpośredniego, negatywnego regulatora transportu azotanów [12]. Potencjalnymi regulatorami mogą być arginina, alanina, asparagina i/lub glutamina, gdyż tylko te amino-

kwasy podane egzogenne, po 3 godzinnej fazie lag wyraźnie obniżają pobieranie azotanów [42]. Podwyższona akumulacja argininy i asparaginy w korzeniach, obserwowana podczas uprawy roślin w obecności amonu może także tłumaczyć hamujące działanie NH_4^+ na pobieranie azotanów [16]. Na udział aminokwasów powstających w korzeniach, w regulacji absorpcji NO_3^- wskazywali również Breteler i Siegerist [7].

Innym potencjalnym regulatorem pobierania azotanów może być także kwas jabłkowy [4, 54, 55]. Pozytywne korelacje pomiędzy endogennym poziomem jabłczanu w korzeniach *Arabidopsis thaliana*, a intensywnością pobierania NO_3^- obserwowane przez Doddema i wsp. [16] potwierdzały rolę tego kwasu w regulacji absorpcji azotanów. Późniejsze badania dowiodły, że jabłczan może spełniać rolę koordynatora pomiędzy pobieraniem azotanów, a ich asymilacją w liściach [54]. Wiadomo bowiem, że w wyniku redukcji azotanów w liściach powstają w równoważnej ilości jony hydroksylowe. Dla utrzymania homeostazy wzrasta synteza silnych kwasów organicznych, które głównie w formie jabłczanu potasu są transportowane do korzeni. Dekarboksylacja jabłczanu w korzeniach dostarcza jonów HCO_3^- wydalanych na zewnątrz, a pobrane w równoważnej ilości azotany są następnie transportowane wraz z potasem do części nadziemnych [4]. Tak więc, kwasy karboksylowe i aminokwasy wydają się być uniwersalnymi regulatorami pobierania NO_3^- produkowanymi zarówno w częściach nadziemnych jak i w korzeniach, odpowiadającymi za reakcję sprzężenia zwrotnego pomiędzy statusem azotowym tkanek, a pobieraniem azotanów.

O ile niewątpliwie egzogenne azotany decydują o indukcji systemu transportującego NO_3^- o wysokim powinowactwie do anionu (HATS), o tyle endogenne poziomy zakumulowanych jonów nie wydaje się bezpośrednio wpływać na jego aktywność. Świadczy o tym identyczna szybkość absorpcji azotanowej przez odmiany dzikie jęczmienia (niska akumulacja NO_3^- w korzeniach) i przez mutanty nie wykazujące aktywnej reduktazy azotanowej (wysoka akumulacja NO_3^- w korzeniach) [61]. Także jony amonowe nie wydają się być bezpośrednim re-

gulatorem wpływającym na intensywność pobierania azotanów. Jakkolwiek ich obecność w środowisku hamuje absorpcję azotanów, to jednak wstępne traktowanie roślin sulfoksyminą metioniny, inhibitorem syntetazy glutamiowej, znosi ten efekt, co sugeruje raczej udział glutaminy lub innych produktów asymilacji azotanów w regulacji pobierania [8].

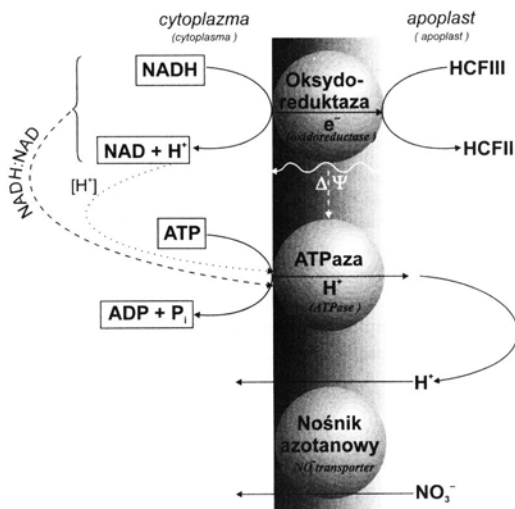
MECHANIZM TRANSPORTU AZOTANÓW PRZEZ PLAZMOLEMĘ

Gwałtowny spadek intensywności pobierania azotanów obserwowany w obecności czynników obniżających natężenie procesów metabolicznych (niska temperatura, warunki beztlenowe, inhibitory metaboliczne) wskazuje na zależność tego procesu od energii metabolicznej. Energia ta wykorzystywana jest nie tylko do asymilacji NO_3^- w cytoplazmie komórek ale także do przeniesienia go przez zewnętrzne błony plazmatyczne [10, 20]. Wiadomo, że aktywny transport azotanów do komórek ma charakter kotransportu protonowego i odbywa się przy udziale tzw. pierwotnej siły transportowej, wytwarzanej dzięki polaryzacji błon [22, 41, 58]. Powszechnie przyjęte jest, że gradient potencjału elektrochemicznego plazmolemy komórek roślinnych generują pompy protonowe zależne od ATP, czyli H^+ATPazy [50, 51]. Jakkolwiek niewątpliwa jest zależność pobierania azotanów od tej aktywności plazmolemowej, to jednak badania przeprowadzone z użyciem specyficznych inhibitorów H^+ATPazy oraz inhibitora konstytucyjnej oksydoreduktazy NADH-żelazicyjanek sugerowały udział także drugiej z wymienionych aktywności plazmolemy w transporcie NO_3^- do komórek korzeni [31, 35, 33]. Przypuszczenia te potwierdziły wyniki doświadczeń przeprowadzonych na pęcherzykach plazmolemy. Absorpcja azotanów przez pęcherzyki o właściwej orientacji błony, zaopatrzone w ATP i NADH przewyższała bowiem wyraźnie pobieranie NO_3^- przez pęcherzyki zawierające jedynie ATP. Co więcej, różnice w ilości pobranych anionów obserwowano tylko wtedy, gdy w mieszaninie inkubacyjnej obecny był żelazicyjanek, a kwinakryna, specyficzny inhibitor oksydore-

duktazy NADH-żelazycyjanek, niwelowała je [32].

Korelacje pomiędzy konstytucyjną aktywnością oksydoredukcyjną plazmolemy, a transportem azotanów mogą wynikać z udziału enzymu w generowaniu bądź regulowaniu wielkości potencjału elektrochemicznego błony. Już w 1981 r. Löppert [38] sugerował udział plazmolemowej oksydoreduktazy w wytwarzaniu gradientu potencjału elektrochemicznego błony. Jednakże funkcjonowanie białka jako elektrogennej pompy protonowej pozostawało przez wiele lat kontrowersyjne. Doświadczenia przeprowadzone na całych roślinach nie wyjaśniły tego problemu [18, 33, 39]. Także wyniki doświadczeń przeprowadzonych na frakcjach zawierających niejednorodnie błony komórkowe (mikrosomy, [40]) lub mieszaninę pęcherzyków plazmolemy o właściwej i odwróconej orientacji [24] nie wydawały się być przekonujące. Dopiero zastosowanie preparatów pęcherzyków plazmolemy o wysokim stopniu czystości i określonej orientacji wykazały, że plazmolemowa oksydoreduktaza NADH-żelazycyjanek odpowiada jedynie za transbłonowy przepływ elektronów i nie jest bezpośrednio zaangażowana w wektorowy transport protonów z cytoplazmy do apoplastu [6, 34]. Dowodziła tego zdolność utleniania NADH obecnego w mieszaninie inkubacyjnej przez pęcherzyki o odwróconej orientacji, tylko wtedy jeśli do ich wnętrza wprowadzono żelazycyjanek. Jednocześnie, wyraźny spadek pH mieszaniny inkubacyjnej świadczył o uwalnianiu protonów po cytoplazmatycznej stronie plazmolemy. Ponadto zauważono, iż transport protonów w pęcherzykach plazmolemy zawierających żelazycyjanek, oznaczany podczas inkubacji w mieszaninie zawierającej zarówno ATP jak i NADH był wyższy od transportu obserwowanego podczas inkubacji pęcherzyków jedynie w obecności ATP [34]. Takie wyniki jednoznacznie dowiodły udziału plazmolemowej oksydoreduktazy w regulacji transportu protonów katalizowanego przez H^+ -ATPazę.

Podsumowując należy stwierdzić, że pobieranie azotanów przez komórki korzeni zależy od gradientu potencjału elektrochemicznego pla-



Rys. 1. Model aktywnego transportu azotanów do komórek roślinnych.

Konstytucyjna oksydoreduktaza zlokalizowana w plazmolemie komórek roślinnych utleniając cytoplazmatyczny NADH uwalnia protony i przenosi przez błonę elektrony na egzogenny akceptor (żelazycyjanek potasu – HCFII) powodując jego redukcję. Poprzez zmianę potencjału elektrycznego błony ($\Delta\Psi$), zmianę stężenia jonów H^+ w cytoplazmie i zmianę stosunku NADH/NAD oksydoreduktaza moduluje aktywność H^+ ATPazy, regulując w ten sposób transport protonów z cytoplazmy do apoplastu komórek roślinnych. H^+ ATPaza jest jedyną pompą protonową funkcjonującą w plazmolemie komórek roślinnych generującą gradient potencjału elektrochemicznego błony. Aktywny transport azotanów do komórek katalizowany jest przez specyficznego nośnika zlokalizowanego w zewnętrznej błonie działającego jako kotransporter protonowy.

Fig. 1. Model of NO_3^- active transport into plant root cells.

The constitutive oxidoreductase, an integral plasma membrane protein, during oxidation of NADH releases protons in cytosol and transfers electrons (e^-) on apoplastic acceptors, such as ferricyanides (HCFII). Changes in: (1) membrane electrical potential ($\Delta\Psi$), (2) H^+ concentration in cytosol and (3) NADH/NAD ratio in cytosol generated by oxidoreductase can regulate ATPase activity and affect the transmembrane proton flux. H^+ ATPase is the only proton pump in plasmalemma changing its electrochemical potential gradient. The active NO_3^- transport into plant cells dependent on an specific carrier protein acts as proton cotransporter.

zmoemy generowanego przez H^+ -ATPazy i modulowanego przez plazmolemową oksydoreduktazę według modelu przedstawionego na rysunku (Ryc. 1).

LITERATURA

- [1] ASLAM M., TRAVIS R. L., HUFFAKER R. C. 1992. Comparative kinetic and reciprocal inhibition of nitrate uptake in roots of uninduced and induced barley seedlings. *Plant Physiol.* **99**: 1124–1133.
- [2] ASLAM M., TRAVIS R. L., HUFFAKER R. C. 1993. Comparative induction of nitrate and nitrite uptake and reduction system by ambient nitrate and nitrite in intact roots of barley seedlings. *Plant Physiol.* **102**: 811–819.
- [3] BEHL R., TISHNER R., RASCHKE K. 1988. Induction of the high capacity nitrate uptake mechanism in barley roots prompted by nitrate uptake through a constitutive low capacity system. *Planta* **176**: 235–240.
- [4] BEN ZIONI A., VAADIA A., LIPS S. H. 1971. Nitrate uptake by roots as regulated reduction products of the shoots. *Physiol. Plant.* **24**: 288–291.
- [5] BLUM A. J., SUKRAPANNA S. E., WARNER R. H. 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation in barley. *Plant Physiol.* **99**: 1294–1301.
- [6] BÖTGER M., MORRE D. J., CRANÉ F. L. 1995. Evidence for transmembrane electron transfer coupled to proton secretion in plasma membrane vesicles loaded by electroporation. *Protoplasma*, **184**: 22–30.
- [7] BRETELER H., SIEGERIST M. 1984. Effect of ammonium on nitrate utilization of dwarf bean. *Plant Physiol.* **75**: 1099–1103.
- [8] BROWNLEE A. G., ARTS H. N. 1983. Nitrate uptake in *Aspergillus nidulans* and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. *J. Bacteriol.* **155**: 1138–1146.
- [9] CHANTAROTWONG W., HUFFAKER R. C., MULLER B. L., GRANSTED R. C. 1976. *In vitro* nitrate reduction to nitrate uptake, nitrate concentration and *in vivo* nitrate reductase activity in intact barley seedlings. *Plant Physiol.* **57**: 519–522.
- [10] CLARKSON D. T. 1986. Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells. A review of current ideas and methodology. W: H. Lambers, J. J. Neeteson, I. Stulen (red.), *Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants*. Martinus Nijhoff, Boston, s. 3–27.
- [11] COVE D. J. 1979. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol. Rev.* **54**: 291–327.
- [12] COOPER H. D., CLARKSON D. T. 1989. Cycling of ammonium – nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals – a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *J. Exp. Bot.* **40**: 753–762.
- [13] CRAWFORD N. M. 1994. Metabolic and genetic control of nitrate, phosphate and iron assimilation in plants. W: E. M. MEYEROWITZ, C. R. SOMERVILLE, (red.), *Arabidopsis*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, s. 1119–1146.
- [14] CRAWFORD N. M. 1995. Nitrate: Nutrient signal for plant growth. *Plant Cell* **7**: 859–868.
- [15] DHUGGA K. S., WAINES J. G., LEONARD R. T. 1988. Correlated induction of nitrate uptake and membrane polypeptides in corn roots. *Plant Physiol.* **87**: 120–125.
- [16] DODDEMA H., HOFFSTRA J. J., FEENSTRA W. J. 1978. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, distributed in uptake or reduction of nitrate. I. Effect of nitrogen source during growth on uptake of nitrate. *Physiol. Plant.* **43**: 343–350.
- [17] DODDEMA H., TELKAMP G. P. 1979. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, distributed in uptake or reduction of nitrate. II. Kinetics. *Physiol. Plant.* **45**: 332–338.
- [18] DÖRING O., LÜTHJE S., BÖTTGER M. 1992. Modification of the activity of the plasma membrane redox system of *Zea mays* L. roots by vitamin K₃ and dicumarol. *J. Exp. Bot.* **43**: 175–181.
- [19] FEI Y.-J., KANAL Y., NUSSBERGER S., GANAPATHY V., LEIBACH F. H., ROMERO M. F., SIGH S. K., BORON W. F., HEDIGER M. A. 1994. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* **368**: 563–566.
- [20] GLASS A. D. M. 1988. Nitrate uptake by plant roots. *ISI Atlas Sci. Anim. Plant Sci.* **1**: 151–156.
- [21] GLASS A. D. M., THOMPSON R. G., BORDELEAU L. 1985. Regulation of NO₃⁻ influx in barley. Studies using NO₃⁻. *Plant Physiol.* **76**: 379–385.
- [22] GLASS A. D. M., SHAFF J. E., KOCHIAN L. V. 1992. Studies on the uptake of nitrate in barley. IV. Electrophysiology. *Plant Physiol.* **99**: 456–463.
- [23] GOYAL S. S., HUFFAKER R. C. 1986. A novel approach and full automated, microcomputer based system to study kinetics of NO₃⁻ and NH₄⁺ transport simultaneously by intact wheat seedlings. *Plant Cell Environ.* **9**: 209–221.
- [24] HASSIDIM M., RUBINSTEIN B., LERNER H. R., REINHOLD L. 1987. Generation of a membrane potential by electron transport in plasmalemma-enriched vesicles of cotton and radish. *Plant Physiol.* **85**: 872–875.
- [25] HUPPE H. C., TURPIN D. H. 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and alga cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 577–607.
- [26] HOLE D. J., EMRAN A. M., FARES Y., DREW M. C. 1990. Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant Physiol.* **93**: 642–647.
- [27] JACKSON W. A., FLESHER D., HAGEMAN R. H. 1973. Nitrate uptake by dark grown corn seedlings. Some characteristics of apparent induction. *Plant Physiol.* **51**: 120–127.
- [28] IMSANDE J., EDWARDS D. G. 1988. Decreased rates of nitrate uptake during pod fill by cowpea, green gram, and soybean. *Agron. J.* **80**: 789–793.
- [29] IMSANDE J., TOURAINE B. 1994. N demand and the regulation of nitrate uptake. *Plant Physiol.* **105**: 3–7.
- [30] KING B. J., SIDDIGI M. Y., RUTH T. J., WARNER R. L., GLASS A. D. M. 1993. Feedback regulation of nitrate influx in barley by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiol.* **102**: 1279–1286.
- [31] KLOBUS G. 1990. Nitrate uptake and activity of plasmalemma associated ATPase in *Cucumis sativus* L. roots. *Acta Physiol. Plant.* **12**: 225–231.

- [32] KŁOBUS G. 1995. The role of plasma membrane-bound activities in nitrate transport into sealed plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* L. roots. W: F. BALUSKA, CIAMPOROVA M., GASPARIKOVA O. BARLOW P. W. (red.), *Developments in Plant and Soil Science. Structure and Function of Roots*, **58**. Kluwer Academic Publishers. S. 133–140.
- [33] KŁOBUS G., BUCZEK J. 1992. A possible role of plasmalemma redox activity in nitrate uptake by *Cucumis sativus* L. seedlings. *Acta Physiol. Plant.* **14**: 41–47.
- [34] KŁOBUS G., BUCZEK J. 1995. The role of plasma membrane oxidoreductase activity in proton transport. *J. Plant Physiol.* **146**: 103–107.
- [35] KŁOBUS G., LOBOCKA J., BUCZEK J. 1991. Effect of sodium tungstate on NO_3^- uptake by *Cucumis sativus* L. seedlings. *Acta Physiol. Plant.* **13**: 227–233.
- [36] KŁOBUS G., WARD M. R., HUFFAKER R. C. 1988. Characteristics of injury and recovery of net NO_3^- transport of barley seedlings from treatments of NaCl. *Plant Physiol.* **87**: 878–882.
- [37] LIM J. T., WILKERSON G. G., RAPER C. D., GOLD H. J. 1990. A dynamic model of vegetative soybean plants: model structure and behaviour under varying root temperature and nitrogen concentration. *J. Exp. Bot.* **41**: 221–241.
- [38] LÖPPERT H. 1981. Energy coupling for membrane hyperpolarization in *Lemna*: respiration rate, ATP level and membrane potential at low oxygen concentrations. *Planta* **159**: 329–335.
- [39] LÜTHJE S., DÖRING O., BÖTTGER M. 1992. The effect of vitamin K₃ and dicumarol on the plasma membrane redox system and H^+ pumping activity of *Zea mays* L. roots measured over a long time scale. *J. Exp. Bot.* **43**: 183–188.
- [40] MACRI F., VIANELLO A. 1986. Independence of plasma membrane proton gradient from NAD(P) ferricyanide oxidoreduction in maize root microsomes. *Plant Sci.* **43**: 25–29.
- [41] MCCLURE P. R., KOCHIAN L. V., SPANSWICK R. M., SHAFF J. E. 1990. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on membrane potential. *Plant Physiol.* **93**: 281–289.
- [42] MÜLLER B., TOURAINE B. 1992. Inhibition of NO_3^- uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. *J. Exp. Bot.* **43**: 617–623.
- [43] NI M., BEEVERS L. 1994. Nitrate-induced polypeptides in membranes from corn seedling roots. *J. Exp. Bot.* **45**: 355–365.
- [44] OMATA T. 1995. Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Cell Physiol.* **36**: 207–213.
- [45] PAULSENI T., SKURRAY R. A. 1994. The POT family of transport proteins. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 404.
- [46] QUESADA A., GALVAN A., FERNANDEZ E. 1994. Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **5**: 407–419.
- [47] REINBAUGH M. G., CAMPBELL W. H. 1991. Higher plant responses to environmental nitrate. *Physiol. Plant.* **82**: 640–650.
- [48] SCHOLTEN H. J., FEENSTRA W. J. 1986. Uptake of chlorate and other ions in seedlings of the nitrate uptake mutant B1 of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **66**: 265–269.
- [49] SIDDI M. Y., GLASS A. D., RUTH T. J., RUFTY T. W. 1990. Studies on the uptake of nitrate in barley. *Plant Physiol.* **93**: 1426–1432.
- [50] SPANSWICK R. M. 1981. Electrogenic ion pumps. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**: 267–289.
- [51] SZE H. 1984. H^+ translocating ATPase of the plasma membrane and tonoplast of plant cells. *Physiol. Plant.* **61**: 683–691.
- [52] STASWICK P. E., HUANG J-F., RHEE Y. 1991. Nitrogen and methyl jasmonate induction of soybean vegetative storage protein genes. *Plant Physiol.* **96**: 130–136.
- [53] STEINER H-Y., SONG W., ZHANG L., NAIDER F., BECKER J. M., STACEY G. 1994. An *Arabidopsis* peptide transporter is a member of a new class of membrane transport proteins. *Plant Cell* **6**: 1289–1299.
- [54] TOURAINE B., GRIGNON N., GRIGNON C. 1988. Charge balance in NO_3^- fed soybean. Estimation of K^+ and carbohydrate regulation. *Plant Physiol.* **88**: 605–612.
- [55] TOURAINE B., MULLER B., GRIGNON C. 1992. Effect of floem translocated malate on NO_3^- uptake of intact soybean plants. *Plant Physiol.* **93**: 1118–1123.
- [56] TRUEMAN L. J., THEODOULOU R. L., MILLER A. J., FORDE B. G. 1994. Cloning and analysis of a putative high affinity nitrate transporter from barley. *Abstracts of the Fourth International Congress of Plant Molecular Biology* s. 1007
- [57] TSAY Y-F., SCHROEDER J. I., FELDMANN K. A., CRAWFORD N. M. 1993. The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**: 705–713.
- [58] ULLRICH W. R., NOVACKY A. 1981. Nitrate-dependent membrane potential changes and introduction in *Lemna gibba* G1. *Plant Sci. Lett.* **22**: 211–217.
- [59] UNKLES S. E., HAWKER K. L., GRIEVE C., CAMPBELL E. I., MONTAGUE P., KINGHORN J. R. 1991. *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 204–208.
- [60] VASSEY J. K., RAPER C. D., HENRY L. T. 1990. Cyclic variation in nitrogen uptake rate in soybean plants: uptake during reproductive growth. *J. Exp. Bot.* **41**: 1579–1584.
- [61] WARNER R. L., HUFFAKER R. C. 1989. Nitrate transport is independent of NADH and NAD(P)H nitrate reductases in barley seedlings. *Plant Physiol.* **91**: 947–953.