

IWONA CIERESZKO

*Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii
Uniwersytet w Białymstoku
Świerkowa 20b, 15-950 Białystok
e-mail: icier@uwb.edu.pl*

CZY MOŻNA USPRAWNIĆ POBIERANIE FOSFORANÓW PRZEZ ROŚLINY ?

Fosfor jest jednym z ważniejszych składników mineralnych niezbędnych do prawidłowego wzrostu, rozwoju i metabolizmu roślin. Wchodzi on w skład wielu związków organicznych, między innymi: fosfolipidów, fosforanów cukrów, kwasów nukleinowych, ATP czy pirofosforanu. Poziom fosforu w tkankach roślin wpływa istotnie na przebieg i intensywność większości procesów metabolicznych w tym: fotosyntezy i oddychania, biosyntezy białek i kwasów nukleinowych oraz transportu asymilatów i składników mineralnych (CIERESZKO i RYCHTER 1995, MIMURA 1999, CIERESZKO 2000, POIRIER i BUCHER 2002, RYCHTER i RAO 2005 oraz prace tam cytowane). Fosfor pełni także funkcje regulatora reakcji enzymatycznych, oddziałuje na ekspresję genów oraz bierze udział w transdukcji sygnałów w komórkach roślinnych (ABEL i współaut. 2002, RAUSCH i BUCHER 2002, CIERESZKO 2003, HAMMOND i współaut. 2004, FRANCO-ZORRILLA i współaut. 2004, CIERESZKO i KLECZKOWSKI 2005).

Fosfor występuje w glebie w postaci związków organicznych lub nieorganicznych, w większości niedostępnych roślinom. Pula organiczna to najczęściej 30–50% całkowitej zawartości fosforu w glebie; tworzą ją głównie kwasy fitynowe, fosfolipidy i kwasy nukleinowe, będące produktami rozkładu roślin i zwierząt (SCHACHTMAN i współaut. 1998, VANCE i współaut. 2003). Organiczne formy fosforu podlegają rozkładowi (mikrobiologicznemu) i przemianie do frakcji nieorganicznej, m. in. dostępnej dla roślin. Nieorganiczne frakcje fosforu w glebie to około 170 form mineralnych są to przede wszystkim fosforany wapniowe, fosforany glinu i żela-

za. Ważniejsze minerały zawierające fosfor i związki fosforu w glebie to: hydroksyapatyt $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, fluoroapatyt $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ oraz fosforany wapniowe: Ca_2HPO_4 i $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, a także waryscyt $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i strengit $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MENGEL i KIRKBY 1983). Bezpośrednio dostępny dla roślin jest jedynie fosfor w roztworze glebowym, występujący w postaci jonów H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} , określanych skrótem Pi. Jednak stężenie Pi w glebie jest niskie i rzadko przekracza 10 μM (MARSCHNER 1995, RAGHOTHAMA 1999). Dostępne roślinom formy fosforu pochodzą z wietrzenia minerałów, a na rolnych gruntach użytkowych – głównie z nawozów sztucznych (GROTZ i GUERINOT 2002). Rośliny są często narażone na niedobór fosforu w środowisku. Szacuje się, że zbiory zbóż nawet z 30–40% światowych użytków rolnych są znacznie obniżone ze względu na niedobór Pi (VANCE 2001). Szczególnie niski poziom Pi jest spotykany w glebach regionów tropikalnych i podzwrotnikowych (VANCE i współaut. 2003). Gleby występujące na terenie Polski także nie są zasobne w przyswajalne formy fosforu. Przykładowo, ponad 50% uprawnych gleb województwa podlaskiego stanowią gleby o niskiej zasobności fosforu (GRABOWSKI 2004). Stosowanie mineralnych nawozów fosforowych jest kosztowne, a fosfor w nich zawarty nie jest w pełni wykorzystany – jedynie 15–25% fosforu z nawozów jest pobierane przez rośliny (REŃKO 2004), reszta przechodzi w formy nierozpuszczalne, niedostępne roślinom, lub jest wymywana z gleby, wywołując często eutrofizację wód. Dostępne scenariusze konsumpcji i perspektywy dostępności fosforanów w glebach zapowiadają znaczący wzrost

zużycia nawozów fosforanowych przy jednoczesnym wyczerpaniu naturalnych zasobów fosforu (RAGHOTHAMA 2000b, VANCE 2001). Przewiduje się, że naturalne źródła fosforu, niezbędne do produkcji sztucznych nawozów fosforowych (głównie fosforyty) ulegną wyczerpaniu w ciągu najbliższych 60 lat (VANCE i współaut. 2003). Zatem, aby utrzymać (lub zwiększyć) produkcję roślin użytkowych na-

leży znaleźć inne, alternatywne rozwiązania. Konieczne jest stworzenie sprawnego systemu monitoringu niedoboru Pi, oraz opracowanie niedrogich lecz skutecznych zabiegów zwiększających dostępność fosforu dla roślin (SMETHURST 2000, VANCE 2001). Potrzebne są też nowe odmiany roślin wydajniej pobierające i wykorzystujące fosfor w glebie (HINSINGER 2001).

POBIERANIE I TRANSPORT Pi

Z roztworu glebowego Pi pobierany jest przez korzenie, zwłaszcza strefę włośnikową. Uważa się, że Pi dyfunduje do przestrzeni apoplastycznych ścian komórkowych włośników, natomiast transport przez błonę do wnętrza komórki jest aktywny (RAGHOTHAMA 2000a). W poprzek korzenia jony fosforanowe są transportowane drogą symplastyczną lub apoplastyczną. Transport długodystansowy jonów fosforanowych odbywa się zarówno ksylemem, jak i elementami floemu (MIMURA 1999, HELL i HILLEBRAND 2001). Ksylemem transportowany jest wyłącznie Pi z korzeni do liści. Floemem zaś związki fosforu mogą przemieszczać się np. ze starszych liści do pędów i młodych liści – w celu utrzymania zawartości Pi w młodych liściach na stałym poziomie. W komórkach roślinnych występują dwie główne pule fosforanów: cytoplazmatyczna (ok. 20% całości Pi) i wakuolarna (ok. 80%). Stężenie cytoplazmatycznej puli Pi, uważanej za pulę metaboliczną, podlega ścisłej regulacji (MIMURA 1999). W warunkach niedoboru fosforu zmagazynowany w wakuoli Pi pozwala utrzymać przez pewien czas pulę cytoplazmatyczną na nie zmienionym poziomie (MIMURA 1999, CIERESZKO 2000, RYCHTER i RAO 2005).

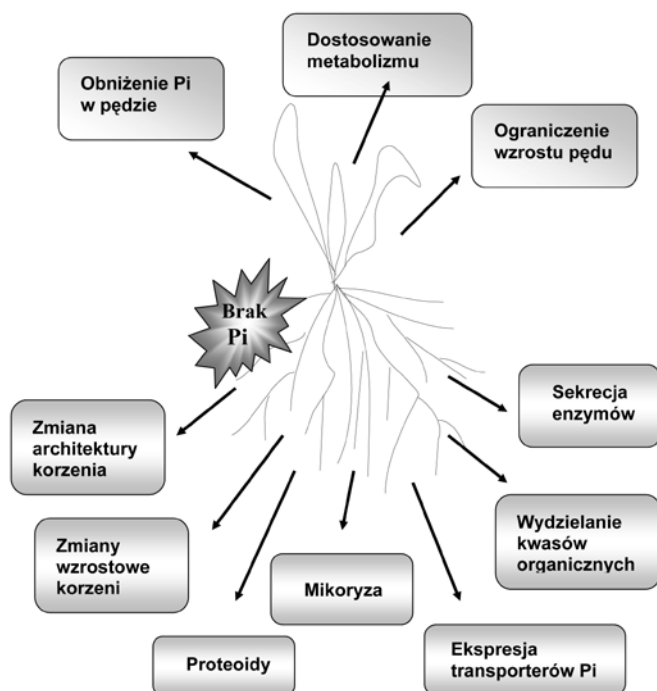
Pobieranie fosforu z otoczenia może stanowić problem dla roślin – stężenie tego pierwiastka wewnątrz komórki (ponad 10 mM) jest bowiem wielokrotnie wyższe niż w podłożu (2–10 μ M) (MARSCHNER 1995, RAGHOTHAMA 2000a). Transport Pi do komórek jest procesem energochłonnym i wymaga obecności specyficznych transporterów.

Wyodrębniono dwa systemy transportowe: transportery o niskim powinowactwie do Pi oraz transportery charakteryzujące się wysokim powinowactwem do Pi (aktywne w warunkach niedoboru fosforu) (POIRIER i BUCHER 2002, SMITH i współaut. 2003). Większość transporterów Pi to białka zlokalizowane w błonach i składające się z 12 domen transmembranowych o dużym obszarze hydrofilowym pomiędzy domeną 6 i 7. Odcinki N- i C-końcowe zlokalizowane są po cytoplazmatycznej stronie błony (transportery o wysokim powinowactwie do Pi) lub po stronie zewnętrznej komórki (transportery o niskim powinowactwie do Pi) (POIRIER i BUCHER 2002, RAUSCH i BUCHER 2002). Biochemiczne i molekularne badania ostatnich lat umożliwiły charakterystykę transporterów Pi, oraz kodujących ich genów, u wielu roślin (RAUSCH i BUCHER 2002, CIERESZKO 2003, SMITH i współaut. 2003). Przykładowo, genom rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.) zawiera kilka, niezbyt licznych, rodzin genowych, m.in. rodzinę *PHT1* (kodującą 9 transporterów). Transportery Pht1;1 i Pht1;4 wykazują najwyższą ekspresję; są to transportery o wysokim powinowactwie do Pi, zlokalizowane w młodych częściach korzeni, przede wszystkim w komórkach włośników (POIRIER i BUCHER 2002, SHIN i współaut. 2004). Genom *Arabidopsis* zawiera ponadto 11 genów z rodziny *PHO1* (kodujących prawdopodobnie transportery) ich ekspresję wykazano w liściach, korzeniach, łodygach i kwiatach roślin, zwłaszcza w tkankach przewodzących (WANG i współaut. 2004).

STRATEGIE DOSTOSOWAWCZE ROŚLIN DO WARUNKÓW NIEDOBORU Pi

Rośliny dysponują wieloma mechanizmami pozwalającymi przetrwać okresy niedoboru Pi (Ryc. 1). Strategie dostosowawcze roślin uwzględniają różnego rodzaju zmiany

morfologiczne, anatomiczne, fizjologiczne i biochemiczne (CIERESZKO 2000, HAMMOND i współaut. 2004, RYCHTER i RAO 2005). Rośliny wykształciły dwa główne rodzaje przysto-



Ryc. 1. Schemat przedstawiający różnorodne reakcje aklimatyzacyjne roślin do niedoboru fosforanów w podłożu

sowań do niedoboru Pi: (i) umożliwiające intensywne pobieranie i przyswajanie fosforanów przez korzenie oraz (ii) pozwalające na oszczędne gospodarowanie zmniejszoną pulą Pi. W pracy omówione zostaną szczegółowo jedynie reakcje przystosowawcze korzeni roślin pozwalające zwiększyć pobieranie Pi (Ryc. 1). Pozostałe odpowiedzi roślin na deficyt fosforu zostały szczegółowo omówione w innych pracach przeglądowych (CIERESZKO i RYCHTER 1995, MIMURA 1999, CIERESZKO 2000, RYCHTER i RAO 2005).

W warunkach początkowego niedoboru Pi w korzeniach roślin następują modyfikacje umożliwiające intensywne poszukiwanie brakującego składnika mineralnego. Zmianie ulegają parametry wzrostowe roślin: zwiększa się długość i powierzchnia korzeni kosztem ograniczenia wzrostu pędu. Cechą charakterystyczną roślin z deficytem Pi jest zazwyczaj wyższy stosunek masy korzenia do masy pędu (CIERESZKO i RYCHTER 1995, HELL i HILLEBRAND 2001, CIERESZKO i współaut. 2002). Korzenie roślin z niedoborem fosforu mają mniej rozgałęzień, ale więcej dłuższych włośników (BATES i LYNCH 2000), charakteryzują się ponadto odmienną architekturą (LYNCH i BROWN 1998, LINKOHR i współaut. 2002). Obserwacje przekrojów korzeni wykazały, że rośliny z deficytem fosforu wytwarzają stosunkowo dużo tkanki powietrznej (aerenchymy), prawdopodobnie ze względu na niższe koszty energetyczne wydłużania korzeni (FAN i współaut. 2003). Ponadto uważa się, iż

zmniejsza się wrażliwość korzeni na bodziec geotropiczny, dzięki czemu korzenie boczne mogą lepiej penetrować powierzchniowe warstwy gleby, które mogą być bardziej zasobne w Pi niż warstwy głębsze. Wzmaga się biosynteza etylenu, który prawdopodobnie uczestniczy w powyższych reakcjach „nadzorując” wytwarzanie aerenchymy oraz zmianę odpowiedzi na siłę przyciągania ziemskiego (FAN i współaut. 2003, MA i współaut. 2003).

Korzenie roślin z niedoborem Pi mogą wykształcać specyficzne struktury zwiększające powierzchnię chłonną, zwane korzeniami proteoidowymi (ang. proteoid root), od nazwy rodziny Proteaceae, u których po raz pierwszy je wykryto (WATT i EVANS 1999). Takie struktury korzeniowe przypominają wyglądem szczoteczki i składają się z dużej liczby drobnych korzeni bocznych obficie porośniętych włośnikami (zdjęcia korzeni proteoidowych udostępnione są na stronach: http://www.tau.ac.il/~ecology/virtau/3-philip_nemoy/cluster_roots.htm lub <http://www.plantsci.org.au/Phytogen/PhytApr01.html#Lambers>). Występowanie korzeni proteoidowych stwierdzono, m.in., u roślin z rodzaju *Banksia*, *Hakea*, *Protea*, *Telopea*, *Viminaria*, *Lupinus* (*L. albus*) (WATT i EVANS 1999, LAMBERS i współaut. 2003). Rośliny te wykazują zwiększoną liczbę proteoidów już po kilkudziesięciu godzinach braku Pi w podłożu (LAMBERS i współaut. 2003). Ostatnie badania wykazały, że proteoidy korzeniowe charakteryzują się odmiennym metabolizmem wę-

gła (w porównaniu z typowymi korzeniami) związanym, między innymi, z wydzielaniem dużej ilości kwasów organicznych (NEUMANN i MARTINOIA 2002, SHANE i współaut. 2003). Uważa się, że proteoidy korzeniowe występują głównie u gatunków roślin nie wchodzących w symbiozę z grzybami (NEUMANN i MARTINOIA 2002).

Szacuje się, że przynajmniej 80–90% roślin lądowych żyje w symbiozie z grzybami (ekto- lub endomikoryza). Ektomikoryzę tworzy kilka tysięcy gatunków grzybów, często specyficznych względem gatunków drzew (TURNAU i współaut. 2002). Najszerzej rozpowszechnionym typem endomikoryzy jest mikoryza arbuskularna. Wewnątrz komórek kory korzenia grzybnia wykształca charakterystyczne drzewkowate struktury, zwane arbuskulami. Mikoryzę arbuskularną tworzy około 120 gatunków grzybów zaliczanych do rzędu Glomales (GADKAR i współaut. 2001, TURNAU i współaut. 2002). Rośliny mają możliwość regulowania kolonizacji grzybowej poprzez wydzielanie cukrów i aminokwasów do podłoża (GADKAR i współaut. 2001). Mikoryza umożliwia powiększenie absorpcyjnej powierzchni korzenia (o powierzchnię strzępek grzybni) i zwiększa dostępność składników mineralnych dla roślin. Wiele roślin może więc rosnąć i rozwijać się w warunkach niedoboru pierwiastków, także przy niskim stężeniu Pi (GADKAR i współaut. 2001, KARANDASHOV i współaut. 2004). Pi jest pobierany przez strzępki grzyba z gleby (z regionów poza ryzosferą) i przenoszony do symbiotycznych rejonów w obrębie kory korzenia. Dzięki mikoryzie pobieranie Pi może być podwyższone nawet kilkanaście razy (SCHACHTMANN 1998, KARANDASHOV i BUCHER 2005). Badania opublikowane w *Nature* (2001) dowiodły, że niedobór fosforu reguluje ekspresję genów kodujących nie tylko transportery Pi w grzybni, ale także roślinne transportery Pi uczestniczące w pobieraniu fosforanów ze strzępek grzybów mikoryzowych (RAUSCH i współaut. 2001). W odpowiedzi na niedobór Pi rośliny wykształciły także inne mechanizmy przystosowawcze (Ryc. 1). Przyswajalność nieorganicznych form fosforu może być zwiększona wskutek biochemicznych modyfikacji otoczenia korzeni – dzięki wydzielaniu kwasów organicznych, protonów lub związków fenolowych do gleby (LÓPEZ-BUCIO i współaut. 2000b, HINSINGER 2001, DAKORA i PHILLIPS 2002, TICCONI i ABEL 2004, JUSZCZUK i współaut. 2005). Wydzielany kwas organiczny wchodzi w reakcje z fosforanami glinu, że-

laza lub wapnia, w wyniku czego uwalniany fosforan nieorganiczny jest pobierany przez korzenie (HINSINGER 2001). Natomiast przyswajalność organicznego fosforu może wzrosnąć dzięki sekrecji enzymów rozkładających estry fosforanowe (LI i współaut. 1997, THOMAS i współaut. 1999, COELLO 2002, TOMSCHA i współaut. 2004). Wymaga to zmodyfikowania metabolizmu korzeni w celu zwiększonej produkcji wydzielanych związków (CIERESZKO i RYCHTER 1995). Przykładowo, zmiany oddychania, np. wzrost ekspresji i aktywności niektórych enzymów cyklu Krebsa (np. syntazy cytrynianowej, EC 4.1.3.7), mogą prowadzić do zwiększonej produkcji cytrynianu (WASAKI i współaut. 2003). Kwas cytrynowy jest wydzielany w dużych ilościach przez korzenie różnych roślin, ponadto kwas ten uważany jest za bardzo efektywny w pozyskiwaniu Pi z gleby (LÓPEZ-BUCIO i współaut. 2000b). Dojrzałe proteoidy korzeniowe mają szczególne zdolności do silnego zakwaszania gleby i mogą wydzielać ilości cytrynianu stanowiące nawet ok. 20% swojej suchej masy (NEUMANN i współaut. 1999).

Inną odpowiedzią na niedobór fosforu w środowisku jest wzmożenie produkcji i sekrecji enzymów ułatwiających hydrolizę organicznych form fosforu, zwłaszcza kwaśnych fosfataz zewnątrzkomórkowych (EC 3.1.3.2) (OLCZAK 1996, HARAN i współaut. 2000). Przy braku Pi stwierdza się gwałtowny wzrost ekspresji genów, a następnie aktywności niespecyficznych kwaśnych fosfataz w apoplasmie ścian komórkowych korzenia oraz szybkie uwalnianie tych enzymów do podłoża (HARAN i współaut. 2000, TOMSCHA i współaut. 2004). Podczas niedoboru Pi fosfatazy działają więc jak system ratowniczy, hydrolizując każdy ewentualny substrat do Pi, który może być pobrany przez korzenie (OLCZAK 1996, TOMSCHA i współaut. 1998). Następuje także wydzielanie fitaz (ang. phytase), zaliczanych do fosfataz (6-fitazy, EC 3.1.3.26), przeprowadzających stopniową hydrolizę kwasu fitynowego do fosforanów i estru mioinozytolu (LI i współaut. 1997, MULLANEY i ULLAH 2003). Fityna i kwas fitynowy to zapasowe formy organicznego fosforu w tkankach roślinnych, zwłaszcza w nasionach, związki trudno ulegające degradacji (BRINCH-PEDERSEN i współaut. 2002). W warunkach deficytu Pi stwierdzano wydzielanie fitaz przez korzenie kilkunastu gatunków roślin, m.in. z rodzaju *Bracharia* i *Stylosanthes*, a także u koniczyny, ryżu, pomidora, niektórych storczyków czy łubinu (LI i współaut. 1997). Rośliny mogą w pewnych

warunkach korzystać także z fosforu zawartego w kwasach nukleinowych. Wydzielane są wówczas z korzeni inne enzymy, np. fosfodiesteraza nukleotydowa (EC 3.1.4.16) oraz nukleazy: deoksyrybonukleaza (EC 3.1.21.1) i rybonukleaza (EC 3.1.27.1) – rozkładające DNA i RNA pochodzenia zwierzęcego lub

roślinnego (ABEL i współaut. 2000, 2002). Ponadto, niektóre rośliny mogą uzyskiwać Pi z pozakomórkowych zasobów ATP dzięki wydzielaniu enzymów określanych mianem apirazy (ang. apyrase) (THOMAS i współaut. 1999).

PRÓBY POPRAWIENIA EFEKTYWNOŚCI POBIERANIA Pi

W ostatnich latach podjęto wiele badań nad stworzeniem i wyborem metod udoskonalenia roślin pod względem pobierania Pi. Metody takie możemy podzielić na tradycyjne oraz nowoczesne, wykorzystujące najnowsze techniki badawcze. Do metod tradycyjnych należałoby zaliczyć: (i) poszukiwanie wśród znanych odmian roślin najlepiej dostosowanych do niedoboru Pi, (ii) hodowlę nowych odmian poprzez krzyżówki znanych roślin, odpornych na niedobór Pi, (iii) próby inokulacji roślin uprawnych (tzn. nasion lub korzeni) propagulami endotroficznych grzybów mikoryzowych, (iv) inokulację nasion lub korzeni roślin przez szczepy bakteryjne, uczestniczące w mineralizacji fosforu organicznego lub w rozpuszczaniu mineralnych form fosforu (RODRIGUEZ i FRAGA 1999, NARRANG i współaut. 2000, WISSUWA 2003).

Poszukując odpowiedzi na pytanie, jakie cechy charakteryzują rośliny najlepiej dostosowane do niedoboru Pi zbadano 36 odmian *Arabidopsis thaliana* (NARRANG i współaut. 2000). Wybrano 5 najbardziej „sprawnych” odmian – charakteryzowały się one przynajmniej jedną z poniższych cech: długie korzenie, długie i gęsto rozmieszczone włośniki, intensywne pobieranie Pi w przeliczeniu na jednostkę długości korzenia, zdolność do zakwaszania ryzosfery (NARRANG i współaut. 2000). W badaniach nad wprowadzeniem nowych genotypów ryżu stwierdzono, że nawet niewielkie zmiany w morfologii korzeni mogą owocować zwiększoną intensywnością pobierania Pi (WISSUWA 2003). Prowadzone wcześniej badania miały na celu wyselekcjonowanie, spośród 16 genotypów fasoli, roślin najlepiej nadających się do uprawy w krajach tropikalnych i subtropikalnych (YAN i współaut. 1995a, b). Nasiona roślin strączkowych stanowią tam niebagatelny procent diety żywieniowej a ziemia uprawna jest uboga w fosfor. Plony są mocno obniżone i wydajność produkcji rolniczej dochodzi jedynie do 20–30% wydajności uzyskiwanej w krajach o wysoko rozwiniętym rolnictwie

(YAN i współaut. 1995a, b, HERRERA-ESTRELLA 1999; VANCE 2001). Badania te, uzupełnione np. o analizę grupy loci cech ilościowych QTL (ang. quantitative trait loci), jak w przypadku ryżu (NI i współaut. 1998), mogą stanowić podstawę do określenia cech pożądanych u roślin użytkowych uprawianych na glebach ubogich w Pi.

Innym podejściem są próby doskonalenia roślin z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej. Uważa się, że korzystne mogłoby być wprowadzenie do tkanek genów warunkujących: (i) efektywny wzrost korzeni lub włośników w warunkach deficytu Pi, (ii) zwiększenie ekspresji transporterów błonowych o dużym powinowactwie do Pi, (iii) zwiększone wydzielanie kwasów organicznych; (iv) podwyższoną syntezę i sekrecję (przez korzenie) enzymów hydrolizujących organiczne formy fosforu w glebie, (iv) zwiększoną biodegradację fityny lub obniżoną zawartość fityny w nasionach (HIRSCH i SUSSMAN 1999, LÓPEZ-BUCIO i współaut. 2000a, RICHARDSON i współaut. 2001, TESFAYE i współaut. 2001, KUNZE i współaut. 2002). Ponadto, korzystne mogłoby być stworzenie roślin transgenicznych użytecznych do monitorowania stopnia niedoboru Pi – „smart plants” (HAMMOND i współaut. 2003).

Transgeniczne kultury komórkowe tytoniu, charakteryzujące się zwiększonym poziomem transkryptu *PHT1* transportera Pi (o wysokim powinowactwie do fosforanu), wydajniej pobierały fosforan i znacznie lepiej rosły na podłożu o niskiej zawartości Pi niż kultury kontrolne (MITSUKAWA i współaut. 1997, KUNZE i współaut. 2002). Nie zbadano jednak wpływu nadekspresji genu *PHT1* na funkcjonowanie i wzrost całej rośliny, nie podjęto także prób uprawy takich roślin w warunkach polowych (KUNZE i współaut. 2002). Ten kierunek badań nie był kontynuowany, prawdopodobnie metodycznym utrudnieniem było podobieństwo sekwencji licznych genów (poznanych w następnych latach) kodujących transportery Pi (KUNZE

i współaut. 2002, SMITH i współaut. 2003). Ponadto, należy pamiętać iż Pi pobrany w nadmiarze przez zmodyfikowane rośliny może mieć dla nich działanie toksyczne (MIMURA 1999, RAGHOTHAMA 1999).

Nadekspresja genów kodujących enzymy związane z syntezą i wydzielaniem kwasów organicznych przez korzenie powinna być użyteczną cechą stymulującą pobieranie Pi z gleby. Stwierdzono, że nadekspresja bakteryjnego genu syntazy cytrynianowej (z *Pseudomonas aeruginosa*) w komórkach tytoniu zwiększała produkcję i wydzielanie kwasu cytrynowego (DE LA FUENTE i współaut. 1997), takie rośliny transgeniczne intensywniej pobierały Pi z podłoża i wykazywały lepszy wzrost na glebach ubogich w fosfor (LÓPEZ-BUCIO i współaut. 2000a). Jednak badania transgenicznego tytoniu z nadekspresją syntazy cytrynianu w innym laboratorium wskazały, że metoda ta wymaga uważnego dobierania promotorów i dalszych doświadczeń, zanim zastosuje się ją w praktyce (Delhaize i współaut. 2001). Natomiast badania z użyciem roślin *Daucus carota* z nadekspresją mitochondrialnej syntazy cytrynianowej (z rzodkiewnika) (KOYAMA i współaut. 1999) oraz *Arabidopsis thaliana* z nadekspresją mitochondrialnej syntazy cytrynianowej (z marchwi) (KOYAMA i współaut. 2000) wykazały, że te transgeniczne rośliny charakteryzują się wyższą produkcją i sekrecją cytrynianu oraz lepszym wzrostem na podłożach zawierających fosforan glinu. Cytrynian, oprócz uwalniania Pi z niedostępnych roślinom fosforanów może stanowić także źródło węgla wzmagając rozwój bakterii glebowych. Rośliny *Medicago sativa* z nadekspresją genu kodującego dehydrogenazę jabłczanową (EC 1.1.1.82) wykazywały wzrost aktywności enzymu (1,6 x) oraz 7-krotny wzrost stężenia kwasów organicznych (cytrynowego, jabłkowego, bursztynowego i octowego) w eksudatach korzeniowych (TESFAYE i współaut. 2001). Powodowało to zwiększenie dostępności P, K, Mn i Zn w ryzosferze korzeni roślin transgenicznych (TESFAYE i współaut. 2003). Natomiast nadekspresja genu kodującego karboksylazę fosfoenolopirogronianową (EC 4.1.1.31) u *Medicago sativa* powodowała wzrost aktywności enzymu, ale nie obserwowano wzrostu stężenia kwasów organicznych w korzeniach (TESFAYE i współaut. 2001).

Podjęmuje się próby doskonalenia nie tylko roślin – poszukuje się także szczepów bakterii o wysokiej wydajności wydzielania kwasów organicznych (lub fosfataz) w celu

zwiększenia dostępności Pi w glebie. Kwasami organicznymi najczęściej wydzielanymi przez bakterie są: kwas glukonowy, octowy, mlekowy, walerianowy, glikolowy czy kwas bursztynowy (RODRIGUEZ i FRAGA 1999). Stwierdzono, że stosowanie szczepów bakteryjnych z rodzaju: *Pseudomonas* (*P. cepacia*), *Azospirillum*, *Burkholderia* (*B. cepacia*), *Enterobacter*, *Bacillus* (*B. firmus*, *B. liqueniformis*), *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. meliloti*), *Erwinia* (*E. herbicola*), *Serratia* poprawia wzrost i rozwój roślin na podłożach ubogich w fosfor rozpuszczalny (RODRIGUEZ i FRAGA 1999).

Wykorzystanie roślin transgenicznych intensywnie wytwarzających enzymy degradujące fitynę mogłoby, z kolei, poprawić biodegradację tych związków, zwiększyć dostępność Pi oraz zapobiec nadmiernemu nagromadzeniu organicznych form fosforu w glebie (BRINCH-PEDERSEN i współaut. 2002). Wprowadzenie genu *phyA* (kodującego fitazę) z *Aspergillus niger* do komórek *Arabidopsis* spowodowało 20-krotny wzrost aktywności fitaz w korzeniach roślin (wykazujących ekspresję *ex::phyA*) (RICHARDSON i współaut. 2001). Zwiększenie aktywności fitaz poprawiało wzrost roślin transgenicznych i gospodarkę fosforanową. Wzrost roślin zmodyfikowanych na podłożu tylko z fityną, był podobny do wzrostu roślin nie zmodyfikowanych genetycznie na podłożu optymalnie zaopatrzonym w fosfor nieorganiczny (RICHARDSON i współaut. 2001). Innym sposobem zapobiegającym nagromadzeniu fityny w otoczeniu są próby wyselekcjonowania roślin z obniżoną zawartością kwasu fitynowego (lub fityny), jako zapasowego związku fosforu w nasionach czy bulwach. Efektem takich badań jest wyizolowanie mutantów kukurydzy i jęczmienia (*lpa1*, *lpa2* – ang. low phytic acid) o obniżonej średnio o 50–80% kumulacji kwasu fitynowego w nasionach lecz podobnej zawartości fosforu całkowitego (RABOY 1998).

Manipulując pulą fosforanów wprowadzono do liści ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) gen kodujący kinazę polifosforanową (enzym bakteryjny z *Echerichia coli*). Wynikiem transformacji było powstanie nowej, nietypowej u roślin, puli Pi w chloroplastach (jednak nieaktywnej metabolicznie) (VAN VOORTHUYSEN i współaut. 2000). Wydaje się, że zmodyfikowane genetycznie rośliny zdolne do gromadzenia polifosforanów powinny mieć również wprowadzone geny (np. także bakteryjne) odpowiedzialne za metabolizm

tej formy zapasowej fosforu (VAN VOORTHUYSEN i współaut. 2000, RAGHOTHAMA 2000 b).

Brak jest dotychczas doniesień o udanych próbach zwiększania sekrecji niespecyficznych kwaśnych fosfataz do podłoża. Wyizolowanie i badania mutantów *Arabidopsis* z obniżoną produkcją kwaśnych fosfataz zewnątrzkomórkowych (*pup1*, *pup3*) (TOMSCHA i współaut. 2004) wykazały, że obniżenie sekrecji fosfataz istotnie zmienia gospodarkę fosforanową roślin. Wydaje się, iż w najbliższej przyszłości zostaną skonstruowane także rośliny transgeniczne charakteryzujące się zwiększonym wydzielaniem niespecyficznych kwaśnych fosfataz z korzeni.

Nasuwać się wątpliwości – a może do utrzymania produkcji rolniczej wystarczyłoby jedynie sprawny system monitorowania poziomu Pi w glebie i dobrane odpowiednio nawożenia? Niestety, ciągle brakuje dobrych metod pomiarów frakcji fosforu dostępnego roślinom. Analiza zawartości fosforu całkowitego i nieorganicznego w glebie metodami chemicznymi na pewno nie jest wystarczająca, ponadto utrudniona jest właściwa ekstrakcja roztworu glebowego (SMETHURST 2000). Poziom Pi jest zmienny, zależy od rodzaju gleby, jej pH, uprawy i intensywności nawożenia. Ponadto chemiczne pomiary stężenia Pi należałoby powtarzać wielokrotnie w ciągu roku. Chemiczne pomiary najczęściej nie odzwierciedlają rzeczywistego zapotrzebowania roślin na Pi i odmiennych możliwości różnych roślin do pobierania fosforu z gleby (SMETHURST 2000); nie uwzględniają też faktu, że rośliny mogą wpływać na swoje otoczenie zwiększając dostępność fosforu. A odpowiednie, jedynie uzupełniające braki Pi, dawki nawozów fosforowych należałoby dobierać biorąc pod uwagę wszystkie wymienione czynniki. Aktualnie podejmowane są próby wprowadzenia metod pomiarów bezpośrednich dostępnych składników mineralnych, które polegają np. na nieinwazyjnych pomiarach fluorescencji chlorofilu w materiale roślinnym za pomocą specjalnych sond (metoda taka okazała się skuteczna przy określeniu stopnia niedoboru azotu) (RAUN i współaut. 1998). Tworzone są obecnie modele (symulacje komputerowe) określające powiązania pomiędzy poziomem Pi w glebie, nawożeniem a odpowiedziami roślin na niedobór fosforu lub nadmierne nawożenie fosforanowe (GREENWOOD i współaut. 2001); modele te powinny w przyszłości ułatwić racjonalne gospodarowanie zasobami fosforu w przyrodzie.

Nowym pomysłem było skonstruowanie roślin zdolnych do rozpoznania i wykazania niedoboru Pi w tkankach, nazwane przez badaczy „smart plants” (HAMMOND i współaut. 2003). Poszukując właściwego genu kontrolnego zbadano ekspresję genów w pędach *Arabidopsis* za pomocą mikromacierzy DNA (ang. cDNA microarray) po 4 h, 1 dniu i po 4 dniach niedoboru fosforu. Za „właściwy gen” autorzy uznali taki, który wykazuje stymulację ekspresji w odpowiedzi na bardzo wczesny i wczesny deficyt P, zanim nastąpią widoczne zmiany we wzroście roślin (które w badanych warunkach następowały po 72 godzinach braku Pi w podłożu). Jako gen kontrolny wybrano *SQD1*, kodujący białko uczestniczące w biosyntezie sulfolipidów (YU i współaut. 2002). Do celów monitorowania niedoboru Pi przygotowano rośliny transgeniczne zawierające konstrukt reportowego genu -glukuronidazy pod kontrolą promotora *SQD1* (*GUS::SQD1*) – zmiany ekspresji genu uwidocznione zostały w postaci niebieskiej barwy produktu aktywności -glukuronidazy (HAMMOND i współaut. 2003). Do kontroli stopnia deficytu Pi u roślin mogłyby służyć również inne „geny kontrolne”. HAMMOND i współaut. (2003) sądzą, że zastosowanie tego typu „smart plants” w praktyce pozwoliłoby na sprawne monitorowanie upraw i racjonalne uzupełnianie braków danego pierwiastka (poprzez nawożenia), tylko w razie rzeczywistego niedoboru niezbędnego składnika mineralnego w tkankach. Podsumowując, należy podkreślić, że rośliny lądowe w czasie swojej ewolucji wykształciły wielostronne mechanizmy pomagające uzyskać niedostępne formy fosforu z podłoża oraz poprawić wykorzystanie wewnątrzkomórkowych zasobów Pi. Sposoby poprawienia dostępności, pobierania, transportu i homeostazy Pi zależą zarówno od pozycji systematycznej danej rośliny, jak i od warunków środowiska (zwłaszcza od rodzaju podłoża). Człowiek podejmuje wiele prób udoskonalenia roślin pod względem efektywności pobierania/odzyskiwania składników mineralnych, w tym także Pi, aby uzyskać odporne na niedobór pierwiastków rośliny uprawne (HIRSCH i SUSSMAN 1999, GROTZ i GUERINOT 2002). Jest to zazwyczaj trudne, głównie ze względu na ogromną różnorodność reakcji roślin na niedobór Pi (oraz wielu podobieństw do reakcji na inne stresy, jak np. zmiany wzrostowe czy nagromadzanie metabolitów). W warunkach laboratoryjnych uzyskano obiecujące egzemplarze roślin udoskonalonych pod względem

wykorzystania Pi. Jednak niewiele wyników tych badań udało się dotychczas wykorzystać w praktyce polowej – do upraw roślin użytkowych. Zastosowanie nowych roślin (np. zmodyfikowanych genetycznie) i metod uprawy w praktyce wymaga na pewno automatyzacji diagnostyki genetycznej i znacznego obniżenia jej kosztów (HERRERA-ESTRELLA 1999). Ponadto, niezbędna jest ścisła współpraca biotechnologów z hodowcami roślin.

Ostatnie lata przyniosły ogromny postęp badań nad molekularnym podłożem odpowiedzi roślin na niedobór Pi (CIERESZKO 2003). Uzyskane wyniki prawdopodobnie przyczynią się do tworzenia nowych roślin, zmodyfikowanych w celu efektywnego wykorzystania Pi, oraz zastosowania nowoczesnych technik uprawy roślin na glebach ubogich w składniki mineralne.

CAN THE UPTAKE OF PHOSPHATES BY PLANTS BE IMPROVED?

Summary

Phosphorus is an important nutrient but usually it is at low availability in the soil – thus, it can limit plant growth and agricultural production. Plants have evolved various responses to adapt to low phosphorus nutrition – which is shortly summarized in this review. For example, roots secrete organic acids and different enzymes to rhizosphere, or can induce the transport system to improve the release (from the soil) and uptake of inorganic phosphate (Pi).

Plants might control Pi nutrition by induction of mycorrhizae or by developing specific root structures – proteoid roots. Attempts to generate plants which may more efficiently acquire Pi from the soil have recently been made by several scientific groups. The usefulness of such transgenic plants, with improved Pi uptake and enhanced Pi mobilization, and possible application of these plants in agriculture are discussed.

LITERATURA

- ABEL S., NÜRNBERGER T., AHNERT V., KRAUSE G.-J., GLUND K., 2000. *Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells*. Plant Physiol. 122, 543–552.
- ABEL S., TICCONI C. A., DELATORRE C. A., 2002. *Phosphate sensing in higher plants*. Physiol. Plant. 115, 1–8.
- BATES T. R., LYNCH J. P., 2000. *The efficiency of Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition*. Am. J. Bot. 87, 964–970.
- BRINCH-PEDERSEN H., SORENSEN L. D., HOLM P. B., 2002. *Engineering crop plants: getting a handle on phosphate*. Trends Plant Sci. 7, 118–125.
- CIERESZKO I., 2000. *Wzrost i metabolizm roślin w warunkach deficytu fosforu*. Kosmos 49, 179–189.
- CIERESZKO I., 2003. *Molekularne podstawy odpowiedzi roślin na niedobór fosforu*. Post. Biol. Kom. 30, 647–665.
- CIERESZKO I., RYCHTER A. M., 1995. *Zmiany metaboliczne w korzeniach wywołane deficytem fosforu*. Wiad. Bot. 39, 81–90.
- CIERESZKO I., KLECZKOWSKI L. A., 2005. *Expression of several genes involved in sucrose/starch metabolism as affected by different strategies to induce phosphate deficiency in Arabidopsis*. Acta Physiol. Plant. 27, 147–155.
- CIERESZKO I., JANONIS A., KOCIAKOWSKA M., 2002. *Growth and metabolism of cucumber in phosphate-deficient conditions*. J. Plant Nutr. 25, 1115–1127.
- COELLO P., 2002. *Purification and characterization of secreted acid phosphatase in phosphorus-deficient Arabidopsis thaliana*. Physiol. Plant. 116, 293–298.
- DAKORA F. D., PHILLIPS D. A., 2002. *Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments*. Plant Soil 245, 35–47.
- DE LA FUENTE J. M., RAMIREZ-RODRIGUEZ V., CABRERA-PONCE J. L., HERRERA-ESTRELLA L., 1997. *Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis*. Science 276, 1566–1568.
- DELHAIZE E., HEBB D. M., RYAN P. R., 2001. *Expression of a Pseudomonas aeruginosa citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux*. Plant Physiol. 125, 2059–2067.
- FAN M., ZHU J., RICHARDS C., BROWN K. M., LYNCH J. P., 2003. *Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots*. Funct. Plant Biol. 30, 493–506.
- FRANCO-ZORRILLA J. M., GONZÁLEZ E., BUSTOS R., LINHARES F., LEYVA A., PAZ-ARES J., 2004. *The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation*. J. Exp. Bot. 55, 285–293.
- GADKAR V., DAVID-SCHWARTZ R., KUNIK T., KAPULNIK Y., 2001. *Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition*. Plant Physiol. 127, 1493–1499.
- GRABOWSKI J., 2004. *Zasobność gleb województwa podlaskiego w fosfor na podstawie badań Stacji Chemiczno-Rolniczej Oddział w Białymstoku*. Wiadomości Rolnicze 7–8, 19–20.
- GREENWOOD D. J., KARPINETS T. V., STONE D. A., 2001. *Dynamic model for the effects of soil P and fertilizer P on crop growth, P uptake and soil P in arable cropping: model description*. Ann. Bot. 88, 279–291.
- GROTZ N., GUERINOT M. L., 2002. *Limiting nutrients: an old problem with new solutions?* Curr. Opin. Plant Biol. 5, 158–163.
- HAMMOND J. P., BENNETT M. J., BOWEN H. C., BROADLEY M. R., EASTWOOD D. C., MAY S. T., RAHN C., SWARUP R., WOOLAWAY K. E., WHITE P. J., 2003. *Changes in gene expression in Arabidopsis shoots during phosphate starvation and the poten-*

- tial for developing smart plants. *Plant Physiol.* 132, 578–596.
- HAMMOND J. P., BROADLEY M. R., WHITE P. J., 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Ann. Bot.* 94, 323–332.
- HARAN S., LOGENDRA S., SESKAR M., BRATANOVA M., RASKIN I., 2000. Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiol.* 124, 615–626.
- HELL R., HILLEBRAND H., 2001. Plant concepts for mineral acquisition and allocation. *Trends Plant Sci.* 12, 161–168.
- HERRERA-ESTRELLA L., 1999. Transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their transfer to the small farmer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5978–5981.
- HINSINGER P., 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237, 173–195.
- HIRSCH R. E., SUSSMAN M. R., 1999. Improving nutrient capture from soil by the genetic manipulation of crop plants. *Trends Biotech.* 17, 356–361.
- JUSZCZUK I. M., WIKTOROWSKA A., MALUSÁ E., RYCHTER A. M., 2005. Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 267, 41–49.
- KARANDASHOV V., NAGY R., WEGMÜLLER S., AMRHEIN N., BUCHER M., 2004. Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6285–6290.
- KARANDASHOV V., BUCHER M., 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* 10, 22–29.
- KOYAMA H., TAKITA E., KAWAMURA A., HARA T., SHIBATA D., 1999. Overexpression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in *Al*-phosphate medium. *Plant Cell Physiol.* 40, 482–488.
- KOYAMA H., KAWAMURA A., KIHARA T., HARA T., TAKITA E., SHIBATA D., 2000. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol.* 41, 1030–1037.
- KUNZE R., FROMMER W. B., FLÜGGE U.-I., 2002. Metabolic engineering of plants: the role of membrane transport. *Metab. Engineer.* 4, 57–66.
- LAMBERS H., CRAMER M. D., SHANE M. W., WOUTERLOOD M., POOT P., VENEKLAAS E. V., 2003. Introduction. Structure and functioning of cluster roots and plant responses to phosphate deficiency. *Plant Soil* 248, 9–19.
- LI M., OSAKI M., RAO I. M., TADANO T., 1997. Secretion of phytase from the roots of several plants species under phosphorus-deficient conditions. *Plant Soil* 195, 161–169.
- LINKOHR B. I., WILLIAMSON L. C., FITTER A. H., LEYSER H. M. O., 2002. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J.* 29, 751–760.
- LYNCH J. P., BROWN K. M., 1998. Regulation of root architecture by phosphorus availability. [W:] *Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes*. LYNCH J. P., DEIKMANN J. (red.) Am. Soc. Plant Physiol. Rockville, Maryland USA, 148–156.
- LÓPEZ-BUCIO J., DE LA VEGA O. M., GUEVARA-GARCIA A., HERRERA-ESTRELLA L., 2000a. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotech.* 18, 450–453.
- LÓPEZ-BUCIO J., NIETO-JACOBO M. F., RAMÍREZ-RODRÍGUEZ V., HERRERA-ESTRELLA L., 2000b. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci.* 160, 1–13.
- MA Z., BASKIN T. I., BROWN K. M., LYNCH J. P., 2003. Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *Plant Physiol.* 131, 1381–1390.
- MARSCHNER H., 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London.
- MENGEL K., KIRKBY E. A., 1983. *Podstawy żywienia roślin*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 308–324.
- MIMURA T., 1999. Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *Inter. Rev. Cytol.* 191, 149–200.
- MITSUKAWA N., OKUMURA S., SHIRANO Y., SATO S., KATO T., HARASHIMA S., SHIBATA D., 1997. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7098–7102.
- MULLANEY E. J., ULLAH A. H. J., 2003. The term *phytase* comprises several different classes of enzymes. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 312, 179–184.
- NARRANG R. A., BRUENE A., ALTMANN T., 2000. Analysis of phosphate acquisition efficiency in different *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiol.* 124, 1786–1799.
- NEUMANN G., MASSONNEAU A., MARTINOIA E., RÖMHELD V., 1999. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208, 373–382.
- NEUMANN G., MARTINOIA E., 2002. Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci.* 7, 162–167.
- NI J. J., WU P., SENADHIRA D., HUANG N., 1998. Mapping QTLs for phosphorus deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97, 1361–1369.
- OLCZAK M., 1996. *Kwaśne fosfatazy roślin wyższych*. *Wiad. Bot.* 40, 39–51.
- POIRIER Y., BUCHER M., 2002. Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. In: *The Arabidopsis Book*. Am. Soc. Plant Biol., pp. 1–35.
- RABOY V., 1998. The genetics of seed storage phosphorus pathways. [W:] *Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes*. LYNCH J. P., DEIKMANN J. (red.) Am. Soc. Plant Physiol. Rockville, Maryland USA, 192–203.
- RAGHOTHAMA K. G., 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 665–693.
- RAGHOTHAMA K. G., 2000a. Phosphate transport and signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 182–187.
- RAGHOTHAMA K. G., 2000b. Phosphorus acquisition; plant in the driver's seat! *Trends Plant Sci.* 5, 412–413.
- RAUN W. R., JOHNSON G. V., SEMBIRING H., LUKINA E. V., LARUFFA J. M., THOMAS W. E., PHILLIPS S. B., SOLIE J. B., STONE M. L., WHITNEY R. W., 1998. Indirect measures of plant nutrients. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29, 1571–1581.
- RAUSCH C., DARAM P., BRUNNER S., JANSÁ J., LALOÍ M., LEGGEWIE G., AMRHEIN N., BUCHER M., 2001. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414, 462–466.
- RAUSCH C., BUCHER M., 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216, 23–37.

- REŃKO J., 2004. Czy warto stosować nawożenie fosforowe. *Wiadomości Rolnicze* 10, 16–17.
- RICHARDSON A. E., HADOBAS P. A., HAYES J. E., 2001. *Extracellular secretion of Aspergillus phytase from Arabidopsis roots enables plants to obtain phosphorus from phytate*. *Plant J.* 25, 641–649.
- RODRIGUEZ H., FRAGA R., 1999. *Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion*. *Biotech. Adv.* 17, 319–339.
- RYCHTER A. M., RAO I. M., 2005. *Role of phosphorus in photosynthetic carbon metabolism*. [W:] *Handbook of Photosynthesis*. PESSARAKI M. (red.), 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 123–148.
- SCHACHTMAN D. P., REID R. J., AYLING S. M., 1998. *Phosphorus uptake by plants: from soil to cell*. *Plant Physiol.* 116, 447–453.
- SHANE M. W., DE VOS M., DE ROOCK S., LAMBERS H., 2003. *Shoot P status regulates cluster-root growth and citrate exudation in Lupinus albus grown with a divided root system*. *Plant Cell Environ.* 26, 265–273.
- 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.
- SMETHURST P. J., 2000. *Soil solution and other soil analyses as indicators of nutrient supply: a review*. *For. Ecol. Manage.* 138, 397–411.
- SMITH F. W., MUDGE S. R., RAE A. L., GLASSOP D., 2003. *Phosphate transport in plants*. *Plant Soil* 248, 71–83.
- TESFAYE M., TEMPLE S. J., ALLAN D. L., VANCE C. P., SAMAC D. A., 2001. *Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum*. *Plant Physiol.* 127, 1836–1844.
- TESFAYE M., DUFAULT N. S., DORNBUSCH M. R., ALLAN D. L., VANCE C. P., SAMAC D. A., 2003. *Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability*. *Soil Biol. Biochem.* 35, 1103–1113.
- THOMAS C., SUN Y., NAUS K., LLOYD A., ROUX S., 1999. *Apyrase functions in plant phosphate nutrition and mobilizes phosphate from extracellular ATP*. *Plant Physiol.* 119, 543–552.
- TICCONI C. A., ABEL S., 2004. *Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures*. *Trends Plant Sci.* 9, 548–555.
- TOMSCHA J., DEWALD A., LYNCH J. P., GUILTINAN M., DEIKMAN J., 1998. *Constitutive phosphatase secretion mutants in Arabidopsis thaliana*. [W:] *Phosphorus in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic, and Ecosystem Processes*. LYNCH J. P., DEIKMAN J. (red.) Am. Soc. Plant Physiol. Rockville, Maryland USA, 376–378.
- TOMSCHA J. L., TRULL M. C., DEIKMAN J., LYNCH J. P., GUILTINAN M. J., 2004. *Phosphatase under-producer mutants have altered phosphorus relations*. *Plant Physiol.* 135, 334–345.
- TURNAU K., JURKIEWICZ A., GRZYBOWSKA B., 2002. *Rola mikoryzy w bioremediacji terenów zanieczyszczonych*. *Kosmos* 51, 185–194.
- VANCE C. P., 2001. *Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant Physiol.* 127, 390–397.
- VANCE C. P., UHDE-STONE C., ALLAN D. L., 2003. *Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource*. *New Phytol.* 157, 423–447.
- VAN VOORTHUYSEN T., REGIERER B., SPRINGER F., DIJKEMA C., VREUGDENHIL D., KOSSMANN J., 2000. *Introduction of polyphosphate as a novel phosphate pool in the chloroplast of transgenic potato plants modifies carbohydrate partitioning*. *J. Biotechnol.* 77, 65–80.
- WANG Y., RIBOT C., REZZONICO E., POIRIER Y., 2004. *Structure and expression profile of the Arabidopsis PHO1 gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis*. *Plant Physiol.* 135, 400–411.
- WASAKI J., YONETANI R., KURODA S., SHINANO T., YAZAKI J., FUJII F., SHIMBO K., YAMAMOTO K., SAKATA K., SASAKI T., KISHIMOTO N., KIKUCHI S., YAMAGISHI M., OSAKI M., 2003. *Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots*. *Plant Cell Environ.* 26, 1515–1523.
- WATT M., EVANS J. R., 1999. *Proteoid roots. Physiology and development*. *Plant Physiol.* 121, 317–323.
- WISSUWA M., 2003. *How do plants achieve tolerance to phosphorus deficiency? Small causes with big effects*. *Plant Physiol.* 133, 1947–1958.
- YAN X., LYNCH J. P., BEEBE S. E., 1995a. *Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types: I. Vegetative response*. *Crop Sci.* 35, 1086–1093.
- YAN X., BEEBE S. E., LYNCH J. P., 1995b. *Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types: II. Yield response*. *Crop Sci.* 35, 1094–1099.
- YU B., XU C., BENNING C., 2002. *Arabidopsis disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5732–5737.