

JÓZEF BUCZEK, JOLANTA MARCINIAK

**REDUKTAZA AZOTANOWA I REDUKTAZA AZOTYNOWA — KLUCZOWE  
ENZYMY ASYMLACJI AZOTANÓW W ROŚLINACH WYŻSZYCH**  
NITRATE REDUCTASE AND NITRITE REDUCTASE A KEY ENZYMES OF NITRATE  
ASSIMILATION IN HIGHER PLANTS

**Wstęp**

Powszechnie przyjmuje się, że azotanowa forma azotu (N) jest korzystniejszym źródłem N dla roślin w porównaniu do amonowej [34]. Przypuszczenie to wynika z faktu, że amoniak pobierany przez rośliny może powodować u wielu gatunków zahamowanie wzrostu i rozwoju i w konsekwencji prowadzić do obniżenia plonowania roślin [2, 3, 4, 30, 51]. Jednakże szereg badań [90] wskazuje, że obydwie formy N mineralnego są równorzędnymi źródłami azotu dla roślin, a stwierdzane różnice w reakcji roślin na  $\text{NH}_4^+$  czy  $\text{NO}_3^-$  wynikają głównie z cech gatunkowych oraz zależą od stężenia  $\text{NH}_4^+$  czy  $\text{NO}_3^-$  i pH środowiska zewnętrznego oraz zawartości innych składników mineralnych w glebie. W naturalnych ekosystemach zarówno amon jak azotan wytwarzane są z organicznych form azotu w procesach mineralizacji, a zasoby N w glebach uprawnych wzbogacane są ponadto stosowaniem nawozów mineralnych, zawierających głównie sole amonowe. Uwzględniając jednak fakt, że większość gleb uprawnych wykazuje właściwości sprzyjające procesom nityfikacji [75], można sądzić, że dominującą formą azotu mineralnego będą azotany [34]. Zgodnie z obliczeniami Guerrero i wsp. [32] globalna wielkość asymilacji  $\text{NO}_3^-$  (około  $2 \times 10^4$  megaton/rok) może przewyższać o dwa rzędy wielkość wiążanego  $\text{N}_2$  z powietrza (około  $2 \times 10^2$  megaton/rok). Wydaje się zatem, że problem asymilacji azotu azotanowego jest godny uwagi zarówno z punktu widzenia badań podstawowych jak utylitarnych.

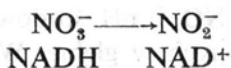
**Asymilacja azotanów**

Azotany pobierane są przez korzenie roślin w dużych ilościach i w większości transportowane są do części nadziemnych, głównie do liści. Część pobranych azotanów ulega bezpośrednio wykorzystaniu w metabolizmie azotowym roślin zarówno

w korzeniach jak w liściach, jednak część, a niekiedy większość pobranych  $\text{NO}_3^-$  magazynowana jest w wakuolach komórek roślin [31]. Redukcja pobranych  $\text{NO}_3^-$  przez rośliny wyższe jest podstawowym procesem biologicznym warunkującym włączenie N azotanowego do azotowych związków organicznych roślin. W procesie tym wysoko utleniona form N nieorganicznego ( $\text{NO}_3^-$ ) ulega redukcji do amoniaku, który wiązany jest następnie w formie aminokwasów. Asymilacja  $\text{NO}_3^-$  w roślinach wyższych do aminokwasów katalizowana jest przez kilka enzymów, wśród których kluczową rolę odgrywa reduktaza azotanowa (NR). Enzym ten przeprowadza reakcję redukcji azotanów do azotynów. W następnym etapie kolejny enzym reduktaza azotynowa (NIR) katalizuje dalszą redukcję  $\text{NO}_2^-$  do amoniaku względnie jonu amonowego. Wytworzony  $\text{NH}_4^+$  w wyniku redukcji, włączany jest do pierwotnej syntezy aminokwasów przy udziale zespołu enzymów: syntetazy glutaminowej (GS) i syntazy glutaminianowej (GOGAT), natomiast udział dehydrogenazy glutaminianowej (GDH) jako alternatywnej drogi biosyntezy pierwotnych aminokwasów z azotanów jest kontrowersyjny z uwagi na niskie powinowactwo tego enzymu do amoniaku ( $K_m$  GDH wobec amoniaku około 5—75 mM) [56] w porównaniu do wysokiego powinowactwa GS wobec amoniaku ( $K_m$  dla GS wobec amoniaku około 10—100  $\mu\text{M}$ ) [[55].

### Reduktaza azotanowa

Reduktaza azotanowa (NR, oksydoreduktaza  $\text{NADH}:\text{NO}_3^-$ ; EC 1.6.6.1) jest flawino-hemo-molibdeno proteiną katalizującą reakcję przeniesienia dwu elektronów z  $\text{NADH}$  na  $\text{NO}_3^-$  z wytworzeniem  $\text{NO}_2^-$  [64] zgodnie z reakcją:

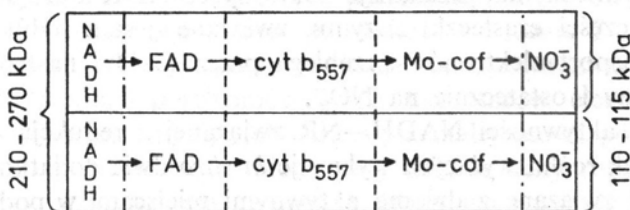


Prawie wszystkie dotąd zbadane rośliny wyższe wykorzystują  $\text{NADH}$  jako dawcę elektronów. Zawierają zatem  $\text{NADH-NR}$  (EC 1.6.6.1) o optimum pH 7,5 i stałej Michaelisa dla  $\text{NO}_3^-$  200  $\mu\text{M}$  i dla  $\text{NADH}$  2  $\mu\text{M}$  [6, 32]. Niektóre rośliny takie jak siewki ryżu [80], korzenie i tarczka zarodkowa kukurydzy [15, 72], liścienie i liście soi [14, 60, 66] zawierają bispecyficzną  $\text{NAD(P)H-NR}$  (EC 1.6.6.2), która wykorzystuje  $\text{NADPH}$  lub  $\text{NADH}$  jako równorzędne donory elektronów. Z badań Campbella [16] wynika, że  $\text{NAD(P)H-NR}$  jest innym typem enzymu o wyższym  $K_m$  (około 4 mM) dla azotanów i niższym optimum pH (około 6,5) [14]. Obydwie formy enzymu można rozdzielić przy pomocy chromatografii powinowactwa [72]. Przypuszcza się, że  $\text{NADH-NR}$  i  $\text{NAD(P)H-NR}$  są dwiema genetycznie różnymi formami NR [89]. Należąca do tropikalnych strączkowych *Erythrina senegalensis* jest jedyną znaną rośliną, która zawiera wyłącznie  $\text{NAD(P)H-NR}$  [93]. Przypuszcza się, że obydwie formy NR mogą występować w tkankach roślin, szczególnie w korzeniach, przy czym funkcja fizjologiczna  $\text{NAD(P)H-NR}$  nie jest jasna, głównie dlatego, że zwykle występuje obok  $\text{NADH-NR}$ , która to forma jest dominująca w korzeniach [92]. Ostatnio [91, 92] znaleziono w liściach soi trzy

typy NR: 1. Monospecyficzną NADH—NR o optimum pH 7,7. 2. Bispecyficzną NAD(P)H—NR o optimum pH 6,5 oraz 3. NADH—NR (dotychczas nie skatalogowaną) o optimum pH 6,5 zdolną do wykorzystania NADH ( $K_m$  około 1,4  $\mu\text{M}$ ) w dużo większym stopniu niż NADPH ( $K_m$  około 15  $\mu\text{M}$ ) [14]. Ponieważ druga i trzecia forma NR występowały w liściach soi gdy roślinom nie podawano  $\text{NO}_3^-$ , przypuszcza się [92], że są to formy tzw. konstytucyjnej NR w odróżnieniu od NADH—NR, która uważana jest za enzym indukcyjny.

### Struktura i funkcja NR

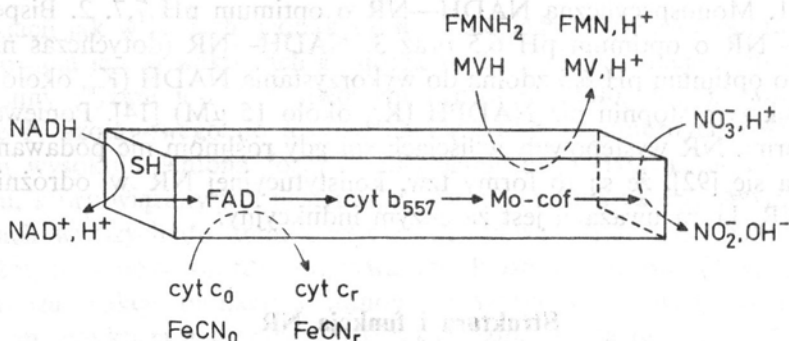
Reduktaza azotanowa występuje w większości roślin we wszystkich organach, szczególnie gdy źródłem azotu są  $\text{NO}_3^-$ . Subkomórkowa lokalizacja NR była do niedawna kontrowersyjna, ale ostatnie dane potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia o cytosolowej lokalizacji NR [7]. Jest zatem enzymem rozpuszczalnym i prawdopodobnie nie występuje w organellach.



Rys. 1. Model dimeru natywnej reduktazy azotanowej w roślinach wyższych [16]. Liniami przerywanymi z kropką (—·—) zaznaczono centra aktywne enzymu (wiązanie donora elektronów i redukcji  $\text{NO}_3^-$ ). Liniami przerywanymi oddzielono poszczególne komponenty enzymu (FAD — dwunukleotyd adenino-flawinowy, cyt.  $b_{557}$  — cytochrom  $b_{557}$ , Mo-cof — Mo-pteryna).

Struktura i funkcja najbardziej rozpowszechnionej formy NR mianowicie NADH—NR była przedmiotem licznych badań w preparatach izolowanych z liści szpinaku [27, 58, 64], tytoniu [53], jęczmienia [83], pszenicy [43], dyni [73] i kukurydzy [76]. Natywny enzym z wszystkich badanych roślin wyższych jest dimerem (rys. 1) dwu identycznych podjednostek o ciężarze molekularnym 200 000 do 270 000. Każda podjednostka o ciężarze molekularnym 110 000 do 115 000 zawiera trzy grupy prostetyczne: FAD [35, 73], żelazo hemowe zidentyfikowane jako cytochrom typu  $b_{557}$  [53, 63, 73, 86] oraz kafaktor molibdenowy o nazwie Mo-pteryna (pteryna — heterocykliczny składnik występujący w kwasie foliowym) [73, 85]. Stwierdzono, że grupa prostetyczna całego enzymu zawiera jeden FAD, jeden hem i jeden atom molibdenu na każdą podjednostkę o ciężarze molekularnym 115 000 [73]. Obydwie podjednostki w natywnym enzymie łączą się, przy czym miejsce wiązania jest bardzo wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych [16].

Model funkcyjny podjednostki NADH—NR przedstawia rys. 2. W natywnym enzymie każda z dwu podjednostek działa niezależnie w transporcie elektronów



Rys. 2. Model funkcyjny podjednostki NR. Strzałki wskazują kierunek transportu elektronów z NADH na NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Zaznaczono również cząstkowe aktywności NR. SH — miejsce aktywne, zawierające grupę tiolową, FeCN — żelazicyjanek, MV — metylviologen. Litery *o* i *r* oznaczają odpowiednio utlenioną i zredukowaną formę. Pozostałe oznaczenia jak na rys. 1 [16].

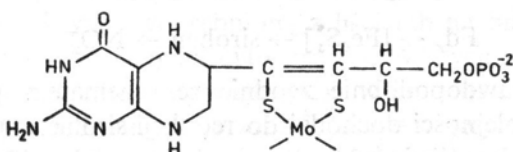
i katalizowaniu redukcji NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Na modelu tym można wyodrębnić dwa oddzielone przestrzennie miejsca aktywne, z których jedno leżące w początkowej (proksymalnej) części cząsteczki enzymu, przekazuje elektrony z NADH a drugie leżące w końcowej (distalnej) części cząsteczki enzymu, związane jest z redukcją NO<sub>3</sub><sup>-</sup> przy udziale Mo. Transport elektronów przebiega przez FAD i następnie cytochrom b<sub>557</sub> do Mo-pteryny i ostatecznie na NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Obok głównej aktywności NADH—NR związanej z redukcją azotanów, NR izolowany z tkanek roślin wyższych wykazuje *in vitro* dwie dodatkowe aktywności cząstkowe [5, 81] związane z dwoma aktywnymi miejscami w podjednostce NR. Pierwsza cząstkowa aktywność NR tzw. aktywność dehydrogenazowa (diaforaza) wrażliwa na inhibitory grup tiolowych (np. p-hydroksyrteciobenzoesany; p—HMB) umożliwia *in vitro* przeniesienie elektronów z NADH na różne akceptory takie jak utleniony cytochrom c, żelazicyjanek i inne. W rezultacie nie dochodzi do redukcji NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, jeżeli do systemu zawierającego NR wprowadzi się któryś z akceptorów elektronów, względnie, jeżeli roślinom poda się p-HMB, który blokuje transport elektronów z NADH na centrum aktywne leżące w proksymalnej części enzymu. Aktywność dehydrogenazową określa się zwykle symbolem CR—NR jako aktywność reduktazy cytochromu c. Usunięcie Mo [29] lub podstawienie Mo przez wolfram [62, 101] czy zablokowanie NR przez meta- lub ortowanadan sodu [10, 11 oraz nieopublikowane dane] nie wpływa na aktywność CR—NR. Sugeruje to, że funkcja dehydrogenazy związana jest z początkowym regionem podjednostki NR obejmującym miejsce wiązania NADH i flawohemoproteinę [9, 96]. Druga cząstkowa aktywność NR (ryc. 2) związana jest z końcowym regionem enzymu i wykazuje zdolność do redukcji NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nawet wówczas, gdy zablokowany jest łańcuch transportu elektronów z NADH, o ile do układu NR wprowadzi się zredukowany FMN lub sztuczny reduktor — metylviologen [81, 11]. Ponieważ zablokowanie Mo przez cyjanki czy azydki względnie przez jony wanadu, które nie blokują aktywności CR—NR (Buczek, dane nieopublikowane) uniemożliwia redukcję NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, jest oczywiste, że aktywność NR pod wpływem zredukowanych

flawin czy innych reduktorów jest funkcją końcowego regionu łańcucha transportu elektronów w podjednostce NR.

Fizjologiczna funkcja poszczególnych aktywności cząstkowych NR nie jest poznana. Jednak na podstawie pewnych eksperymentów można sądzić, że te aktywności NR obok aktywności głównej związanej z redukcją azotanów mogą odgrywać pewną rolę fizjologiczną w roślinach. Znalaziono np. że NADH—NR z liścieni dyni redukował  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$  w Fe-sideroforze bakteryjnym tzw. ferrioksymynie B [19] oraz inne Fe-siderofory z *Aromonas hydrophilia* [20]. Ostatnio Smarelli i Castignetti [21, 84] wykazali, że NADH—NR z liścieni dyni katalizował redukcję Fe-fitosideroforu (są to produkowane przez rośliny siderofory chaluatujące  $\text{Fe}^{3+}$ , 59) z jęczmienia, przy czym optimum pH dla redukcji Fe-fitosideroforów z jęczmienia wynosiło 6,0, podczas gdy dla redukcji  $\text{NO}_3^-$  — 7,5. Podobną aktywność wykazywała NR wobec cytrynianu żelazowego. Autorzy przypuszczają, że aktywność dehydrogenazowa CR—NR związana z początkowym regionem enzymu może w korzeniach roślin funkcjonować jako reduktaza dla kompleksu— $\text{Fe}^{3+}$  uczestnicząc w asymilacji żelaza przez komórki roślin.

Inne doniesienia sugerują udział cząstkowej aktywności NR w procesach związanych z generowaniem powierzchniowych potencjałów redoksowych. Mianowicie Jones i Morel [42] sugerowali, że w okrzemkach z rodzaju *Thalassiosira*, obok rozpuszczalnej formy NR występuje reduktaza azotanowa związana z plazmalemmą zdolną do redukcji pozakomórkowych akceptorów elektronów. Według autorów, reduktaza ta funkcjonuje jako trans-plazmalemmowa pompa protonowa przekazując elektrony na zewnątrz błony przy udziale dehydrogenazowej aktywności NR. Autorzy przypuszczają, iż energia uwalniana na skutek transportu elektronów i protonów przez plazmalemmę może zużywać się bezpośrednio lub pośrednio w pobieraniu azotanów lub innych jonów. Badania te nawiązują do wcześniejszej hipotezy Butz i Jackson [13], którzy sugerowali występowanie w plazmalemmie komórek roślin kompleksu enzymu: reduktaza azotanowa—ATPaza odpowiedzialnego za pobieranie  $\text{NO}_3^-$  przez komórki.



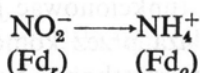
Rys. 3. Proponowany model kofaktora molibdenowego (Mo-pteryna) [41].

Molibden wchodzący w skład wszystkich molibdenoenzymów (reduktaza azotanowa, dehydrogenaza ksantynowa, oksydaza siarczynowa) roślin wyższych z wyjątkiem nitrogenazy [67, 79] występuje w formie kompleksu utworzonego pomiędzy Mo a fosforylowaną pteryną o nazwie molibdenopteryna lub kofaktor molibdenowy (Mo-pteryna, Mo-Co) [39, 40, 41] o przypuszczalnej strukturze przedstawionej na rys. 3. Łańcuch boczny zawiera co najmniej 4 atomy węgla i dwa atomy siarki. Przypuszcza się, że pteryna funkcjonuje jako chelator Mo wiążąc go z biał-

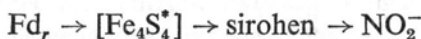
kiem i nadając mu tym samym biologiczną aktywność [100] oraz wpływając na dimeryzację podjednostek flawino-hemowych [45, 47]. Natura wiązania Mo nie jest jeszcze w pełni poznana, ale przypuszcza się, na podstawie badań z zastosowaniem EPR i innych [8, 23], że podstawową rolę w wiązaniu Mo odgrywają atomy siarki i atomy tlenu grupy fosforanowej. Okazało się, że występowanie Mo—Co w tkankach roślin jest niezależne od światła i azotanów, chociaż obecność  $\text{NO}_3^-$  podwyższała zawartość Mo-pteryny w liściach kukurydzy [18].

### Reduktaza azotynowa

Drugim etapem asymilacji azotanów jest redukcja azotynów do amoniaku. Proces ten przebiega przy udziale reduktazy azotynowej (NIR, oksydoreduktaza ferredoksyna:  $\text{NO}_2^-$ ; EC 1.7.7.1) zgodnie z reakcją:

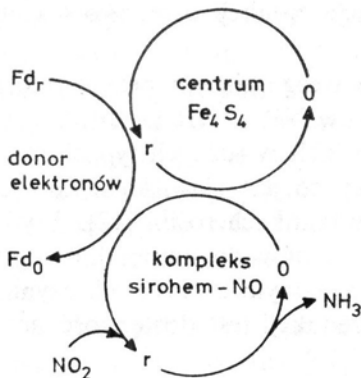


Występująca w roślinach wyższych NiR katalizuje przeniesienie 6 elektronów z zredukowanej ferredoksyny ( $\text{Fd}_r$ ) na azotyn redukując go do  $\text{NH}_4^+$ . W zielonych tkankach roślin wyższych NiR występuje w chloroplastach [25, 32], wykorzystując zredukowaną ferredoksynę jako dawcę elektronów. Enzym wyodrębniono i oczyszczono z liści dyni [36], szpinaku [37, 38, 98], jęczmienia [78] i pszenicy [82]. Okazało się, że NIR jest monomerym o ciężarze molekularnym 61 000 do 63 000. Jako grupę prostetyczną zawiera jedną tetranuklearną cząsteczkę  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  sprzężoną z hemem [28, 48, 50, 98]. Hem występujący w NIR zidentyfikowano [57] jako Fe-tetrahydroporfirynę (sirohemy) typu izobakteriochloryny zawierającą 8 reszt karboksylowych w bocznych łańcuchach. Szereg badań [1, 97, 98] wykazało, że sirohemy jest miejscem wiązania substratu ( $\text{NO}_2^-$ ) w ilości 1 mol  $\text{NO}_2^-$  na mol enzymu. Przypuszcza się [1, 36, 98], że  $\text{Fd}_r$  przekazuje elektrony poprzez centrum aktywne  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  i sirohemy na  $\text{NO}_2^-$  zgodnie ze schematem:



Reakcja przebiega prawdopodobnie zgodnie ze schematem przedstawionym na rys. 4. W pierwszej kolejności dochodzi do redukcji sirohemy przez elektron przekazywany przez  $\text{Fd}_r$ . Umożliwia to tworzenie się kompleksu NO-sirohemy, co z kolei warunkuje redukcję centrum  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  i dalszą transformację NO-sirohemy do kompleksu enzym— $\text{NH}_3$ . Proces ten związany jest z równoczesnym przekazaniem przez  $\text{Fd}_r$  dalszych 5 elektronów poprzez centrum  $\text{FeS}$ . NIR może redukować obok  $\text{NO}_2^-$  również hydroksyloaminy, ale aktywność redukcyjna jest bardzo słaba po oczyszczeniu enzymu [102].

W niezielonych tkankach roślin wyższych (korzenie) NIR jest zlokalizowana w plastydach [25, 49, 54, 65, 94]. Do niedawna funkcjonowanie NIR w korzeniach było niejasne ze względu na nieznaną źródło donorów elektronów. W doświadczeniach *in vitro* NIR funkcjonował tylko wtedy, gdy do mieszaniny reagującej



Rys. 4. Proponowany model redukcji azotynów w zielonych tkankach roślin [57].  $Fd_r$  i  $Fd_0$  odpowiednio zredukowana i utleniona forma ferredoksyny.

wprowadzono zredukowaną ferredoksynę lub zredukowany metylviologen, natomiast NADH czy NADPH okazały się mało skuteczne. Jednakże badania Kłobus [46] wykazały, że w korzeniach peluski NIR funkcjonuje wykorzystując NADH z szlaku fosforanów pentoz oraz NADPH pochodzący z utleniania kwasów organicznych przy udziale zależnej od  $NADP^+$  dehydrogenazy jabłczanowej. Do dzisiaj nie znaleziono jednak przekonywujących danych wyjaśniających mechanizm redukcji  $NO_2^-$  w korzeniach.

Pewne światło na proces redukcji  $NO_2^-$  w korzeniach rzuciły badania Ninomiya i Sato [61] oraz Suzuki i wsp. [95], którzy wyodrębnili z niezielonych kultur tkanek tytoniu i z młodych korzeni kukurydzy, nośnik elektronów podobny do ferredoksyny występującej w liściach. Wyżej cytowani badacze sugerują, że znaleziony przez nich nośnik ferredoksyno-podobny jest pewnym typem ferredoksyny o ciężarze molekularnym około 19 500 oraz wykazuje wysoką aktywność jako dawca elektronów w redukcji azotynów w proplastydach komórek tytoniu. Z drugiej strony Suzuki i wsp. [95] opisali reduktazę nukleotydów pirydynowych w tkankach korzeni kukurydzy wykazując, że może ona przenosić elektrony z NADH czy NADPH na ferredoksynę wyodrębnioną z liści lub na białko ferredoksyno-podobne uzyskane z korzeni i dalej na cytochrom c. W tych układach NADH czy NADPH mogą pełnić rolę substratów dla NIR w korzeniach. Okazało się dalej, że białko ferredoksyno-podobne z korzeni kukurydzy jest bardzo podobne, ale nie identyczne, z białkiem ferredoksyny z liści [95]. Ostatnio Wada i wsp. [99] wyizolowali z korzeni rzodkiewki ferredoksynę, która wykazywała charakterystyczne spektrum absorpcyjne właściwe dla ferredoksyny liściowej, różniąc się jednak składem aminokwasowym. Ferredoksyna wyodrębniona z korzeni zdolna była do przenoszenia elektronów z podsiarczynu sodu na NIR izolowany z korzeni gorczyca, jak również pośredniczyła w fotoredukcji  $NADP^+$  z rozbitych chloroplastów szpinaku [99]. Powyższe badania sugerują, że w korzeniach występuje pewien typ ferredoksyny funkcjonującej jako czynnik redoksywny enzymów zależnych od ferredoksyny np.  $Fd-NIR$  czy  $Fd-GOGAT$  [99].

## Regulacja redukcji azotanów i azotynów

Podstawowym czynnikiem regulującym proces redukcji azotanów w tkankach roślin jest aktywność enzymów NR i NIR uczestniczących w szlaku redukcyjnym. Z reguły poziom aktywności NIR w różnych typach tkanek roślinnych przewyższa poziom aktywności NR [32], co jest zjawiskiem korzystnym, gdyż rzadko obserwuje się akumulację  $\text{NO}_2^-$  w tkankach roślin [12]. Wydaje się zatem, że kluczową rolę w regulacji redukcji azotanów do amoniaku odgrywa raczej pierwszy etap, mianowicie redukcja  $\text{NO}_3^-$ , a jednym z głównych czynników limitujących poziom aktywności całego procesu redukcji jest dostępność substratu ( $\text{NO}_3^-$ ) dla systemu redukującego.

Zarówno NR jak NIR są enzymami indukcyjnymi, indukowanymi przez  $\text{NO}_3^-$  [5, 6, 32, 44, 71], chociaż NIR indukowany jest głównie przez  $\text{NO}_2^-$ . Zaopatrzenie roślin, względnie dostępność substratu ( $\text{NO}_3^-$ ) dla systemu redukującego azotany jest zatem ważnym czynnikiem kontrolującym sprawne funkcjonowanie systemu. W związku z tym procesy takie jak pobieranie  $\text{NO}_3^-$  oraz magazynowanie i dystrybucja  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NO}_2^-$  w tkankach roślin, odgrywają podstawową rolę w regulacji poziomu redukcji  $\text{NO}_3^-$  do amoniaku [52]. Jeżeli roślinom głodzionym na azot poda się  $\text{NO}_3^-$ , obserwuje się po pewnym czasie (okres zwłoki) szybki wzrost aktywności NR i NIR, który trwa do kilku godzin aż do momentu osiągnięcia stanu stacjonarnego. Jednakże obserwowane zmiany w poziomie aktywności NR i NIR mogą wynikać albo z aktywacji lub inaktywacji znajdujących się w komórkach białek enzymu względnie z syntezy enzymów lub ich degradacji.

Badania ostatnich lat, przeprowadzone w oparciu o bardzo czułe immunologiczne metody ilościowego oznaczania białek enzymów wskazują, że azotany oraz światło są niezbędnymi czynnikami indukcji enzymów uczestniczących w redukcji  $\text{NO}_3^-$  do  $\text{NH}_4^+$  oraz, że indukcja polega na biosyntezie *de novo* białek apoenzymów NR i NIR. Doświadczenia Somersa i wsp. [83] przeprowadzone na liściach jęczmienia z zastosowaniem immunoforetycznej metody wykrywania białek wykazały, że aktywność enzymu rosła od poziomu zerowego równoległe ze zwiększeniem się poziomu białka NR. Z kolei, gdy usunięto z pożywki  $\text{NO}_3^-$ , w której rosły siewki jęczmienia, szybko zmniejszał się poziom białka i aktywność NR. Podobnie, gdy siewki dyni traktowano  $\text{NO}_3^-$ , obserwowano indukcję zarówno aktywności enzymu jak białka NR w liścieniach roślin [24]. Cytowane wyżej prace sugerowały, że NR nie może występować w formie nieaktywnej czy zapasowej w tkankach roślin, gdy usunie się sygnał azotanowy niezbędny dla indukcji enzymu. Bardziej dokładną analizę przeprowadzili Remmler i Campbell [74] na liściach kukurydzy po zastosowaniu czułej immunochemicznej metody ilościowego oznaczenia białka (ELISA). Autorzy ci wykazali, że białko NR pojawiło się wcześniej po podaniu  $\text{NO}_3^-$  niż aktywność NR co sugeruje, że biosynteza NR zachodzi rzeczywiście *de novo* w reakcji na  $\text{NO}_3^-$  oraz, że indukcja NR polega na biosyntezie apoenzymu reduktazy azotanowej, a nie na aktywacji nieaktywnej lub zapasowej formy NR.

Rozważany jest również problem, czy  $\text{NO}_3^-$  mogą wpływać na poziom mRNA



kodującego białko NR (NR—mRNA). Szereg badań doprowadziło ostatecznie do wniosku, że rośliny rosnące na świetle bez azotanów zawierają znikome ilości NR—mRNA [16, 22]. Dokarmianie roślin azotanami, zwiększyło wielokrotnie poziom NR—mRNA. Można zatem przypuszczać, że zachodzi korelacja między poziomem NR—mRNA a poziomem białka enzymu i aktywnością NR oraz, że  $\text{NO}_3^-$  na bliżej nieznaną drogę wpływają na transkrypcję mRNA specyficznego dla kodowania sekwencji aminokwasów apoenzymu NR [16]. Powyższe wnioski wymagają dalszych badań, ale już dzisiaj wiadomo, że  $\text{NO}_3^-$  indukuje transkrypcję poprzez specyficzne białko regulatorowe.

Pojawienie się NR i NIR w tkankach roślin jest silnie zależne od światła [26, 88], przy czym, jak wykazał Rajasekhar i Mohr [69], w procesie tym pośredniczy fitochrom. Jednakże indukcja NR i NIR pod wpływem światła zachodzi tylko wtedy, gdy komórki pobierają  $\text{NO}_3^-$  [17, 77]. Uważa się zatem, że  $\text{NO}_3^-$  odgrywa główną i pierwotną rolę w indukcji enzymów asymilacji azotanów, natomiast światło jedynie moduluje pojawianie się NR i NIR w obecności  $\text{NO}_3^-$ . Doświadczenia przeprowadzone na liściach kukurydzy przez Remmlera i Campbella [74] potwierdziły powyższe przypuszczenie. Mianowicie, gdy do etiolowanych liści kukurydzy uprzednio głodzonej na azot wprowadzono  $\text{NO}_3^-$  i pozostawiono w ciemności, bardzo wolno zwiększał się poziom białka i aktywność NR. Jednakże z chwilą przeniesienia liści kukurydzy na światło obserwowano istotne zwiększenie poziomu białka i aktywności enzymu. Stwierdzono również [74], że poziom NR—mRNA w etiolowanych liściach kukurydzy uprzednio głodzonych na azot, a następnie traktowanych azotanami w ciemności zwiększał się nieistotnie, podczas gdy te same liście traktowane światłem zawierały wysoki poziom NR—mRNA. Dane powyższe wskazują, że światło wywiera wpływ raczej na transkrypcję NR—mRNA ale tylko w obecności  $\text{NO}_3^-$  [68]. Prawdopodobnie podobny wpływ światła dotyczy indukcji NIR, Mianowicie immunologiczne badania Gupta i Beeversa [33] sugerowały, że  $\text{NO}_3^-$  i światło wpływały na *de novo* syntezę NIR [70]. Ostatnio doświadczenia przeprowadzone na NIR z liści szpinaku wykazały, że wprowadzenie  $\text{NO}_3^-$  powoduje intensywne zwiększenie poziomu mRNA kodującego białko NIR [2]. Jednak nie jest pewne, czy chodzi tu o modulowanie procesu transkrypcji, czy stabilizacji produktu działania mRNA.

*Praca wykonana w ramach problemu: CPBP 5.02.*

#### LITERATURA

- [1] Aparicio P. J., Knaff D. B., Malkin R. 1975. Role of an iron-sulfur center and siroheme in spinach nitrite reductase. Arch. Biochem. Biophys. 169: 103—107.
- [2] Back E., Burkhardt W., Mayer M., Privalle L., Rothstein S., 1988. Isolation of cDNA clones coding for spinach nitrite reductase: complete sequence and nitrate induction. Mol. Gen. Genet. 212: 20—26.
- [3] Barker A. V., Maynard D. N., Lachman W. K. 1966. Induction of tomato stem and leaf lesions and potassium deficiency by excessive ammonium nutrition. Soil. Sci. 103: 319—327.

- [4] Bennet A. C., Adams F. 1970. Concentration of  $\text{NH}_3$  (aq.) required for incipient  $\text{NH}_3$  toxicity to seedlings. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 34: 259—263.
- [5] Beevers L., Hageman R. H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 495—522.
- [6] Beevers L., Hageman R. H. 1980. Nitrate and nitrite reduction. In: *The Biochemistry of Plants*, ed. Mifflin B. J., Vol. 5: 115—168. New York: Academic Press.
- [7] Beevers L., Hageman R. H., 1983. Uptake and reduction of nitrate: Bacteria and Higher plants. In: *Encyclop. Plant Physiol.* ed. Lauchli A., Bielecki R. L., Vol. 15 A: 351—375. Springer—Berlin.
- [8] Bray R. C. 1980. The reaction and the structures of molybdenum centers in enzymes. In: *Advances in enzymology*, ed. Meister A., Vol. 51: 107—166, N. York; Academic Press.
- [9] Brown J., Small I. S., Wray J. L. 1981. Age-dependent conversion of nitrate reductase to cytochrome c reductase species in barley leaf extract. *Phytochemistry* 20: 389—398.
- [10] Buczek J. 1973. Effect of vanadium on nitrate reductase activity in tomato leaves. *Acta Soc. Bot. Pol.* 42: 223—232.
- [11] Buczek J. 1980. Reduction of nitrites in *Cucumis sativus* L. seedlings. II. Influence of tungsten and vanadium on nitrate reductase and adenosine triphosphatase activities. *Acta Soc. Bot. Pol.* 49: 269—280.
- [12] Buczek J. 1985. Regulation of nitrate and nitrite reductase activities in whole cucumber plants by endogenous level of nitrate supply. *Acta Physiol. Plant.* 7: 21—30.
- [13] Butz R. G., Jackson V. A. 1977. A mechanism for nitrate transport and reduction. *Phytochemistry*, 16: 409—417.
- [14] Campbell W. H. 1976. Separation of soybean leaf nitrate reductase by affinity chromatography. *Plant Sci. Lett.* 7: 239—247.
- [15] Campbell W. H. 1978. Induction of NAD(P)H: nitrate reductase from the scutellum of maize. *Z. Pflanzenphysiol.* 88: 357—361.
- [16] Campbell W. H. 1988. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiol. Plant.* 74: 214—219.
- [17] Campbell W. H., Smarelli J. Jr. 1986. Nitrate reductase biochemistry and regulation. In: *Biochemical Basis of Plant Breeding*, ed. Neyra C., Vol. II: 1—39. CRC Press. Boca Raton F. L.
- [18] Campbell W. H., DeGracia D. J., Campbell E. R. 1987. Regulation of molybdenum cofactor of maize leaf. *Phytochemistry* 26: 2149—2150.
- [19] Castignetti D., Smarelli J. Jr. 1984. Siderophore reduction catalysed by higher plant NADH: nitrate reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 52—58.
- [20] Castignetti D., Smarelli J. Jr. 1986. Siderophores the iron nutrition of plants and nitrate reductase. *FEBS Lett.* 209: 147—151.
- [21] Castignetti D., Smarelli J. Jr. 1988. Iron assimilation in plants, reduction of ferrityrosiderophore by NADH: nitrate reductase from squash. *Planta* 173: 563—566.
- [22] Cheng C. L., Dewdney J., Kleinhofs A., Goodman H. M. 1986. Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 6825—6828.
- [23] Cramer S. P., Wahl R., Rajagopalan K. V. 1981. Molybdenum sites of sulphite oxidase and xantine dehydrogenase. *Plant Physiol.* 69: 1196—1199.
- [24] Crawford N. M., Campbell W. H., Davis R. W. 1986. Nitrate reductase from squash: cDNA cloning and nitrate regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 8073—8076.
- [25] Dalling M. J., Tolbert W. E., Hageman R. H. 1972. Intracellular location of nitrate reductase. II Wheat roots. *Biochim. Biophys. Acta.* 283: 513—519.
- [26] Duke S. H., Duke S. O. 1984. Light control of extractable nitrate reductase in higher plant. *Physiol. Plant.* 62: 485—493.
- [27] Fido R. J., Notton B. A. 1984. Spinach nitrate reductase: further purification and removal of „nicked” subunits by affinity chromatography. *Plant Sci. Lett.* 37: 87—91.
- [28] Fray I. V., Camack R., Hucklesby D. P., Hewitt E. J. 1980. Stability of the nitrosyl-siroheme complex of plant nitrite reductase investigated by EPR spectroscopy *FEBS Lett* 111: 377—389.
- [29] Gewitz H. S., Pietke J., Vennesland B. 1961. Purification and characterization of demo-

- lybdonitrate reductase (NADH cytochrome c oxidoreductase) of *Chlorella vulgaris*. J. Biol. Chem. 256: 11527—11534.
- [30] Gigon A., Rorison I. H. 1972. The response of some ecologically distinct plant species to nitrate and ammonium nitrogen. J. Ecol. 60: 93—102.
- [31] Granstedt R. C., Huffaker R. C. 1982. Identification of leaf vacuole as major nitrate storage pool. Plant Physiol. 70: 410—413.
- [32] Guerrero M. G., Vega J. M., Losada M. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32: 169—204.
- [33] Gupta S. C., Beevers L., 1985. Regulation of synthesis of nitrate reductase in pea leaves: *in vivo* and *in vitro* studies. Planta 166: 89—95.
- [34] Haynes R. J., Goh K. M. 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants. Biol. Rev. 53: 465—510.
- [35] Hewitt E. J., Notton B. A. 1980. Nitrate reductase system in eucaryotic and procaryotic organisms. In: Molybdenum and Molybdenum containing enzymes. Coughlan M. ed. pp. 273—325, Oxford: Pergamon Press.
- [36] Hucklesby P. D., James D. M., Banwell M. J., Hewitt E. J. 1976. Properties of nitrate reductase from *Cucurbita pepo*. Phytochemistry 15: 599—603.
- [37] Ida S. 1977. Purification to homogeneity of spinach nitrite reductase by ferredoxin-sepharose affinity chromatography. J. Biochem. 82: 915—918.
- [38] Ida S., Mikami B. 1986. Spinach ferredoxin-nitrite reductase: a purification procedure and characterization of chemical properties. Biochim. Biophys. Acta. 871: 167—176.
- [39] Johnson J. L. 1980. The molybdenum cofactor common to nitrate reductase, xantine dehydrogenase and sulfite oxidase. In: Molybdenum and molybdenum-containing enzymes. Coughlan M. ed. pp. 345—383. Oxford: Pergamon Press.
- [40] Johnson J. L., Hainline B. E., Rajagopalan K. V. 1980. Characterisation of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xantine oxidase and nitrate reductase. Identification of a pteridine as a structural component. J. Biol. Chem. 255: 1783—1786.
- [41] Johnson J. L., Hainline B. E., Rajagopalan K. V., Arison B. H. 1984. The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. J. Biol. Chem. 259: 5414—5422.
- [42] Jones G. J., Morel M. M. 1988. Plasmalemma redox activity in the diatom *Thalassiasira*. Plant Physiol. 87: 143—147.
- [43] Jones P. W., Ni Mhuimhneachain M. 1985. The activity and stability of wheat nitrate reductase *in vitro*. Phytochemistry 24: 385—392.
- [44] Kelker H. C., Filner P. 1971. Regulation of nitrate reductase and its relationship to the regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cels. Biochim. Biophys. Acta 252: 69—82.
- [45] Ketchum P. A., Cambier H. Y., Frazier W. A., Madansky C. H., Nason A. 1970. *In vitro* assembly of *Neurospora* mutant assimilatory nitrate reductase from protein subunits of a *Neurospora* mutant and xanthine oxidising and aldehyde oxidase system of higher plants. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 66: 1016—1023.
- [46] Kłobus G. 1984. Sources of reducing equivalents for nitrite reductase in *Pisum arvense* roots. Acta Soc. Bot. Pol. 53: 507—513.
- [47] Kłobus G., Hageman R. V., Rajagopalan K. V. 1984. *In vitro* reconstitution of nitrate reductase activity of the *Neurospora crassa* mutant nit-1: Specific incorporation of molybdopterin. Archiv Biochem. Biophys. 233: 821—829.
- [48] Krueger R. J., Siegel L. M. 1982. Evidence for siroheme — Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> interaction in spinach ferredoxin-sulfite reductase. Biochemistry 21: 2905—2909.
- [49] Kubik-Dobosz G., Kłobus G. 1985. The localization of nitrite reductase, glutamate synthase and malate metabolism enzymes in *Pisum arvense* L. roots. Acta Soc. Bot. Pol. 54: 85—93.
- [50] Lancaster J. R., Vega J. M., Kamin H., Orme-Johnson N. R., Orme-Johnson W. H., Krueger R. J., Siegel L. M. 1979. Identification of the iron-sulfur center of spinach ferredoxin nitrite reductase as a tetranuclear center and preliminary EPR studies of mechanisms. J. Biol. Chem. 254: 1268—1271.
- 51 Lewis O. A. M. 1986. Plants and nitrogen. Arnold E., (ed), London.

- [52] Losada M., Guerrero M. G., Vega J. M. 1981. The assimilatory reduction of nitrate. In: Biology of inorganic nitrogen and sulfur, Bothe H., Trebst A., (eds). Springer, Berlin.
- [53] Mendel R. R., Muller A. J. 1980. Comparative characterisation of nitrate reductase from wild-type and molybdenum cofactor defective cell cultures of *Nicotiana tabacum*. Plant Sci. Lett. 18: 277—288.
- [54] Mifflin B. J. 1974. The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of roots and leaves. Plant Physiol. 54: 550—555.
- [55] Mifflin B. J., Lea P. 1976. The pathway of nitrogen assimilation in plants. Phytochemistry 15: 873—883.
- [56] Mifflin B. J., Lea P. 1982. Ammonia assimilation and amino acid metabolism. In: Encyclopedia of Plant Physiology, Boulter D., Parthier B., (eds). Vol. 14A pp. 5—64. Springer, Berlin.
- [57] Murphy M. J., Siegel L. M., Tove S. R., Kamin H. 1974. Sideroheme: A new prosthetic group participating in six electron reduction reactions catalysed by both sulfite and nitrite reductases. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 612—616.
- [58] Nakagawa K., Yonemura Y., Yamamoto H., Sato T., Ogura N., Sato R. 1985. Spinach nitrate reductase. Purification, molecular weight and subunit composition. Plant Physiol. 77: 124—128.
- [59] Neilands J. B. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. Ann. Rev. Plant Physiol. 37: 187—208.
- [60] Nelson R. S., Streit L., Harper J. E. 1984. Biochemical characterisation of nitrate and nitrite reduction in the wild type and nitrate reductase mutant of soybean. Physiol. Plant. 61: 384—390.
- [61] Ninomiya Y., Sato S. 1983. An electron carrier in nitrite reduction in proplastids of cultured tobacco cells. Plant Cell Tissue Organ Culture 2: 285—292.
- [62] Nötton B. A., Hewitt E. J. 1971. The role of tungsten in the inhibition of nitrate reductase activity in spinach (*Spinacea oleracea*) leaves. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 702—710.
- [63] Notton B. A., Fido R. J., Hewitt E. J. 1977. The presence of a functional haem in a higher plant nitrate reductase. Plant Sci Lett. 8: 165—170.
- [64] Notton B. A., Hewitt E. J. 1979. Structure and properties of higher plant nitrate reductase especially *Spinacea oleracea* L. In: Nitrogen Assimilation in Plants, Hewitt E. J., Cutting C. V., (eds) pp. 227—244. Academic Press, N. York.
- [65] Oaks A., Hirel B. 1985. Nitrogen metabolism in roots. Ann. Rev. Plant Physiol. 36: 345—365.
- [66] Orihuel-Iranzo B., Campbell W. H. 1980. Development of NAD(P)H: nitrate reductase activities in soybean cotyledons. Plant Physiol. 65: 595—599.
- [67] Pienkos P. T., Shah V. K., Brill W. J. 1977. Molybdenum co-factors from molybdo-enzymes and *in vitro* reconstitution of nitrogenase and nitrate reductase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74: 5468—5471.
- [68] Rajaselhar V. K., Campbell W. H., 1988. Phytochrome and blue light modulation of the inducible nitrate reductase gene expression in cotyledons squash seedlings. Plant Physiol. Suppl. 88: 33.
- [69] Rajasekhar V. K., Mohr H. 1986. Appearance of nitrate reductase in cotyledons of the mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings as affected by nitrate, phytochrome and photooxidative damage of plastids. Planta 168: 369—376.
- [70] Rajasekhar V. K., Oelenmuller R. 1987. Regulation of induction of nitrate reductase and nitrite reductase in higher plants. Physiol. Plant. 71: 517—521.
- [71] Rao L. V. M., Rajasekhar V. K., Sopory S. K., Guha-Mukherjee S. 1981. Phytochrome regulation of nitrite reductase — a chloroplast enzyme — in etiolated maize leaves. Plant Cell. Physiol. 33: 577—582.
- [72] Redinbaugh M. G., Campbell W. H. 1981. Purification and characterization of NAD(P)H: nitrate reductase and NADH: nitrate reductase from corn roots. Plant Physiol. 68: 115—120.
- [73] Redinbaugh M. G., Campbell W. H. 1985. Quaternary structure and composition of squash NADH: nitrate reductase. J. Biol. Chem. 260: 3380—3385.
- [74] Remmler J. L., Campbell W. H. 1986. Regulation of corn leaf nitrate reductase. II. Synthesis and turnover of the enzymes activity and protein. Plant Physiol. 80: 442—447.

- [75] Runge M. 1983. Physiology and ecology of nitrogen nutrition. In: Encyclopedia of Plant Physiology. Lange O. L., Nobel P. S., (eds). Vol 12C pp: 163—200. Springer, Berlin.
- [76] Schrader L. E., Ritenour G. L., Eilrich G. L., Hageman R. H. 1968. Some characteristic of nitrate reductase from higher plants. *Plant Physiol.* 43: 930—940.
- [77] Schuster C., Oelenmuller R., Mohr H. 1987. Signal storage in phytochrome action on nitrate-mediated induction of nitrate reductase and nitrite reductase in mustard seedling cotyledons. *Planta* 171: 136—143.
- [78] Serra J. L., Ibarlucea J. M., Arizmerdi J. M., Llama M. J. 1982. Purification and properties of the assimilatory nitrite reductase from barley *Hordeum vulgare* leaves. *Biochem. J.* 201: 167—170.
- [79] Shah V. K., Brill W. J., 1977. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3249—3252.
- [80] Shen T. C., Funkhauser E. A., Guerrero M. G., 1976, NADH- and NAD(P)H-nitrate reductase in rice seedlings. *Plant Physiol.* 58: 292—297.
- [81] Sherrard J. H., Dalling M. J. 1979. *In vitro* stability of nitrate reductase from wheat leaves. I. stability of highly purified enzyme and its component activities. *Plant Physiol.* 63: 346—353.
- [82] Small I. S., Gray J. C. 1984. Synthesis of wheat leaf nitrite reductase *de novo* following induction with nitrite. *Eur. J. Biochem.* 145: 291—297.
- [83] Small I. S., Wray J. L. 1980. NADH nitrate reductase and related NADH cytochrome c reductase species in barley. *Phytochemistry* 19: 387—394.
- [84] Smarelli J. Jr., Castignetti D. 1988. Iron assimilation in plants reduction of a ferrityrosidophore by NADH: nitrate reductase from squash. *Planta* 173: 563—566.
- [85] Solomonson L. P., Barker M. J., Howard W. D., Johnson J. L., Rajagopalan K. V. 1984. Electron paramagnetic resonance studies on the molybdenum center of assimilatory NADH: nitrate reductase from *Chlorella vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 259: 849—853.
- [86] Somers D. A., Kuo T. M., Kleinhofs A., Warner R. L. 1982. Barley nitrate reductase contains a functional cytochrome  $b_{557}$ . *Plant Sci. Lett.* 24: 261—265.
- [87] Somers D. A., Kuo Z. M., Kleinhofs A., Warner R. L., Oaks A. 1983. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase. *Plant Physiol.* 72: 949—952.
- [88] Sopory S. K., Rajasekhar V. K. 1986. Phytochrome control of chloroplast development. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 181: 431—457.
- [89] Sorger G., Gooden D. O., Earle E. D., McKinnon J. 1986. NADH nitrate reductase and NDH(P)H nitrate reductase in genetic variants and regenerating callus of maize. *Plant Physiol.* 82: 473—478.
- [90] Street H. E., Sheat D. E. G. 1958. The absorption and availability of nitrate and ammonia. In: *Handbuch Pflanzenphysiologie*. Ruhland W. (ed.), Vol. VIII. Springer, Berlin.
- [91] Streit L., Nelson R. S., Harper J. E., 1985. Nitrate reductases from wild-type and  $nr_1$ -mutant soybean (*Glycine max* L.) leaves. *Plant Physiol.* 78: 80—84.
- [92] Streit L., Martin B. A., Harper J. E. 1987. A method for the separation and partial purification of three forms of nitrate reductase present in wild-type soybean leaves. *Plant Physiol* 84: 654—675.
- [93] Stewart G. R., Orebamjo T. O. 1979. Some unusual characteristics of nitrate reduction in *Erythrina senegalensis* DC. *New Phytol.* 83: 593—596.
- [94] Suzuki A., Gadal P., Oaks A. 1981. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. *Planta* 151: 457—461.
- [95] Suzuki A., Vidal J., Nguyen J., Gadal P. 1984. Occurrence of ferredoxin-dependent glutamate synthase in plant cell fraction of soybean root nodules (*Glycine max*). *FEBS Lett.* 173: 204—208.
- [96] Thompson S. T., Kass K. M., Stellwagen E. 1975. Blue dextran Sepharose: An affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 669—672.
- [97] Vega J. M., Garrett R. K., Siegel L. M. 1975. Siroheme: A prostetic group of the *Neurospora crassa* assimilatory nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 250: 7980—7989.
- [98] Vega J. M., Kamin H. 1977. Spinach nitrite reductase. Purification and properties of a siroheme-containing iron-sulfur centre. *J. Biol. Chem.* 252: 896—909.

- [99] Wada K., Osuda M., Matsubura H. 1986. Ferredoxin isolated from plant non-photosynthetic tissues. Purification and characterization. *Plant Cell Physiol.* 27: 407—415.
- [100] Wahl R. C., Hageman R. V., Rajagopalan K. V. 1984. The relationship of Mo, molybdopterin and the cyanolysable sulfur in the Mo cofactor. *Arch. Biochem. Biophys.* 230: 264—273.
- [101] Wray J. L., Filner P. 1970. Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. *Biochem J.* 119: 715—725.
- [102] Zumft W. G. 1972. Ferredoxin: nitrite oxidoreductase from *Chlorella* Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 276: 363—375.

Prof. dr hab. Józef Buczek

Mgr Jolanta Marciniak

Zakład Fizjologii Roślin,

Instytut Botaniki Uniwersytetu Wrocławskiego,

ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław