

УДК 581

## ОСОБЛИВОСТІ НІТРАТРЕДУКТАЗНОЇ АКТИВНОСТІ У ВИЩИХ РОСЛИНАХ

А.В. КОЛІСНИК, М.М. МУСІЄНКО

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
03033 Київ, вул. Володимирська, 64*

Проаналізовано дані щодо нітратредуктазної активності (НРА) у вищих рослинах: локалізацію, регуляцію, вплив фітогормонів і стресових чинників, методи визначення НРА, зв'язок із продуктивністю рослин та якістю врожаю.

*Ключові слова:* нітратредуктазна активність (НРА), нітрати.

Серед форм азоту, який рослини споживають із ґрунту, нітратна форма є домінуючою. На шляху перетворень азоту ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow$  амінокислоти) першу реакцію редукції нітрату до нітриту здійснює нітратредуктаза (НР) (КФ 1.6.6.1). Цю реакцію вважають етапом, що регулює і лімітує процес асиміляції окисненого азоту, адже швидкість перетворення нітрату на нітрит на порядок нижча за швидкість утворення амонію з нітриту. Ця особливість запобігає накопиченню токсичних іонів  $\text{NO}_2^-$ , а також робить її більш залежною від впливів різних чинників. Виходячи з цього, багато дослідників приділяє особливу увагу вивченню особливостей і регуляції нітратредуктазної активності, зокрема вивченню залежності між НРА і господарсько-важливими показниками рослин, такими як урожайність, накопичення білка, вміст нітратів, стійкість до несприятливих чинників середовища. Хоча даних із цих питань накопичено чимало, однак не всі вони однозначні, а часто і суперечливі. Тому вивчення особливостей НРА треба продовжувати з урахуванням сучасних поглядів на регуляцію метаболічних процесів у рослинах.

Загальновідомо, що фермент НР локалізований у цитозолі або вільно зв'язаний із зовнішньою мембраною хлоропластів. Це димер, що складається з ідентичних субодиниць, які включають ФАД, цитохром  $b_{557}$  і Мо-птериновий кофактор. Кожна субодиниця є мініелектронтранспортним ланцюгом, яким електрони переносяться з відновника на  $\text{NO}_3^-$ . У тканинах вищих рослин НР специфічна переважно до НАДН, хоча в деяких видів (соя, кукурудза, ячмінь, рис, пшениця) крім НАДН знайдено і НАДФН-залежну форму [44, 58]. Розрізняють асиміляторні (КФ 1.6.6.1; 1.6.6.2; 1.6.6.3) і дисиміляторні (КФ 1.7.99.4) нітратредуктази. Асиміляторні НР відновлюють нітрат, а дисиміляторні (знайдені в бактеріях) за анаеробних умов під час синтезу АТФ використовують нітрати як акцептори електронів. Нітратредуктази містяться не тільки у вищих рослинах і водоростях, а й у численних видах бактерій, дріжджів, грибів. Відомо, що нітратредуктази продукує анаеробна мікрофлора ро-

тової порожнини людини і тварин [16]. Крім редукції нітратів НР може брати участь в утворенні оксиду азоту (NO), який є компонентом сигнальної системи зв'язку між окремими клітинами і цілим рослинним організмом [34].

**Локалізація НР.** За активністю нітратредуктази в коренях і листках культурні рослини поділяють на три групи: ті, що відновлюють  $\text{NO}_3^-$  переважно в коренях (бобові, деревні рослини), у листках (цукровий буряк, салат, кабачки, огірки, картопля) і в обох органах (злаки — кукурудза, ячмінь, овес, пшениця) [66].

Однак ситуація може змінюватись за зміни температурних умов [1—3], а також за високих концентрацій нітратів у поживному середовищі [19]. Коли концентрація  $\text{NO}_3^-$  у середовищі збільшується, зростають пропускні можливості коренів по відношенню до  $\text{NO}_3^-$ . В усіх рослин, що належать до різних груп, листки є важливими органами, які визначають асиміляцію нітратів. Роль різних органів у відновленні нітратів може змінюватись і в онтогенезі. В коренях проростків злакових відновлюється 25—60 %  $\text{NO}_3^-$ , а коли фотосинтетичний апарат уже сформований, переважна кількість  $\text{NO}_3^-$  відновлюється в листках [24].

Основними зонами клітини, де локалізована НР, є цитозоль і зовнішні мембрани пластид [11]. У цитозолі в результаті гліколізу і в мітохондріях у циклі Кребса утворюється НАДН, необхідний для відновлення нітратів.

У різних органах можна виділити зону тканин, яка відповідає за асиміляцію нітрату. У коренях, гіпокотиліях і мезокотиліях це кортикальна зона, в листках — мезофіл. Нітрат асимілюється в тих клітинах, які мають велике ядро, багато рибосом, мітохондрій, добре розвинену мембранну сітку. Ці клітини пронизані великою кількістю плазмодесм, за допомогою яких вони зв'язані з провідними тканинами.

За сучасними уявленнями, поглинені коренями нітрати розподіляються в рослині по просторово розділених компартментах: запасному (вакуолярному) і метаболічному [31].

Нітрати метаболічного фонду локалізовані в цитозолі, там, де й НР, а нітрати запасного фонду знаходяться у вакуолях. У багатьох дослідженнях показано, що на НРА впливають нітрати метаболічного фонду [12, 26, 37]. Перехід нітратів із запасного в метаболічний фонд може бути одним зі способів регуляції азотного обміну [4]. Показано, що розміри основних нітратних фондів залежать від виду рослин [27, 33], сортових особливостей [21], концентрації нітрату в середовищі [27, 30], віку рослин [7, 49], дози азоту [7], способу внесення азотного добрива [31].

**Регуляція НРА.** Нітратредуктазна активність регулюється на різних рівнях. Перший рівень — це експресія відповідних генів, другий — регуляція активності ферменту в клітині внаслідок зворотного фосфорилування на консервативному сериновому залишку. Посттрансляційна регуляція НРА дає змогу дуже швидко змінювати активність ферменту в клітині [56, 57]. Ще вищий рівень регуляції пов'язаний зі зв'язком відновлення нітратів з усім метаболізмом рослини та компартментацією в рослинній клітині.

НР є субстратіндукованим ферментом, його активність виявляється і зберігається за наявності в середовищі нітратів. Субстратна індукція НР вивчена на багатьох різноманітних об'єктах [39, 59, 73].

Проте є роботи, в яких відмічено низькі значення фонові НРА у рослин, культивованих на безнітратному середовищі [65]. Азотне голодування не призводило до зниження цієї фонові активності. Цікаво, що рослини, вирощувані на середовищі з  $\text{NH}_4^+$ , а потім культивовані на безазотному середовищі, виявляли підвищену швидкість індукції НРА порівняно з рослинами, які не голодували на азот [65].

Білок НР швидко поновлюється (4 рази за добу), тому механізми регуляції, пов'язані з індукцією/репресією його синтезу та діяльністю специфічних протеаз, відіграють значну роль у комплексній системі регуляції НРА [44, 73]. За низьких концентрацій нітрату його поглинання тісно пов'язане з функціонуванням НР [37]. У діапазоні концентрацій  $\text{NO}_3^-$  0,1–15 мМ НРА зростає майже лінійно [28]. В міру подальшого збільшення концентрації НРА різко посилюється, а потім зменшується внаслідок накопичення амонію або продуктів його метаболізму [23]. Рівень вмісту  $\text{NO}_3^-$  в середовищі, за якого відбувається зниження НРА, неоднаковий для різних видів і сортів рослин. Доза нітратів є потужним екзогенним чинником, що регулює НРА і продуктивність пшениці [7]. Встановлено також, що нітрати зумовлюють синтез цитокінінів, які, в свою чергу, індують синтез НР [68, 75].

Оскільки молібден входить до складу НР, її активність залежить від рівня забезпечення рослин цим елементом. За нестачі молібдену в поживному середовищі НРА різко знижується [23].

Важливу роль у регуляції НРА відіграє кальцій як посередник у передачі зовнішніх і внутрішніх сигналів [35, 53].

Найбільш багатогранний вплив на відновлення нітратів чинить світло. Воно індукує синтез білка НР, хоча за відсутності  $\text{NO}_3^-$  така дія світла проявляється слабко [40, 67, 73]. Світло може регулювати активність НР стимулюванням переходу неактивної форми ферменту в активну або опосередкованою дією через систему активації/інактивації специфічних протеаз — інгібіторів НР. При перенесенні рослин із темряви на світло і навпаки активність ферменту змінювалась як внаслідок реакції фосфорилювання — дефосфорилювання, так і в результаті синтезу — розпаду ферменту. Профіль загальної активності НР подібний до зміни вмісту нітратредуктазного білка [61]. Останнім часом переважають погляди, що ефекти, спричинені світлом, більшою мірою пов'язані з індукцією синтезу білка ферменту *de novo* і меншою — з активацією вже існуючої в клітині НР [63].

Одним з основних чинників регуляції відновлення нітратів є енергетичне забезпечення відновником, джерелом якого можуть бути окисно-відновні реакції фотосинтезу, дихання і фотодихання. Крім регуляції реакції через доступність відновника можливі й інші механізми дії світла як прямої, так і опосередкованої.

Швидкість редукції нітратів у листках залежить від їх притоку з коренів, розподілу між метаболічним і вакуолярним пулами, а також від доступності запасного нітрату для НР. Усі ці процеси можуть регулюватися світлом і опосередковано пов'язані з фотосинтезом через відкривання продихів чи забезпечення енергетичними еквівалентами для транспорту іонів [4].

Останнім часом дедалі більшого значення в регуляції азотного обміну надають компартментації. Вважають, що від співвідношення основних нітратних фондів (запасного і метаболічного) залежить редукція

нітратів [6]. Компартментація в рослинній клітині впливає не тільки на редукцію нітратів, а й на весь метаболізм загалом. Перенесення з одного компартменту в інший субстратів, продуктів, кофакторів і ефекторів, тобто учасників реакцій, і транспортні системи мембран, які здійснюють таке перенесення, є ще одним механізмом регуляції як окремих реакцій і процесів, так і узгодження взаємопов'язаних процесів. На думку Альохіної [4], компартментація і транспорт крізь мембрани як системи регуляції є вищим, ніж метаболітна регуляція, рівнем в ієрархії систем, що керують метаболізмом.

**Вплив фітогормонів на НРА.** Численні дослідження засвідчують, що серед природних фітогормонів найбільше впливають на НРА саме цитокініни. На зародках кукулю [20] і на рослинах карликової квасолі [43] було показано, що синтез НР індукується незалежно нітратами і цитокініном. Доведено також, що нітрати можуть підвищувати вміст цитокінінів у рослинах [72]. Якщо азотне живлення надмірне, то спостерігається пригнічення НР [30]. Ці ж автори вважають, що за допомогою екзогенних цитокінінів можна підвищувати ефективність засвоєння не тільки надлишкових, а й оптимальних доз азотних добрив, принаймні у тій складовій, в якій вона визначається інтенсивністю роботи НР. Однак ці результати не можна беззастережно переносити на всі об'єкти досліджень, бо останнім часом з'явилось багато даних щодо невідповідності НРА й азотного статусу рослин [17, 18, 25]. Одним із чинників цієї невідповідності є компартментація азотних сполук і метаболічних процесів у часі та просторі [17]. Заперечувати ж залежність між НРА та нітратним статусом рослин теж не можна, бо за певних умов вона часто спостерігається.

Як надмірна кількість нітратів, так і надмірна кількість цитокінінів можуть пригнічувати НРА. Описано факти прискорення старіння листків за високих концентрацій цитокінінів [42]. Старіння листків, у свою чергу, призводить до зниження активності асиміляторних ферментів, у тім числі й НР.

Раніше вважалось, що вміст цитокінінів залежить від надходження їх із коренів [22, 76]. Проте останнім часом показано, що при обробці ізольованих листків пшениці розчином  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  цитокініни можуть синтезуватись [9]. Виявлено також, що нітрати стимулюють експресію генів, відповідальних за синтез цитокінінів у рослин арабідопсису [64]. Формується думка, що вплив нітратів на експресію генів НР опосередкований цитокінінами [68, 75].

Відмічено також дію синтетичних рістстимуляторів [8, 30]. Так, обробка N-оксидом піридину (триманом) сприяла підвищенню активності НР. При цьому в продукції вміст нітратів був знижений. Як зазначають автори, посилене залучення нітратів в азотний метаболізм рослин може спричинити зниження вмісту азоту в коренях і прикореневому ґрунті, а це, у свою чергу, приведе до синтезу нітрогенази в клітинах асоціативних діазотрофів, яка активізується за нестачі азоту в субстраті і забезпечення бактеріальної клітини вуглецем [30].

**НРА за дії стресів.** Як відомо, висока температура великою мірою впливає на метаболічні процеси в рослинах. Так, підвищення температури в денні години до  $40\text{ }^\circ\text{C}$  призводило до різкого зниження фотосинтезу у пшениці [62]. Оскільки НР тісно пов'язана з процесом фотосинтезу (донор електронів, джерело вуглецевих скелетів тощо), очевидно,

що швидкість відновлення нітратів під дією високих температур має знижуватись. Так, показано [61], що теплова дія (+40 °С) на рослини озимої пшениці супроводжувалась різким зниженням як загальної активності ферменту, так і вмісту його активної форми. Найінтенсивніше зменшувався вміст активної форми НР. Після усунення теплового впливу за умов освітлення активність НР у рослинах озимої пшениці швидко відновлювалась [61].

Очевидно, що зі зниженням температури швидкість усіх реакцій уповільнюється, втім числі й здійснюваних НР. Однак показано [2, 3, 14], що на падіння НРА більше впливає зменшення надходження нітратів із кореневої системи, оскільки процес поглинання нітратів відзначається високою чутливістю до зниження температури. Зменшуватиметься НРА також внаслідок того, що в разі зниження температури порушується зв'язок процесів накопичення, транспорту і відновлення нітратів у рослинах [13].

Відоме в біології явище гормезису (стимуляція метаболізму під дією порівняно низьких доз опромінення) може стосуватись і НРА. Так, за опромінення дозою 20 Гр підвищувалась НРА рослин *Eruca vesicaria*, водночас вміст нітратного азоту зменшувався, а вміст загального азоту і калію — збільшувався [34]. Автори запропонували використовувати передпосівну обробку насіння гамма-променями дозою 20 Гр для зменшення вмісту нітратів і підвищення врожайності еруки посівної. В інших досліджах [41] спостерігали негативний вплив опромінення високими і низькими дозами ультрафіолету на азотний метаболізм проростків сої. В разі додавання рідкісноземельного металу лантану (20 мг/л) активність НР та інших ферментів азотного метаболізму збільшувалась і тим самим зменшувалась негативна дія опромінення на азотний метаболізм. За низької дози опромінення ефект від обробки лантаном був відчутнішим.

Стрес, спричинений підвищеним рівнем  $\text{NO}_3^-$ , негативно впливає на фотосинтез і відтік асимілятів із листків [5]. Ця дія виявлялась на двох рівнях. По-перше, знижувався фотосинтез, ослаблювався синтез сахарози і збільшувався потік вуглецю гліколатним шляхом. По-друге, зменшувалась відтік уже синтезованої сахарози з листків. Очевидно, що такі зміни не сприятимуть зростанню НРА.

Сольовий стрес, спричинений NaCl, призводив до зменшення НРА, а також вмісту білка й сухої речовини в листках і коренях томатів [46]. Порушувалось співвідношення корені/листки на користь коренів, а також змінювався перерозподіл НРА: в листках її вміст зменшувався, а в коренях — зростав.

Водний стрес знижував НРА, інгібуючи поглинання  $\text{NO}_3^-$  та синтез білка [70], а осмотично активні речовини — пролін, гліцин і цукроза чинили протекторну дію на НРА.

Останнім часом з'являється дедалі більше повідомлень щодо ролі НР як продуцента NO, що є важливою сигнальною молекулою з різноманітними фізіологічними функціями в рослинах [36, 51, 78]. NO бере участь у регуляції росту і розвитку, індукції цвітіння, досягання фруктів та старіння органів. За стресів, викликаних біотичними й абіотичними чинниками, вміст NO в різних видах рослин збільшується. Роль NO в рослинній сигнальній системі, що веде до експресії генів, які відповіда-

ють за реакції на різні стресові чинники, детально висвітлена в огляді Арасімовича [36].

**Методи визначення НРА.** НРА широко використовують для оцінювання процесу відновлення нітратів. Методи визначення можна поділити на 2 типи: 1) у тканинному гомогенаті (*in vitro*) [63]; 2) на відрізках тканин (*in vivo*) [10, 55].

За рівнем НРА судять про стійкість видів і сортів до дії несприятливих чинників середовища і продуктивність культур, ефективність засвоєння рослинами окисненого азоту, здатність не накопичувати нітрати у тканинах [48, 60, 74]. Поряд із повідомленнями про те, що НРА можна використовувати як тест, є свідчення, що зміни в НРА не відбивають змін у процесі відновлення нітратного азоту [2, 14, 18, 39].

Який метод — *in vitro* чи *in vivo* найпридатніший для оцінювання можливостей рослини чи її органів використовувати нітратний азот — питання дискусійне. Відсутність однозначних висновків — свідчення того, що НР дуже лабільна, її активність залежить від багатьох чинників, які діють на нативний фермент, а також на фермент у процесі його виділення й інкубації. Як зазначала Альохіна [2], НР дуже нестабільна після руйнування тканин (*in vitro*) і дуже чутлива до зміни температури інкубації. В системі *in vitro* фермент із листків пшениці інактивувався вже за 37 °С, що є звичайною температурою інкубації ферментів. Однак у сегментах листків *in vivo* фермент стійкий до підвищення температури в середовищі визначення, і НРА вдвічі вища за 37 °С, ніж за 27 °С. Високу чутливість до температури НР у системі *in vitro* пояснюють нижчою термостабільністю ферментного білка порівняно з термостабільністю білків-інгібіторів, що вивільняються під час розтирання тканин [71]. Крім того, є інші методичні причини, які можуть впливати на НРА [25]. Так, під час визначення НРА *in vitro* при гомогенізації тканин протеази можуть зруйнувати структуру багатьох ферментів, у тім числі й НР. У разі визначення НРА *in vivo*, коли можливість руйнівного впливу зводиться до мінімуму, постає інша проблема (актуальніша для дослідів із коренями) — корені потерпають від нестачі відновника через втрату зв'язку з листками.

Порівнянням результатів, отриманих із використанням методів *in vitro* та *in vivo*, встановлено, що НРА, виявлена в досліді *in vitro*, була в кілька раз вищою, ніж у досліді *in vivo* [15]. Проте, як вказують автори, у фізіологічних умовах важливі не абсолютні значення НРА, а співвідношення активностей між варіантами, яке б адекватно відбивало ситуацію в нативному об'єкті. Показано, що кореляція між кількостями накопиченого і відновленого нітрату часто не спостерігається [26]. При визначенні НРА *in vitro*, коли нітрат і відновник містяться в інкубаційному середовищі в оптимальних співвідношеннях, ця активність вища за реальну інтенсивність асиміляції нітрату в рослинах. Кількості необхідних субстратів у цьому разі завищені порівняно з ендогенними. При оцінюванні НРА *in vivo* з додаванням нітрату в інкубаційне середовище навіть у збагачених ним тканинах накопичення нітрату також стимулюється [26]. Це відбувається тому, що щойно поглинений нітрат активніше використовується НР, ніж накопичений раніше внаслідок неоднакових його розподілу в клітині та доступності ферменту. Отже, дослідники вважають, що на основі цих методичних підходів реальна

здатність рослин до відновлення нітратів часто переоцінюється. У разі визначення НРА методом *in vivo* без внесення нітрату в інкубаційне середовище НРА частіше корелює з кількістю відновленого нітрату [38]. Однак і в цього методу є істотний недолік, тому що може відновитись весь наявний у клітині нітрат, зосереджений як у цитоплазматичному (метаболічному), так і в запасному (вакуолярному) фондах. З урахуванням недоліків описаних методів було запропоновано інший методичний підхід, оснований на оцінюванні інтенсивності відновлення нітрату за величиною метаболічного фонду в листках рослин [26].

Отже, з вищенаведених даних випливає, що при визначенні НРА треба враховувати недоліки існуючих методів, компартментацію нітратів у тканині, а також особливості досліджуваних об'єктів.

**НРА і продуктивні якості рослин.** Широке вивчення генетичного поліморфізму щодо НРА в сільськогосподарських рослинах проведене групою Хагемана (США) [69, 77]. Було досліджено близько 50 інбредних ліній кукурудзи, між деякими з них знайдено стійкі відмінності за рівнем НРА, що досягала 5-кратного рівня. Дослідники підтвердили генетичну обумовленість цієї ознаки. На основі комбінацій, що давали гетерозис в  $F_1$ , було вивчено успадкування НРА у кукурудзи [77].

Група Хагемана виявила відмінності за рівнем НРА також між сортами пшениці. Відмічено, що характерні для різних сортів рівні НРА пов'язані з продуктивними якостями цих сортів [48]. На основі результатів власних дослідів автори дійшли таких висновків: 1) вміст нітрату в тканині — важливий чинник, що контролює НРА; 2) індукція НР у польових умовах забезпечується внесенням азотних добрив; 3) досягнені при цьому рівні НРА визначаються генотипом сорту; 4) у деяких сортів виявлено значну кореляцію між рівнем НРА і врожаєм зерна й білка в зерні, в той час як у інших сортів такої кореляції не спостерігається; 5) сорт, для якого характерний низький рівень НРА, не може бути добрим продуцентом білка.

Кореляцію між рівнем НРА, продуктивністю і якістю зерна пшениці виявлено і в деяких сучасних дослідженнях [60]. Вивчено також НРА у карликових і високорослих сортів пшениці за внесення різних доз азотних добрив [54]. У карликових сортів максимальна НРА була значно вищою, ніж у високорослих за всіх доз добрив. Загальний рівень НРА в усіх сортів після внесення добрив підвищувався, що корелювало зі збільшенням врожаю зерна і вмісту білка.

Рівні НРА у 17 сортів суданської трави відрізнялися між собою в 3 рази залежно від продуктивних якостей рослин [47]. Визначали також НРА у різних сортів сої [52]. Хоча відмінності за НРА між сортами досягали 2 разів, з урожаєм і вмістом білка в зерні вони не корелювали. Це, ймовірно, пояснюється тим, що рослини сої засвоюють до 50 % азоту внаслідок діяльності симбіотичних азотфіксувальних бактерій в амонійній формі, тобто не через НР-систему.

На трансгенних рослинах тютюну з гіперактивною НР показано, що багаторазове зростання НРА не супроводжувалось змінами швидкості фотосинтезу, вмісту білка, хлорофілу, крохмалю і сахарози [50]. Це означає, що вихідний рівень НРА у контрольних рослинах достатній для забезпечення оптимальної швидкості асиміляції азоту і збалансований з роботою фотосинтетичного апарату. Звісно, у цьому разі подальше зро-

стання НРА не корелюватиме з продуктивністю рослин. Однак у мутантів із низькою НРА відбувались значні зміни в метаболізмі: знижувалась швидкість фотосинтезу, змінювалось співвідношення С/Н (збільшувався вміст розчинних цукрів), знижувалась ефективність перетворення енергії в ФС II за високої інтенсивності світла, змінювався склад каротиноїдів, які захищають хлоропласти від фоторедукції [50]. В результаті у рослин із низькою активністю НР уповільнювався ріст.

Пояснити відсутність кореляції між НРА та азотним статусом рослин, урожаєм, якістю врожаю та іншими показниками допоможуть результати комплексних досліджень. Так, було виявлено, що в цукрового буряка потенційна НРА перевищувала реальну в 12 разів [26]. Автори зазначають, що така велика різниця свідчить про те, що в листках цієї культури не НРА лімітує процес асиміляції нітрату, а його недоступність у клітині для відновлення. Оскільки в дослідях у листках рослин буряка містилось багато нітратів, то їх відновлення обмежувалось не нестачею, а бар'єрною функцією мембран у клітині, тобто компартментацією. Саме тому в середньому до 80 % нітратів, що надходять у клітини листків цукрових буряків, не відновлюються, а відкладаються в запас у вакуолях [26].

Отже, відсутність кореляції між НРА і продуктивними якостями рослин у деяких дослідженнях може бути зумовлена тим, що вихідний рівень НРА достатній для збалансованого метаболізму в рослині, а також недоступністю нітратів вакуолярного фонду для НР. Причиною можуть бути і недоліки існуючих методів визначення НРА.

Підсумовуючи викладене, можна сказати, що хоча НР знаходиться на вході процесу редукції нітратів і, безумовно, впливає на весь метаболізм рослин, зв'язок між нею та метаболічними процесами, продуктивністю, якістю врожаю тощо не завжди однозначний, що обумовлено складною системою регуляції в рослині та її клітинах на багатьох рівнях, а також недоліками існуючих методів визначення НРА.

Останнім часом дедалі частіше редукцію нітратів, як і весь азотний обмін, розглядають із позицій компартментації. У зв'язку з цим стають зрозумілішими причини невідповідності між НРА та вмістом нітратів у рослині, а також між НРА й продуктивністю, врожайністю і якістю врожаю.

1. *Алехина Н.Д.* Усвоение азота в корнях и листьях: видоспецифичность и зависимость от условий среды // Физиология и биохимия культ. растений. — 1992. — **24**, № 4. — С. 338—344.
2. *Алехина Н.Д., Ключикова А.И.* Температура среды и адаптивные изменения свойств ферментов ассимиляции азота у растений // Вестн. Моск. ун-та. — Сер. Биология. — 1988. — № 3. — С. 3—14.
3. *Алехина Н.Д., Ключикова А.И.* Усвоение азота растениями при пониженной температуре // Физиология растений. — 1986. — **33**, № 2. — С. 372—386.
4. *Алехина Н.Д., Кренделева Т.Е., Полесская О.Г.* Взаимосвязь процесса усвоения азота и фотосинтеза в клетке листа  $C_3$ -растений // Там же. — 1996. — **43**, № 1. — С. 136—148.
5. *Баташева С.Н., Абдрахимов Ф.А., Бакирова Г.Т., Чиков В.И.* Влияние нитратов, вводимых с транспирационным током воды, на транспорт ассимилятов // Там же. — 2007. — **54**, № 3. — С. 424—431.
6. *Булгакова Н.Н.* О поглощении и накоплении нитрата растениями // Агрохимия. — 1999. — № 11. — С. 80—88.



7. Булгакова Н.Н., Большакова Л.С., Ниловская Н.Т. Влияние азотного питания на продуктивность яровой пшеницы, ассимиляцию нитрата и его распределение по функциональным фондам // *Агрохимия*. — 1996. — № 8—9. — С. 15—27.
8. Волкогон В.В. Влияние стимуляторов роста растений на активность процесса ассоциативной азотфиксации // *Микробиол. журн.* — 1997. — **59**, № 4. — С. 70—78.
9. Высоцкая Л.Б., Тимергалина Л.Н., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р. Влияние азотсодержащих солей на содержание цитокининов в изолированных листьях пшеницы // *Физиология растений*. — 2007. — **54**, № 2. — С. 217—222.
10. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И. и др. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Колос, 1972. — 456 с.
11. Измайлов С.Ф. Азотный обмен в растениях. — М.: Наука, 1986. — 320 с.
12. Измайлов С.Ф., Дробышева Н.И., Овчаренко Г.М. Временная и функциональная характеристики насыщения и использования фондов нитрата в листьях гороха // *Физиология растений*. — 1992. — **39**, № 5. — С. 853—861.
13. Климов С.В., Трунова Т.И., Мокронос А.Т. Механизмы адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды через донорно-акцепторные отношения // *Там же*. — 1990. — **37**, № 5. — С. 1024—1035.
14. Клюйкова А.И., Алехина Н.Д. Использование нитратного азота проростками пшеницы, растущими при разной температуре в зоне корней // *Вестн. Моск. ун-та. — Сер. Биология*. — 1983. — № 11. — С. 35—43.
15. Клюйкова А.И., Алехина Н.Д. Определение активности нитратредуктазы у пшеницы: сравнение методов и оценка результатов // *Там же*. — 1991. — № 3. — С. 55—60.
16. Комарова В.И. Определение нитратредуктазной активности ротовой жидкости // *Науч. вестн. Зоотехния*. Вып. 1. — Волгоград: ВГСХА, 1999. — С. 123—124.
17. Кондратьев М.Н. Временная и пространственно-временная регуляция азотного обмена у растений на организменном уровне: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 1990. — 45 с.
18. Кондратьев М.Н., Лебединская С.О. Нитратредуктазная и протеолитическая активность пшеницы в генеративный период // *Физиология растений*. — 1995. — **42**, № 3. — С. 399—407.
19. Котлярова Т.И. Особенности усвоения азота корнями и листьями разных растений: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 1987. — 20 с.
20. Кузнецов В.В., Кузнецов В.В., Кулаева О.Н. Влияние нитрата и цитокинина в изолированных зародышах куколя // *Биохимия*. — 1979. — **44**, № 4. — С. 684—687.
21. Кузменко Л.М., Сивак Л.А., Ткачук Е.С. Компартиментация  $\text{NO}_3^-$  и активность нитратредуктазы в корнях линий кукурузы // *Физиолого-генетические механизмы регуляции азотного питания растений: Тез. докл.* — Киев, 1991. — С. 54—55.
22. Кулаева О.Н. Цитокинины, их структура и функции. — М.: Наука, 1973. — 264 с.
23. Львов Н.П. Ассимиляция нитратов растениями // *Биол. химия*. — 1987. — **23**. — С. 150—189.
24. Львов Н.П. Молибден в ассимиляции азота у растений и микроорганизмов. — М.: Наука, 1989. — 86 с.
25. Никифорова Т.А., Овчаренко Г.А., Измайлов С.Ф. Оценка нитратвосстанавливающей способности корней и листьев гороха с использованием различных методических подходов // *Физиология растений*. — 1993. — **40**, № 6. — С. 932—939.
26. Овчаренко Г.А., Дробышева Н.И., Худякова Е.М. и др. Величина метаболического фонда нитрата как критерий его усвоения растением // *Там же*. — № 1. — С. 67—70.
27. Овчаренко Г.А., Никифорова Т.А., Худякова Е.М., Измайлов С.Ф. Компартиментация и ассимиляция нитратов в растениях гороха и сахарной свеклы // *Там же*. — 1990. — **37**, № 4. — С. 642—649.
28. Павлов А.Н., Грабовская М.И. Ферменты азотного обмена и минеральное питание растений // *Агрохимия*. — 1989. — № 3. — С. 112—130.
29. Павлов А.Н., Кирнос С.В., Мироненко Т.Г. Активность нитратредуктазы и цитокининов в растениях ячменя при различной обеспеченности азотом // *С.-х. биология*. — 1987. — № 2. — С. 43—45.
30. Патица В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін. Біологічний азот. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
31. Пеккер Е.Г., Токарев Б.И. Биохимический подход к диагностике обеспеченности растений азотом в ходе вегетационного периода // *Азотный обмен и продуктивность зерновых культур в условиях химизации земледелия Западной Сибири*. — Новосибирск: 1984. — С. 27—42.

32. Соколов О.А. Роль нитратных фондов в азотном питании растений // Агрохимия. — 1998. — № 7. — С. 87—93.
33. Соколов О.А., Семенова В.М., Агаев В.А. Нитраты в окружающей среде. — Пушкино: ОНТИ, 1990. — 317 с.
34. Хелал Р.М. Роль гамма-облучения в регуляции содержания  $\text{NO}_3^-$  в растениях эруки // Физиология растений. — 2006. — **53**, № 2. — С. 215—219.
35. Ali A., Sivakami S., Raghuram N. Regulation of activity and transcript levels of NR in rice (*Oryza sativa*): Roles of protein kinase and G-proteins // Plant Sci. — 2007. — **172**, N 2. — С. 406—413.
36. Arasimowicz M., Floryszak-Wieczorek J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses // Ibid. — N 5. — P. 876—887.
37. Aslam M., Rosichen I.L., Hiffaker R.C. Comparative induction of nitrate reductase by nitrate and nitrite in barley leaves // Plant Physiol. — 1987. — **83**, N 3. — P. 579—584.
38. Baer G.R., Collet G.F. In vivo determination of parameters of nitrate utilization in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings grown with low concentration of nitrate in the nutrient solution // Ibid. — 1981. — **68**, N 6. — P. 1237.
39. Beevers L., Hageman R.H. Nitrate and nitrite reduction // Biochem. Plants. — 1980. — **5**. — P. 115—168.
40. Campbell W.H. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants // Physiol. plant. — 1988. — **74**, N 1. — P. 214—219.
41. Cao R., Huang X., Zhou Q., Cheng X. Effects of lanthanum (III) on nitrogen metabolism of soybean seedlings under elevated UV-B radiation // J. Environ. Sci. — 2007. — **19**, N 11. — P. 1361—1366.
42. Carimi F., Terzi M., de Michele R. et al. High levels of the cytokinin BAP induce PCD by acceleration senescence // Plant Sci. — 2004. — **166**. — P. 963—969.
43. Cate C.H., Hanisch T., Breler H. Effect of plant growth regulators on nitrate utilization by roots of nitrogen depleted dwarf bean // J. Exp. Bot. — 1982. — **33**, N 132. — P. 37—46.
44. Chatterjee S.R., Naik M.S. Regulation of nitrate assimilation in higher plants under light-dark conditions // Proc. Indian Acad. Sci. — 1993. — **59**, N 3/4. — P. 209—218.
45. Dean J.V., Harper J.E. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean // Plant Physiol. — 1988. — **88**. — P. 389—395.
46. Debouba M., Gouia H., Suzuki A.M.H. et al. NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedlings // J. Plant Physiol. — 2006. — **163**, N 12. — P. 1247—1258.
47. Eck H.V., Hageman R.H. Nitrate reductase activity in sudangrass cultivars // Crop. Sci. — 1974. — **14**. — P. 283.
48. Eilrich G.R., Hageman R.H. Relationships between nitrate reductase activity, applied nitrogen and grain protein production in two wheat varieties // Agron. Abstr. — Madison, USA, 1967. — P. 27.
49. Ferrari T.E., Yader O.C., Filner P. Anaerobic nitrite production by plant cell and tissues: evidence for two nitrate pools // Plant Physiol. — 1973. — **51**, N 3. — P. 423—431.
50. Foyer C.H., Lescure J.-Ch., Lefebvre C. et al. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity // Ibid. — 1994. — **104**, N 1. — P. 171—178.
51. Garcia-Mata C., Lamattina L. Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure — is nitrate reductase one of the missing links? // Trends Plant Sci. — 2003. — **8**, N 1. — P. 20—26.
52. Harper J.E., Nicholas J.C., Hageman R.H. Seasonal and canopy variation in nitrate reductase activity of soybean (*Glycine max* L., Merr.) varieties // Crop. Sci. — 1972. — **12**. — P. 382.
53. Hepler P.K. Calcium: a central regulator of plant growth and development // Plant Cell. — 2005. — **17**. — P. 2142—2155.
54. Hernandez H.H., Walsh D.E., Baner A. Nitrate reductase of wheat — its relation to nitrogen fertilization // Gen. Chem. — 1974. — **51**. — P. 330.
55. Jaworski E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues // Biochem. Biophys. Res. Comm. — 1971. — **43**, N 6. — P. 1274—1279.
56. Kaiser W.M., Huber S.C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers // J. Exp. Bot. — 2001. — **52**. — P. 1981—1989.

57. Kaiser W.M., Weiner H., Huber S.C. Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity // *Physiol. plant.* — 1999. — **105**. — P. 385–390.
58. Kenjebaeva S., Rakova N. Multiple forms of nitrate reductase and their role in nitrate assimilation in roots of wheat at low temperature or high salinity // *Ibid.* — 1995. — **93**. — P. 249–252.
59. Kessler E. Nitrate assimilation by plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.* — 1964. — **15**. — P. 57.
60. Kichey T., Hirel B., Heumez E. et al. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers // *Field Crops Res.* — 2007. — **102**, N 1. — P. 22–32.
61. Klimenko S.B., Peshkova A.A., Dorofeev N.V. Nitrate reductase activity during heat shock in winter wheat // *J. Stress Physiol. Biochem.* — 2006. — **2**, N 1. — P. 50–55.
62. Law R.D., Crafts-Brandner S.J. Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase // *Plant Physiol.* — 1999. — **120**. — P. 173–181.
63. Lillo C. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants // *Physiol. plant.* — 1994. — **90**, N 4. — P. 616–620.
64. Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. Expression of cytokinin biosynthesis isopentenyltransferase genes in arabidopsis: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate // *Plant J.* — 2004. — **37**. — P. 128–138.
65. Orebamjo T.O., Stewart G.R. Some characteristics of nitrate reductase induction in *Lemna minor* L. // *Planta.* — 1974. — **117**, N 4. — P. 4.
66. Pate J.S. Transport and partitioning of nitrogen solutes // *Annu. Rev. Plant Physiol.* — 1980. — **31**. — P. 313–340.
67. Rajasekhar V.K., Oelmuller R. Regulation of induction of nitrate reductase and nitrite reductase in higher plants // *Physiol. plant.* — 1987. — **71**, N 4. — P. 517–521.
68. Sasakibara H., Suzuki M., Takei K. et al. Response-regulator homologue possibly involved in nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize // *Plant J.* — 1998. — **14**. — P. 337–344.
69. Schrader L.E., Paterson D.M., Leng E.R., Hageman R.H. Nitrate reductase activity of maize hybrids and their parental inbreds // *Crop. Sci.* — 1966. — **6**. — P. 169.
70. Sharma P., Dubey R.S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant // *J. Plant Physiol.* — 2005. — **162**, N 8. — P. 854–864.
71. Sherrard J.H., Kennedy J.A., Dalling M.J. In vitro stability of nitrate reductase from wheat leaves. 2. Isolation of factors from crude extract which affect stability of highly purified nitrate reductase // *Plant Physiol.* — 1979. — **64**, N 3. — P. 439–444.
72. Singh S., Letham D.S., Zhang X., Palni I.M.S. Cytokinin biochemistry in regulation to leaf senescence. 6. Effect of nitrogenous nutrients on cytokinin levels and senescence of tobacco leaves // *Physiol. plant.* — 1992. — **84**. — P. 262–268.
73. Solomonson L.P., Barber M.J. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 1990. — **41**. — P. 225–253.
74. Srivastava H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants // *Phytochemistry.* — 1980. — **19**, N 5. — P. 725–733.
75. Takei K., Sasakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T.A. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induced gene expression of maize response regulator // *Plant Cell Physiol.* — 2001. — **42**. — P. 85–93.
76. Torrey J.G. Root hormones and plant growth // *Annu. Rev. Plant Physiol.* — 1976. — **27**. — P. 407–413.
77. Warner R.L., Hageman R.H., Dulbey I.W., Lambert R.I. Inheritance of nitrate reductase activity in *Zea mays* L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1969. — **62**. — P. 785.
78. Yamasaki H., Sakihama Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species // *FEBS Lett.* — 2000. — **468**. — P. 89–92.

Отримано 23.05.2008

## ОСОБЕННОСТИ НИТРАТРЕДУКТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

---

### ОСОБЕННОСТИ НИТРАТРЕДУКТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ

*А.В. Колесник, Н.Н. Мусяенко*

Киевский университет имени Тараса Шевченко

Проанализированы данные о нитратредуктазной активности (НРА) в высших растениях: локализация, регуляция, влияние фитогормонов и стрессовых факторов, методы определения НРА, связь с продуктивностью растений и качеством урожая.

### FEATURES OF NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN HIGHER PLANTS

*A.V. Kolysnik, M.M. Musienko*

Taras Shevchenko Kyiv National University  
64 Volodymyrska St., Kyiv, 03033, Ukraine

Data about nitrate reductase activity (NRA) in higher plants, localisation, regulation, influence of phytohormones and stressful factors, methods of definition NRA and correlation with productivity of plants and yield quality are analysed.

*Key words:* nitrate reductase activity (NRA), nitrate.