

Edward Dembiński

Zakład Kultur Tkankowych IHAR Radzików

Asymilacja i metabolizm azotu w roślinach

1. Obieg azotu w roślinie

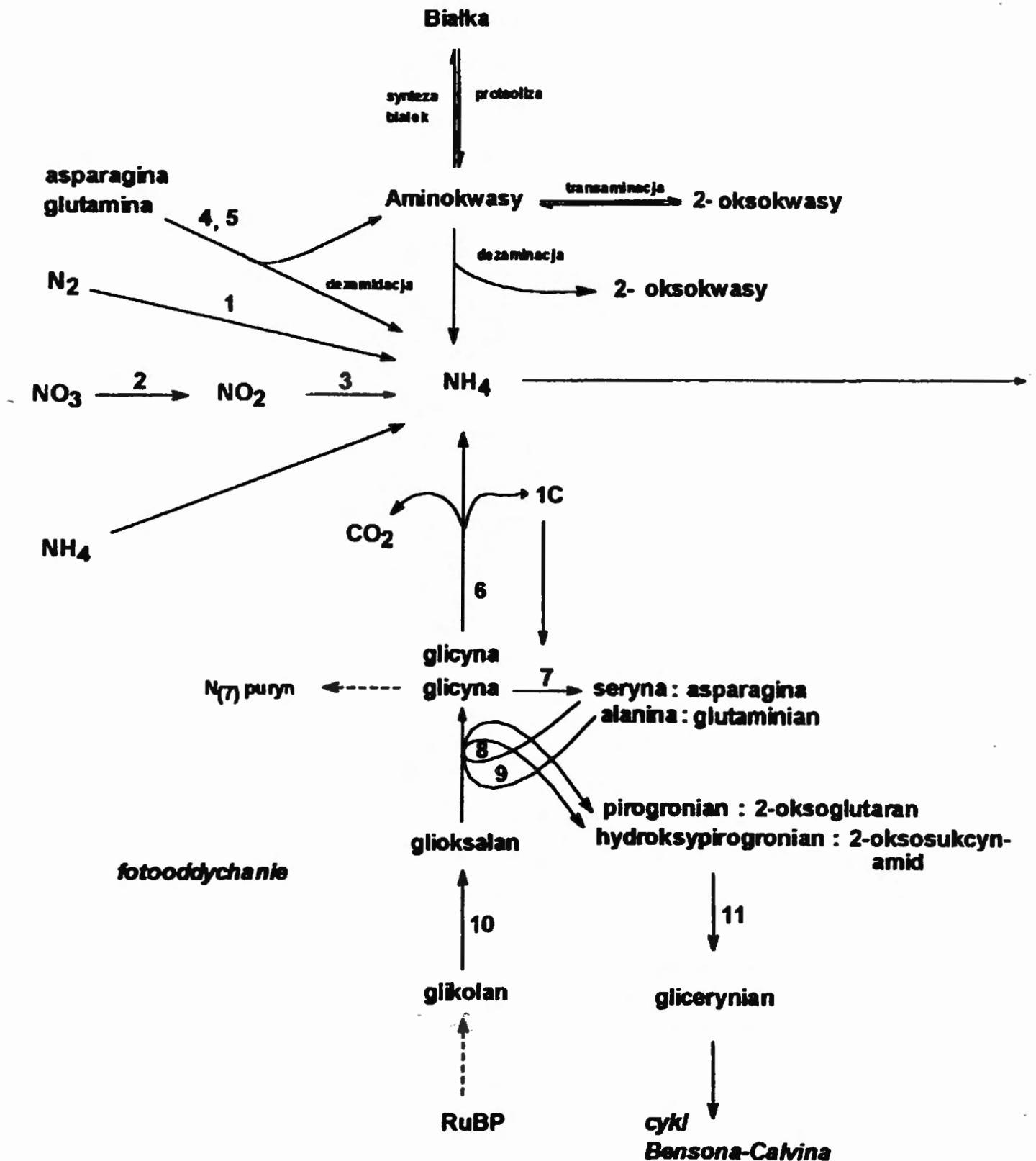
Przekształcenie nieorganicznego azotu w azot organiczny i jego obieg w roślinie ma podstawowe znaczenie w procesach wzrostu i rozwoju rośliny. Znaczna toksyczność jonów amonowych sprawia, że ich asymilacja i metaboliczny obrót są bardzo sprawne. Ilość azotu transportowana w formie jonu amonowego z korzeni do liści, poprzez floem i ksylem, jest niewielka. Jego większość ulega wbudowaniu w połączenia organiczne (aminokwasy, uroidy) i w tej formie transportowana jest do miejsc jego wykorzystania [33]. Rysunek 1 ilustruje podstawowe reakcje zachodzące podczas obiegu azotu w roślinie.

1.1. Pochodzenie jonów amonowych

Jony amonowe znajdujące się w roślinie zostały pobrane z gleby lub powstały z azotanów w wyniku kolejnego działania reduktazy azotanowej (NR), katalizującej przeniesienie dwóch elektronów z NADH (EC. 1.6.6.1) lub NAD (P) H (E.C. 1.6.6.2.) na azotan, i reduktazy azotynowej (NiR) (EC 1.7.7.1) wykorzystującej zredukowaną ferredoksynę jako donor elektronów. Oba enzymy występują zarówno w liściach, jak i w korzeniach. Subkomórkowa lokalizacja NR pozostaje nieznana, chociaż większość prac przemawia za jej cytozolowym występowaniem [50].

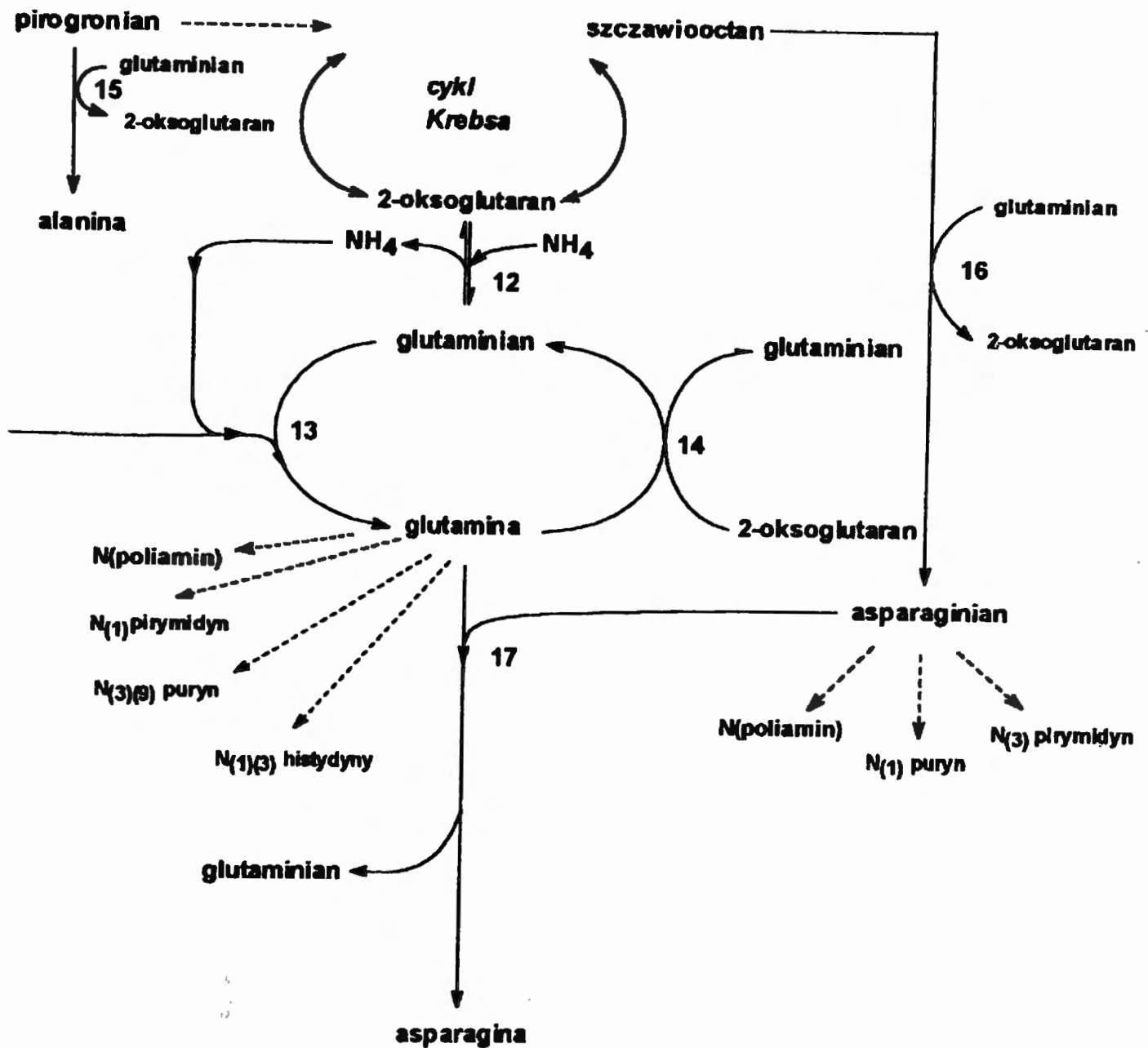
W przeciwieństwie do reduktazy azotanowej reduktaza azotynowa zlokalizowana jest w plastydach [34], z czym Bowsheer i wsp. [5] wiążą większą stabilność tego białka. Oba enzymy indukowane są przez azotany [5, 10,], światło [5, 10, 14], a także hormony [13, 28, 39]. Dodatkowym aktywatorem reduktazy azotanowej może być również NO_2 [3, 25]. Wykazano także represję reduktazy azotanowej przez glutaminę [30]. Wiadomo, że rośliny C₃ kumulują więcej azotanów niż rośliny C₄, co wiąże się prawdopodobnie z szybszym pobieraniem azotanów i/lub szybszą redukcją prowadzącą do bardziej efektywnego rozmieszczenia azotu w roślinach C₄ [13].

Asymilacja azotu atmosferycznego przeprowadzana jest przez symbiotyczne bakterie z rodzaju *Rhizobium*, promieniowce z rodzaju *Actinomyces* oraz wolno żyjące bakterie glebowe z rodzajów *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Cyanobacteria* i *Klebsiella*. Redukcja jednej cząsteczki azotu zachodzi kosztem hydrolizy



dwóch cząsteczek ATP przez elektrony generowane w reakcjach utleniania i fotosyntezy, a następnie przenoszone kolejno przy udziale (4Fe-4S) i (6Fe-Mo-6S) domen nitrogenazy na cząsteczkę azotu.

Jony amonowe powstają również w roślinie w wyniku przemian metabolizmu azotowego i są reasymilowane. Źródłem endogennych jonów amonowych jest cykl 2C fotooddychania, w których procesowi odzyskania CO₂, traconego przez oksygenazową czynność RUBISCO, towarzyszy synteza glicyny. Synteza ta oparta jest na



Rysunek 1. Obieg azotu w roślinach: a — nitrogenaza, 2 — reduktaza azotanowa, 3 — reduktaza azotynowa, 4 — asparaginaza, 5 — glutaminaza, 6 — kompleks dekarboksylazy glicynowej, 7 — hydroksymetylotransferaza serynowa, 8 — aminotransferaza seryna (asparagina)-glioksalan, 9 — aminotransferaza alanina (glutaminian)-glioksalan, 10 — oksydaza glikolanowa, 11 — reduktaza hydroksypirogronianowa, 12 — dehydrogenaza glutaminianowa (GDH), 13 — syntetaza glutaminy (GS), 14 — syntaza glutaminianowa (GOGAT), 15 — aminotransferaza glutaminian-pirogronian (GPT), 16 — aminotransferaza glutaminian-szczawiooctan (GOT), 17 — syntetaza asparaginy (AS)

transaminacji glioksalanu przez transaminazy: nieswoistą transaminazę seryna-glioksalan, współdziałającą również z asparaginą [18, 37], oraz nieswoistą transaminazę glutaminian-glioksalan, współdziałającą również z alaniną [36]. Dekarboksylacja glicyny przez wieloenzymowy kompleks dekarboksylazy glicynowej prowadzi do wydzielenia jonów amonowych. Po resyntezie seryny z glicyny i fragmentu 1C (N^5 , N^{10} metylenotetrahydrofolianu) następuje resynteza fragmentu 3C cyklu Bensona-Calvina. Ilość jonów amonowych uwalnianych w wyniku dekarboksylacji glicyny u

roślin C3 jest równoważna lub przewyższa ilość jonów amonowych wywodzących się z azotu glebowego. W roślinach C4 proces ten zachodzi na znacznie mniejszą skalę i ma miejsce w tkankach wiązki pochwy liścia.

Innym źródłem jonów amonowych są procesy dezaminacji i dezamidacji aminokwasów, związane z degradacją białek zachodzącą w starzejących się liściach. Uruchamianie aminokwasów z białek liści i łodygi zachodzi w generatywnej fazie rozwoju rośliny i wiąże się z syntezą białek zapasowych [17, 41]. U kukurydzy azot znajdujący się w ziarniakach w ok. 50% pochodzi z białek liści [11]. Dezaminacja aminokwasów zachodzi również w warunkach deficytu węglowodanów, gdy szkielety węglowe aminokwasów wykorzystywane są jako substraty w oddychaniu, co w końcu może doprowadzić do śmierci rośliny w wyniku zatrucia amoniakiem.

Odnosić należy również uwalnianie jonów amonowych w reakcji syntezy wiązania izopeptydowego między grupą amidową reszt glutamylowych białek a resztami lizynowymi, a także pierwszorzędowymi aminami typu putrescyny czy sperminy katalizowanej przez transglutaminazę [46]. Tego typu modyfikacja posttranslacyjna dużej podjednostki RUBISCO u lucerny jest potwierdzeniem znaczenia tej reakcji w roślinach [29].

1.2. Asymilacja jonów amonowych

1.2.1. Cykl glutamina-glutaminian

Pierwszymi organicznymi produktami asymilacji azotu są glutamina i glutaminian syntetyzowane w tzw. cyklu GS-GOGAT (syntetaza glutaminy — syntetaza glutaminianowa) [35]. Cykl ten od czasu odkrycia przez Tempesta [54] NADP-zależnej syntazy glutaminianowej oraz przez Lea i Miflina [26] ferredoksynozależnej syntazy glutaminianowej uważany jest za główną drogę włączania azotu do związków organicznych. Czynność GS przewyższa czynność GOGAT i owa dysproporcja czynności enzymów w cyklu skłania do przypuszczenia, że GS pełni również rolę w detoksykacji jonów amonowych [21]. Odbywająca się za pośrednictwem tego cyklu pierwotna asymilacja azotu w korzeniach jest źródłem organicznego azotu dla biosyntezy prawie wszystkich związków azotowych. W liściach cykl ten umożliwia reasymilację azotu uwalnianego w czasie fotorespiracji [51], przy czym ilość azotu przyswajalnego w ten sposób jest często większa niż ilość azotu przyswajanego z gleby [24]. U roślin motylkowych, korzystających z azotu atmosferycznego, zredukowany przez nitrogenazę *Rhizobium* azot uwalniany jest do cytoplazmy komórek rośliny, gdzie ulega włączeniu do metabolizmu azotowego za pośrednictwem specyficznych dla brodawek korzeniowych izoform syntetazy glutaminy [44, 57].

W roślinach występują dwie podstawowe izoformy GS: cytozolowa (GS1) w cytoplazmie liści i tkanek nefotosyntetyzujących oraz chloroplastowa (GS2) występująca także w plastydach korzeni lub w roślinach etiolowanych. Rola obu form jest zgodna z ich lokalizacją: GS2 bierze udział w pierwotnej asymilacji azotu w chloro-

plastach oraz w reasymilacji jonów amonowych uwalnianych w procesie fotooddychania. Niewyjaśniona natomiast pozostaje rola GS2 w plastydach korzeni. GS1 katalizuje asymilację jonów amonowych w korzeniach. Szereg badaczy jako odrębną formę uważa GS brodawek roślin motylkowych (GS_n). Mutanty jęczmienia zdolne do życia jedynie w warunkach zahamowanej fotorespiracji wykazują brak formy chloroplastowej GS w liściach [65], natomiast nie zmieniony poziom GS cytoplazmatycznej. Wskazuje to na decydującą rolę formy zlokalizowanej w chloroplastach w reasymilacji azotu pochodzącego z fotooddychania. Jednakże powinowactwo do glutaminianu formy chloroplastowej jest około dziesięciokrotnie mniejsze niż formy cytozolowej i optimum pH jest przesunięte w kierunku alkalicznym [21].

Syntetaza glutaminy jest białkiem oktamerycznym o różnej homo- i heterologicznej strukturze podjednostek, o masie cząsteczkowej 37–45 kDa. Układ podjednostek jest specyficzny dla danego organu i tkanki i prowadzi do różnic w aktywności enzymatycznej. Formy izomeryczne kodowane są przez niezależne jądrowe rodziny genów, stąd występowanie wielu wariantów budowy podjednostkowej i wariantów elektroforetycznych. Tak np. cytozolowa forma GS fasoli zbudowana jest z trzech typów podjednostek α , β i γ o podobnych masach — ok. 40 kDa. Forma występująca w cytoplazmie komórek liści składa się z podjednostek α i β , natomiast w korzeniach dominują podjednostki β i γ . Synteza podjednostki γ indukowana jest w brodawkach korzeniowych asymilujących azot atmosferyczny [61]. Indukcja ta związana jest zarówno z fazą rozwojową brodawek, jak i wzrostem stężenia jonów amonowych w wyniku działania nitrogenazy. Budowa podjednostkowa cytozolowej GS w innych roślinach motylkowych jest inna [56, 57]. Występowanie formy chloroplastowej, charakterystycznej dla liści, regulowane jest przez światło. Kodowane przez genom jądrowy mRNA dla tej formy zawiera sekwencję sygnałną, umożliwiającą przejście przez błonę chloroplastu [58]. Obecność tej formy, wykrywana metodą immunoprecypitacji ze specyficznymi przeciwciałami, wzrasta po oświetleniu etiolowanych siewek białym światłem, podczas gdy obecność formy korzeniowej oraz brodawkowej nie zmienia się. Zmianom na poziomie polipeptydów odpowiadają zmiany na poziomie mRNA. Tak więc mRNA formy chloroplastowej jest nieoznaczalny w korzeniach i występuje na bardzo niskim poziomie w liściach siewek etiolowanych, natomiast znaczne jego ilości pojawiają się po oświetleniu roślin [58]. W doświadczeniu z wykorzystaniem światła dalekiej i bliskiej podczerwieni wykazano, że zmiany na poziomie mRNA kontrolowane są na poziomie transkrypcji przynajmniej częściowo przez fitochrom. Oprócz fitochromu na poziom ekspresji tej formy wpływ mogą mieć także inne czynniki związane z dojrzewaniem chloroplastów i rozpoczęciem fotooddychania [15].

Syntaza glutaminianowa (GOGAT) katalizuje reakcję przeniesienia grupy amidowej z glutaminy na 2-oksoglutaran, prowadzącego do wytworzenia dwóch cząstek glutaminianu. GOGAT występuje w trzech formach różniących się masą cząsteczkową, kinetyką i specyfiką współdziałającego związku redukującego: NADH-za-

leżna GOGAT, NAD(P)H-zależna GOGAT i ferredoksyno-zależna GOGAT (Fd-GOGAT). Masa NAD(P)H-GOGAT wynosi od 200 do 240 kDa [19, 53], NADH-GOGAT 235 kDa [1], a (Fd)-GOGAT 125–180 kDa [53]. Badania immunologiczne dowodzą odrębności białek Fd i NAD(P)H-zależnych enzymów. Forma ferredoksynozależna zlokalizowana jest w chloroplastach [23, 51], chociaż jej obecność stwierdzono także w korzeniach i brodawkach korzeniowych [1]. Aktywność tej formy ulega podobnym zmianom pod wpływem światła, jak aktywność formy chloroplastowej GS [64]. Sugeruje to, że forma ta współdziała z GS w procesie reasymilacji azotu pochodzącego z fotooddychania [2]. Obecność formy NAD(P)H-zależnej stwierdzono w łądygach, korzeniach i brodawkach korzeniowych [19, 31, 53]. Aktywność formy NADH-zależnej związana jest ze stadium rozwoju rośliny i jest największa w młodych, rozwijających się liściach charakteryzujących się niekompletnym autotrofizmem [32, 38]. W późniejszym okresie jej aktywność spada i zostaje zastąpiona formą Fd-zależną. Podobnie jak w przypadku GS, zarówno obecność jonów amonowych, jak i równowaga pomiędzy N/C są odpowiedzialne za regulację izoenzymów GOGAT. W brodawkach korzeniowych fasoli i lucerny występują specyficzne dla tej tkanki izoenzymy NADH-zależnej GOGAT. W początkowym okresie rozwoju brodawek ich ekspresja jest niezależna od aktywności nitrogenazy, jednakże w brodawkach nieasymilujących azotu ich aktywność wynosi jedynie 15% aktywności w normalnie funkcjonujących brodawkach [8]. Wydaje się zatem, że obecność jonów amonowych jest niezbędna do maksymalnej indukcji aktywności GOGAT.

1.2.2. Dehydrogenaza glutaminianowa

Alternatywną drogą włączania jonów amonowych do związków organicznych może być reakcja katalizowana przez dehydrogenazę glutaminianową. Enzym ten katalizuje odwracalną reakcję syntezy glutaminianu z kwasu 2-oksoglutazarowego i amoniaku przy udziale NADH lub NADPH. Rola tego układu w asymilacji jonów amonowych jest kontrowersyjna. Aktywność GDH w tkankach roślin przewyższa wprawdzie aktywność GS i w jeszcze większej mierze aktywność GOGAT, ale enzym charakteryzuje się niskim powinowactwem do jonów amonowych (K_m 5,2 do 70 mM), poddającym w wątpliwość jego aminacyjną funkcję. Z drugiej strony — termodynamika reakcji przemawia za kierunkiem aminacji 2-oksoglutaranu (ΔG° ok. $-30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), a za tym — za działaniem tej reakcji nawet przy niskich stężeniach jonu amonowego. Na potwierdzenie tego faktu Yamaya i Oaks [69] przytaczają wyniki uzyskane z izolowanymi mitochondriami, dowodzące anaplerotycznej roli GDH w liściach kukurydzy. Wyniki ostatnich prac Tirado i wsp. [59, 60] wskazują na wysoką aktywność GDH, dorównującą aktywności GS w młodych liściach soi. W liściach starych aktywność aminacyjna dominowała, szczególnie w warunkach głodu azotowego lub nawożenia solami amonowymi. We wcześniejszych pracach wykazywano również wzrost aktywności GDH pod wpływem zwiększonego stężenia jonów amonowych [40, 42, 48], w starzejących się liściach [47, 52] oraz w warunkach braku

świata i wody [52]. Udowodniono przy tym, że wysoka aktywność GDH przy wysokim stężeniu amoniaku jest wynikiem syntezy *de novo* białka enzymatycznego [7]. Powyższe wyniki skłaniają do wniosku, że synteza glutaminianu przez GDH stanowi mechanizm detoksykacji w przypadku wysokiego stężenia amoniaku towarzyszącego degradacji białka w tkance. Natomiast Thomas [55], a ostatnio Robinson i wsp. [45] podkreślają kluczowe znaczenie GDH w regulacji przepływu węgla i azotu w roślinie. Zdaniem tych autorów zasadniczą rolą GDH jest dezaminacja glutaminianu, dostarczająca szkieletów węglowych do procesów oddechowych. Dowodem potwierdzającym tę hipotezę są wyniki prac wykonanych na zawieszinie komórkowej marchwi [45], w której wykazano, że poziom aktywności GDH związany jest z dostępnością węgla w pożywce oraz poziomem amoniaku w komórce. Przy niskim stężeniu sacharozy w pożywce obserwuje się zmniejszenie zawartości białka w komórkach oraz jednocześnie zwiększenie stężenia amoniaku i aktywności GDH. Proces ten zostaje odwrócony po przeniesieniu komórek do świeżej pożywki z sacharozą.

Zastosowanie inhibitorów cyklu GS-GOGAT, takich jak np. metioninosulfoheksimin, powoduje zahamowanie asymilacji jonów amonowych i ich nagromadzenie w tkankach [16, 43]. Jak należy jednak wytłumaczyć wzrost aktywności GDH w rozwijających się ziarniakach kukurydzy [12] zarówno o wysokiej, jak i niskiej zawartości białka? W ziarniakach tych zachodzi synteza białka przy pełnej dostępności węglowodanów.

Dehydrogenaza glutaminianowa jest oligomerycznym, allosterycznym białkiem zlokalizowanym w błonie mitochondrialnej, hamowanym *in vitro* przez GTP, a aktywowanym przez ADP. Jej aktywność jest niewątpliwie zależna od dostępności substratów i kofaktorów, ich kompartmentacji, a także od stanu energetycznego komórki. Wydaje się, że wszystkie te czynniki należy brać pod uwagę w ocenie roli GDH w metabolizmie komórki. Przykładem rozważań na temat regulacji dostępności 2-oksoglutaranu jest hipoteza Chena i Gadala [9] o roli NADP-zależnej dehydrogenazy izocytrynianowej zlokalizowanej w chloroplastach, dostarczającej 2-oksoglutaran do tych organelli.

1.3. Drogi metaboliczne zasymilowanych jonów amonowych

Azot jonów amonowych wbudowany w glutaminę i glutaminian jest przekazywany w procesach syntezy innych metabolitów azotowych: aminokwasów, kwasów nukleinowych i poliamin. Procesy te wymagają bądź nie wymagają udziału związków wysokoenergetycznych. Zasadniczy mechanizm "rozprowadzania" azotu z pierwotnych produktów asymilacji jonów amonowych na 2-oksokwasy w syntezie aminokwasów polega na transaminacji nie wymagającej udziału energii i oparty jest na tautomeryzacji zasad Schiffa fosforanu pirydoksalu lub fosforanu pirydoksaminy w mechanizmie ping-pong Bi Bi [63]. Aminotransferazy biorące udział w syntezie

aminokwasów różnią się na ogół specyficznością w stosunku do jednego tylko związku biorącego udział w reakcji, gdyż zasadniczym dawcą grup aminowych jest glutaminian, a w niektórych tylko wypadkach asparaginian lub alanina, podczas gdy w reakcjach dezaminacji akceptorem jest głównie 2-oksoglutaran, a rzadziej szczawiooctan lub pirogronian. Odwracalne przekształcenie glutaminianu w asparaginian katalizowane przez aminotransferazę glutaminian-asparaginian zapewnia specyficzność poszczególnych reakcji transaminacji przy jednoczesnej koordynacji biosyntezy poszczególnych aminokwasów. W obecności powszechnie występującej transaminazy glutaminian-asparaginian (GOT) powstaje asparaginian, który podobnie jak glutaminian jest prekursorem innych aminokwasów. Z asparaginianu powstaje treonina, lizyna i metionina, z glutaminianu — prolina, arginina i ornityna; z tej ostatniej tworzy się putrescyna, pierwsza poliamina w syntezie poliamin [20]. Glutaminian jest dawcą grupy aminowej w syntezie seryny, przekształcanej w cysteinę, aminokwasów rozgałęzionych: izoleucyny, waliny i leucyny, aminokwasów aromatycznych: tyrozyny i fenyloalaniny, a także histydyny. W wyniku transaminacji z udziałem asparaginianu powstaje alanina. Glutamina może przekazywać grupę amidową w reakcjach katalizowanych przez amidotransferazy bez udziału ATP (synteza glutaminianu w drugiej reakcji cyklu GS-GOGAT, synteza pierścienia imidazolowego histydyny). W przeciwieństwie do tych amidotransferaz synteza wiązania amidowego asparaginy polegająca na przekazaniu grupy amidowej glutaminy na asparaginian oraz amidacja glutaminianu przez jony amonowe katalizowana jest przez oparte na udziale ATP ligazy. Podobnie w reakcjach syntezy puryn i pirymidyn, a także histydyny wykorzystanie grupy amidowej glutaminy odbywa się kosztem energii (N_3 puryn i N_1 pierścienia imidazolowego, N_9 puryn oraz N_3 i N_9 pirymidyn).

1.4. Transport aminokwasów

Aminokwasy są u zbóż głównymi obok sacharozy metabolitami transportowanymi z miejsc produkcji asymilatów (ang. source) do rozwijających się organów roślin (ang. sink). Przyjmuje się, że u dojrzałych roślin ok. 90% azotu transportowanego do nasion pochodzi z remobilizacji azotu z części wegetatywnych (łodyga i liście), a jedynie 10% pochodzi z bieżącej asymilacji azotu glebowego przez korzenie [47]. Mobilizacja azotu z części wegetatywnych obejmuje trzy procesy:

- proteolizę białek lub transport z korzeni,
- przekształcenia puli prowadzące do syntezy aminokwasów wykrywanych we floemie,
- załadowanie aminokwasów do floemu.

Z rozpoczęciem generatywnej fazy rozwoju rośliny skorelowany jest wzrost aktywności enzymów proteolitycznych, prowadzący do degradacji białek i uwalniania aminokwasów [41]. Proces ten obserwowany jest również w roślinach rosnących w warunkach zahamowania fotosyntezy i braku asymilatów [6]. Równoległe z aktywnością proteolityczną obserwuje się w powyższych warunkach wysokie aktywności

enzymów asymilacji jonów amonowych, tj. syntetazy glutaminy, syntazy glutaminowej, dehydrogenazy glutaminowej, syntetazy asparaginowej oraz aminotransferazy asparaginowej [6, 47].

Najwięcej danych na temat mechanizmów transportu aminokwasów dostarcza porównanie stężeń aminokwasów w cytozolu komórek mezofilu, pochwy okołowiązkowej liści oraz soku floemu. Wykazano, że dobrym miernikiem stężenia aminokwasów w mezofilu i w pochwie okołowiązkowej jest stężenie aminokwasów w całych liściach [67]. Na podstawie różnic w stężeniu można wyodrębnić 3 grupy aminokwasów [66]. Pierwsza grupa składająca się z alaniny, glutaminianu, seryny i treoniny wykazuje podobne stężenie w całych liściach i we floemie. Druga grupa składa się z glicyny i asparaginianu, których stężenie we floemie jest ok. 3 razy niższe niż w komórkach mezofilu i które prawdopodobnie nie podlegają eksportowi z liści. Asparagina i glutamina tworzą trzecią grupę aminokwasów. Ich stężenie we floemie jest od 3 do 10 razy większe niż w mezofilu. Świadczyć to może o istnieniu selektywnego mechanizmu ładowania tych aminokwasów do floemu. U łubinu 70% azotu transportowanego do nasion występuje w formie asparaginy [49], podczas gdy u zbóż główną formą transportową jest glutamina, natomiast asparagina stanowi mniej niż 1% transportowanych aminokwasów [47, 68]. Dane na temat mechanizmu transportu aminokwasów są ciągle jeszcze niepełne.

Transport aminokwasów z cytozolu komórek mezofilu i pochwy okołowiązkowej do rurek sitowych prawdopodobnie odbywa się przez apoplast [62], chociaż nie można wykluczyć transportu całkowicie symplastycznego [22]. Transport apoplastyczny wymaga przekroczenia dwóch membran cytoplazmatycznych. W plazmalemmach stwierdzono występowanie czterech specyficznych nośników transmembranowych dla aminokwasów: dwóch dla aminokwasów obojętnych, jednego dla aminokwasów kwaśnych i jednego dla aminokwasów zasadowych [27]. Regulacja aktywności tych przenośników prawdopodobnie odpowiada za kontrolę załadunku floemu. Blum i Bentrup [4] wykazali specyficzną indukcję systemu transportu aminokwasów zasadowych w komórkach *Chenopodium rubrum* przeniesionych na pożywkę pozbawioną azotu, a Winter i wsp. [68] obserwowali różnice w transporcie do floemu poszczególnych aminokwasów na świetle oraz w ciemności. Ci ostatni zwracają jednak uwagę na współzależność transportu aminokwasów oraz sacharozy i formułują hipotezę o wspomaganiu transportu aminokwasów przez przepływ masowy sacharozy.

Literatura

-
- [1] Anderson M.P., Vance C.P., Heichel G.H., Miller S.S. 1989. Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* **90**: 351–358.
 - [2] Avilla C., Botella J.R., Canovas F.M., De Castro I.N., Valpuesta V. 1987. Different characteristics of the two glutamate synthase in the green leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* **85**: 1036–1039.

- [3] Back E., Burkhart W., Moyer M., Privalle L.S., Rothstein S. 1988. Isolation of cDNA clones coding for spinach nitrite reductase: complete sequence and nitrate induction. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 20–26.
- [4] Blum W., Bentrup F.W. 1991. An inducible amino acid transport system in photoautotrophic suspension cells of *Chenopodium rubrum* L. *J. Plant Physiol.* **137**: 674–676.
- [5] Bowsher C.G., Long D.M., Oaks A., Rothstein S.J. 1991. Effect of light/dark cycles on expression of nitrate assimilatory genes in maize shoots and roots. *Plant Physiol.* **95**: 281–285.
- [6] Brouquisse R., James F., Pradet A., Raymond P. 1992. Asparagine metabolism and nitrogen distribution during protein degradation in sugar-starved maize root tips. *Planta* **188**: 384–395.
- [7] Cammaerts D., Jacobs M. 1985. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **163**: 517–526.
- [8] Chen F.L., Cullimore J.V. 1988 Two isozymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L.: purification, properties and activity changes during nodule development. *Plant Physiol.* **88**: 1411–1417.
- [9] Chen R.D., Gadal P. 1990. Do the mitochondria provide the 2-oxoglutarate needed for glutamate synthesis in the higher plant chloroplasts?. *Plant Physiol. Biochem.* **28**: 141–145.
- [10] Cheng C.L., Dewdney J., Kleinhofs A., Goodman H.M. 1986. Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6825–6828.
- [11] Crowford T.W., Rendig V.V., Broadbent F.E. 1982. Sources, fluxes and sinks of nitrogen during early reproductive growth of maize (*Zea mays* L.) *Plant Physiol.* **70**: 1654–1660.
- [12] Dembiński E., Rafalski A., Wiśniewska I. 1991. Effect of long-term selection toward high and low protein content on the metabolism of amino acids and carbohydrates in maize kernel. *Plant Physiol. Biochem.* **29**: 549–557.
- [13] Deng M.D., Faure J.D., Caboche M. 1992. The molecular aspects of nitrate and nitrite reductase expression in higher plants. W: *Control of Plant Gene Expression* Verma D.P.S. ed. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 425–443.
- [14] Deng M.D., Moureaux T., Leydecker M.T., Caboche M. 1990. Nitrate reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* **180**: 257–261.
- [15] Edwards J.W., Coruzzi G.M. 1989. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell.* **1**: 241–248.
- [16] Fentem P.A., Lea P.J., Stewart G.R. 1983. Ammonia assimilation in the roots of nitrate- and ammonia-grown *Hordeum vulgare* (c.v. Golden Promise). *Plant Physiol.* **71**: 496–501.
- [17] Friedrich J.W., Schrader L.E., Nordheim E.V. 1979. N deprivation in maize during grain filling. I. Accumulation of dry matter, nitrate-N, and sulphate-S. *Agron. J.* **71**: 461–465.
- [18] Givan C.V. 1980. Aminotransferase in higher plants w *The Biochemistry of Plants* vol. 5, Mifflin B.J. ed., Academic Press, New York, 329–357.
- [19] Groat R.G., Vance C.P. 1981. Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **67**: 1198–1205.
- [20] Heby O., Persson L. 1990. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Tibs* **15**: 153–158.
- [21] Hirel B., Miao G.H., Verma D.P.S. 1992. Metabolic and developmental control of glutamine synthetase in legume and non-legume plants. W: *Control of Plant Gene Expression* Verma D.P.S. ed. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 443–459.
- [22] Humphreys T.E. 1988. Phloem transport — with emphasis on loading and unloading. W: *Solute Transport in Plant Cells and Tissues* Baker D.A., Hall J.L. eds., Longman Scientific and Technical, Harlow 1988, 305–346.
- [23] Kendall A.C., Wallsgrove R.M., Hall N.P., Turner J.C., Lea P.J. 1986. Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum sativum* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* **168**: 316–323.
- [24] Keys A.F., Bird I.F., Cornelius M.J., Lea P.J., Walsgrove R.M., Mifflin B.J. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741–743.

- [25] Lahners K., Kramer V., Back E., Privalle L.S., Rothstein S. 1988. Molecular cloning of complementary DNA encoding maize nitrite reductase. Molecular analysis and nitrate induction. *Plant Physiol.* **88**: 741–746.
- [26] Lea P.J., Mifflin B.J. 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**: 614–616.
- [27] Li Z.C., Bush D.R. 1990. Δ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves. *Plant Physiol* **94**: 268–277.
- [28] Lu J.L., Ertl J.R., Chen Ch.M. 1990. Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. *Plant Mol. Biol.* **14**: 585–595.
- [29] Margosiak S.A., Dharma A., Bruce-Carver M.R., Gonzales A.P., Louie D., Kuehn G.D. 1990. Identification of the large subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase as a substrate for transglutaminase in *Medicago sativa*. *Plant Physiol.* **92**: 88–96.
- [30] Martino S.J., Smarelli J. 1989. Nitrate reductase synthesis in squash cotyledons. *Plant Sci.* **61**: 61–65.
- [31] Matoh T., Takahashi E. 1980. Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Physiol.* **21**: 1461–1474.
- [32] Matoh T., Takahashi E. 1981. Glutamate synthase in greening pea shoots. *Plant Cell Physiol.* **22**: 727–731.
- [33] McParland R.H., Guevara J.G., Becker R.R., Evans J. 1976. Purification and properties of glutamine synthetase from cytosol of soya in root nodules. *Biochem. J.* **153**: 597–606.
- [34] Mifflin B.J. 1974. The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plasids of roots and leaves. *Plant Physiol.* **54**: 550–555.
- [35] Mifflin B.J., Lea P.J. 1980. Ammonia assimilation. W: *The Biochemistry of Plants* vol. 5, Mifflin B.J., ed., Academic Press, New York, 169–202.
- [36] Nakamura Y., Tolbert N.E. 1983. Serine: glyoxylate, alanine: glyoxylate, and glutamate: glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* **258**: 7631–7638.
- [37] Paszkowski A., Niedzielska A. 1990. Serine: glyoxalate aminotransferase from the seedlings of rye (*Secale cereale* L.). *Acta Biochem. Polon.* **37**: 277–282.
- [38] Pate J.S. 1973. Uptake, assimilation, and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 109–119.
- [39] Rao L.V.M., Datta N., Mahadevan M., Guha-Mukherjee S., Sopory S.K. 1984. Influence of cytokinins and phytochrome on nitrate reductase activity in etiolated leaves of maize. *Phytochem.* **23**: 1875–1879.
- [40] Ratajczak L., Ratajczak W., Mazurowa H. 1981. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. *Physiol. Plant.* **51**: 277–281.
- [41] Reed A.J., Below F.E., Hageman R.H. 1980. Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and protease activities during grain development of maize (*Zea mays* L.). I. Variation between genotypes. *Plant Physiol.* **66**: 164–170.
- [42] Rhodes D., Rendon G.A., Stewart G.R. 1976. The regulation of ammonia assimilating enzymes in *Lemna minor*. *Planta* **129**: 203–210.
- [43] Rhodes D., Sims A.P., Folkes B.F. 1980. Pathway of ammonia assimilation in illuminated *Lemna minor*. *Phytochem.* **19**: 357–365.
- [44] Robert F.M., Wong P.P. Isozymes of glutamine synthetase in *Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L. root nodules. *Plant Physiol.* **81**: 142–148.
- [45] Robinson S.A., Slade A.P., Fox G.G., Phillips R., Ratcliffe R.G., Stewart G.R. 1991. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol.* **95**: 509–516.
- [46] Signiorini M., Beninati S., Bergamini C.M. 1991. Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Plant Physiol.* **137**: 547–552.
- [47] Simpson R.J., Dalling M.J. 1981. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). III. Enzymology and transport of amino acids from senescing flag leaves. *Planta* **151**: 447–456.

- [48] Singh R.P., Srivastava H.S. 1982. Glutamate dehydrogenase activity and assimilation of inorganic nitrogen in maize seedlings. *Biochem Physiol. Pflanzen* **177**: 633–642.
- [49] Sodek L., Lea P.J., Mifflin B.J. 1980. Distribution and properties of a potassium-dependent asparaginase isolated from developing seeds of *Pisum sativum* and other plants. *Plant Physiol.* **65**: 22–26.
- [50] Solomonson L.P., Barber M.J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **41**: 225–2253.
- [51] Somerville C.R., Ogren W.L. 1980. Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* **286**: 257–259.
- [52] Srivastava H.S., Singh R.P. 1987. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochem.* **26**: 597–610.
- [53] Suzuki A., Gadal P. 1984. Glutamate synthase: physiochemical and functional properties of different forms in higher plants and other organisms. *Physiol. Veg.* **22**: 471–486.
- [54] Tempest D.W., Meers J.L., Brown C.M. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by hitherto unknown route. *Biochem J.* **117**: 405–407.
- [55] Thomas H. 1978. Enzymes of nitrogen mobilization in detached leaves of *Lolium temulentum* during senescence. *Planta* **142**: 161–169.
- [56] Tingey S.V., Coruzzi G.M. 1987a. Glutamine synthetase of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* **84**: 366–373.
- [57] Tingey S.V., Walker E.L., Coruzzi G.M. 1987b. Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots, and nodules. *Embo J.* **6**: 1–9.
- [58] Tingey S.V., Tsai F.Y., Edwards J.W., Walker E.L., Coruzzi G.M. 1988. Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed in vivo. *J. Biol. Chem.* **263**: 9651–9657.
- [59] Tirado J.L., Conejero G., Robin P. 1990a. Comparaison des activites glutamine synthetase et glutamate deshydrogenase dans le feuille de *Glycine max*. Distribution dans la plante et effect de l'ammonium et du nitrate. *Plant Physiol. Biochem.*, **28**: 239–250.
- [60] Tirado J.L., Conejero G., Robin P. 1990b. Comparaison des activites glutamine synthetase, glutamate deshydrogenase et nitrate reductase chez *Glycine max*. Effect de l'obscurite sur la premiere feuille trifoliee. *Plant Physiol. Biochem.* **28**: 251–257.
- [61] Tjaden G., Coruzzi G.M. 1992. Glutamine and asparagine biosynthesis: the regulation of genes for enzymes along a common nitrogen-metabolic pathway. W: Control of Plant Gene Expression Verma D.P.S. ed CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 459–471.
- [62] Turgeon R. 1989. The sink-source transition in leaves. *Ann Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **40**: 119–138.
- [63] Voet G., Voet J.G. 1990. Biochemistry. John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane Toronto, Singapore, 679–680.
- [64] Wallsgrave R.M., Lea P.J., Mifflin B.J. 1982. The development of NADH-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta* **154**: 473–476.
- [65] Wallsgrave R.M., Turner W.C., Hall N.P., Kendall A.C., Bright S.W.J. 1987. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase. Biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol.* **83**: 155–158.
- [66] Weiner H., Blechschmidt-Schneider S., Mohme H., Eschrich W., Held H.W. 1991. Phloem transport of amino acids. Comparison of amino acid contents of maize leaves and of the sieve tube exudate. *Plant Physiol. Biochem.* **29**: 19–23.
- [67] Weiner H., Heldt H.W. 1992. Inter- and intracellular distribution of amino acids and other metabolites in maize (*Zea mays* L.) leaves. *Planta* **187**: 242–246.
- [68] Winter H., Lohaus G., Heldt H.W. 1992. Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant Physiol.* **99**: 996–1004.
- [69] Yamaya T., Oaks A. 1987. Synthesis of glutamate by mitochondria. An anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. *Physiol. Plant.* **70**: 749–756.