

## 2,4-Dinitrophenol을 처리한 호밀 (*Secale cereale* L.) 유식물의 질산염 환원에 관한 연구

### II. 호밀 유식물 뿌리의 질산염 환원효소 활성에 대한 2,4-Dinitrophenol의 영향

曹 圭 燦·李 相 淑·權 五 溶

(충남대학교 자연과학대학 생물학과)

## Studies on *in vivo* Nitrate Reduction in Rye (*Secale cereale* L.) Seedlings Treated with 2,4-Dinitrophenol

### II. Effect of 2,4-Dinitrophenol on *in vivo* Nitrate Reductase Activity in the Roots of Rye Seedlings

Jo, Gyu-Chan, Sang-Suk Lee and Oh-Yong Kwon

(Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon)

#### ABSTRACT

This work was carried out to determine the effect of 2,4-dinitrophenol (DNP) on *in vivo* nitrate reductase activity in the roots of 6 day old rye (*Secale cereale* L.) seedlings. The nitrate reductase activity in the roots of 6 day old rye seedlings pretreated with 0.5 mM DNP was higher than that of the control group in all the experimental conditions. The optimal concentration of  $\text{KNO}_3$  for maximum nitrate reductase activity was 10 mM in both control and treated group. The nitrate reductase activity in the treatment of 10 mM  $\text{KNO}_3$  gradually increased for 4 h in both groups, and then maintained constantly. The nitrate reductase activity occurred per hour was highest at 1 h in both groups, while it was declined by large degrees as time goes on. The daily pattern of nitrate reductase activity was gradually decreased in both groups with the passage of day. The optimal pH for nitrate reductase activity was 7.5 in both groups.

From the results of this experiment and a previous paper (Kwon *et al.*, 1991), it was determined that the nitrate reductase activity in both roots and shoots of rye seedlings was increased by the treatment of 0.5 mM DNP, and particularly in both groups, the nitrate reductase activity in the roots of rye seedlings was higher than that in shoots of them.

#### 서 론

고등식물의 질산염 환원은 잎에서만 일어나는 것이 아니고, 배, 자엽, 화분립, 소순판(scutellum), 호분 세포, 뿌리 등 식물체의 다양한 부위에서 일어난다고 보고(Beevers and Hageman, 1972; Hewitt and Gundry, 1976)되었다. 특히 뿌리에서의 질산염 환원은 초기 생장시 매우 활발하게 일어나기 때문에 유식물의 생장에 중요한 역할을 담당하고 있다고 보고(Pate, 1980)하였다.

DNP(2,4-dinitrophenol)는 chloroplast thylakoid membrane과 mitochondria membrane에서 전자 전달을 방해하여 membrane을 경계로 한  $\text{H}^+$ 이온 농도구배를 파괴시킴으로써, 전자전달과 인산화 과정이 동시에 일어나지 못하게 하는 uncoupling agent이다(Cotton and Jackson, 1983). 이것들은 세포막에 대한  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ 이온의 투과를 촉진시키며(Riemersma, 1968; Barker and Levitan, 1974; Jackson, 1982), tobacco XD 칼루스와 호분층에서 질산염의 주 저장소인 액포로부터 세포질로 질산염 유출을 촉진시

킨다고 보고(Ferrari *et al.*, 1973)하였다. 한편, Lee(1979)는 *in vivo*의 실험을 통하여 또 다른 uncoupling agent로서 0.25  $\mu$ M, 5  $\mu$ M CCCP(carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazine)와  $\mu$ M, 0.1 mM DNP가 처리된 보리 유식물 뿌리에 질산염 환원산물인 아질산염이 축적됨을 보고하였다. Klepper(1979)는 *in vivo*에서 밀 유식물 잎에 0.54 mM DNP를 처리하면 질산염 환원효소 활성이 증가한다는 것을 밝혔다. 또한 0.5 mM DNP를 처리한 보리 유식물 잎에서도 질산염 환원효소 활성이 증가하고 있음을 보고(Ben-Shalom, 1983)하였다. Kwon 등(1991)은 호밀 유식물 묘조(shoots)에서 질산염 환원효소 활성에 관한 DNP의 영향을 발표한 바 있으나 아직까지 이 분야의 연구에 관한 보문이 그리 많지 않은 현실이다.

따라서 본 연구는 호밀 유식물 뿌리의 질산염 환원에서 DNP가 얼마만큼 영향을 미치며, 또한 호밀 유식물의 뿌리와 묘조에서 얼마 만큼의 활성도 차이가 나타나는가를 구명하기 위해, 질산염 환원효소의 유도물질 즉  $KNO_3$ 의 농도 및 처리시간, 성장 단계, pH 변화에 따라서 DNP에 대한 질산염 환원효소의 활성을 측정하고 분석하였다.

## 재료 및 방법

**재 료.** 본 실험 재료인 호밀(*Secale cereale* L.)은 충청남도 금산군 남이면 신동리에서 5-6년 동안 재배해 온 종자로서, 1989년에 수확한 것을 사용하였다.

**발아 및 성장 조건.** 호밀 종자는 1% sodium hypochlorite 용액으로 10분 동안 표면 살균시킨 후, 증류수로 4회 이상 충분히 세척하였다(Sweet and Bolton, 1979). 멸균된 종자를 발아시키기 위해 비이커로 옮긴 후, 증류수를 넣고 aeration pump로 통기시키면서 암소의 배양기( $28 \pm 1^\circ C$ )에서 24시간 동안 침윤시켰다. 침윤이 일어나는 동안 약간의 발아가 시작된 종자에 0.5 mM DNP(2,4-dinitrophenol)를 2시간 동안 처리한 후, DNP 처리구와 대조구로 나누어 발아 상자( $30 \times 20 \times 5$  cm) 위에 1겹의 거어즈를 깔고 암소의 배양기( $28 \pm 1^\circ C$ )에서 하루에 2회씩 정기적으로 증류수를 교환하면서 6일 동안 생장시켰다.

**질산염 환원효소 활성 측정.** 질산염 환원효소 활성은 Streeter and Bosler(1972)의 *in vivo* 분석법을 변형하여 측정하였다. 성장 상태가 균일한 호밀 유식물을 DNP 처리구와 대조구별로 각각 10개체씩 선별한 다음, 암소의 배양기( $28 \pm 1^\circ C$ )내에서 10 mM  $KNO_3$  용액으로 1시간 동안 처리하여 질산염 환원효소의 활성화를 유도시켰다. 질산염 환원효소 활성 분석을 위해 뿌리(0.1-0.3 g)를 3% N-prophanol과 50  $\mu$  chloramphenicol solution(0.5 mg/ml)으로 조성된 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)가 20 ml씩 들어 있는 뚜껑달린 시험관(25 ml)에 넣고, 암소의 배양기( $28 \pm 1^\circ C$ )에서 1시간 동안 배양하면서  $NO_2^-$ 을 완

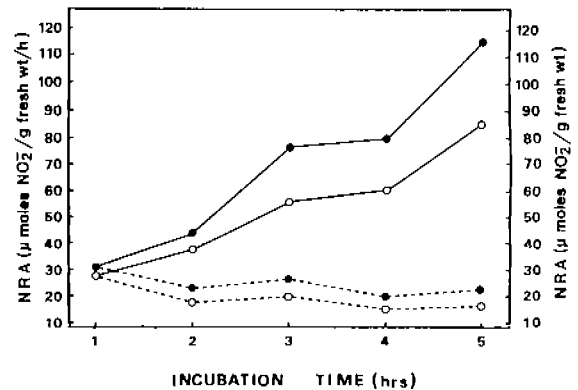


Fig. 1. Effect of incubation time on *in vivo* NRA in the roots of 6 day old rye seedlings which were not pretreated (○) and pretreated (●) with 0.5 mM DNP after imbibition for 24 h at  $28(\pm 1)^\circ C$  in the dark. (---),  $\mu$  moles  $NO_2^-$ /g fresh weight/h; (—),  $\mu$  moles  $NO_2^-$ /g fresh weight.

충용액내로 유출시켰다.  $NO_2^-$ 이 유출된 완충용액 10 ml에 3 N HCl으로 녹인 1% sulfanilamide와 0.02% N-1-naphthylethylene diamine dihydrochloride를 차례로 각각 0.5 ml씩 첨가한 후, 20분 동안 붉은색의 착색 화합물 생성을 유도시켜 spectrophotometer(Bekman Du-65)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 질산염 환원효소 활성은 완충용액내로 유출된  $NO_2^-$  양을  $\mu$ moles  $NO_2^-$ /g fresh wt/h.으로 나타냈다.

## 결과 및 고찰

호밀 유식물 뿌리에 10 mM  $KNO_3$ 를 1시간 동안 처리한 후, 완충용액(pH 7.5)내에서 배양시간에 따라 나타난 질산염 환원효소 활성은 대조구보다 0.5 mM DNP 처리구의 뿌리에서 더 높게 나타났다(Fig. 1). 배양시간이 지나면서 점차로 증가한 질산염 환원효소의 활성은 3-4시간째 일정하게 나타난 후, 5시간째는 큰 폭으로 증가되었다. 그러나 단위시간당 나타난 활성은 1시간째 가장 높게 나타났으나 시간이 지나면서 감소하는 것을 볼 수 있었다. 호밀 유식물의 묘조에서도 이와 유사한 결과를 보고(Kwon *et al.*, 1991)한 바 있으며, 밀 유식물 묘조에서 단위시간당 나타난 질산염 환원효소 활성이 1시간째 가장 높게 나타남을 보고(Kwon *et al.*, 1989)한 실험 결과와 일치하였다. 이러한 실험적 결과에 의해서 본 실험은 1시간 동안 완충용액내에서 배양한 후 질산염 환원효소 활성을 측정하였다.

0.5 mM DNP 처리구의 뿌리는  $KNO_3$  처리농도가 증가됨에 따라서 질산염 환원효소 활성이 증가되었으며, 대조구에 비해서 높게 나타났다(Fig. 2).  $KNO_3$  처리농도의 증

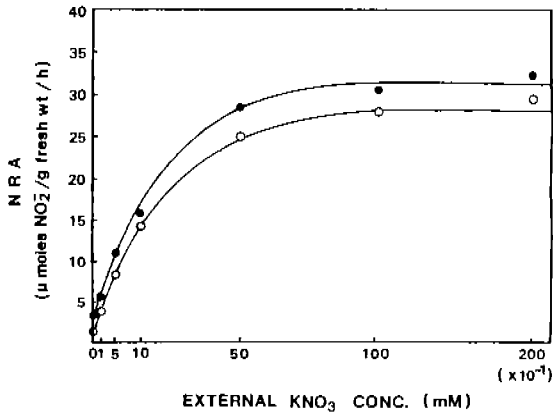


Fig. 2. Effect of external KNO<sub>3</sub> concentration on *in vivo* NRA in the roots of 6 day old rye seedlings which were not pretreated (○) and pretreated (●) with 0.5 mM DNP after imbibition for 24 h at 28(±1)°C in the dark.

가에 따라서 증가한 활성은 10 mM 이상에서 더 이상 증가가 일어나지 않고 두 그룹 모두 일정하게 유지되었으며, 10 mM에서 활성이 최대로 나타남을 알 수 있었다. 이러한 결과는 질산염 환원효소의 활성화와 합성에는 기질인 질산염이 필요하며(Duke and Duke, 1984), 옥수수 뿌리에 질산염이 일정농도 이상으로 존재해도 질산염 환원효소 활성은 증가되지 않고 일정하게 유지되었다는 Konrad 등(1983)의 보고와 일치하는 것이다. 한편, 대두 잎은 질산염을 공급하지 않으면 질산염 환원효소의 활성이 나타나지 않는다고 보고(Harpper, 1974)한 바 있으나, 본 실험 재료인 호밀 유식물 뿌리에서는 미량의 활성이 나타났으며, 묘조에서도 이와 같은 현상이 나타남을 보고(Kwon et al., 1991)하였다. 질산염 환원효소가 최대 활성을 타나내는데 필요한 KNO<sub>3</sub> 농도는 보리(Smith and Thompson, 1971), 난장콩(Hans and Nissen, 1982), 옥수수(Wallace, 1973)에서 각각 10 μM, 0.1 mM, 100 mM로, 그리고 강남콩(Emelia and Neyra, 1983), 호밀 유식물 묘조(Kwon et al., 1991)는 10 mM로 밝혀진 바 있어, 종의 특이성과 조직 부위에 따라서 활성이 다양하게 나타나는 것으로 사료된다.

보리와 밀 유식물 잎에 0.5 mM, 0.54 mM DNP를 처리하면 질산염 환원효소의 활성이 증가한다고 보고(Klepper, 1979; Ben-Shalom et al., 1983)가 있다. 그 뿐만 아니라 Lee(1979)는 0.1 mM DNP를 처리한 보리 유식물 뿌리에서 질산염 환원산물인 아질산염이 축적됨을 보고하였는데, 이것은 본 실험 결과와 유사하였다. Klepper(1979)는 질산염 산화·환원과정에서 DNP가 cytochrome계의 NADH 산화를 방해한다고 하였다. 그러나 DNP 처리에 의한 질산염 환원효소의 활성 증가 현상에 대해서는 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

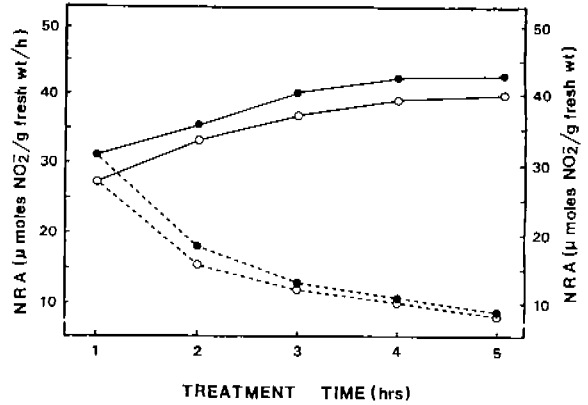


Fig. 3. Effect of KNO<sub>3</sub> on *in vivo* NRA as a function of treatment time in the roots of 6 day old rye seedlings which were not pretreated (○) and pretreated (●) with 0.5 mM DNP after imbibition for 24 h at 28(±1)°C in the dark. (---), μ moles NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/g fresh weight/h; (—), μ moles NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/g fresh weight.

0.5 mM DNP 처리구의 뿌리에서는 10 mM KNO<sub>3</sub> 처리 시간에 따라서 질산염 환원효소 활성이 대조구에 비해 높게 나타났다(Fig. 3). 4시간째까지 지속적인 증가를 나타낸 0.5 mM DNP 처리구와 대조구의 활성은 5시간 처리시에 둔화되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 *Lolium perenne* 식물의 뿌리와 묘조에서 질산염 흡수와 질산염 환원효소의 활성이 4시간까지 지속되었다는 보고(Bowman and Paul, 1988)와 유사한 것이다. Hageman 등(1980)은 밀 유식물 잎에서 질산염 환원효소의 활성이 3시간 동안 지속적으로 증가함을 보고하였다. 또한 10 mM KNO<sub>3</sub>를 처리한 밀 유식물 뿌리에서 4시간째 활성이 가장 높게 나타나는 결과(Kwon et al., 1989)와 본 실험이 유사함을 알 수 있었다. 단위시간당 나타난 활성은 1시간째 가장 높게 나타난 후 시간이 지나면서 감소되었다. Kwon 등(1989)은 밀 유식물 묘조에서 단위시간당 나타난 활성이 1시간째 가장 높게 나타남을 보고하였다.

0.5 mM DNP 처리구의 뿌리는 생장 단계별에 따라서 질산염 환원효소 활성이 대조구에 비해 높게 나타났으며, 생장이 지속되면서 점차로 감소되었다(Fig. 4). 생장 단계별로 나타나는 질산염 환원효소 활성에 대한 실험으로서, 호밀 유식물의 묘조(Kwon et al., 1991)와 강남콩 유식물의 어린잎에 나타난 활성은 생장하면서 점차로 감소되었으며(Peirson and Elliott, 1981), *Kalanchoë fedtschenkoi* 유식물의 잎에서도 6일 동안 생장하면서 질산염 환원효소의 활성이 감소한다고 보고(Chang et al., 1981)하였다. 대두의 어린 자엽은 성숙한 자엽에서 보다 활성이 높게 나타났으며(Benito and Campbell, 1980), Reed 등(1980)은 옥수수가

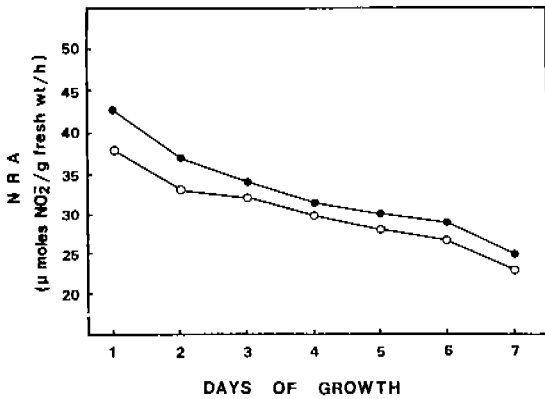


Fig. 4. Daily pattern on *in vivo* NRA in the roots of growing rye seedlings which were not pretreated (○) and pretreated (●) with 0.5 mM DNP after imbibition for 24 h at 28(±1)°C in the dark.

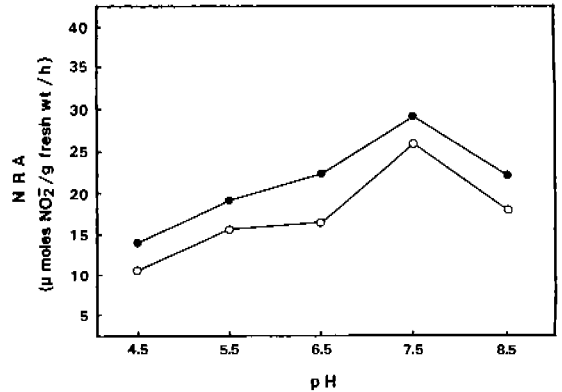


Fig. 5. Effect of pH on *in vivo* NRA in the roots of 6 day old rye seedlings which were not pretreated (○) and pretreated (●) with 0.5 mM DNP after imbibition for 24 h at 28(±1)°C in the dark.

개화한 후 60일 동안 성장하면서 질산염 환원효소의 활성이 감소되는 것을 보고하였다. Wallace(1978)는 성숙한 옥수수 뿌리에서 어린 뿌리에 비해 질산염 환원효소 활성이 낮게 나타남을 밝히고, 어린 뿌리보다 성숙한 뿌리에 다량의 inactivator가 존재하기 때문에 이들이 질산염 환원효소와 결합하여 효소의 활성화를 억제시킨다고 보고하였다. 이러한 사실은 유식물의 초기 성장에서 질산염 환원효소의 활성이 활발하게 나타나는 것을 시사하는 것이다.

0.5 mM DNP 처리구의 뿌리는 pH 변화에 따라서 질산염 환원효소 활성이 대조구에 비해 더 높게 나타났으며, pH 4.5-pH 8.5의 전 실험구간 중 pH 7.5에서 두 그룹 모두 활성이 최대로 나타났다(Fig. 5). 0.5 mM DNP 처리구와 대조구의 활성은 강 산성과 강 알칼리쪽에 갈수록 점차로 감소되는 것을 볼 수 있었으며, 호밀 유식물 묘조에서도 이와 같은 경향이 나타났다(Kwon *et al.*, 1991). pH 변화에 따르는 질산염 환원효소 활성에 대한 실험으로서, 밀 유식물 잎과 대두는 pH 7.5에서 활성이 최대로 나타난다고 보고(Sherard and Dalling, 1979; Robin *et al.*, 1985)하여 본 실험 결과와 일치하였다. 또한 옥수수 뿌리에 pH 4-pH 7의 범위까지 pH 변화를 주게되면 pH 7에서 조직내 질산염 이온 농도가 높아지고, 질산염 환원효소 활성이 증가됨을 보고(Konrad *et al.*, 1983)하여 본 실험 결과와 유사한 양상을 나타냈다.

이러한 실험 결과들을 분석해 보면, KNO<sub>3</sub>의 각 처리농도에서 대조구 보다 0.5 mM DNP 처리구는 전반적으로 더 높게 나타났으며, 두 그룹 모두 10 mM에서 질산염 환원효소 활성이 최대로 나타났다. 0.5 mM DNP 처리구에서 대조구에 비해 10 mM KNO<sub>3</sub>의 처리시간이 지속됨에 따라 질산염 환원효소가 높은 활성을 나타내면서 4시간까지 점

진적으로 증가되었다. 또한 호밀 유식물의 성장과정에서 0.5 mM DNP 처리구는 대조구보다 초기 성장시 높은 활성을 유지하였으나 생장이 지속됨에 따라 감소되는 경향을 보였다. pH 4.5-pH 8.5의 구간에서도 0.5 mM DNP 처리구는 대조구보다 높은 질산염 환원효소의 활성을 나타내었고, pH 7.5에서는 다같이 질산염 환원효소의 최대 활성을 보였다. 이와 같이 0.5 mM DNP 처리로 인해 질산염 환원효소의 활성이 증가된다는 사실은 Klepper(1979)의 보고를 통해서 어느 정도 해석이 가능하리라 생각된다. 그는 질산염 산화·환원과정에서 DNP 처리는 cytochrome계의 NADH 산화를 억제함으로써 질산염 환원효소의 전자 공여체인 NADH가 세포질내로 부가적으로 더 많이 공급되어 나타난 결과로 추정하였다. 그러나 이러한 사실에 대한 생리적 기작이 구체적으로 상세하게 증명되지 않았기 때문에 이러한 실험에 대해서는 앞으로 더 많은 증명이 필요하다고 사료된다.

### 적 요

본 연구는 6일간 자란 호밀 유식물의 뿌리에서 질산염 환원효소 활성에 관한 DNP의 영향을 밝힌 것이다. 모든 실험 조건에서 질산염 환원효소 활성은 0.5 mM DNP 처리구가 대조구에 비해 더 높게 나타났으며, KNO<sub>3</sub>의 각 처리농도에서 10 mM KNO<sub>3</sub> 처리시에 활성이 가장 높게 나타났다. 10 mM KNO<sub>3</sub> 처리에서 증가한 활성은 4시간 이후부터 일정하게 유지되었고, 단위시간당 나타난 활성은 1시간째 가장 높았으나 시간이 지나감에 따라 점차로 감소되었다. 성장 단계에 따르는 활성은 성장 초기에 높게 나타났으나, 생장이 지속되면서 점차로 감소하였다. pH

변화에 따라서 활성이 증가하다가 pH 7.5에서 최대로 나타난 후 감소하였다. 이 실험과 그 이전의 실험 결과(Kwon *et al.*, 1991)에서 보면, 호밀 유식물의 뿌리와 묘조에서 질산염 환원효소의 활성이 0.5 mM DNP 처리에 의해서 증가하였을 뿐만 아니라, 유식물 뿌리의 질산염 환원효소 활성이 묘조에서 보다 높게 나타난 것이 밝혀졌다.

## 참 고 문 헌

- Barker, J.L. and H. Levitan. 1974. Phenol: effect on membrane permeability of molluscan neurons. *Brain Res.* **67**: 555-561.
- Beevers, L. and R.H. Hageman. 1972. The role of light in nitrate metabolism in higher plant. In, *Photophysiology*, A.C. Giese (ed.). Vol. 7, Academic, New York. pp. 85-113.
- Benito, O.-I. and W.H. Campbell. 1980. Development of NAD(P)H and NADH: nitrate reductase activity in soybean cotyledons. *Plant Physiol.* **65**: 595-599.
- Ben-Shalom, N., R.C. Huffaker and L. Rappaport. 1983. Effect of photosynthetic inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation on nitrate and nitrite reduction in barley leaves. *Plant Physiol.* **71**: 63-66.
- Bowman, C.D. and J.L. Paul. 1988. Uptake and assimilation of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  by nitrogen deficient perennial ryegrass turf. *Plant Physiol.* **88**: 1303-1309.
- Chang, N.K., H.M. Vines and C.C. Black, Jr. 1981. Nitrate assimilation and crassulacean acid metabolism in leaves of *Kalanchoe fedtschenkoi* var. *marginata*. *Plant Physiol.* **68**: 464-468.
- Cotton, N.P.J. and J.B. Jackson. 1983. Titration of ATP synthesis with uncoupling agents do not provide evidence of localized high energy intermediates in electron transport phosphorylation in bacterial chromatophores. *FEBS Lett.* **161**: 93-99.
- Duke, S.H. and S.O. Duke. 1984. Light control of extractable nitrate reductase activity in higher plant. *Plant Physiol.* **62**: 485-493.
- Emelia, E.T. and C.A. Neyra. 1983. Expression of nitrate and nitrite reductase activities under various forms of nitrogen nutrition in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **72**: 71-75.
- Ferrari, T.E., O.C. Yodr and P. Filner. 1973. Anaerobic nitrite production by plant cells and tissues. Evidence for two nitrate pools. *Plant Physiol.* **51**: 423-31.
- Hageman, R.H., A.J. Reed, R.A. Femmer, J.H. Sharrard and M.J. Dalling. 1980. Some new aspects of the *in vivo* assay for nitrate reductase in wheat (*Triticum aestivum*) leaves. *Plant Physiol.* **65**: 27-32.
- Hans, B. and P. Nissen. 1982. Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean. *Plant Physiol.* **70**: 754-759.
- Harpper, J.E. 1974. Soil and symbiotic nitrogen requirements for optimum soybean production. *Crop Sci.* **14**: 255-260.
- Hewitt, E.J. and C.S. Gundry. 1976. The molybdenum requirement of plants in relation to nitrogen supply. *J. Hort. Sci.* **45**: 351-358.
- Jackson, P.C. 1982. Differences between effect of undissociated and anionic 2,4-dinitrophenol on permeability of barley roots. *Plant Physiol.* **70**: 1373-1379.
- Klepper, L.A. 1979. Effects of certain herbicides and their combinations on nitrate and nitrite reduction. *Plant Physiol.* **64**: 273-275.
- Konrad, M., P. Robin and L. Salsac. 1983. Nitrate reductase activity in shoots and roots of maize seedling as affected by the form of nitrogen nutrition and the pH of the nutrient solution. *Plant Physiol.* **71**: 618-622.
- Kwon, O.Y. and H.S. Park. 1989. Effect of sodium azide on *in vivo* nitrate reductase activity of wheat seedlings. *Chungnam J. Sci.* **16**: 134-140.
- Kwon, O.Y., G.C. Jo and S.S. Lee. 1991. Studies on *in vivo* nitrate reduction in rye (*Secale cereale* L.) seedlings treated with 2,4-dinitrophenol. I. Effect of 2,4-dinitrophenol on *in vivo* nitrate reductase activity in the shoots of rye seedlings. *Chungnam J. Sci.* **18**: 82-90.
- Kwon, O.Y., Y.H. Rhee, H.M. Oh, H.S. Park and J.C. Lee. 1988. Effect of cycloheximide on the nitrate reductase activity and the protein content of rye (*Secale cereale* L.) seedlings. *Chungnam J. Sci.* **15**: 75-83.
- Lee, R.B. 1979. The release of nitrite from barley roots in response to metabolic inhibitors, uncoupling agents, and anoxia. *J. Exp. Bot.* **30**: 119-133.
- Pate, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 313-340.
- Peirson, D.R. and J.R. Elliott. 1981. *In vivo* nitrite reduction in leaf tissue of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **68**: 1068-1072.
- Reed, A.J., C. Huffaker and D.W. Rains. 1984. Early effects of salinity in nitrate assimilation in barley seedling. *Plant Physiol.* **76**: 321-325.
- Riemersma, J.C. 1968. Effect of sodium azide and 2,4-dinitrophenol on phosphorylation reactions and ion fluxes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta* **153**: 80-87.
- Robin, P., L. Streit, W.H. Campbell and J.E. Harpper. 1985. Immunochemical characterization of nitrate reductase forms from wild-type (cv. Williams) and  $\text{nr}_1$  mutant soybean. *Plant Physiol.* **77**: 232-236.
- Sherrard, J.H. and M.J. Dalling. 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.
- Smith, F.W. and J.F. Thompson. 1971. Regulation of nitrate reductase in excised barley roots. *Plant Physiol.* **48**:

- 219-223.
- Streeter, J.G. and M.E. Bosler. 1972. Comparison of *in vivo* and *in vitro* assays for nitrate reductase in soybean leaves. *Plant Physiol.* **49**: 448-450.
- Sweet, J.C. and W.E. Bolton. 1979. The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings. *Am. J. Bot.* **66**: 692-698.
- Wallace, W. 1973. The distribution and characteristics of nitrate reductase and glutamate dehydrogenase in the maize seedling. *Plant Physiol.* **52**: 191-196.
- Wallace, W. 1978. Comparison of a nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root with a protease from yeast which inactivated tryptophan synthase. *Biochem. Biophys. Acta* **524**: 418-427.

(1991. 10. 7 接受)