

ATIVIDADE DA REDUTASE DE NITRATO *IN VIVO* EM FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM FUNÇÃO DAS VARIAÇÕES NAS CONDIÇÕES DE ENSAIO¹

LUIZ EDSON MOTA DE OLIVEIRA² e ANTONIO CELSO NOVAES MAGALHÃES³

RESUMO - Neste trabalho foram determinadas as condições mais apropriadas de ensaio *in vivo* da redutase de nitrato em tecidos foliares de plantas de duas variedades de cana-de-açúcar (NA 56-79 e CB 47-355). Concentrações de nitrato no meio de reação superiores a 50 mM induziram uma queda na atividade enzimática. A inibição no processo e redução de nitrato por altas concentrações de KNO₃ parece não ser decorrente da diminuição do potencial osmótico do meio de reação. Não foi observada qualquer atividade da redutase de nitrato quando os tecidos foliares foram ensaiados em meio de reação sem nitrato exógeno. As atividades máximas da redutase de nitrato foram alcançadas nos pHs 7,5 e 8,5, respectivamente, para as variedades CB 47-355 e NA 56-79. A taxa máxima de redução de nitrato a nitrito foi determinada nas temperaturas de 32°C, para a variedades NA 56-79, e entre 32°C a 37°C, para a variedade CB 47-355. A atividade da enzima atingiu seu valor máximo nas folhas +3, +4 e +5 (folhas completamente expandidas).

Termos para indexação: tecidos foliares, nitrato, atividade enzimática.

NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN SUGARCANE LEAVES IN FUNCTION OF VARIATIONS IN THE ASSAY CONDITIONS

ABSTRACT - The most appropriate conditions for *in vivo* nitrate reductase activity (NRA) assay in leaf tissue of two sugarcane varieties (NA 56 - 79 and CB 47 - 355) were studied. Above 50 mM NO₃⁻, the NRA declined considerably. Such effect of high KNO₃ levels on NRA was probably not related to the osmotic potential of the medium. In the absence of exogeneous NO₃⁻, the NRA was negligible. Maximal NRA was obtained at pHs 7,5 and 8,5 for the varieties CB 47 - 355 and NA 56 - 79, respectively. Maximal reduction of nitrate to nitrite was observed at 32°C for NA 56 - 79 and between 32°C and 37°C for CB 47 - 355. The maximal NRA occurred in the +3, +4 and +5 leaf (fully expanded leaves).

Index terms: leaf tissue, nitrate, enzymatic activity.

INTRODUÇÃO

O nitrogênio desempenha um papel-chave no crescimento e produtividade das plantas, constituindo-se em componente fundamental das proteínas e ácidos nucléicos, participa, direta ou indiretamente, de importantes processos bioquímicos e metabólicos das células. O nitrogênio é absorvido quase que totalmente na forma de íon nitrato, que é reduzido a amônia e posteriormente assimilado em aminoácidos (Magalhães 1975). Tem sido proposto que a transformação de nitrato até aminoácidos é controlada pela atividade de redutase de nitrato pelo fato de ela ser: a) a primeira en-

zima no caminho metabólico; b) relativamente instável tanto *in vivo* como *in vitro*, e especialmente sensível quando submetida a condições extremas de disponibilidade de água e temperatura (Beevers & Hageman 1969).

As condições ótimas dos fatores que governam a atividade da redutase de nitrato *in vivo* podem variar com a espécie de planta (Tingey et al. 1974, Jones & Sheard 1977, Meguro & Magalhães 1982). Dentre os fatores que afetam a atividade da enzima encontram-se: concentração de nitrato exógeno, pH do meio de incubação, tempo de reação, temperatura de ensaio e estágio ontogenético do tecido.

Em cana-de-açúcar existem poucas informações na literatura sobre a atividade da redutase de nitrato, e a metodologia utilizada para os ensaios *in vitro* e *in vivo* emprega técnicas desenvolvidas para outras espécies. Os estudos realizados com a redutase de nitrato em cana-de-açúcar se referem à indução da atividade da enzima pelo nitrato, em folhas,

1 Aceito para publicação em 12 de agosto de 1988.

2 Eng. - Agr., Dr., Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Dep. de Biol., Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG.

3 Eng. - Agr., Ph.D., Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Inst. de Biol., Caixa Postal 1170, CEP 13100 Campinas, SP.

raízes e colmos (Maretzki & Dela Cruz 1967), às interações entre potássio e nitrogênio com o processo de redução do nitrato (Silveira 1980), ou à atividade enzimática nas fases vegetativa e reprodutiva da planta. (Chiranjivi Rao & Vijayasathdy 1980).

Existem, também, alguns trabalhos mostrando o efeito depressivo da deficiência hídrica na atividade da redutase de nitrato (Viqueira et al. 1983) e a importância da nutrição de nitrato sobre a atividade da enzima e, conseqüentemente, sobre a produção de cana-de-açúcar (Parthasarathi & Ramakrishnan 1964, Parthasarathi 1966, Rosario & Sooksathan 1978).

O propósito deste trabalho foi o de estabelecer as condições mais apropriadas para a determinação da atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, em tecidos de lâminas foliares de plantas de cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas duas variedades de cana-de-açúcar (NA 56-79 e CB 47-355) cultivadas em vasos contendo 120 kg de substrato constituído de 75% de solo e 25% de areia. A adubação da mistura solo/areia foi realizada de acordo com o resultado de análise de fertilidade, e consistiu de 170 g de salitre-do-chile, 250 g de superfosfato simples e de 100 g de cloreto de potássio para cada 100 litros de substrato.

A atividade da redutase de nitrato *in vivo* foi avaliada segundo o método descrito por Meguro & Magalhães (1983), com modificações nas condições de ensaio visando à maximização da atividade em tecidos foliares de cana-de-açúcar.

Lâminas foliares sem a nervura central foram subdivididas, transversalmente, em segmentos de aproximadamente 3 mm e colocadas em recipientes contendo solução-tampão de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,5. Posteriormente, amostras de 500 mg de tecido foliar segmentado foram transferidas para frascos de vidro contendo 5 ml de meio de incubação, constituído de fosfato de potássio 0,1 M, nitrato de potássio e 1% de n-propanol.

Foram determinadas as condições mais apropriadas de ensaio enzimático, tais como: (a) concentração de nitrato e tempo de reação, (b) pH e temperatura do meio de incubação e (c) estádio ontogenético da folha amostrada. Informações adicionais sobre a metodologia adotada na determinação das condições apropriadas de ensaio estão incluídas nas legendas das próprias figuras, resultantes destas determinações, no capítulo "resultados e discussão".

As amostras de tecido foliar foram mantidas submersas no meio de incubação, através de um suporte de plástico

revestido com tela de nylon, e submetidas à infiltração a vácuo durante dois minutos. O ar foi reintroduzido rapidamente, e o procedimento, repetido. Os frascos de vidro contendo as amostras foram incubados em banho-maria com agitação e no escuro. Ao final de cada tempo de reação foram retiradas alíquotas para a determinação da quantidade de nitrito formado. Em cada alíquota foram adicionados 1 ml de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N, 1 ml de N-2-naftil etilenodiamino diHCl 0,02% e água destilada para completar 4 ml de volume final. As absorvâncias foram determinadas a 540 nm, e a atividade expressa em μ moles de nitrito produzido por grama de peso fresco por hora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade da redutase de nitrato em função da concentração de nitrato exógeno e do tempo de reação

Observa-se, pelas Fig. 1A e 1B, que concentrações de nitrato no meio de reação superiores a 50 mM induziram uma queda na atividade da redutase de nitrato, sendo que os maiores decréscimos foram observados na variedade NA 56-79. A inibição na taxa de redução de nitrato provocada pelo aumento da concentração salina no meio de reação já tinha sido observada em variedades de cana-de-açúcar (Rosario & Sooksathan 1978), em cotilédones de rabanete (Beever et al. 1965), e em plantas de soja (Tingey et al. 1974), de café (Meguro & Magalhães 1982) e de aguapé (Russo 1983).

Com o propósito de estudar a inibição do processo de indução da atividade de redutase de nitrato por altas concentrações de KNO_3 (Fig. 1-A e 1-B), a atividade da enzima foi determinada em três meios de reação contendo: (a) baixa concentração de KNO_3 (50 mM e -0,26 MPa de ψ_s), (b) alta concentração de KNO_3 (300 mM e -1,53 MPa de ψ_s) e (c) baixa concentração de KNO_3 e adição de manitol para o decréscimo do potencial osmótico até o valor correspondente ao meio com alta concentração salina, isto é, -1,53 MPa. Como pode ser observado pela Tabela 1, a inibição no processo de redução de nitrato parece não ser decorrente da diminuição do potencial osmótico do meio de reação, pois não se observou qualquer alteração significativa na atividade da enzima quando se abaixou o potencial osmótico do meio contendo 50 mM de KNO_3 com a adição de Manitol. Estes resultados

TABELA 1. Atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, na variedade NA 56-79, em função do potencial osmótico do meio de reação obtido com KNO₃ e Manitol. As condições de ensaio foram as mesmas indicadas na legenda da Fig. 1, exceto a retirada de alíquota que foi feita aos 15 e 75 minutos de reação. Média de três repetições.

| Tratamento osmótico | Potencial osmótico (-MPa) | Redutase de nitrato ($\mu\text{moles NO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$) |
|------------------------------------|---------------------------|--|
| KNO ₃ (50 mM) | 0,26 | 1,37 a |
| KNO ₃ (300 mM) | 1,53 | 0,51 b |
| KNO ₃ (50 mM) + Manitol | 1,53 | 1,29 a |

As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

sugerem que a inativação da enzima poderia estar associada à alta força iônica desenvolvida no compartimento celular onde está localizada a redutase de nitrato, causando uma desestabilização no complexo de subunidades que compõe a molécula protéica. Esta hipótese é reforçada por resultados obtidos por outros autores, que verificaram uma inibição da atividade da redutase de nitrato *in vitro* quando foram adicionados sais de NH₄⁺, K⁺, Na⁺, Cl⁻ e SO₄²⁻ no meio de ensaio (Schrader 1978 citado por Aslam et al. 1984). Outra possível explicação para a diminuição da redução de nitrato por altas concentrações de KNO₃ (300 mM) consiste na inibição da absorção de NO₃⁻ pelo K⁺, como sugere Aslam et al. 1984).

Nos experimentos realizados não foi observada qualquer atividade da redutase de nitrato quando os tecidos foliares foram ensaiados em meio de reação sem nitrato exógeno. (Fig. 1-A e 1-B). Isto sugere a carência de nitrato no sítio metabólico responsável pela redução e/ou a ausência do influxo deste íon do compartimento armazenador para o sítio metabólico (Beevers et al. 1965), uma vez que não foi possível detectar níveis de NO₃⁻ nas lâminas foliares pelo método de Cataldo et al. (1975). O pequeno efeito da adição de n-propanol no meio de reação, como indutor de permeabilidade de membrana, e a forte correlação entre a ativi-

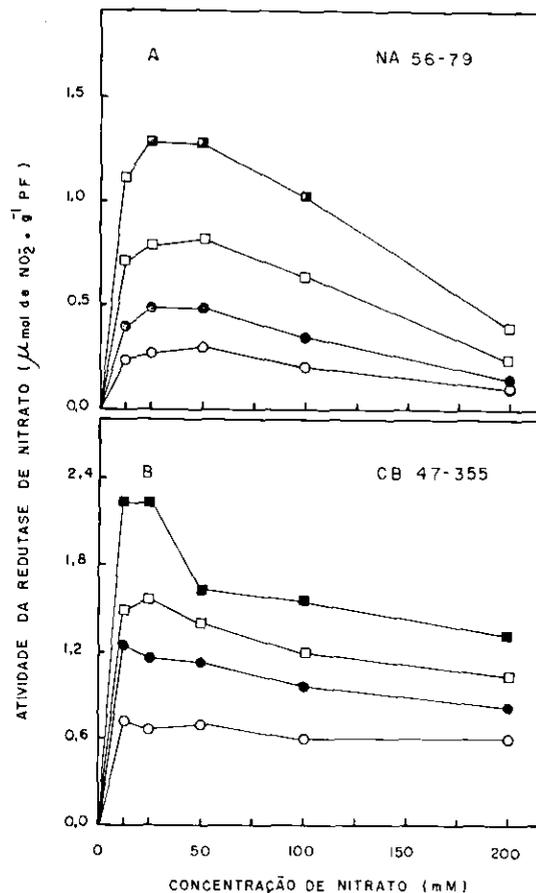


FIG. 1. Atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, em função da concentração de nitrato no meio de incubação e nos intervalos de tempos de reação de 30 (O-O), 60 (●-●), 90 (□-□) e 135 (■-■) minutos, nas variedades NA 56-79 (A) e CB 47-355 (B). O pH e a temperatura do meio de reação foram de 7,3 e 37°C, respectivamente. As amostras de segmentos de lâminas foliares ensaiadas foram obtidas de uma mistura de folhas +1, +2 e +3. As retiradas de alíquotas para a dosagem de nitrito no meio foram realizadas após 15, 45, 75, 105 minutos de reação. Média de quatro repetições.

dade de redutase de nitrato e o fluxo de nitrato na corrente transpiratória (Shaner & Boyer 1976 a, b, Oliveira 1985) sugerem que o tecido não continha um reservatório significativo de nitrato nas células.

Como pode ser observado pelas Fig. 1A e 1B, o intervalo de 60 minutos entre a retirada das alíquotas (15 e 75 minutos de reação) foi estabelecido como o mais apropriado para a determinação da concentração de nitrito no meio de reação.

Os experimentos permitiram estabelecer a concentração de 50 mM de KNO_3 no meio de incubação, e o intervalo de reação entre 15 e 75 minutos, para os procedimentos posteriores de determinação da atividade da redutase de nitrato.

Atividade da redutase de nitrato em função do pH do meio de reação

Os resultados apresentados na Fig. 2A mostram que as tendências de maiores atividades da redutase de nitrato foram alcançadas nos pHs 7,5 e 8,5, respectivamente, para as variedades CB 47-355 e NA 56-79, embora, nestes pHs, a diferença na atividade enzimática nas duas variedades, não tenha sido estatisticamente significativa. O efeito do pH do meio de reação na atividade da redutase de nitrato é variável entre as diferentes espécies e variedades de plantas (Meguro & Magalhães 1982, Russo 1983). Os resultados dos experimentos realizados permitiram a escolha de pH 7,5 para as determinações posteriores.

Os efeitos do pH no processo de redução de nitrato a nitrito, *in vivo*, parecem estar relacionados com a permeabilidade de membranas e também com o fluxo de nitrato e nitrito nos tecidos utilizados. Prakash & Naik (1982) verificaram que os valores de pH, variando de 3,0 a 7,5 durante a infiltração e incubação, não tiveram efeito marcante na atividade da redutase de nitrato de discos foliares de plantas de trigo, embora em pHs ácidos tenham constatado um menor efluxo de nitrato do interior dos tecidos para o meio de reação que em pHs alcalinos. A razão de as células foliares serem incapazes de absorver ou reter nitrito em pH alcalino não está esclarecida. Estes autores e Raven & Smith (1980) sugeriram que o pH citoplasmático é pouco influenciado pelas alterações no pH extracelular. Entretanto, Bassioni (1971) sugere que, em pH alcalino, os íons OH^- competem com o nitrato,

impedindo o seu influxo ao interior da célula, e que em pH muito ácido pode ocorrer dano no tecido.

Atividade da redutase de nitrato em função da temperatura do meio de reação

Verifica-se, pela Fig. 2B, que a taxa máxima de redução de nitrato a nitrito foi determinada nas temperaturas de 32°C, para a variedade NA 56-79, e entre 32°C a 37°C, para a variedade CB 47-355. Em temperaturas inferiores e superiores a estes valores, observou-se um decréscimo acentuado na atividade enzimática. Em função destes resultados, a temperatura de 32°C foi utilizada nos experimentos posteriores. A queda na capacidade de redução de nitrato nas temperaturas extremas (17, 22 e 42°C) pode ser atribuída às alterações induzidas na permeabilidade das membranas, decrescendo a absorção e o transporte de nitrato para os sítios de redução no interior das células (Bassioni 1971, Magalhães et al. 1976, Benzioni & Heimer 1977, Hallmark & Huffaker 1978, Magalhães & Hageman 1978). Segundo Magalhães et al. (1976), Benzioni & Heimer (1977) e Santoro (1979), a inibição da atividade da redutase de nitrato em temperaturas elevadas pode também ser devida à alteração conformacional da molécula da enzima, tornando-a inativa.

Atividade da redutase de nitrato em função do estágio ontogenético da folha

Neste estudo foram utilizadas plantas com três meses de idade, e a amostragem de tecidos foliares foi realizada nas folhas 0, +1, +2, +3, +4 e +5, segundo classificação feita por Kuijper (1915) citado por Van Dillewijn (1952).

Nota-se, pela Tabela 2, que a atividade da redutase de nitrato atingiu seu valor máximo nas folhas +3, +4 e +5 (folhas completamente expandidas). Observa-se, também, que a redução de nitrato a nitrito decresceu progressivamente da folha +3 para a folha 0 (folha encartuchada e em crescimento). Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos em diferentes espécies de plantas, inclusive em variedades de cana-de-açúcar, que mostram baixa atividade em tecidos foliares em expansão e valores máximos em tecidos quase que comple-

TABELA 2. Atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, em função do estágio ontogenético da lâmina foliar de plantas de cana-de-açúcar, variedade NA 56-79, com três meses de idade. As condições de ensaio foram as estabelecidas anteriormente. Média de três repetições.

| Folha | Redutase de nitrato ($\mu\text{moles NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$) |
|-------|---|
| 0 | 0,67 d |
| +1 | 0,76 cd |
| +2 | 1,35 bc |
| +3 | 1,70 ab |
| +4 | 2,10 a |
| +5 | 2,05 a |

As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

tamente expandidos (Mattas & Pauli 1965, Harper & Hageman 1972, Carelli 1979, Meguro & Magalhães 1982). As variações na atividade de redutase de nitrato observadas nas lâminas foliares de diferentes idades fisiológicas podem estar correlacionadas com as diferenças na capacidade de síntese de proteína e/ou de fixação de CO₂ dos tecidos. (Wallace & Pate 1965, Kannangara & Woolhouse 1967, Jordan & Huffaker 1972, Srivastava 1975).

Com base nos resultados apresentados na Tabela 2, e considerando-se que tecidos fisiologicamente ativos, com suficiente capacidade para a fixação do CO₂ e síntese de proteína, apresentam maior atividade da redutase de nitrato (Meguro & Magalhães 1982), a folha +3 pode ser preferencialmente escolhida para estudos da atividade da enzima *in vivo*.

CONCLUSÕES

Concentrações de nitrato no meio de reação superiores a 50 mM induziram uma queda na atividade da redutase de nitrato. As atividades máximas da enzima foram alcançadas nos pHs 7,5 e 8,5, respectivamente, para as variedades CB 47 - 355 e NA 56 - 79. A taxa máxima de redução de nitrato a nitrito foi determinada nas temperaturas de 32°C, para a variedade NA 56 - 79, e entre 32°C a 37°C, para a variedade CB 47 - 355. A atividade da enzima atingiu seu valor máximo nas folhas +3, +4 e +5.

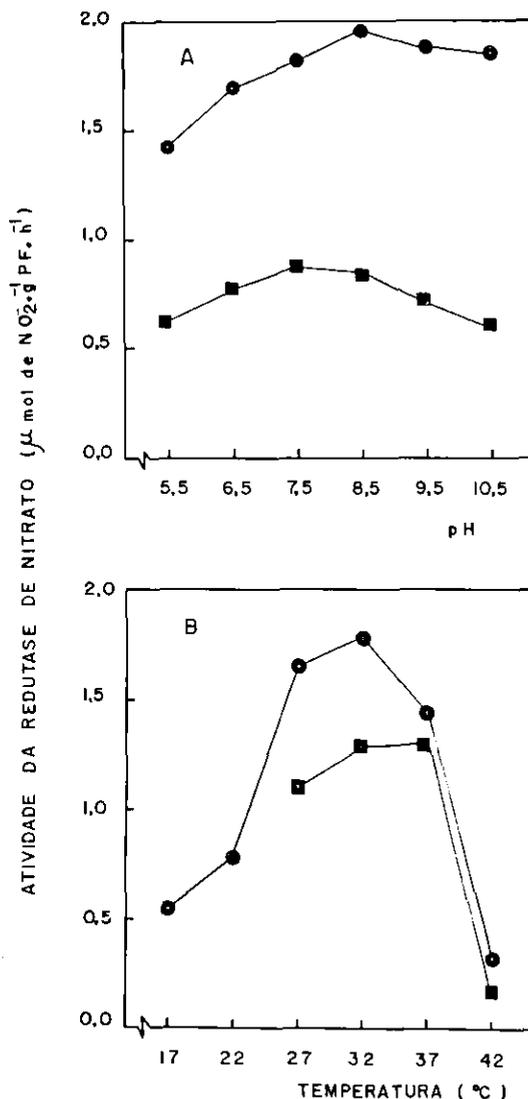


FIG. 2. Atividade da redutase de nitrato, *in vivo*, em função do pH (A) e da temperatura (B) do meio de incubação nas variedades NA 56-79 (●-●) e CB 47-355 (■-■). A temperatura e o pH do meio de reação foram de 37°C e 7,5, respectivamente, para os ensaios de pHs e temperaturas. As demais condições de ensaio foram aquelas estabelecidas anteriormente. Média de três repetições.

REFERÊNCIAS

- ASLAM, M.; HUFFAKER, R.C.; RAINS, D.W. Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.*, 76:321-5, 1984.
- BASSIONI, N.H. Temperature and pH in NO_3^- uptake. *Plant Soil*, 35:445-8, 1971.
- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20:495-522, 1969.
- BEEVERS, L.; SCHRADER, L.E.; FLESCHER, D.; HAGEMAN, R.H. The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiol.*, 40:691-8, 1965.
- BENZIONI, A. & HEIMER, Y.M. Temperature effect on nitrate reductase activity *in vivo*. *Plant Sci. Lett.*, 9: 225-31, 1977.
- CARELLI, M.L. Partição da atividade da redutase do nitrato durante o desenvolvimento de plântulas de soja (*Glycine max* L. merr). Piracicaba ESALQ/USP, 1979. 78p. Tese de Mestrado.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 6:71-80, 1975.
- CHIRANJIVI RAO, K. & VIJAYASARADHY, M. Nitrate reductase (NRA) at vegetative and reproductive conditions in *Saccharum* (Cultivar CO 285). In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 17, Manica, 1980. *Proceedings. Manica, s.ed.*, 1980. p.432-7.
- DILLEWIJN, C. van. Botany of sugar cane. Waltham, Mass., Chronica Botanica, 1952. 371p.
- HALLMARK, W.B. & HUFFAKER, R.C. The influence of ambient nitrate, temperature and light on nitrate assimilation in Sudangrass. *Physiol. Plant.*, 44:147-52, 1978.
- HARPER, J.E. & HAGEMAN, R.H. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybean (*Glycine max* L. Merr). *Plant Physiol.*, 49:146-54, 1972.
- JONES, R.W. & SHEARD, R.W. Conditions affecting *in vivo* nitrate reductase activity in Chlorophyllous tissues. *Can. J. Bot.*, 55:896-901, 1977.
- JORDAN, W.R. & HUFFAKER, R.C. Influence of age and light on the distribution and development of nitrate reductase in greening barley leaves. *Physiol. Plant.*, 26:296-301, 1972.
- KANNANGARA, C.G. & WOOLHOUSE, H.W. The role of carbon dioxide, light and nitrate in the synthesis and degradation of nitrate reductase in leaves of *Perilla frutescens*. *New Phytol.*, 66:553-61, 1967.
- MAGALHÃES, A.C. Nitrate assimilation in higher plants; What's new in plant physiol. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, 7:1-5, 1975.
- MAGALHÃES, A.C. Nitrate assimilation in higher plants. What's new in plant physiol. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, 7:1-5, 1975.
- MAGALHÃES, A.C. & HAGEMAN, R.H. High temperature effects on net CO_2 exchange, nitrate reductase and RuDPcarboxylase activities in soybean leaves. *R. bras., Bot.*, 1:139-41, 1978.
- MAGALHÃES, A.C.; PETERS, D.B.; HAGEMAN, R.H. Influence of temperature on nitrate metabolism and leaf expansion in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. *Plant. Physiol.*, 58:12-6, 1976.
- MARETZKI, A. & DELA CRUZ, A. Nitrate reductase in sugarcane tissues. *Plant Cell Physiol.*, 8:605-11, 1967.
- MATTAS, R.E. & PAULI, A.W. Trends in nitrate reduction and nitrogen fractions in young corn (*Zea mays* L.) plants during heat and moisture stress. *Crop Sci.*, 5:181-4, 1965.
- MEGURO, N.E. & MAGALHÃES, A.C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 17(12):1725-31, dez. 1982.
- MEGURO, N.E. & MAGALHÃES, A.C. Water stress affecting nitrate reduction and leaf diffusive resistance in *Coffea arabica* L. cultivars. *J. Hort. Sci.*, 58:147-52, 1983.
- OLIVEIRA, L.E.M. Comportamento fisiológico de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) sob condições de deficiência hídrica: Alterações da assimilação do nitrato e mobilização de açúcares. Campinas, UNICAMP, 1985. 126p. Tese Doutorado.
- PARTHASARATHI, K. Contributions to a biochemical study of sugarcane. 3. Nitrate reductase activity and potential nitrate and their use in determining the relative yield capacity of cane varieties. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 64:91-5, 1966.
- PARTHASARATHI, K. & RAMAKRISHNAN, S. Contributions to a biochemical study of sugarcane. I. Potential nitrate and nitrate reductase in sugarcane and their possible relation to yield capacity. *Proc. Indian Acad. Sci.*, 59:110-6, 1964.
- PRAKASH, S.S. & NAIK, M.S. Reevaluation of *in vivo* assay of nitrate reductase activity in wheat leaves. *Plant Sci. Lett.*, 25:9-14, 1982.
- RAVEN, J.A. & SMITH, F.A. Intracellular pH regulation in the giant-celled marine alga *Chaetomorpha darwinii*. *J. Exp. Bot.*, 31:1357-69, 1980.
- ROSARIO, E.L. & SOOKSATHAN, K. Influence of fertility levels on nitrate reductase activity and its significance to sugar yield. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 17, São Paulo, 1977. São Paulo, s.ed., 1978. p.1825-41.
- RUSSO, M.T. Aspectos autoecológicos do processo de redução do nitrato em *Eichhornia crassipes* (mart) Solms, (Aguapé). Campinas, UNICAMP, 1983. 69p. Tese Mestrado.

- SANTORO, L.G. Alterações da atividade da redutase de nitrato durante o desenvolvimento da folha de soja (*Glycine max* (L.) merr. Campinas, UNICAMP, 1979. 89p. Tese Mestrado.
- SHANER, D.L. & BOYER, J.S. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. I. Regulation by nitrate flux. *Plant Physiol.*, 58:499-504, 1976a.
- SHANER, D.L. & BOYER, J.S. Nitrate reductase activity in maize (*Zea mays* L.) leaves. II. Regulation by nitrate flux at low leaf water potential. *Plant Physiol.*, 58:505-9, 1976b.
- SILVEIRA, J.A.G. Aspectos bioquímicos e fisiológicos da relação K/N em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) cv NA 56-79 cultivada em solução nutritiva. Piracicaba, ESALQ-USP, 1980. 127p. Tese Mestrado.
- SRIVASTAVA, H.S. Distribution of nitrate reductase bean seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 16:995-9, 1975.
- TINGEY, D.T.; FITES, R.C.; BAHARSJAH, J. Factors influencing nitrate reduction in soybean foliage. *New Phytol.*, 73:21-9, 1974.
- VIQUEIRA, L.; GOMEZ, L.; RODRÍGUEZ, C. Effect of water deficiency on two sugarcane varieties. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 18, Havana, 1983. *Proceedings.* . . Havana, s.ed., 1983. p.539-65.
- WALLACE, W. & PATE, J.S. Nitrate reductase in field pea (*Pisum arvenis* L.). *Ann. Bot.*, 29:665-71, 1965.