

# ATIVIDADE DA REDUTASE DE NITRATO EM CULTIVARES DE CAFÉ<sup>1</sup>

NAIR E. MEGURO<sup>2</sup> e ANTONIO CELSO MAGALHÃES<sup>3</sup>

**RESUMO** - A atividade da redutase de nitrato *in vivo* foi padronizada para tecido de folhas de cafeeiro, (*Coffea arabica* L.) em condições controladas de ambiente. As cultivares utilizadas foram as seguintes: Nacional, Catuaí, Maragogipe, Mundo Novo e Angustifolia. As plantas foram mantidas em câmaras de crescimento, reguladas para a temperatura de 28°C durante o dia e 20°C à noite, e doze horas de fotoperíodo. Nas cultivares estudadas, a atividade da redutase de nitrato foi mais baixa nas folhas mais jovens, e observou-se um aumento de atividade em folhas fisiologicamente maduras. A atividade mais alta foi nos tecidos de folhas do segundo, terceiro e quarto pares foliares a partir do ápice. A luz induziu aumento da atividade da redutase de nitrato, atingindo o valor máximo após duas horas do início do período de iluminação. A atividade da redutase de nitrato decresceu após seis horas de iluminação contínua. A adição de 0,05 M e 0,1 M de nitrato ao meio de incubação causou um aumento linear da atividade enzimática durante 15 a 90 ou 120 minutos da reação. A atividade máxima foi determinada em pH 8 e temperatura de 33°C. A utilização de diferentes tampões, tais como fosfato, hepes e tris, não afetaram significativamente a atividade enzimática, mas a inclusão de tampão borato causou inibição da atividade da redutase de nitrato *in vivo*.

Termos para indexação: cultivares, câmaras de crescimento, fotoperíodismo, fisiologia.

## NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN COFFEA CULTIVARS

**ABSTRACT** - Determination of nitrate reductase activity *in vivo* was standardized in coffee (*Coffea arabica* L.) leaves under controlled environmental conditions. Cultivars used in this study were: Nacional, Catuaí, Maragogipe, Mundo Novo and Angustifolia. Plants were grown in controlled chambers set at 28°C and 20°C, day and night temperatures, and 12-hour photoperiod. In all cultivars, lower nitrate reductase activity was determined in younger leaves and increased enzyme activity occurred in mature leaves. Highest activity was observed in leaves of the 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> pairs counted from the top of the branch. Light induced increased enzyme activity which reached a maximum value approximately two hours after the beginning of the illumination period. Nitrate reductase activity usually decreased after six hours of continuous illumination. Addition of 0.05 M and 0.1 M of nitrate to the incubation medium caused a linear increase of enzyme activity during 15 to 90 or 120 minutes of reaction. Maximum enzyme activity was observed in the assays carried out in pH 8.0 and 33°C of temperature. The use of different buffers such as phosphate, hepes and tris, did not significantly affect enzyme activity, but borate buffer drastically inhibited the *in vivo* activity of nitrate reductase.

Index terms: growth in controlled chambers, cultivars, photoperiod, physiology.

## INTRODUÇÃO

O nitrato é a principal fonte de nitrogênio para as plantas superiores crescendo em condições naturais de cultura (Magalhães 1975). A redução do nitrato é iniciada pela conversão do nitrato a nitrito através da reação catalizada pela enzima redutase de nitrato, que utiliza predominantemente NADH como cofator. A atividade de redutase de nitrato nos tecidos vegetais é determinada por

fatores genéticos, balanço hormonal e fatores ambientais, tais como nutrição mineral, intensidade de luz, temperatura ambiente, disponibilidade de água para a planta.

As condições ótimas para a determinação da atividade da redutase de nitrato *in vivo* já foram, estudadas em diferentes espécies de plantas (Ferrari & Varner 1970, Jaworski 1971, Klepper et al. 1971, Streeter & Bosler 1972, Radin 1973, Bilal & Rains 1973, Tingey et al. 1974, Nicholas et al. 1976, Jones & Sheard 1977). Este sistema de ensaio depende da absorção do nitrato pelo tecido, produção endógena de NADH e liberação do nitrito formado na reação para o meio de incubação. Dentre os fatores que afetam a atividade enzimática, incluem-se substâncias que alteram a permeabilidade celular, variação da concentração exógena do nitrato, pH do meio de incubação e

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 23 de abril de 1982. Trabalho parcialmente financiado pela FAPESP (Proc. 78/1477) através do auxílio de pesquisa concedido.

<sup>2</sup> Bióloga, M.Sc., Bolsista da CAPES, Instituto de Biologia, UNICAMP, Barão Geraldo, CEP 13100, Campinas, SP.

<sup>3</sup> Eng.º - Agr.º, Ph.D., Professor-Titular do Departamento de Fisiologia Vegetal Instituto de Biologia, UNICAMP.

temperatura do ensaio. Aliado a estes fatores a idade fisiológica do tecido vegetal influencia grandemente a determinação da atividade enzimática.

A enzima redutase de nitrato tem sido muito pouco estudada em plantas de café. Os trabalhos existentes na literatura se referem à atividade da redutase de nitrato associada à fertilização nitrogenada (Brealy & Carvajal 1971), ao efeito das deficiências minerais (Carvajal & Cavallini 1972, Cavallini & Carvajal 1978), a tratamentos de luz e nutrição nitrogenada (Faleiros et al. 1975) e à variação sazonal da atividade enzimática em duas regiões climáticas diferentes em Costa Rica (Taleisnik et al. 1980).

O presente trabalho teve como objetivo investigar os vários fatores que afetam a determinação da atividade da redutase de nitrato *in vivo*, em diferentes cultivares de café.

## MATERIAL E MÉTODOS

As cinco cultivares de café (*Coffea arabica* L.) selecionadas para estudo foram as seguintes: Nacional, Angustifolia, Mundo Novo e Catuaí. Estas cultivares foram escolhidas em função do prévio conhecimento de suas diferenças quanto ao crescimento e produção. As plantas, com cerca de um ano de idade, foram transplantadas para vasos de plástico contendo aproximadamente 3 kg de solo do tipo Terra Roxa misturada e mantidos em casa de vegetação. Vinte e quatro horas antes do início de cada experimento, oito plantas de cada cultivar foram transferidas da casa de vegetação para a câmara de crescimento com ambiente controlado, regulado para a temperatura de 28°C durante o dia e 20°C à noite, e doze horas de fotoperíodo.

A atividade da enzima redutase de nitrato *in vivo* foi determinada pelo método descrito por Klepper et al. (1971) e modificado por Harper & Hageman (1972).

As folhas foram cortadas com um furador de rolas manual, em discos de, aproximadamente, 10 mm de diâmetro. O tecido foi pesado (0,2 g) e, em seguida, transferido para frascos de vidro contendo 5 ml de solução denominada de meio de incubação, constituída por 10 mM de fosfato de potássio, pH 7,5 e 0,2 M de nitrato de potássio. As amostras de tecido, mantidas imersas no meio de incubação através de um suporte preso ao frasco, foram colocadas num dessecador a vácuo, por dois minutos. O ar foi rapidamente reintroduzido e o procedimento repetido. Os discos de folhas foram, em seguida, transferidos para um banho-maria agitador e incubados por uma hora a 30°C, no escuro. Dentro de um intervalo de tempo variável entre 15 minutos e 1 hora, alíquotas de 0,2 ml foram retiradas do meio de incubação para a determi-

nação da concentração do nitrito formado pela reação. Em cada alíquota, foram adicionados 2 ml de reagente constituído por N-2-naftiletileno diamino di-HCl 0,02% e sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N a proporção de 1:1 (v/v). As absorbâncias foram determinadas espectrofotometricamente a 540 nm. A atividade da redutase de nitrato foi expressa em umoles de nitrito, formado por grama de peso fresco, por hora.

As condições para a determinação da atividade enzimática foram padronizadas para tecidos de folhas de café, visando aperfeiçoar a técnica quanto à concentração de nitrato no meio de incubação, tempo decorrido para a retirada de alíquotas e temperatura de incubação. Foram verificados, também, o efeito do pH, tipo de tampão e tempo de exposição à luz previamente à retirada das amostras. Todas as determinações foram feitas com três repetições para cada tratamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Padronização do método para a determinação da atividade da redutase de nitrato

#### Definição da idade da folha

O efeito da idade fisiológica do tecido sobre a atividade da redutase de nitrato já foi demonstrado em diferentes espécies de plantas (Harper & Hageman 1972, Bilal e Rains 1973, Srivastava 1975). Assim, a fim de padronizar o ensaio da enzima redutase de nitrato em folhas de café, foi necessário, inicialmente, determinar a atividade enzimática em diferentes fases do desenvolvimento da folha. Cinco pares de folhas de diferentes plantas foram marcados no estágio correspondente às folhas jovens, de aspecto brilhante, tonalidade verde-clara ou bronzeada, com área foliar de aproximadamente 2,5 cm<sup>2</sup>. Este estágio foi considerado como a fase inicial de expansão foliar (dia zero). A partir do início dos experimentos, considerando as folhas mais jovens, outras folhas de diferentes idades foram retiradas para a determinação da atividade enzimática.

Os resultados expressos na Fig. 1 mostram padrões de atividade em relação a idade da folha em todas as cultivares, sendo que nas folhas mais jovens, dia zero, as atividades foram sistematicamente mais baixas. Com o aumento da idade da folha, a atividade enzimática cresceu até um determinado valor, a partir do qual permaneceu constante. Foram detectadas diferenças entre as cultivares com referência ao padrão de atividade enzimática durante o desenvolvimento foliar.

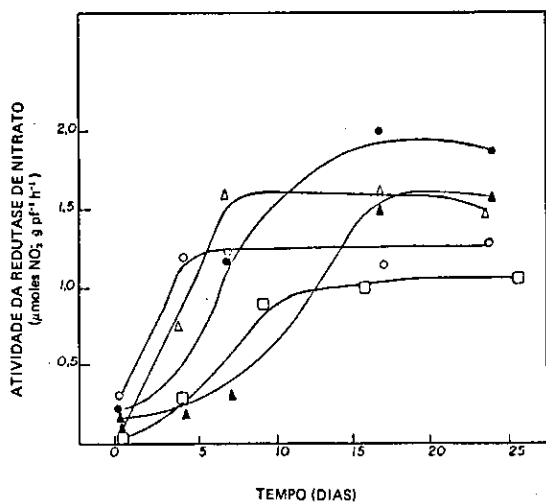


FIG. 1. Efeito da idade do tecido foliar sobre a atividade da redutase de nitrato. As folhas utilizadas nas determinações foram etiquetadas no estágio inicial de crescimento e os valores obtidos durante 25 dias de desenvolvimento do tecido. Média de cinco repetições.

- (—▲—) Angustifolia
- (—●—) Maragogipe
- (—△—) Nacional
- (—□—) Catual
- (—○—) Mundo Novo

Em outro experimento, tecidos foliares de idades fisiológicas diversas foram obtidos pela retirada de folhas localizadas em diferentes posições em um mesmo ramo plagiotrópico, de plantas da cultivar Mundo Novo. Os pares foliares, em número de cinco, foram enumerados a partir do ápice. O primeiro par continha folhas ainda não totalmente expandidas. O segundo correspondeu às folhas com 25 dias, como no experimento anterior. No terceiro e quarto par as folhas se encontravam em estágio de maturidade fisiológica, e no quinto, com folhas em início de senescência. Os resultados sumariados na Fig. 2, mostram atividades enzimáticas mais baixas no primeiro e quinto par, e mais elevadas nos tecidos de folhas do segundo, terceiro e quarto par de folhas. As variações na atividade da redutase de nitrato observadas nos pares foliares de diferentes idades podem ser resultantes das diferenças na capacidade de síntese de proteína e fixação do CO<sub>2</sub> dos tecidos. Kannangara & Woolhouse (1967) mostraram que em folhas de *Perilla*, a síntese da redutase de nitrato foi maior

em folhas mais jovens e menor em folhas maduras e senescentes. Estes autores sugeriram que a síntese da enzima parece ser dependente da atividade fotossintética. Wallace & Pate (1965) verificaram que a quantidade de proteína existente no tecido vegetal pode ser correlacionada com sua capacidade para a síntese de redutase de nitrato. Jordan & Huffaker (1972) demonstraram que a atividade da redutase de nitrato determinada em seções de folhas de cevada de diferentes idades fisiológicas, está relacionada com a quantidade de polirribossomos presentes. Aqueles autores sugeriram que os produtos da fotossíntese são necessários para a indução da atividade da redutase de nitrato. Considerando-se que tecidos fisiologicamente ativos, com suficiente habilidade para a fixação do CO<sub>2</sub> e síntese de proteína, apresentam maior atividade da redutase de nitrato, decidiu-se que o terceiro par de folhas seria preferencialmente utilizado para os estudos posteriores.

Padrão de variação da atividade da enzima na luz e no escuro

O estudo da variação da atividade enzimática durante os períodos de luz e escuro, para a cultivar

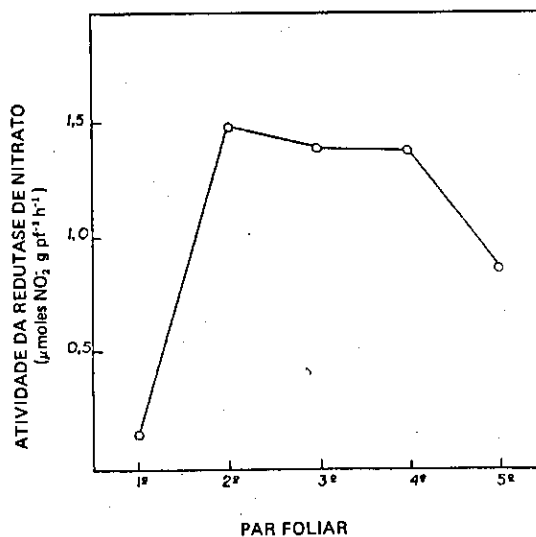


FIG. 2. Influência da idade fisiológica da folha sobre a atividade da redutase de nitrato *in vivo*, cultivar Mundo Novo. O tecido foi obtido de folhas de diferentes pares localizados em um ramo plagiotrópico, a partir do ápice. Média de três repetições.

Mundo Novo, está representado na Fig. 3. Nota-se um aumento na atividade da enzima logo após o início do período de iluminação. Esta intensificação da atividade da redutase de nitrato, em resposta à radiação luminosa, pode ter sido causada pelo aumento do fluxo de nitrato através do xilema em direção às folhas, que decorre da transpiração (Shaner & Boyer 1976). Por outro lado, sabe-se que a redução do nitrato está associada com o processo da oxidação dos carboidratos produzidos na fotossíntese, e relacionada com a disponibilidade de NADH no citoplasma (Klepper et al. 1971).

Após seis horas de iluminação observa-se uma queda na atividade enzimática, possivelmente devido à inibição da redutase de nitrato causada pelo acúmulo de compostos intermediários do metabolismo do nitrogênio (Bilal & Rains 1973). O acúmulo de aminoácidos produzidos por um processo muito intenso de assimilação poderá provocar retroinibição na atividade da redutase de nitrato (Filner 1966, Stewart 1972, Heimer & Riklis 1979). No escuro, com a diminuição da taxa de redução de nitrato, a inibição poderia ser liberada em parte, causando um aumento temporário da atividade enzimática após um período de obscuridade. A energia necessária para o processo de redução no escuro estaria relacionada com a degradação dos produtos fotossintéticos armazenados e o conseqüente aumento da disponibilidade de

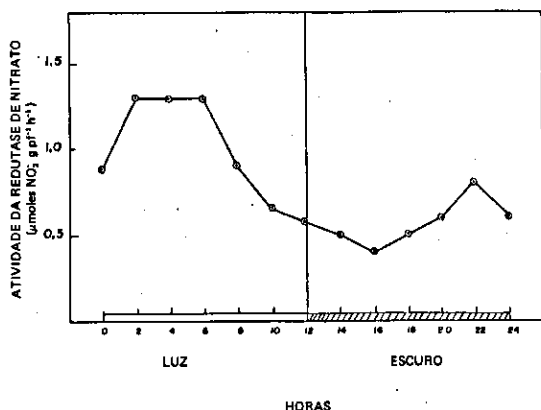


FIG. 3. Atividade da enzima redutase de nitrato *in vivo* em folhas de café da cultivar Mundo Novo durante o período de luz e escuro em ambiente controlado. Média de três repetições.

NADH para a reação catalizada pela redutase de nitrato (Aslam et al. 1979). Em função dos resultados obtidos neste experimento, as amostragens subsequentes foram sistematicamente feitas decorridas quatro a cinco horas de iluminação, quando a enzima atingiu o máximo de atividade.

#### Ensaio da atividade da redutase de nitrato *in vivo*

##### Tempo de reação e concentração de nitrato no meio de incubação

Experimentos para determinar a concentração adequada de nitrato no meio de incubação e, também o tempo de reação para a retirada de alíquotas para as cultivares de café, são mostrados na Fig. 4.

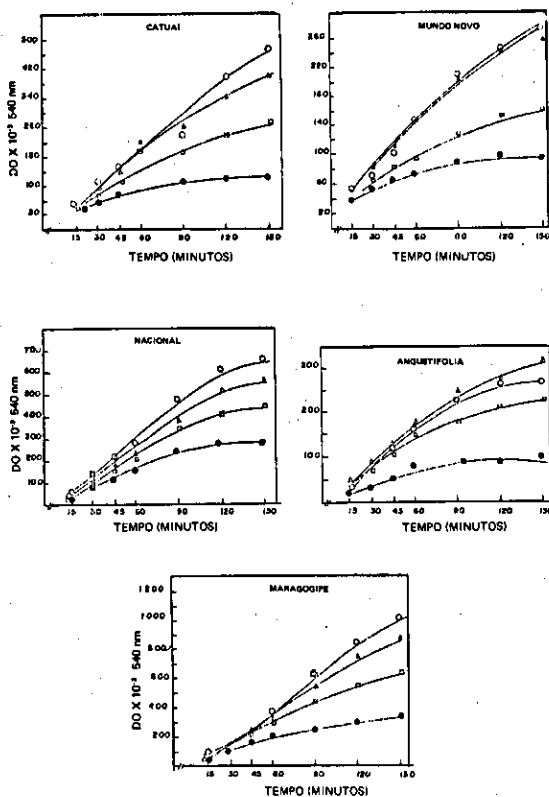


FIG. 4. Efeito de diferentes concentrações do nitrato no meio de incubação sobre a atividade da redutase de nitrato *in vivo*, em folhas de café. Concentrações de nitrato obtidas pela adição de nitrato de potássio ao tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5). Média de três repetições.

(—○—) 0,05 M de nitrato      (—△—) 0,1 M de nitrato  
(—□—) 0,2 M de nitrato      (—●—) 0,4 M de nitrato

Verifica-se que existe uma relação linear entre a taxa de difusão dos íons nitrito no meio de incubação, resultante da redução do nitrato, e o tempo de reação compreendido entre 15 e 90 ou 120 minutos, em concentrações de 0,05 M e 0,1 M, dependendo da cultivar considerada para estudo. Para as concentrações de 0,2 M e 0,4 M não foi observada uma linearidade na velocidade de reação, e a taxa de redução do nitrato foi mais baixa, provavelmente devido à inibição provocada pelo aumento da concentração salina no meio de reação. Em função dos resultados experimentais, e objetivando a padronização das determinações, ficou estabelecida a utilização de 0,1 M de nitrato no meio de incubação e a retirada de alíquotas 15 e 75 minutos após o início da reação.

**Efeito do pH**

A faixa de pH escolhida para estudo, baseado em experimentos preliminares, foi de 6 a 9, utilizando-se tampão fosfato de potássio. Os valores expressos na Fig. 5 demonstram que, em todas as cultivares, a atividade da redutase de nitrato foi menor em valores mais baixos de pH. A variação do pH do tampão de 6 para 7 foi acompanhada de um aumento na atividade enzimática, sendo mais acentuada na cultivar Angustifólia, onde o acréscimo foi de 70%; nas demais cultivares, o aumento ficou entre 20% e 40%. Todas as cultivares apresentaram maior atividade da redutase de nitrato em pH 8. Em pH 9, a atividade permaneceu constante nas cultivares Catuaí, Nacional e Maragogipe, e houve diminuição nas cultivares Angustifólia e Mundo Novo. O pH 8 foi selecionado para as determinações enzimáticas posteriores.

**Efeito de diferentes tampões**

Para verificar a influência da composição do tampão sobre a atividade da redutase de nitrato, foram utilizados diferentes produtos, todos na concentração 0,1 M, cujos pKa's se aproximassem de valores próximos a 8. Os resultados constantes na Tabela 1 mostram atividades semelhantes nos tampões fosfato hepes<sup>4</sup> e tris<sup>5</sup>, indicando que estes tampões não têm influência diferencial na determinação da atividade enzimática. Com o tampão bo-

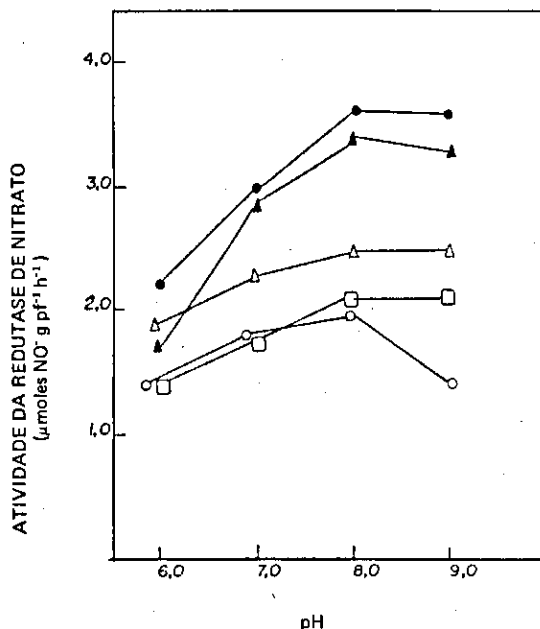


FIG. 5. Efeito do pH do meio de incubação sobre a atividade da redutase de nitrato *in vivo*, em folhas de café. Meio de incubação constituído por tampão fosfato 0,1 M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ou K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e 0,1 M de nitrato. Valores de pH ajustados com HCl 1N. Média de três repetições.

- (—▲—) Angustifólia
- (—●—) Maragogipe
- (—△—) Nacional
- (—□—) Catuaí
- (—○—) Mundo Novo

rato, entretanto, notou-se que a atividade enzimática foi sensivelmente inibida, apresentando valor, aproximadamente, dez vezes menor comparativamente aos demais tampões incluídos no experimento. O efeito do íon borato sobre a atividade da redutase de nitrato *in vivo* e *in vitro* foi investigado por Haga et al. (1981) em diferentes espécies de plantas. Para os estudos posteriores foi utilizado o tampão fosfato.

**Efeito da temperatura**

Em função do conhecimento prévio da temperatura ótima para o ensaio enzimático, determinada para outras espécies de plantas, no presente estudo foram selecionadas temperaturas de 25, 30, 33 e 38°C. Os resultados demonstrados na Fig. 6 indicam que, para todas as cultivares estudadas, a atividade da redutase de nitrato foi menor em temperatura mais baixa, aumentando, a seguir, e

<sup>4</sup> Ácido N-2 hidroxi et al. piperazina N'-2 elanosulfônico.

<sup>5</sup> Tris - hidroxi metil aminometano.

atingindo sua máxima atividade a 33°C. Com o aumento da temperatura ocorre, possivelmente, denaturação térmica da proteína refletida na diminuição da atividade enzimática. Trabalhos realizados por Magalhães et al. (1976) e Santoro (1979), em folhas de soja, mostraram que ocorre inibição da atividade da redutase de nitrato em temperatura ao redor de 36°C, devido à alteração conformacional da molécula de proteína, que ocorre em temperaturas elevadas.

TABELA 1. Influência da composição do tampão no meio de infiltração para a determinação da atividade da enzima redutase de nitrato *in vivo* em folhas de cafeeiro, da cultivar Mundo Novo. Média de três repetições.

Tampões	Atividade da redutase de umoles NO <sub>2</sub> g pf <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
Fosfato	1,48
Tris	1,45
Hepes	1,49
Borato	0,14

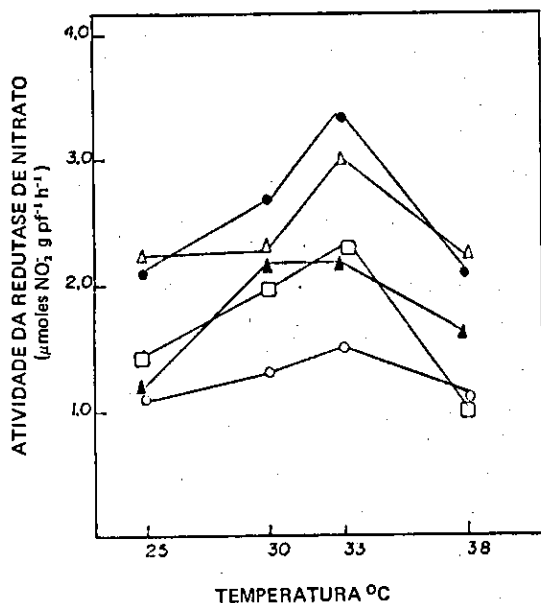


FIG. 6. Efeito de temperatura do meio de incubação sobre a atividade da redutase de nitrato *in vivo*. Média de três repetições.

(—▲—) Angustifolia (—□—) Catuaí  
 (—●—) Maragogipe (—○—) Mundo Novo  
 (—△—) Nacional

## REFERÊNCIAS

- ASLAM, M.; HUFFAKER, R.C.; RAINS, D.W. & RAO, K.P. Influence of light and ambient carbon dioxide concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings. *Plant Physiol.*, 63:1205-9, 1979.
- BILAL, I.M. & RAINS, R.W. *In vivo* characterization of nitrate reductase activity in cotton. *Physiol. Plant.*, 28:237-43, 1973.
- BREALLY, O. & CARVAJAL, J.F. La actividad de la reductasa del nitrato como guía de la fertilización nitrogenada del cafeeiro. In: SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE FISILOGIA VEGETAL, 4, Lima, Perú, 1971. Programas y Resúmenes. p.44-5.
- CARVAJAL, J.F. & CAVALLINI, J.A. Nitrate reductase activity on coffee trees as affected by mineral deficiency. In: AMERICAN SOCIETY OF AGRONOMY ANNUAL MEETING, Miami, USA., 1972. Abstract, p.190.
- CAVALLINI, J.A. & CARVAJAL, J.F. Mineral nutrition and nitrate reductase activity in coffee trees affected by mineral deficiency. *Turrialba*, 28(1):61-6, 1978.
- FALEIROS, R.S.; MELO, W.J.; CARVALHO, F. & MIRANDA NETO, A.T. Atividade da nitrato reductase e desenvolvimento de mudas de *Coffea arabica* L. (Café). *Científica*, 3(2):277-83, 1975.
- FERRARI, T.E. & VARNER, J.E. Control of nitrate reductase activity in barley aleurone layers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 65:729-36, 1970.
- FILNER, P. Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochem. Biophys. Acta.*, 118:299-310, 1966.
- HAGA, K.I.; SODEK, L. & MAGALHÃES, A.C. Borate inhibition of leaf nitrate reductase activity. *Plant Physiol.*, 67:8, 1981. Supplement.
- HARPER, J.E. & HAGEMAN, R.H. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) *Plant Physiol.*, 49:146-54, 1972.
- HEIMER, Y.R. & RIKLIS, E. Post-transcriptional control of nitrate reductase of cultured tobacco cells by aminoacids. *Plant Physiol.*, 64:663-4, 1979.
- JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43:1274-9, 1971.
- 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 rôle 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.

- KLEPPER, L.; FLESHER, D.F. & HAGEMAN, R.H. Generation of reduced nicotinamide-adenine-dinucleotide for nitrate reduction in green leaves. *Plant Physiol.*, 48:580-90, 1971.
- MAGALHÃES, A.C. Nitrate assimilation in higher plants. *What's New Plant Physiol.*, 7:1-5, 1975.
- 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.
- NICHOLAS, J.C.; HARPER, J.E. & HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) I - Effects of light and temperature. *Plant Physiol.*, 58:721-5, 1976.
- RADIN, J.W. *In vivo* assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. Effect of oxygen and ammonium. *Plant Physiol.*, 51:332-6, 1973.
- SANTORO, L.G. Alterações da atividade da redutase de nitrato durante o desenvolvimento da folha de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Campinas, UNICAMP, 1979. 89p. Tese Mestrado.
- 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, 1976.
- SRIVASTAVA, H.S. Distribution of nitrate reductase in ageing bean seedlings. *Plant & Cell Physiol.*, 16:995-9, 1975.
- STEWART, G.R. The regulation of nitrite reductase level in *Lemna minor* L. *J. Exp. Bot.*, 23:171-83, 1972.
- STREETER, J.G. & BOSLER, M.E. Comparison of *in vivo* and *in vitro* assays for nitrate reductase in soybean leaves. *Plant Physiol.*, 49:448-50, 1972.
- TALEISNIK, E.; BRICEÑO, J.A. & CARVAJAL, J.F. Variación estacional de la reductasa de nitrato en el cafeto. *Turrialba*, 30(3):330-6, 1980.
- TINGEY, D.T., FITES, R.C. & BAHARSJAH, J. Factors influencing nitrate reduction in soybean foliage. *New Phytol.*, 73:21-9, 1974.
- WALLACE, E. & PATE, J.S. Nitrate reductase in field pea (*Pisum arvensis* L.). *Ann. Bot.*, 29:655-71, 1965.