

LA ACTIVIDAD DE LA REDUCTASA DEL NITRATO COMO GUIA DE LA FERTILIZACION NITROGENADA DE CINCO ESPECIES AGRICOLAS¹ *

Enrique Villalobos y José F. Carvajal**

ABSTRACT

Nitrate reductase activity as a guide to the nitrogenous fertilization of five agricultural species. The applicability of biochemical diagnosis to tropical plant species was studied, on the basis of the correlation between nitrate reductase activity (NRa) in the foliage, and soil application of increasing levels of nitrogen. The investigation was carried out on field grown coffee (*Cofea arabica*) and sugar cane plants (*Saccarum officinarum*), and in tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), elephant grass (*Pennisetum purpureum*) and kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) grown in the greenhouse. Volcanic soils were used in all assays.

Plant response was evaluated by quantitative determination of initial NRa, as influenced by treatments, and that shown 24 hours after *in vivo* infiltration of the leaves with 0.15 M KNO₃. Total potential of nitrate assimilation as a result of soil treatment was estimated by the trend and magnitude of the 'NRa (induced)/NRa (initial)' quotient. NRa quotients of the order of magnitude of 1.22, 4.37, 1.22 and 1.51, were associated with and apparently adequate nitrogen nutrition in coffee, sugar cane, tomatoes and elephant grass, respectively. These findings suggest a valid applicability of the technique as a guide to the nitrogenous fertilization of such species. Data on kikuyu grass indicated a case of exception, since NRa was found to correlate negatively with nitrogen availability.

It is concluded that the mangitude and trend of the statistical correlations between the parameters investigated vary with the plant species, availability of nitrogen in the nutrient medium, and the ability of the plants to accumulate nitrates in the leaf tissues.

INTRODUCCION

La relación entre la actividad de la reductasa del nitrato (aRN) y la nutrición por nitrógeno y molibdeno ha sido estudiada por varios investigadores (2, 6, 10, 15, 16). La inducción de la enzima (síntesis de novo) depende de la presencia de nitrato en el tejido y en algunas especies se manifiesta proporcional, dentro de límites, a la cantidad de ión presente. Tal inducción enzimática no se logra con nitrito o nitrógeno amoniacal.

Estudios realizados por Sanderson y Cocking (17) en plantas de tomate cultivadas en solución nutritiva han demostrado que la aRN desciende rápidamente al sustituir el nitrógeno nítrico del medio nutricio por cantidades equimolares de nitrógeno amoniacal. Resultados en el mismo sentido han obtenido García-Martínez y Coic (12) en maíz y tomate.

Harper y Hageman (14) encontraron una correlación positiva entre la actividad de la referida enzima y el contenido de nitrato durante el ciclo de vida de plantas de soya cultivadas en suelo y en solución nutritiva. Cuando se alimentaron del medio líquido la aRN fue significativamente mayor en estados tardíos del crecimiento, lo que sugirió que bajo condiciones normales de campo el potencial para la utilización del nitrato puede no ser desarrollado en su totalidad. Estudios realizados en café y otros cultivos han indicado que, además de nitrato, la deficiencia individual de algunos nutrimentos causa una disminución de la aRN (8, 12, 15).

1 Recibido para su publicación el 10 de setiembre de 1976.

* Trabajo presentado en el II Congreso Agronómico Nacional, San José, Costa Rica, febrero de 1976. Contiene parte de la tesis de grado de Ingeniero Agrónomo, presentada por el primer autor a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica.

** Centro de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica. Dirección actual del primer autor: Centro de Investigaciones en Granos y Semillas, de la misma Institución.

Bar-Akiva y colaboradores (1, 2, 3) han sugerido la posibilidad de usar la aRN como una medida del estado de nutrición por nitrógeno en plantas de cítricos y gramíneas forrajeras. Estos autores encontraron que se puede inducir una máxima actividad de la enzima mediante infiltración foliar de KNO_3 0,1 M, y que tal magnitud puede servir como indicadora del estado de nutrición por nitrógeno en dichas plantas, pues cuando existe deficiencia de este nutrimento la diferencia con respecto a la actividad desarrollada por el tejido sin infiltración previa, resulta muy evidente. Estudios en el mismo sentido han sido realizados en café por Brealey y Carvajal (6). Estos autores encontraron que, cuando la planta contiene un nivel de N-NO_3 por encima del crítico, o sea de 600 ppm para hojas de posición equivalente a las estudiadas (7), la actividad de la reductasa prácticamente se mantiene estable aún cuando las hojas son asperjadas con una solución de KNO_3 0,35 M; pero cuando el nivel de nitrógeno es insuficiente la aspersión de las hojas con la misma solución eleva hasta un óptimo "potencial" la actividad enzimática, lo cual ratifica la postulación de Bar-Akiva y colaboradores (1,2), de que la aRN puede ser usada como una guía del estado de la nutrición nitrogenada, cuando menos en algunas especies. El cociente que se obtiene de la relación aRN inducida/aRN inicial ha sido sugerido recientemente por Shaked, Bar-Akiva y Mendel (19) como indicación del potencial total de asimilación de nitrato y es útil como guía de la fertilización nitrogenada.

El objetivo del presente estudio fue analizar el comportamiento de la enzima reductasa del nitrato en algunas especies botánicas de importancia agrícola, en respuesta a la aplicación al suelo de dosis variables de nitrógeno, lo que sirvió de sustrato analítico para derivar cifras representativas del potencial total de asimilación de nitrato influido por los tratamientos. En esta clase de estudios la actividad enzimática que se analiza en un momento dado se ha denominado, en trabajos previos, actividad actual, inicial, o a tiempo cero (t_0). A la actividad que muestra un tejido foliar equivalente, 24 horas después de haber sido infiltrado artificialmente con nitrógeno nítrico, se la denomina actividad a t_{24} , "potencial" o inducida.

MATERIALES Y METODOS

Análisis de la actividad de la reductasa del nitrato

Se determinó la actividad de la reductasa del nitrato en tejido foliar de las especies siguientes: café (*Coffea arabica* cv. Típica), tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Manapal, caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) cv. 'Barbados', zacate elefante (*Pennisetum purpureum*) y zacate kikuyu (*Pennisetum clandestinum*).

Las muestras se lavaron en todos los casos con HCl 0,15 N inmediatamente después de colectadas en el campo o invernadero, para eliminar impurezas y contaminaciones. Con un sacabocados de 2,5 mm de diámetro se obtuvieron discos de tejidos foliares, hasta completar 1 g de muestra, la que fue colocada en un tubo de ensayo de 25 ml. La actividad enzimática (producción de nitrato) procedió seguidamente en el mismo tubo de ensayo, en un medio de incubación compuesto por 5 ml de buffer Tris HCl 0,05 M, pH 7,5; 1 ml de succinato 0,1 M, neutralizado a pH 7 con NaOH 3 M; 1 ml de KNO_3 0,1M y 2 ml de agua bidestilada. Este procedimiento analítico constituye una modificación al método usado por Dirr, Barker y Maynard (10) para la determinación de la actividad de la referida enzima en hojas de azalea, al usar buffer Tris HCl en lugar de buffer de fosfato. La incubación prosiguió por 30 minutos a temperatura ambiente, en ausencia de luz (4). El líquido se recogió en un frasco volumétrico de 100 ml luego de filtrar a través de un papel de filtro "banda azul"; se practicaron tres lavados consecutivos con aproximadamente 5 ml de agua bidestilada. El color distintivo del contenido de nitrato se desarrolló al agregar 2 ml de sulfanilamida al 1% p/v disuelta en HCl 1,5 N y 2 ml de dihidrocloruro del $\text{N}(1\text{-naftil})$ etilendiamina al 0,02% p/v preparada en HCl 0,2 N. El volumen se ajustó finalmente a 100 ml con el fin de llevar la intensidad del color a un ámbito de lectura de mayor confiabilidad. La intensidad del color desarrollado se midió a 525 milimicrones de longitud de onda en un espectrofotómetro Fisher Modelo AC o en un fotocolorímetro Bausch & Lomb Spectronic-20. La concentración de KNO_3 que se usó para inducir la aRN potencial en 24 horas fue 0,15 M, con base en estudios previos en que se determinó que esta concentración no causaba daños físicos en el follaje de las especies bajo estudio. La aplicación de KNO_3 se hizo con un atomizador manual pequeño, asperjando una sola vez las hojas experimentales por ambas superficies; se añadió el humectante Triton X-114.

Efecto de diferentes dosis de nitrógeno en la aRN

El efecto de dosis ascendentes de nitrógeno adicionales al suelo se midió mediante un diseño experimental irrestrictamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones. En el Cuadro 1 se consignan los tratamientos.

La investigación en café y caña de azúcar fue hecha en el campo. En el primer caso se seleccionaron cafetos adultos en una plantación bajo explotación comercial en la Serie Heredia (suelo volcánico). La aplicación del fertilizante se hizo en banda, a 30 cm del tronco; se usó una planta por repetición. La determinación de la aRN a t_0 se hizo 30 días después de la aplicación de los fertilizan-

tes en hojas del segundo par de la parte superior de los arbustos (de afuera hacia adentro). El análisis de la aRN a t_{24} fue hecho en la hoja opuesta a la usada en la primera determinación. En caña de azúcar la investigación tuvo lugar en una siembra nueva (caña de plantilla) ubicada en la Hacienda Zetillal (Serie Alajuela Plano, suelo volcánico), en cuyo caso el fertilizante se aplicó sobre el surco de siembra al cumplir las plantas tres y medio meses de edad, en parcelas (repeticiones) de 10 m de largo. La actividad enzimática fue determinada 25 días después de la aplicación del fertilizante, en una muestra foliar formada por los 20 cm centrales de la cuarta hoja.

La investigación con tomate y los zacates elefantes y kikiyu tuvo lugar en el invernadero. En ambos casos se utilizó suelo de la Serie Heredia y macetas de 12 l de capacidad; se usó un recipiente por repetición. Cuando se utilizó tomate, el fertilizante se aplicó al momento de efectuar el trasplante, con plantas de 22 días de edad; en este caso el análisis de la aRN se hizo 26 días después de la aplicación de los tratamientos. Se utilizó la hoja No. 2 entera, de la parte superior de la planta, para el análisis a t_0 y su inmediata inferior para el análisis a t_{24} . En zacate elefante se efectuó un primer corte dos meses y medio después de la aplicación de los tratamientos, con el propósito de obtener luego un material experimental más uniforme; en este momento se aplicó un suplemento de 100 y 200 Kg/ha de nitrógeno como NH_4NO_3 a los tratamientos III y IV, respectivamente. El análisis de la actividad enzimática se efectuó en los 19 días después de la segunda aplicación del fertilizante. La muestra donde se practicó el análisis consistió en las primeras cuatro

hojas, de arriba hacia abajo; en todos los casos se descartó la hoja arrollada o "candelilla" y 3 cm del ápice y la base de las hojas seleccionadas. En zacate kikiyu, cinco semanas después de la siembra se realizó un primer corte y en este momento se añadió un suplemento de 100 y 200 Kg/ha de nitrógeno como NH_4NO_3 a los suelos de los tratamientos III y IV, respectivamente. Transcurridos 22 días se efectuó un análisis de aRN en una muestra experimental compuesta por las primeras cuatro hojas, del ápice hacia la base. Debido a que los datos obtenidos en esta especie resultaron de tendencia diametralmente opuesta en relación a las encontradas en las demás, se decidió repetir el experimento en igualdad de condiciones, excepto que la aRN fue determinada en esta oportunidad 16 días después de la segunda adición de nitrógeno.

Índice del potencial de asimilación de nitrato

Se usó el cociente $\text{aRN}_{t_{24}}/\text{aRN}_{t_0}$ sugerido por Shaked, Bar-Akiva y Mendel (19), para evaluar el estado de nutrición del nitrógeno inducido en cada especie. La interpretación fue hecha con base en la magnitud del referido cociente como indicativo del potencial total de asimilación de nitrato, para las condiciones experimentales en que se trabajó.

RESULTADOS

Las correlaciones obtenidas en la presente investigación, entre los tratamientos y el estado inicial del nitrógeno (aRN_{t_0}) en las hojas de las plantas experimentales, se presentan en las Figuras 1 a 5. La magnitud, signo y significación estadística de dichas correlaciones permitie-

Cuadro 1. Fertilizantes añadidos al suelo para suplir diferentes dosis de nitrógeno, según la especie.

Tratamientos	Dosis de fertilizante por cultivo											
	Café (g/arbusto)			Caña de azúcar* (kg/ha)			Tomate* (kg/ha)			Zacates elefante y kikiyu* (kg/ha)		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	20,3	11,3	17,0	0	150	150	0	600	200	0	100	100
III	40,6	22,6	34,0	75	150	150	100	600	200	100	100	100
IV	61,0	33,9	51,0	150	150	150	200	600	200	200	100	100

* Fuentes usadas: nitrato de amonio, cloruro de potasio y superfosfato triple. El café se fertilizó con la fórmula comercial 18-10-15-4-1.2.

ron distinguir tres comportamientos distintos entre las especies investigadas: a) en el cafeto, la aRN se mostró indiferente a los tratamientos; b) en caña de azúcar, tomate y zacate elefante, la aRN mostró un incremento en concordancia con la dosis de nitrógeno suministrada al suelo; c) en zacate kikuyu, el suministro de nitrógeno causó una disminución de la aRN. Se observó, asimismo, que la aplicación de nitrógeno, mediante atomización al follaje de una solución de KNO_3 0,15 M, en general causó un incremento en la actividad de la $\text{aRN}_{t_{24}}$.

En el Cuadro 2 se transcriben los cocientes derivados de las determinaciones de la aRN inicial e inducida, indicadores del potencial total de asimilación de nitrato. Se encontró que en este caso las correlaciones son de signo negativo, en correspondencia con una correlación con la aRN inicial de signo positivo, estadísticamente significativa (caso de la caña de azúcar, tomate y zacate elefante, Figuras 2, 3 y 4). Los referidos cocientes experimentaron una magnitud decreciente hacia la unidad, influida por el suministro de nitrógeno al suelo. La prueba de Duncan al 1% señaló cocientes semejantes entre sí para los cuatro tratamientos, en los casos de café y kikuyu (Cuadro 2). En las Figuras 6 y 7 se representan gráficamente las tendencias de los cocientes encontradas. Se observa que cuando las plantas disponen de cantidades adecuadas de nitrógeno en el medio nutricio el citado cociente tiende a estabilizarse, como se destaca en los tratamientos III y IV.

El comportamiento del zacate kikuyu resultó ser un caso de excepción en el presente estudio, al presentar una correlación negativa entre el suministro de nitrógeno y la aRN_{t_0} , según se aprecia en la Figura 5; la repetición del experimento dio los mismos resultados; esto invalida

al cociente 'aRN inducida/aRN inicial' como indicador del potencial total de asimilación del nitrato en esta especie.

DISCUSION

Los datos obtenidos en la presente investigación señalan que el potencial total de asimilación de nitrato, estimado mediante el cociente 'aRN inducida/aRN inicial', que ha sido sugerido por Shaked, Bar-Akiva y Mendel (19) como guía de la fertilización nitrogenada, tiene asidero en la existencia de una correlación significativa (+) entre la disponibilidad de nitrógeno en el medio nutricio y la aRN inicial; esta correlación estaría influida por una disminución paulatina de la magnitud de la diferencia entre la aRN inicial y la inducida. Este último hecho ha sido postulado como valedero por Bar-Akiva y colaboradores (1,2,3) en cítricos y *Lolium perenne*, y por Brealey y Carvajal (6) en plantas de café. Se infiere que, como guía de la fertilización nitrogenada, un cociente lo más cercano posible a la unidad señala estados de nutrición por nitrógeno adecuados. Ahora bien, de la prueba de Duncan que se consigna en el Cuadro 2, se deduce, sin embargo, que tal criterio es valedero solamente cuando las plantas muestran una aRN inicial dentro de un estrecho ámbito, que varía para cada especie pero que de hecho no sería constante, y es influido por la disponibilidad de nitrógeno, en ausencia de otros factores limitantes, nutricionales o ecológicos, según lo demuestran los trabajos de varios autores (8, 9, 18). En las especies investigadas, excepción hecha del kikuyu y del café, los tratamientos con nitrógeno causaron siempre un incremento de la actividad enzimática inicial. Ahora bien, las diferencias encontradas en café y kikuyu tienen distintos orígenes: mientras en el primero los tratamientos sin nitrógeno exhibieron una actividad enzimática semejante a la inducida en los tratamientos que recibieron dicho nutrimento (se trataba de un lote de café comercial bien fertilizado), en zacate kikuyu los testigos presentaron la mayor actividad enzimática; no es posible ofrecer por ahora una explicación adecuada para el comportamiento de esta especie. Por otro lado, el hallazgo en el cafeto corrobora las investigaciones realizadas en esta especie por Brealey y Carvajal (6) y por Bar-Akiva y Sternbaum (2) en cítricos.

Cabe mencionar, por discordante, el hecho de que en caña de azúcar la infiltración de KNO_3 produjo un gran aumento en la actividad enzimática inducida, mayor que en las otras especies, producto de la síntesis de novo de la enzima. La baja actividad de la aRN inicial que se encontró en esta especie probablemente está asociada con la poca concentración de N-NO_3 en los tejidos foliares (11).

Cuadro 2. Datos comparativos de potencial total de asimilación de nitrato, derivados de la relación $\text{aRN}_{t_{24}}/\text{aRN}_{t_0}$

Tratamientos	Cociente $\text{aRN}_{t_{24}}/\text{aRN}_{t_0}$				
	Café	Caña	Tomate	Elefante	Kikuyu
I	1,32 a*	24,96 a	1,97 a	2,07 a	1,86 a
II	1,21 a	16,17 b	1,56 b	1,52 b	1,98 a
III	1,25 a	6,88 b	1,24 c	1,53 c	2,06 a
IV	1,23 a	4,80 b	1,22 c	1,51 c	1,96 a
r	-0,17	-0,63	-0,67	-0,71	-0,38

* Tratamientos con las mismas letras, son iguales entre sí, según la prueba de Duncan al 1%

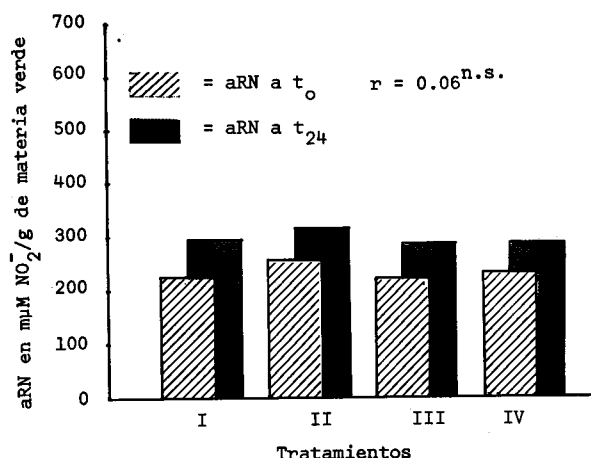


Fig. 1. aRN actual (t_0) y potencial (t_{24}) en hojas de plantas de Café, fertilizadas con dosis estratificadas de la fórmula 18-10-15-4-1.2

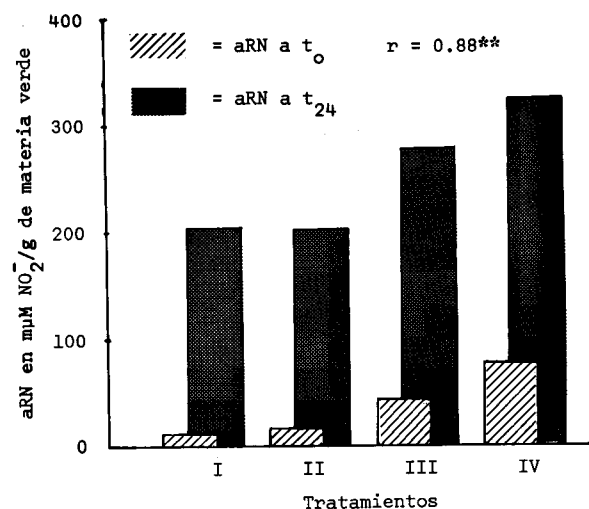


Fig. 2. aRN actual (t_0) y potencial (t_{24}) en hojas de plantas de Caña de Azúcar, fertilizadas con dosis diferentes de nitrógeno.

Los cocientes derivados del presente trabajo mostraron una estabilización en los tratamientos del ensayo con café (Cuadro 2); en tomate, zacate elefante y caña de azúcar, los tratamientos con nitrógeno exhibieron cocientes prácticamente iguales y fueron los más cercanos a la unidad. Ello indica que en las especies mencionadas los cocientes hallados representan cifras de potencial de asimilación de nitrato en correspondencia quizá con estados óptimos de nutrición por nitrógeno, o

muy cercanos. Los resultados que se presentan señalan que en café, caña de azúcar, tomate y zacate elefante, los cocientes $\text{aRN}_{t_{24}}/\text{aRN}_{t_0}$, indicativos de un óptimo estado de nutrición por nitrógeno, mostraron valores en los alrededores de 1,22, 4,32, 1,22 y 1,51, respectivamente, para las condiciones experimentales en que se trabajó. Para zacate kikuyu aún no se ofrece índice alguno debido al comportamiento *sui-generis* de la aRN inicial (Figura 5).

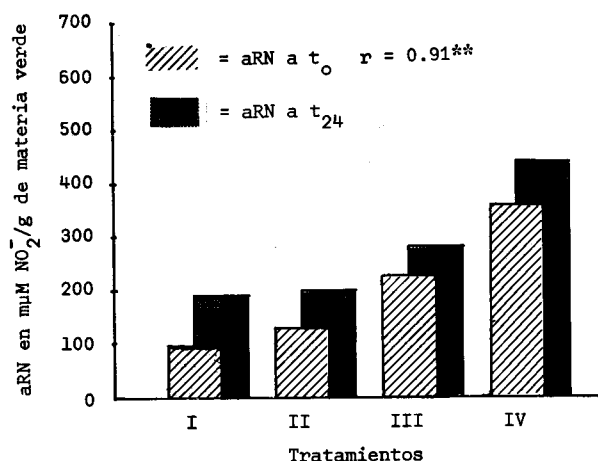


Fig. 3. aRN actual (t_0) y potencial (t_{24}) en hojas de plantas de tomate fertilizadas con dosis variables de nitrógeno.

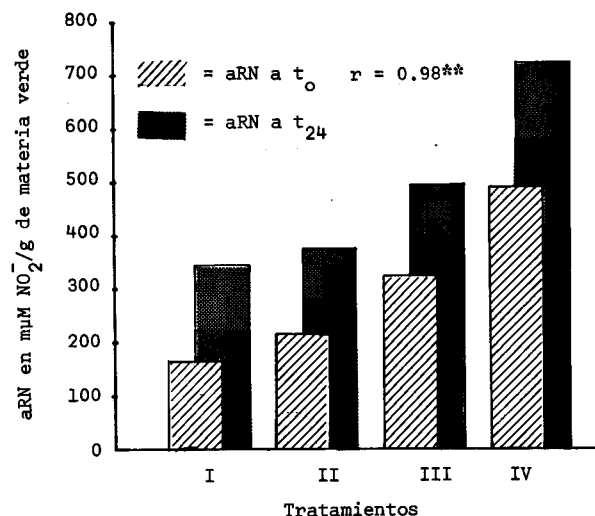


Fig. 4. aRN actual (t_0) y potencial (t_{24}) en hojas de plantas de zacate Elefante, en función de dosis variables de nitrógeno.

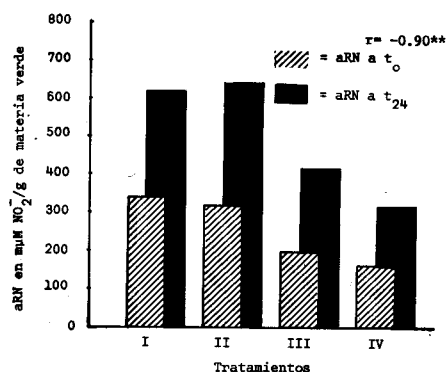


Fig. 5. aRN actual (t_0) y potencial (t_{24}) en hojas de plantas de zacate Kikuyu de 16 días de edad en función de dosis variables de nitrógeno.

El hecho de que hasta los tratamientos que recibieron nitrógeno en dosis altas mostraron mayor actividad enzimática a t_{24} que a t_0 , indica que la infiltración de KNO_3 en los tejidos de las hojas provocó la síntesis de substratos o cofactores de los que intervienen en la síntesis de la RN. Resta por conocer si tal comportamiento es independiente la capacidad del sistema radical de las plantas de absorber todo el nitrato necesario para inducir, en cualquier momento y bajo la influencia de cualesquiera dosis de nitrógeno, una máxima actividad de RN. Esta inquietud ha sido planteada por otros investigadores, quienes han señalado que en condiciones naturales quizá el sistema radical no sea capaz de desarrollar todo el potencial para la absorción de nitrato (14). Se necesitan estudios de saturación de absorción de este ion, vía raíz, en combinación con mediciones de aRN. Asimismo, sobre la variación del potencial total de asimilación de nitrato durante la ontogenia, o estacional, según se trate de plantas de crecimiento determinado o indeterminado, respectivamente.

RESUMEN

Se investigó la respuesta a nitrógeno mediante la técnica de diagnóstico bioquímico. Para los efectos se estudió la correlación que existe entre la actividad de la reductasa del nitrato (aRN inicial) en el follaje y la aplicación al suelo de dosis crecientes de nitrógeno. La investigación se hizo en café (*Coffea arabica*), caña de azúcar, (*Saccharum officinarum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), zacate elefante (*Pennisetum purpureum*) y zacate kikuyu (*Pennisetum clandestinum*). La respuesta de las plantas se evaluó mediante la determinación de la magnitud de la aRN provocada por los tratamientos y al infiltrar *in vivo* una solución de KNO_3 0,15 M en las hojas (aRN inducida). El potencial total de asimilación de nitrato fue estimado por la variación y magnitud del cociente 'aRN inducida/aRN inicial'.

En café, caña de azúcar, tomate y zacate elefante, cocientes representativos del potencial total de asimilación de nitrato, de magnitud 1,22, 4,37, 1,22 y 1,51, respectivamente, se asociaron con estados aparentemente adecuados de nutrición nitrogenada, lo que sugiere la postulación del método de diagnóstico bioquímico como guía de la fertilización nitrogenada en estas especies. Los datos obtenidos en zacate kikuyu revelaron un caso de excepción al mostrar la existencia de una correlación negativa entre la aRN inicial y la disponibilidad de nitrógeno.

Se concluyó que el grado y clase de correlación que existe entre los parámetros estudiados varía según la especie, la disponibilidad de nitrógeno en el medio nutritivo y la capacidad de las plantas para acumular nitrato en los tejidos.

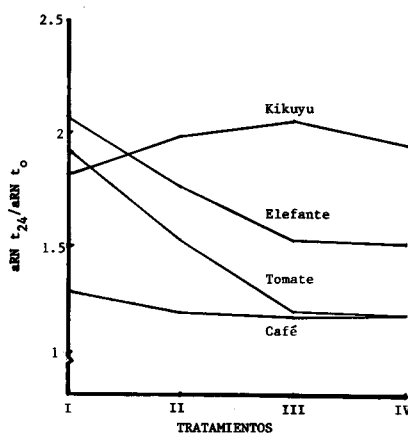


Fig. 6. Cociente 'aRN inducida/aRN inicial' vs. tratamientos.

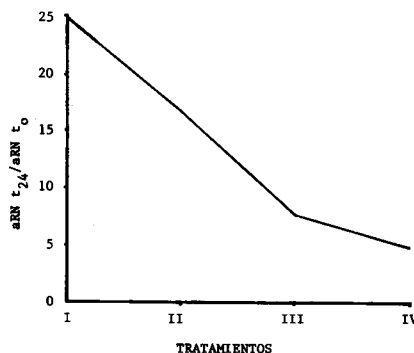


Fig. 7. Cociente 'aRN inducida/aRN inicial' vs. tratamientos en caña de azúcar.

LITERATURA CITADA

1. BAR-AKIVA, A., J. SAGIV y LESHEM, L. Nitrate reductase activity as indicator for assessing the nitrogen requirements of grass crops. *J. Sci. Food. Agric.* 21: 405-407. 1970.
2. _____ y STERNBAUM, J. Possible use of the nitrate reductase activity of leaves, as a measure of the nitrogen requirements of citrus leaves. *Plant Cell Physiol.* 6: 575-577. 1965.
3. _____ y _____ Nitrate reduction in citrus trees leaves. *Plant Soil* 23: 141-144. 1965.
4. _____ y _____ Non-enzymatic reduction of the nitrite by means of ascorbic acid in citrus and other higher plant tissues. *Physiol. Plant.* 19: 422-428. 1966.
5. BEEVERS, L., SCHRADER, L. E., FLESHER, D. y HAGEMAN, R. H. The role of light and nitrate in the induction of nitrate reductase in radish cotyledons and maize seedlings. *Plant Physiology* 40: 691-698. 1965.
6. BREALEY, O. y CARVAJAL, J.F. La actividad de la reductasa del nitrato como guía de la fertilización nitrogenada del café. In: IV Simposio Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Programa y Resúmenes. 1971. pp. 44-45.
7. CARVAJAL, J. F. Café, Cultivo y Fertilización. International Potash Institute, Berne, Switzerland. 1972. 141 p.
8. _____ y CAVALLINI, J. A. Nitrate reductase activity in coffee trees as affected by mineral deficiency. American Society of Agronomy, Annual Meeting. Miami, U.S.A. 1972.
9. CASTILLO, L. D. y CARVAJAL, J. F. Algunos factores que afectan la actividad de la reductasa del nitrato en el café. Resumen 71. Anales II Congreso Agronómico Nacional I; 65-66. 1976.
10. DIRR, M. A., BARKER, V. y MAYNARD, D. N. Nitrate reductase activity in the leaves of the highbush blueberry and other plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97: 329-331. 1972.
11. EXPERIMENT STATION OF THE HAWAIIAN SUGAR PLANTERS' ASSOCIATION. How fast does the cane plant take up nitrogen? Annual report, Honolulu, Hawaii, 1963. pp. 20.
12. GARCIA-MARTINEZ, J. L. y COIC, Y. Influence de la nutrition nitrique, ammoniacale et de la deficiencia en soufre sur l'activite de la nitrate reductase dans les feuilles du maïs et de la tomate. *Annales de Physiologie Végétale* 11: 397-404. 1969.
13. HAGEMAN, R. H. y FLESHER, D. Nitrate reductase activity in corn seedlings as affected by light and nitrate content of nutrient media. *Plant Physiology* 35: 700-708. 1960.
14. HARPER, J. E. y R. H. HAGEMAN, R. H. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybean (*Glycine max*) L. Merr. *Plant Physiology* 49: 146-154. 1972.
15. HARPER, J. E. y PAULSE, R. H. Nitrogen assimilation and protein synthesis in wheat seedlings as affected by mineral nutrition. I. Macronutrients. *Plant Physiology* 44: 110-114. 1968.
16. NICHOLAS, D. J., NASON, A. y Mc ELROY, W. D. Molybdenum and nitrate reductase. Effect of molybdenum deficiency on the Neurospora. *J. Biol. Chem.* 207: 341-351. 1954.
17. SANDERSON, G. W. y COCKING, E. C. Enzymatic assimilation of nitrate in tomato plants. Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Physiology* 39: 416-422. 1964.
18. SHAKED, A., BAR-AKIVA, A. y MENDEL, K. Effect of water stress and high temperature on nitrate reduction in citrus leaves. *J. Hort. Sci.*, 47: 183-190. 1972.
19. SHAKED, A., BAR-AKIVA, A. y MENDEL, K. L'activite de la nitrate reductase: une indication de l'etat nutritionnel et des besoins en azote d'agrumes en vergers. *Fruits* 30 (2): 125-128. 1975.