

FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI AKTIVITAS NITRAT REDUKTASE *IN VIVO* DAUN KOPI ROBUSTA*) (FACTORS AFFECTING *IN VIVO* NITRATE REDUCTASE ACTIVITY OF ROBUSTA COFFEE LEAVES)

Abdul Mukti Nur**), Djoko Isbandi***), Hari Hartiko***)

Abstract

Factors affecting *in vivo* nitrate reductase activity (NRA) of robusta coffee leaves were investigated: Enzyme activity dropped sharply at pH 8.0 — 9.0 of the incubation medium (0.1 M Na-phosphate buffer). The pH 7.5 was found to be optimal for *in vivo* NR assay of robusta coffee leaves. The optimum nitrate concentration was 0.1 M. The use of n-propanol and n-butanol as a buffer component were less effective than sodium dodecyl sulfate (SDS) in enhancing enzyme activity. The optimum concentration of the organic solvent was 2% (v/v), 1% (v/v), and 0.08% (w/v), respectively.

Soaking the leaf slices in buffer medium containing its component for 24 hours before assay had a negative effect. On the contrary, presoaking the leaf slices in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH = 7.5) without its component for 24 hours followed by assay in buffer containing 0.08% SDS and 0.1 M NaNO₃ caused a significant increase in NRA. The use of leaf slices (± 1.0 c, $\times 0.1$ cm) enhanced NRA significantly as compared to leaf discs (± 1.0 cm in diameter).

Ringkasan

Beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas nitrat reduktase (ANR) *in vivo* daun kopi robusta telah diteliti. ANR mengalami penurunan tajam pada pH medium (larutan penyangga 0,1 M Na-pospat) 8,0 — 9,0. pH medium assay optimum adalah 7,5 dan kadar nitrat optimum 0,1 M. Penggunaan n-propanol dan n-butanol sebagai komponen larutan penyangga kurang efektif dibanding sodium dodecyl sulfate (SDS). Kadar optimum ke 3 pelarut organik tersebut berturut-turut adalah 2% (v/v), 1% (v/v), dan 0,08% (w/v).

Perendaman irisan daun dalam larutan penyangga berisi komponennya selama 24 jam sebelum assay berpengaruh negatif terhadap ANR. Perendaman irisan daun 24 jam sebelum assay dalam larutan penyangga 0,1 M Na-pospat (pH = 7,5) diikuti assay menggunakan larutan penyangga segar (baru) berisi 0,08% SDS dan 0,1 NaNO₃, menghasilkan ANR tertinggi dibanding cara assay yang lain. Penggunaan irisan daun berukuran $\pm 0,1$ cm \times 1,0 cm menghasilkan ANR lebih tinggi dibanding piringan daun (diameter $\pm 1,0$ cm).

Pendahuluan

Tanaman menyerap nitrogen (N) terutama dalam bentuk nitrat (NO₃) (Bidwell, 1979; Novoa dan Loomis, 1981). Dalam tubuh tanaman nitrat harus direduksi menjadi ammonia (NH₃) agar dapat dimanfaatkan lebih lanjut dalam proses metabolisme nitrogen tanaman. Nitrat reduktase (NR) merupakan enzim tanaman yang diyakini menjadi faktor pembatas laju reduksi nitrat menjadi ammonia dan memegang peranan sangat penting dalam mengatur sintesis senyawa-senyawa nitrogen tanaman

*) Sebagian dari penelitian untuk tesis Pasca Sarjana yang disampaikan pada Fakultas Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada

**) Balai Penelitian Perkebunan Jember.

***) Fakultas Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

(Beevers dan Hageman, 1969; Croy dan Hageman, 1970; Huffaker dan Rains, 1978). Banyak hasil penelitian melaporkan bahwa tingkat aktivitas nitrat reduktase (ANR) dapat digunakan sebagai salah satu kriteria seleksi tanaman berdaya hasil tinggi (Deckard *et al.*, 1973; Johnson *et al.*, 1976; Singh *et al.*, 1976; Dalling dan Loyn, 1977). Tingkat aktivitas NR juga dilaporkan dapat digunakan sebagai parameter dalam menentukan status N tanaman (Oosterhuis dan Bate, 1983).

Tingkat aktivitas NR dalam jaringan tanaman dipengaruhi banyak faktor termasuk metoda pengukurannya. Aktivitas NR dapat diukur menggunakan metoda assay *in vitro* maupun *in vivo*. Metoda *in vitro* mengukur aktivitas enzim dalam kondisi yang optimum yang dalam hal ini jarang ditemui pada kondisi sebenarnya. Perusakan jaringan selama ekstraksi dan permunian enzim sering ikut melarutkan zat-zat penghambat yang dapat menurunkan aktivitas enzim (Wallace, 1973; Eck dan Hageman, 1974). Assay *in vitro* juga memerlukan banyak peralatan yang cukup rumit. Assay *in vitro* lebih sederhana. Pada metoda *in vivo* struktur jaringan dipertahankan tetap utuh. Aktivitas enzim yang terukur tergantung pada keadaan dakhil (*internal*) sel sehingga lebih memberikan gambaran aktivitas fisiologi enzim yang sebenarnya.

Pengujian aktivitas NR menggunakan metoda *in vivo* telah dilakukan banyak peneliti (Bate *et al.*, 1978; Perez dan Kliewer 1978; Hartiko, 1979; Lin dan Kao, 1980; Hog *et al.*, 1983; Lilo, 1983). Aktivitas NR *in vivo* didasarkan pada besarnya penimbunan nitrit (NO_2) dalam medium assay. Banyak faktor yang mempengaruhi pelepasan nitrit ke dalam medium, antara lain yaitu kadar substrat dalam medium, pH medium, ukuran dan berat potongan daun yang digunakan, dan macam serta kadar pelarut organik yang digunakan untuk meningkatkan permeabilitas membran sel.

Kondisi assay NR *in vivo* yang optimum beragam tergantung pada jenis tanamannya. Tulisan ini menyajikan hasil penelitian mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas NR *in vivo* pada tanaman kopi robusta.

Bahan dan Cara

Daun-daun muda yang sudah berkembang penuh diambil dari cabang plagiotrop kopi robusta yang tidak menunjukkan adanya dormansi pucuk. Daun dibersihkan dengan kertas tisu yang telah dibasahi akuades dan diiris kecil-kecil ($\pm 1,0 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm}$) dengan meninggalkan bagian pangkal, ujung, dan ibu tulang daun. Pengambilan contoh daun dilakukan pagi hari sekitar pukul 08.00 — 09.00.

Tiga ratus miligram irisan daun dimasukkan ke dalam tabung hitam berisi 10 ml larutan penyangga 0,1 M Na-pospat (pH = 7,5). Kemudian ke dalam medium ditambahkan substrat 0,1 M NaNO_3 dan diinkubasikan selama 1 — 3 jam. Untuk penentuan NR sejumlah 0,1 ml alikuot dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 0,5 ml 0,2% N-naphtylethylenediamine dichloride dan 0,5 ml 0,1% sulfanilamide (dalam 3 N HCl). Campuran dikocok kuat-kuat menggunakan mesin kocok dan warna dibiarkan berkembang selama ± 15 menit, kemudian ditambahkan akuades sehingga volume akhir menjadi 3 ml. Larutan dalam tabung reaksi tersebut kemudian dipindahkan ke dalam kuvet spektrofotometer dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dengan menggunakan blanko sebagai standar absorbansi nol. NR dinyatakan

dalam mikromole nitrit yang dihasilkan per jam per gram berat basah daun (mole $\text{NO}_2/\text{gbb.}/\text{jam}$).

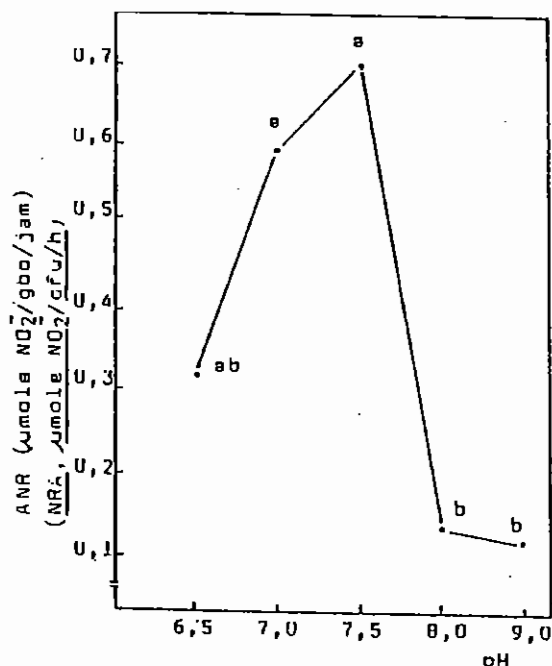
Untuk mendapatkan kondisi assay yang optimum dilakukan optimasi terhadap pH, kadar substrat NaNO_3 , kadar zat pelarut organik yang digunakan sebagai komponen medium, dan ukuran potongan daun yang digunakan. Pengaruh perendaman dalam bermacam komponen medium terhadap aktivitas NR juga dipelajari.

Penelitian dilakukan di laboratorium Biokimia Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh pH dan Kadar Substrat dalam Medium Assay

Aktivitas NR (ANR) sangat dipengaruhi oleh pH medium. pH optimum berkisar antara 7,0 — 7,5 dengan tingkat ANR tertinggi diperoleh pada pH 7,5. Pada pH 8,0 — 9,0 ANR mengalami penurunan yang tajam. Pada kisaran pH tersebut aktifitas enzim tercatat hanya 16 — 18% ANR maksimum (Gambar 1). Umumnya pH optimum medium assay ANR *in vivo* didapatkan pada pH 7,0 — 7,5 (Nicholas *et al.*, 1976; Perez & Kliewer, 1976; Bate *et al.*, 1978; Fakorede & Mock, 1978). pH optimum medium assay dipengaruhi kecuali oleh jenis tanaman juga oleh umur tanaman dan daun, dan kandungan asam organik dakhil (endogen) dalam jaringan (Eck & Hageman, 1974).



Gambar 1. Pengaruh pH medium terhadap ANR (rata-rata dari 4 ulangan; inkubasi 3 jam). Angka rata-rata dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%

(Figure 1. Effect of medium pH on NRA (average of 4 replications, 3 hours of incubation). Means with the same letter are not significantly different at 5% level)

Pengaruh penambahan substrat ke dalam medium assay tertera pada daftar 1. Nampak bahwa tanpa penambahan substrat ke dalam medium assay taraf ANR pada 1 jam inkubasi masih cukup tinggi, tetapi pada 2 dan 24 jam inkubasi taraf ANR sudah sangat menurun. Hal ini memberikan petunjuk adanya nitrat dakhil dalam jaringan yang tersedia sebagai substrat enzim tetapi jumlahnya sudah sangat berkurang dalam beberapa jam inkubasi. Nitrat dalam jaringan tanaman sebagian besar terdapat dalam vakuola tetapi tidak tersedia sebagai substrat enzi. Nitrat dalam bentuk tersedia sebagai substrat dan berperan juga sebagai "inducer" yang efektif untuk NR terdapat dalam sitoplasma tetapi jumlahnya sangat kecil (Aslam *et al.*, 1976; Hog *et al.*, 1983; Mills & Lips, 1984). Penambahan nitrat ke dalam medium assay kecuali sebagai substrat diduga juga membantu mencegah enzim menjadi inaktif (Mills & Lips, 1984). Kadar nitrat optimum berkisar antara 0,05 — 0,2 M NaNO_3 . Namun untuk penelitian-penelitian berikutnya digunakan kadar 0,1 M NaNO_3 . Pada kadar tersebut aktivitas enzim mencapai 98% ANR maksimum.

Daftar 1. Pengaruh kadar nitrat dalam medium assay terhadap AND (μ mole NO_3 /gbb./jam)

(Table 1. Effect of nitrate concentrations assay medium on NRA μ mole NO_2 /gfw/h)

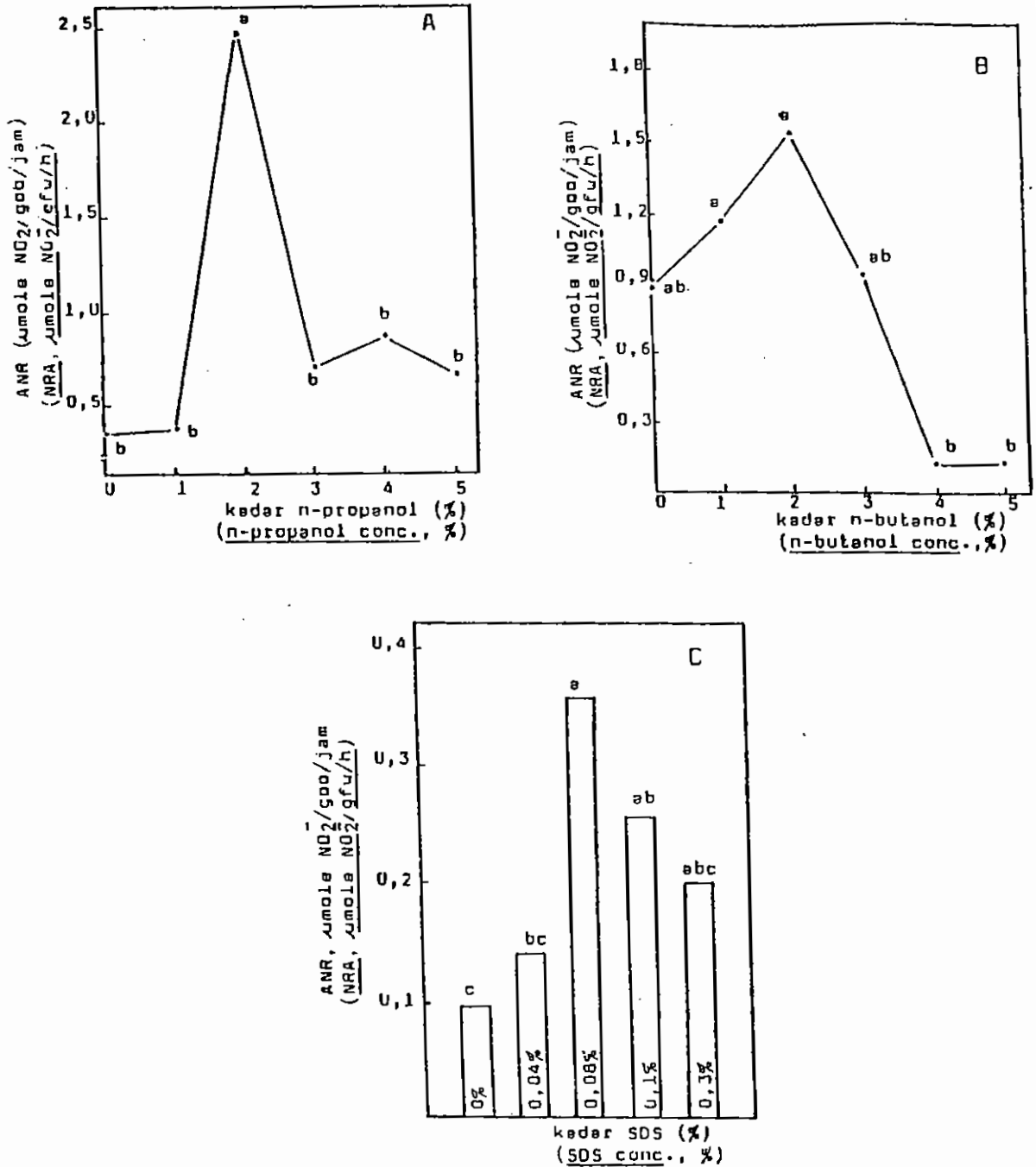
Kadar NO_3 (M) (No_3 conc., M)	Inkubasi (jam) (hours in incubation)			Rata-rata (mean)
	1	2	24	
0.0	0,730	0,057	0,026	0,271 bc
0,05	0,099	0,133	7,613	2,578 a
0,1	0,213	0,201	7,670	2,695 a
0,2	0,714	0,228	7,296	2,746 a
0,3	1,429	0,107	2,971	1,803 d
0,6	1,001	0,194	0,504	0,570 b
1,0	0,269	0,057	0,012	0,113 c

Catatan : Uji beda nyata menurut Duncan pada taraf 5%, angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata.

(note : DMRT at 5% level, numbers which followed by same letters were not significant)

Pengaruh Zat Pelarut Organik dan Perendaman dalam Berbagai Macam Komponen Medium Assay

Tiga pelarut organik, yaitu n-propanol, n-butanol, dan sodium dodecyl sulfat (SDS) digunakan dalam penelitian ini. Kadar optimum ke 3 pelarut organik tersebut berturut-turut adalah 2% (v/v), 1% (v,v), dan 0,08% (w/v) (gambar 2a, 2b, dan 2c). Pengaruh masing-masing zat pelarut organik tersebut terhadap ANR tercantum pada daftar 2.



Gambar 2. Pengaruh kadar n-propanol (a), n-butanol (b), dan SDS (c) terhadap ANR (rata-rata dari 4 ulangan, inkubasi 1 jam). Angka rata-rata dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%.

(Figure 2. Effect of n-propanol (a), n-butanol (b), and SDS (c) concentrations on NRA (average of 4 replications, one hour of incubation). Means with the same letter are not significantly different at 5% level)

Terlihat bahwa penggunaan pelarut organik sebagai komponen medium assay berpengaruh positif terhadap ANR, walaupun efektifitasnya tidak sama. Dalam hal ini penggunaan 0,08% SDS paling efektif. Propanol (2%, v/v) lebih efektif dibanding butanol (1%, v/v), walaupun secara statistik perbedaannya tidak nyata (daftar 2).

Daftar 2. Pengaruh penambahan pelarut organik terhadap ANR (μ mole NO_2 /gbb./jam)

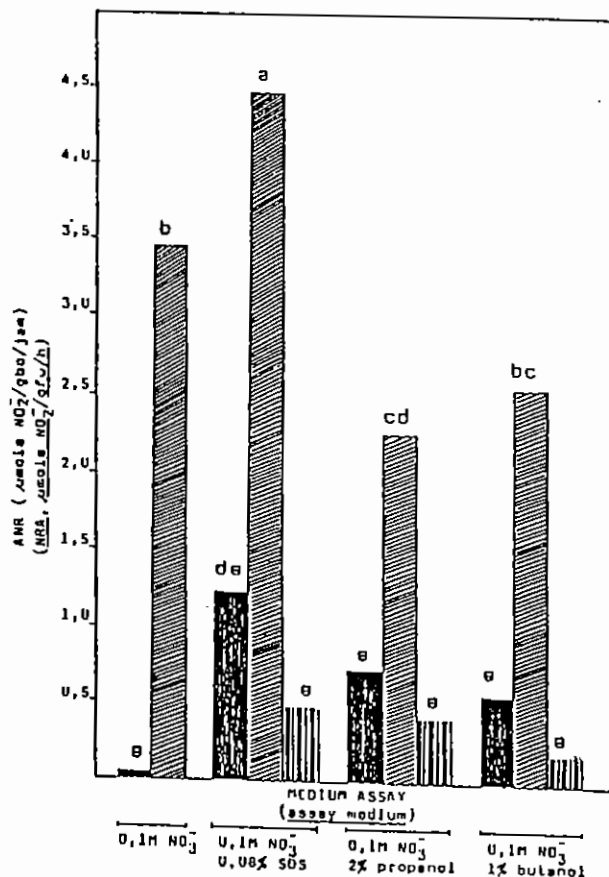
(Table 2. *Effect of various organic solvents on NRA, μ mole NO_2 /gfw/h*)

Pelarut Organik (Organik solvents)	Inkubasi (jam) (Hours of incubation)		Rata-rata (Mean)
	1	2	
2 n-propanol	0,274	0,479	0,602 b
1% n-butanol	0,570	0,271	0,421 b
0,08% SDS	1,220	0,747	0,984 a
kontrol (none)	0,040	0,065	0,053 c

Catatan : Uji beda nyata menurut Duncan pada taraf 5%, angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata.

(note : DMRT at 5% level, numbers which followed by same letters were not significant)

Perendaman bahan 24 jam sebelum assay dalam medium larutan penyangga 0,1 M Na-pospat (pH = 7,5) bersama komponennya ternyata berpengaruh negatif terhadap ANR. Aktifitas enzim lebih rendah dibanding aktivitas enzim hasil pengukuran langsung dengan menggunakan medium assay yang sama. Tetapi bila perendaman dilakukan menggunakan medium larutan penyangga 0,1 M Na-pospat saja, tanpa komponennya, kemudian assay dilakukan dengan cara mengganti medium perendaman dengan medium assay segar (baru) berisi komponennya, maka ANR secara nyata meningkat. Dengan cara perendaman ini ANR meningkat sebesar 57 — 111 kali lebih dibanding ANR kontrol dengan cara assay langsung tanpa menggunakan pelarut organik (gambar 3).



Gambar 3. Pengaruh bermacam kondisi assay terhadap ANR (rata-rata dari 4 ulangan, inkubasi 1 jam).

Angka rata-rata dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%.

Keterangan : ■ ANR diukur langsung (tanpa perendaman)

▨ : Daun direndam 24 jam sebelum assay dalam larutan penyangga U, 1M Na-pospat berisi komponennya.

▩ : Daun direndam 24 jam sebelum assay dalam larutan penyangga U, 1M Na-pospat tanpa komponennya.

(Figure 3. Effect of various assay conditions on NRA (average of 4 replications, one hour of incubation). Means with the same letter are not significantly different at 5% level)

Notes : ■ : NRA were assayed directly without presoaking.

▨ : Leaf slices were soaked 24 hours before assay in U, 1M Na-phosphate buffer medium containing its component.

▩ : Leaf slices were soaked 24 hours before assay in U, 1M Na-phosphate buffer medium without its component.

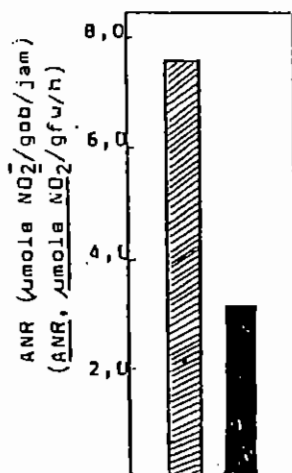
Dari gambar 3 juga terlihat bahwa dengan cara perendaman ini penggunaan propanol dan butanol sebagai komponen medium assay kurang efektif, ANR yang dihasilkan masih lebih rendah dibanding ANR hasil pengukuran tanpa menggunakan pelarut organik.

Penambahan pelarut organik ke dalam medium assay sudah banyak dilakukan. Zat pelarut organik berperan menurunkan tegangan permukaan larutan medium dan meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga memungkinkan difusi nitrat ke dalam jaringan dan atau difusi nitrit ke luar jaringan berlangsung lebih baik (Nicholas *et al.*, 1976; Fakorede & Mock, 1978; Lin & Kao, 1980; Lilo, 1983).

Hasil penelitian assay ANR dengan cara perendaman di atas ada kesesuaian dengan hasil penelitian Hartiko (1979) pada kelapa. Hartiko (1979) menduga terdapatnya pelarut organik dalam medium perendaman mungkin menyebabkan terjadinya denaturasi atau disosiasi NR menjadi sub unit-sub unitnya yang mengakibatkan enzim tidak aktif. Di lain pihak, perendaman bahan 24 jam dalam medium larutan penyangga 0,1 M Na-pospat (pH = 7,5) membantu difusi senyawa penghambat ke luar jaringan. Terdapatnya senyawa-senyawa penghambat NR dalam jaringan daun telah dikemukakan Wallace (1973), Eck & Hageman (1974), dan Purvis & Tieschler (1976).

Pengaruh Ukuran Potongan Daun

Pengaruh ukuran potongan daun terhadap ANR dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Pengaruh bentuk/ukuran potongan daun terhadap ANR (rata-rata dari 4 ulangan, inkubasi 2 jam). Angka rata-rata berbeda nyata pada taraf 5%. ▨ irisan, ■ piringan.

(Figure 4. Effect of leaf segment size on NRA (average of 4 replications, 2 Hours of incubation). Means significantly different at 5% level. ▨ leaf slices, ■ leaf discs.

Pemotongan daun menjadi bentuk irisan kecil-kecil berukuran $\pm 0,1 \times 1,0$ cm menghasilkan ANR nyata lebih tinggi dibandingkan dengan yang dihasilkan potongan daun berukuran lebih besar dalam bentuk piringan (diameter $\pm 1,0$ cm). Peningkatan ANR bahan irisan ("leaf slices") mencapai lebih dari 2,5 kali bahan piringan ("leaf discs"). Lin & Kao (1980) menduga difusi nitrat ke dalam jaringan berlangsung melalui bidang potongan daun dan difusi nitrit ke luar jaringan juga melalui jalur yang sama. Pemotongan daun dalam bentuk irisan kecil-kecil dapat memperluas bidang permukaan potongan sehingga memungkinkan proses difusi berlangsung lebih cepat. Lilo (1983) menyebutkan difusi nitrit ke dalam medium dari potongan daun berukuran lebar 2 mm berlangsung lebih cepat dibandingkan laju difusi irisan daun dengan ukuran lebih lebar (6 mm). Lin & Kao (1980) melaporkan ANR daun "triticale" berkurang dengan makin lebarnya ukuran irisan daun. Disebutkan lebar irisan daun optimum adalah 1 — 2 mm.

Kesulitan pada metoda irisan terletak pada usaha membuat ukuran irisan seragam, mengingat cara pemotongan yang dilakukan secara manual. Untuk itu perlu dikembangkan teknik pemotongan yang menjamin keseragaman ukuran irisan daun.

Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil-hasil penelitian ini dapat ditarik beberapa kesimpulan :

1. pH medium (larutan penyangga 0,1 M Na-pospat) optimum untuk assay ANR *in vivo* daun kopi robusta adalah 7,5. Kadar substrat optimum adalah 0,1 M NaNO_3 .
2. Penambahan zat pelarut organik ke dalam medium assay meningkatkan ANR. Kadar optimum pelarut organik n-propanol, n-butanol, dan SDS berturut-turut adalah 2%, 1% dan 0,08%. Penggunaan propanol dan butanol sebagai komponen medium assay kurang efektif dibanding SDS.
3. Perendaman bahan 24 jam sebelum assay dalam larutan penyangga 0,1 M Na-pospat (pH = 7,5) berisi pelarut organik menekan ANR. Perendaman bahan 24 jam sebelum assay dalam larutan penyangga 0,1 M Na-pospat (pH = 7,5) diikuti assay menggunakan 0,1 M Na-pospat (pH = 7,5) berisi 0,08% SDS dan 0,1 M NaNO_3 menghasilkan ANR paling tinggi.
4. Penggunaan irisan daun berukuran $\pm 0,1 \text{ cm} \times 1,0 \text{ cm}$ menghasilkan ANR lebih tinggi dibanding piringan daun (diameter $\pm 1,0 \text{ cm}$).

Daftar Pustaka

- Aslam, M., A. Oaks, and R.C. Huffaker (1976). Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant Physiol.* 58 (4) : 588 — 591.
- Bate, G.C., M.E.R. Meakin, and D.M. Oosterhuis (1978). Effect of environment on nitrate reductase assays in field-grown cotton leaves. *Exp. Agric.* 14 (4) : 317 — 323.
- Beevers, L., and R.H. Hageman (1969). Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20 : 495 — 552.

- Bidwell, R.G.S. (1979) *Plant Physiology*. 2nd Mc.Millan Publ. New York. p. 726.
- Croy, L.I., and R.H. Hageman (1970). Relationship of nitrate reductase activity to grain protein production in wheat. *Crop Sci.* 10 (3) : 280 — 285.
- Dalling, M.G., and R.H. Loyn (1977). Level of activity of nitrate reductase at the seedling stage as a predictor of grain nitrogen yield in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Aust. J. Agric. Res.* 28 (1) : 1 — 4.
- Deckard, E.L., R.G. Lambert, and R.H. Hageman (1973). Nitrate reductase activity in corn leaves as related to yields of grain protein. *Crop Sci.* 13 (3) : 343 — 350
- Eck, H.V., and R.H. Hageman (1974). Nitrate reductase activity in sudangrass cultivars. *Crop Sci.* 14 (2) : 283 — 287.
- Fakorede, M.A.B., and J.J. Mock (1978). Nitrate reductase activity and grain yield of maize cultivar hybrids. *Crop Sci.* 18 (4) : 680 — 682.
- Hartiko, H. (1979). *In vivo* leaf nitrate reductase activity of coconut (*Cocos nucifera* L.) cultivars and hybrids. MS thesis (unpublished). University of the Philippines at Los Banos. p. 88.
- Hog, K., M.B. Hartvigsen, and O.L. Rasmussen (1983). Critical evaluation of the *in vivo* nitrate reductase assay for detection of two nitrate pools in wheat leaves. *Physiol. Plant.* 59 (1) : 141 — 147.
- Huffaker, R.C., and D.W. Rains (1978). Factors influencing nitrate acquisition by plant; Assimilation and fate of reduced nitrogen. *Dalam "Nitrogen in the environment* (Eds. D.R. Nielsen & J.G. Mc Donald). Vol. II. Academic Press, New York. p. 1 — 43.
- Johnson, C.B., W.J. Whittington, and G.C. Blackwood (1976). Nitrate reductase as a possible predictive test of crop yield. *Nature* 262 (5564) : 133 — 134.
- Lilo, C. (1983). Studies of diurnal variation of nitrate reductase activity in barley leaves using various assay methods *Plant Physiol.* 57 (3) : 357 — 362.
- Lin, W.H., and C.H. Kao (1980). Factors affecting *in vivo* nitrate reductase activity in triticale. *Physiol. Plant.* 48 (3) : 361 — 364.
- Mills, D., and H.S. Lips (1984). Nitrate reduction and compartmentation in tomato leaves. I. Nitrate accumulation in leaf sections in aqueous and gaseous medium. *Physiol. Plant.* 61 (1) : 141 — 148.
- Nicholas, J.C., J.E. Harper, and R.H. Hageman (1976). Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). I. Effect of light and temperature. *Plant Physiol.* 58 (6) : 731 — 735.
- Novoa, R., and R.S. Loomis (1981). Nitrogen and plant production. *Plant and Soil* 58 (1 — 3) : 177 — 204.
- Oosterhuis, D.M., and G.C. Bate (1983). Nitrogen uptake of field grown cotton. II. Nitrate reductase activity and petiole nitrate concentration as indicators of plant nitrogen status. *Exp. Agric.* 19 (3) : 103 — 109.
- Perez, J.R., and W.M. Kliewer (1978). Nitrate reduction in leaves of grapevine and other fruit trees. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103 (2) : 246 — 250.

- Purvis, A.C., and R.C. Tieschler (1976). *In vitro* studies of nitrate reductase activity in cotton cotyledon. Effect of Dowes 1-C1 and BSA. *Plant Physiol.* 58 (2) : 95 — 99.
- Singhe, B., V.T. Sapra, and J.A. Petel (1976). Nitrate reductase and its relationship to protein and yield characteristic of triticale. *Euphytica* 25 : 193 — 199.
- Wallace, W. (1973). A nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root. *Plant Physiol.* 52 (3) : 197 — 201.