

Evaluación de la actividad de la enzima nitrato reductasa para el diagnóstico de la nutrición nitrogenada en naranjos¹

Rafael Ruiz S.² y Aldo Norero Sch.³

INTRODUCCION

El análisis de la concentración de nutrientes en los tejidos vegetales es una técnica de uso muy generalizado como medio de evaluar el estado nutricional de las plantas. Sin embargo, en algunos casos, diferencias de producción atribuibles a fertilización nitrogenada no aparecen reflejadas en la concentración de nitrógeno total foliar (Smith, 1966).

Recientemente se ha desarrollado un nuevo método de diagnóstico para nitrógeno, que se basa en la determinación de la actividad de la enzima nitrato reductasa en los tejidos de las hojas (Bar-Akiva y Sternbaum, 1965 a,b; Bar-Akiva *et al.*, 1967; Bar-Akiva *et al.*, 1970 a, b). La acción de esta enzima consiste en reducir los nitratos a nitritos. El ni-

trato es la forma predominante en que el nitrógeno es absorbido y transportado hacia las hojas, en la mayoría de las especies cultivadas. Esta actividad reductora de nitratos está concentrada fundamentalmente en las hojas y en menor grado en las raíces (Sanderson y Cocking, 1964).

La enzima nitrato reductasa es del tipo adaptable, vale decir ella se forma o activa en presencia del sustrato, en este caso el ión nitrato (Mulder *et al.*, 1959). Sin embargo, se sabe que además otros factores de tipo fisiológico y relacionados a la síntesis proteica estarían condicionando su actividad (Beevers y Hageman, 1969).

Bar-Akiva señala que si la actividad enzimática se expresa como la relación entre la cantidad de nitritos producidos al introducir forzosamente a un tejido una solución de nitrato de potasio (ANRi)*, con los que se producen espontáneamente (ANRe)**, el cociente ANRi/ANRe, representaría el déficit de "nitrógeno activo" en los tejidos y tendrá valores altos en los tejidos deficitarios y bajos al aumentar el aporte nitrogenado. Trabajando en base a esta relación, Bar-Aki-

¹Tesis de Grado de Rafael Ruiz S., efectuada como parte de los requisitos para optar al Título de Ing. Agr., M. S. en la Universidad de Los Andes, Venezuela.

Recepción originales: 4 de noviembre de 1976.

²Ing. Agr., M. S., Programa Fertilidad de Suelos, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

³Ing. Agr., Ph. D. CIPIAT. Apartado 219, Mérida, Venezuela.

*ANRi: Actividad de nitrato reductasa inducida.

**ANRe: Actividad de nitrato reductasa endógena.

va (1970 b) llega a sugerir un valor crítico de 1,5 para cítricas. Cabe agregar que el mismo autor trabajando en pasto llegó a un valor crítico similar de 1,4 (Bar-Akiva *et al.*, 1970 a).

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar este método y compararlo al tradicional de nitrógeno total, relacionando los valores analíticos obtenidos en muestras de hojas, con niveles de fertilización nitrogenada y/o producción, en huertos de naranjos.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se desarrolló en Venezuela en dos zonas citrícolas: valles altos de Carabobo y Yaracuy y en los valles de Aragua. Se trabajó con hojas de naranjos de las variedades California y Valencia, provenientes de huertos bajo diferentes condiciones de nutrición nitrogenada, a saber:

1. Ensayo de fertilización con tres dosis de nitrógeno.
2. Ensayo de interacción riego-fertilización nitrogenada.
3. Huertos de alta producción con manejo conocido.
4. Huerto no fertilizado.

I. Muestras

Previamente a enfrentar el objetivo mismo del trabajo se condujeron una serie de pruebas preliminares respecto al proceso analítico y al tipo de material vegetal a ser analizado, por cuanto ciertos aspectos no quedaban bien definidos en la metodología original del autor. En cuanto a la hoja a muestrear, Bar-Akiva recomienda "hojas del flujo de primavera". En las condiciones climáticas de Venezuela, la brotación se efectúa en forma prácticamente continua, de modo que una solución de compromiso práctico y avalado por ciertas experiencias efectuadas señalan que las hojas más adecuadas son aquellas que se encuentran en el sector medio de las ramillas con crecimiento nuevo.

Cada muestra para el ensayo enzimático estuvo constituida por un mínimo de 100 hojas del tipo anteriormente señalado, provenientes de un número variable de árboles entre 4 y 32.

El análisis de N total se efectuó sobre los mismos árboles, en hojas provenientes de ramillas con fruta de acuerdo a Chapman

(1966) y en otros casos sobre ramillas sin fruta, de acuerdo a Smith (1966).

II. Técnica analítica

El procedimiento analítico empleado para el análisis enzimático consistió en:

a) Recortar en hojas frescas discos del limbo foliar, de aproximadamente 3 mm de diámetro hasta completar unos 500 mg de materia verde y separarlos en dos grupos iguales.

b) Introducir un grupo de discos en un tubo de vidrio de aproximadamente 5 cm de alto por 1 cm de diámetro y agregar sucesivamente: 1) agua destilada, 3 ml; 2) Tris buffer (pH 7,4 HCl), 1 ml; 3) Acido succínico 0,1 M, neutralizado con NaOH, 1 ml; 4) Agitación, seguida de la agregación de alcohol etílico 95% v/v, 0,1 ml. Agitación inmediata.

c) Sumergir otro grupo de discos en la misma forma, excepto que se sustituye el agua destilada por una solución de KNO_3 0,25 M.

d) Impregnar los discos al vacío, ejerciendo una succión hasta alcanzar 0,85 atm. en un tiempo aproximado de un minuto; volver a presión atmosférica, dejando entrar aire lentamente; ejercer una nueva succión de 0,85 atm. y mantenerla durante el incubado posterior. Esta operación es posible efectuarla en un desecador conectado a una bomba de vacío, y tiene por objeto permitir una imbibición completa del tejido vegetal.

e) Incubación a 30° de temperatura durante dos horas, en la oscuridad.

f) Determinar químicamente los nitritos (Chapman y Pratt, 1961), no antes de cinco minutos ni después de 30 minutos de haber terminado la incubación y retornado el material a la presión atmosférica.

g) Expresar los resultados en términos relativos dividiendo la concentración de nitritos en las submuestras infiltradas con KNO_3 (ANRi) por las de las no tratadas (ANRe).

III. Establecimiento de valores diagnósticos de la nutrición nitrogenada mediante la técnica enzimática

Para lograr este objetivo se relacionaron los valores del índice ANRi/ANRe con la producción frutal y con la fertilización nitrogenada.

Dado que la producción es función de la edad del árbol, y las muestras han sido obtenidas

nidas en huertos de diferentes edades, se procedió a ajustar dichos valores a la equivalente a una edad de 15 años (que fue la máxima incluida) tomando como base para ello curvas ya establecidas para estas variables (Turrell, 1961).

RESULTADOS Y DISCUSION

La utilidad práctica de una técnica de diagnóstico depende del grado de correlación de los valores analíticos, obtenidos en condiciones estándar de muestreo y análisis, con la condición nutricional de las plantas. Esta última puede estar caracterizada por:

- Cantidad de nutrientes absorbidos por el cultivo.
- Intensidad de respuesta a la fertilización.
- Intensidad y tipo de síntomas de deficiencia o exceso.
- Por la dosis de fertilizante aplicado que aporta el elemento en déficit.
- Por la magnitud de la cosecha.

En este trabajo se han considerado los dos últimos criterios.

Los resultados provienen de las fuentes que se describen a continuación:

1. Ensayo de fertilización de N (Localidad: Agua de Obispo)

Este ensayo consiste en estudiar la influencia de tres niveles de nitrógeno y dos de potasio en la producción. Cada tratamiento fue aplicado a una unidad experimental compuesta de cuatro árboles. Cada bloque compuesto de seis tratamientos se repitió cuatro veces. Los árboles eran de la variedad California, de ocho años de edad. Hasta el momento en que se efectuó el estudio se pudo constatar respuesta a nitrógeno pero no a potasio.

La Figura 1 muestra una relación consistente entre el índice nutricional ANRi/ANRe y la producción obtenida en el mismo ensayo. La producción decrece al aumentar el índice.

La Figura 2 correspondiente al mismo ensayo señala una relación poco clara entre la concentración de nitrógeno total foliar y la producción, aun más, la gran mayoría de los tratamientos cae dentro del rango "bajo", de acuerdo a los estándares de Smith (1966), incluso, los tratamientos de alta fertilización.

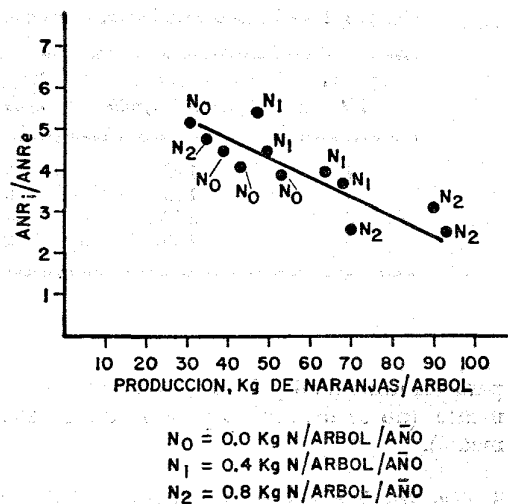


Figura 1 — Correlación entre el índice nutricional ANRi/ANRe y la producción.

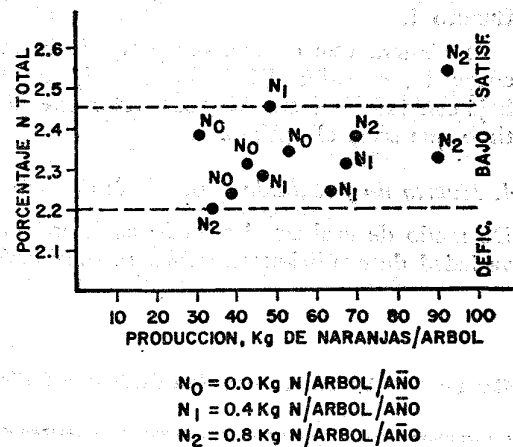


Figura 2 — Correlación entre concentración de nitrógeno y producción.

2. Ensayo de fertilización nitrogenada y riego (Localidad: Cagua)

En este ensayo se eligió aquel tratamiento que asegure un suministro adecuado de agua durante todo el período seco. Dentro de este tratamiento se estaban aplicando distintas dosis de nitrógeno (0; 0,65; 1,30 KgN/árbol/año). Los resultados del índice ANRi/ANRe fueron de: 8,8; 3,3; y 2,3 respectivamente. Los porcentajes de N total fueron de 2,16 y 2,62%

Cuadro 1 — Índices nutricionales en cuatro huertos de óptimo manejo.

Huerto Nº	Fertilización Kg N/árbol/año	Edad años	ANRi/ANRe	N %	Producción Kg/árbol
1	1,45	15	1,50	2,35	191
2	1,75	9	1,36	2,71	168
3	2,18	14	1,64	2,84	188
4	1,00	9	2,14	2,14	166

para las dosis de 0 y 1,3 Kg de N, respectivamente (no se determinó para la dosis intermedia).

3. Huertos de alta producción (Localidad: Carabobo y Yaracuy)

Se consideraron cuatro huertos de óptimo manejo, y que además contaran con un historial registrado de prácticas de fertilización en los últimos años. Los resultados aparecen en el Cuadro 1.

Se observa que cuando el aporte de N es adecuado, el valor del índice ANRi/ANRe baja con valores entre 2,1 y 1,5 valor este último que sería el óptimo.

4. Huerto no fertilizado (Localidad: Cagua)

De modo de evaluar el método en la mayor variedad de condiciones posibles se consideró

un huerto no fertilizado en los últimos seis años. Los resultados fueron de 2,14% de N, valor que está en el límite entre adecuado y bajo. En cuanto al índice ANRi/ANRe éste fue igual a 10,5 señalando claramente la situación de fuerte déficit.

El Cuadro 2 resume las relaciones obtenidas entre dosis de fertilizantes y ambos índices nutricionales en los tres huertos mencionados más arriba. Se observa que el índice enzimático discrimina mejor que el porcentaje de N el aporte de este elemento por fertilización.

La Figura 3 resume las relaciones obtenidas entre los valores relativos de actividad enzimática y producción. En las abscisas figuran cinco escalas superpuestas para huertos de diferentes edades. Se ha diseñado este sistema de representación en razón de que los árboles muestreados fluctuaban en edad entre 8 y 15 años. La capacidad de producción depende

Cuadro 2 — Relación entre fertilización e índices nutricionales.

	DOSIS	$I = \frac{ANRi}{ANRe}$	Situación Nutricional según 1	% N	Situación Nutricional según % N
Ensayo de fertilización (Agua de Obispo)	N ₀	4,42	bajo	2,31	bajo ¹
	N ₁	4,39	bajo	2,32	bajo ¹
	N ₂	3,25	satisfact.	2,36	bajo ¹
Ensayo Riego-Fertiliz. N	N ₀	8,8	muy bajo	2,16	satisf. ²
	N ₁	3,2	satisfact.		
	N ₂	2,2	satisfact.	2,67	satisf. ²
Huertos de alta producción	N ₁	2,14	satisfact.	2,14	bajo ¹
	N ₂	1,50	muy bueno	2,25	satisf. ²
	N ₃	1,36	muy bueno	2,71	satisf. ²
	N ₄	1,64	muy bueno	2,84	satisf. ²

¹Estándar de Smith (1966).

²Estándar de Chapman (1966).

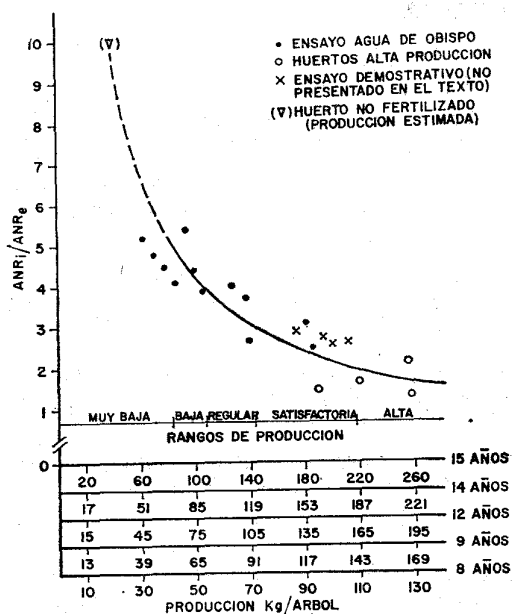


Figura 3 — Valores relativos de actividad enzimática (ANRi/ANRe = 1) en relación a la producción corregida según la edad.

entre otros factores de la edad del árbol, y de esta manera los huertos quedan en situación comparable. La correspondencia de escalas se basó en la relación productividad-edad presentada por Turrell (1961). La curva que relaciona producción con actividad enzimática, se trazó a mano alzada, de modo de com-

pensar la dispersión de puntos. Se observa una buena correlación entre ambas variables; huertos de baja producción tienen valores de actividad enzimática superiores a cinco, y los de alta producción inferiores a dos.

La Figura 4 señala la relación entre N total y producción en los mismos casos. Pone de manifiesto —al igual que en el caso del ensayo de fertilización— una dispersión de valores que no muestra una correlación de valores clara con producción.

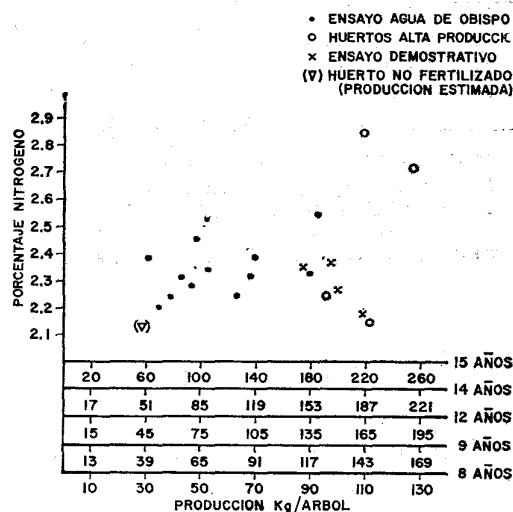


Figura 4 — Relación entre la concentración de nitrógeno en las hojas y la producción.

R E S U M E N

Se evaluó un nuevo método para diagnosticar el *status* nutricional de nitrógeno, basado en la evaluación de la actividad de la enzima nitrato reductasa, y se comparó con el tradicional de medir la concentración de N total. Esta comparación efectuada en hojas de naranjo y en las condiciones climáticas de la zona citrícola de Venezuela mostró ventajas para el primero de los métodos encontrándose una estrecha correlación con niveles de fertilización y producción. Por el contrario el análisis de N total no indicó tan satisfactoriamente estas relaciones.

S U M M A R Y

EVALUATION OF THE NITRATE-REDUCTASE ACTIVITY AS A DIAGNOSTIC TOOL OF ORANGE NITROGEN NUTRITION

Nitrate-reductase activity and total N was measured in orange leaves in order to evaluate the nitrogen *status* of the tree. This work was done in the citrus growing area of Venezuela. Enzyme activity showed a close correlation with fertilization practices as well as yield. Total N was found to be less satisfactory.

LITERATURA CITADA

- BAR-AKIVA, A. and STERNBAUM, J. 1965a. Possible use of the nitrate reductase activity of leaves as a measure on the nitrogen requirements of citrus tree. *Plant and Cell Physiol.*, 6:575-577.
- , and ———. 1965b. Nitrate reduction in citrus tree leaves. *Plant and Soil*. XXIII (1): 141-144.
- , SHAKED, A. and SAGIV, J. 1967. The use of nitrate reductase activity for the appraisal of nitrogen status and productivity of grapefruit orchards trees. *Hort. Sci.* 2 (2): 51-53.
- . 1970b. Chemical and biochemical measurements on plants as a mean of controlling yield and plant performance. The Volcani Institute Agricultural Research, Bet-Dagan, Israel. Series Nº 1752: 211-219.
- , SAGIV, J. and LESHEM, J. 1970a. Nitrate reductase activity as an indicator for asses sing the nitrogen requirements for grass crops. *J. Sci. Ed. Agric.*, 21: 405-407.
- BEEVERS, L. and HAGEMAN, R. H. 1969. Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 20: 495-522.
- CHAPMAN, H. D. 1966. Diagnostic criteria for plants and soils. University of California Press, 640 p.
- , and PRATT, P. F. 1961. Methods of analysis for soils, plants and water. University of California Press. 309 p.
- MULDER, E. G., BOEXMA, R. and VAN VEEN, W. L. 1959. Nitrate reduction in plant tissues. *Plant and soil*, 10: 335-355.
- SANDERSON, G. W. and COCKING, E. C. 1964. Enzymic assimilation of nitrate in tomato Plants. *Plant. Physiol.* 39: 416-422.
- SMITH, P. F. 1966. Leaf analysis for citrus orchards. *In*, Temperate to tropical fruit nutrition (Childers, F. Ed.) Rutgers. The State University, New Jersey. 888 p.
- TURRELL, F. M. 1961. Growth of the photosynthetic area of citrus. Paper Nº 1279. University California Citrus Experiment Station.