EVALUACION DE UNA NUEVA TECNICA PARA EL DIAGNOSTICO DE LA NUTRICION NITRODGENADA EN CITRICAS

POR

RAFAEL RUIZ SCHNEIDER

Tesis para optar al grado de "Magíster Scientiae" en

Suelos y Riego

CENTRO INTERAMERICANO DE DESARROLLO E

INVESTIGACION AMBIENTAL Y TERRITORIAL

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

MÉRIDA - VENEZUELA

AGRADECIMIENTO

A la Dirección de la Fundación Servicio para el Agricultor (FUSAGRI), que hizo posible la realización de esta investigación, al otorgar los medios para el trabajo de laboratorio, movilización hacia los lugares de interés, facilidades en la biblioteca, logísticas, y en cuanto a la publicación de la tesis.

Debo mencionar en forma particular a los Señores Héctor Ayala y Aldo Norero, así mismo a Luis Bascones y José L. Carvallo. A los Ayudantes de Laboratorio Angel Toro y Luis Castillo, al Perito Agropecuario Henry Faneite, al Dibujante Sr. René Croes y a la Secretaria Srta. Teresa Gómez.

También se agradece la colaboración al Ing. Agr. Eddie Ramírez y al Perito Agropecuario Alexis Zeis, de Empacadora de Cítricas (CITRIEMPAC).

Al Centro Interamericano de Desarrollo Integral de Aguas y Tierras CIDIAT), cuya Dirección, otorgó facilidades logísticas, de traslado y el apoyo de su personal.

A los Ings. Agrs. Ganímedes Cabrera y Nilo Rívas, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (U.C.V.).

Al Dibujante R. Perdomo, de la Estación Edafológica del Centro, del Ministerio de Obras Públicas (M.O.P.).

A la Organización de Estados Américanos (O.E.A.), por la beca otorgada y puntualidad en el envío de las cuotas.

Finalmente, y de modo muy especial, a mi esposa por su interminable paciencia en la traducción de mis borradores.

I N D I C E

I. INTRODUCCION 1

II. OBJETIVO 7

III. REVISION BIBLIOGRAFICA 8

A. La concentración de elementos químicos en los tejidos vegetales como método de diagnóstico 8

1. Preparación de la muestra y análisis 8

2. Interpretación de los análisis 10

a) Porta-injertos y variedades 10

b) Tejido empleado 15

c) Posición de la hoja 15

d) Ramillas frutales y no frutales 17

e) Edad de la hoja 19

f) Variabilidad de año en año 21

g) Ciclos vegetativos 24

h) Riego 25

i) Enteracción entre nutrientes 27

j) Muestras representativas 28

3. Confección de patrones y diagnóstico 30

B. La actividad enzimática como método de diagnóstico 31

1. Antecedentes acerca de la enzima nitrato reductasa 34

2. La actividad de la nitrato reductasa como herramienta de diagnóstico 37

a) Relación de la nitrato reductasa con el contenido de proteína y la producción 37

b) La actividad enzimática en relación a deficiencias de microelementos 39

c) La técnica de la nitrato reductasa para el diagnóstico de la nutrición nitrogenada en citrus..... 40

IV. PROCEDIMIENTO 43

A. Investigación de variables operativas en la técnica enzimática 43

1. Muestras 43

2. Técnica analítica 45

B. Establecimiento de valores diagnósticos de la nutrición nitrogenada mediante la técnica enzimática ... 46

C. Comparación entre la técnica enzimática y el análisis de nitrógeno total, como medios de diagnóstico. 46

D. Otras especies cítricas 48

V. RESULTADOS Y DISCUSION 48

A. Variables operativas en la técnica enzimática 49

1. Muestreo 49

a) Tipo de brote o ramilla 49

b) Variabilidad en el muestreo 56

c) Conservación y preparación de la muestra .. 56

2. Técnica analítica 58

a) Medios químicos de incubación 58

1°) Tampón 58

2°) Acido succínico 59

3°) Concentración del substrato 60

4°) Efecto del etanol 62

b) Infiltración 63

c) Tiempo de incubación 68

B. Patrones de diagnóstico en la técnica enzimática .. 70

C. Comparación entre la técnica enzimática y del análisis total de nitrógeno 73

D. Otras especies cítricas 79

1. En limones 79

2. En mandarinas 80

E. Consideraciones generales..... 80

VI. CONCLUSIONES 82

VII. RESUMEN 84

VIII. BIBLIOGRAFIA 87

IX. ANEXOS 92

LISTA DE FIGURAS

1. Variación de la concentración de nitrógeno con la edad en hojas del ciclo de primavera y verano 20
2. Variación de la concentración de nitrógeno con la edad en hojas del ciclo de primavera y verano 20
3. Variación de la concentración de nitrógeno en hojas de acuerdo a la edad, bajo tres dosis de fertilización nitrogenada 22
4. Variación de la concentración de nitrógeno en hojas de brotes frutales de acuerdo a la edad 22
5. Correlación entre producción y concentración de nitrógeno en hojas de Grape fruit 29
6. Standards propuestos para nitrógeno 32
7. Standards propuestos para potasio 33
8. Efecto de la luz sobre la actividad de la N.R. en discos de hojas de maíz 38
9. Correlación entre cosecha y ANRi, en hojas de Grape Fruit de un ensayo de fertilización 42
10. Efecto del aporte de nitrógeno en la relación ANRi/ANRe, en árboles nuevos de Grape Fruit 42
11. Relación entre fertilización nitrogenada, concentración de nitratos y actividad endógena de la nitrato reductasa 44
12. Relación entre fertilización nitrogenada, cosecha y ANRi y ANRe 44
13. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre la relación ANRi/ANRe en pastos 44
14. Relación entre edad del árbol y producción 47
15. Actividad de la N.R. a lo largo de brotes de árboles nuevos 55
16. Efecto de la concentración del substrato en la actividad de la nitrato reductasa 61
17. Efecto de la succión en la producción de nitritos en dos tratamientos de fertilización nitrogenada 66

18. Producción de nitritos en función del tiempo de incubación 69
19. Producción de nitritos en función del tiempo, en tacaco 69
20. Valores relativos de actividad enzimática (ANRi/ANRe)=I) en relación a la producción 72
21. Rendimiento vs. tratamiento de nitrógeno en el ensayo en "Agua de Obispo" 74
22. Correlación entre el índice nutricional ANRi/ANRe, y la producción 75
23. Correlación entre concentración de nitrógeno y producción 75
24. Relación entre la concentración de nitrógeno en las hojas y la producción 77

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Rangos de concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en hojas de árboles Valencia, creciendo sobre diferentes patrones.	11
2	Efecto de diferentes patrones en la composición mineral de hojas Valencia.	12
3	Efecto de diferentes patrones en la composición de árboles Valencia y California.	13
4	Efecto de injertos y portainjertos en la composición mineral de las hojas.	13
5	Efecto de la relación injerto - portainjerto en la composición mineral de las hojas.	14
6	Composición mineral de hojas de naranjo pineapple a lo largo del brote (%) .	16
7	Efecto de la fructificación en la composición mineral de hojas cítricas de 5 meses de edad del ciclo de primavera.	17
8	Efecto de brotes con o sin fruto en composición mineral.	18
9	Variación "año a año" en la concentración de nitrógeno y potasio en hojas cítricas.	23
10	Efecto del crecimiento de verano en la composición nitrogenada de las hojas del ciclo de primavera.	24
11	Efecto del déficit hídrico en la concentración de nitrógeno en hojas de aguacate.	26
12	Efecto de déficit hídrico en la concentración de potasio y fósforo en hojas de tres especies.	27

13	Efecto de la infiltración en la actividad de la N R, en hojas de tomate que crecieron con bajo aporte de nitrógeno.	36
14	Efecto de deficiencias nutricionales en la actividad de metalo-enzimas, medida en hojas de cítricas.	40
15	Efecto de la fertilización nitrogenada en la actividad de la nitrato reductasa y el contenido de N total en hojas de Grapefruit.	41
16	Efecto de la fertilización nitrogenada en la cosecha, nitrógeno total y la relación ANRi/ANRe, en naranjas.	43
17	Actividad de la nitrato reductasa en hojas provenientes de brotes viejos uniformes, en árboles con tres tratamientos de nitrógeno.	50
18	Actividad de la nitrato reductasa en tres tipos de hojas.	51
19	Efecto del fertilizante nitrogenado sobre la actividad de la nitrato reductasa medida en tres fechas sucesivas (nM/g/2h).	53
20	Actividad de la nitrato reductasa en hojas en diferente posición en el brote nuevo, en árboles Valencia de dos y medio años.	54
21	Variabilidad por muestreo y entre árboles	56
22	Efecto del tiempo de conservación de la muestra en refrigeración sobre la actividad de la nitrato reductasa (nM/g/2h).	57
23	Efectos del ácido succínico en la producción de nitritos.	59
24	Efecto de la concentración de KNO_3 en la producción de nitritos.	60
25	Efecto del etanol sobre la producción de nitritos (micro-mili-moles/g/2h).	62

26	Producción de nitritos en relación al tiempo post-incubación en que se efectúa el trasvasado de la alícuota.	63
27	Efecto del aumento de succión en forma manual mediante jeringa en la producción de nitritos.	64
28	Efecto de la succión ejercida mediante bomba de vacío en la producción de nitritos.	64
29	Efecto de la succión sobre la relación ANRi/-ANRe, en dos tratamientos de nitrógeno.	67
30	Efecto de succiones múltiples en la producción de nitritos.	67
31	Comparación en la producción de nitritos (nM/g/2h) bajo dos condiciones de incubación en dos tratamientos de fertilización nitrogenada.	70
32	Relación entre fertilización e índices nutricionales.	76
33	Actividad de la nitrato reductasa en dos tipos de hojas en limones.	79
34	Actividad de la nitrato reductasa, en hojas jóvenes de mandarina.	80

I. INTRODUCCION

El cultivo de las cítricas ocupa el segundo lugar en el panorama frutícola de Venezuela, solamente superada por el cultivo de bananas (plátanos y cambures). El área ocupada por la citricultura en 1972, fué de 31.146 Has., con una producción total de 209.950 Tm., cuyo valor se sitúa en alrededor de 61 millones de bolívares*.

Dentro de éste panorama, los Valles Altos de Carabobo y Yaracuy, se destacan del resto por estar ubicados en una condición ecológica privilegiada (altura que fluctúa entre 600 y 900 m.), y que produce una calidad de fruta, interna y externamente muy superior a la del resto de Venezuela (Salibe, A., 1972). La productividad media de los huertos en la zona se puede estimar en 1.3 - 1.5 Kg/m^2. (Pinto, M., et al., 1971), superiores a los 0,65 Kg/m^2., que corresponde al valor promedio para todo el país (Salibe, A., 1972), pero aún muy baja comparada a índices de producción extranjeros, que son del órden de 5 Kg/m^2. (Smith, P. F., 1966). Sin embargo, exísten huertos en los cuales se están obteniendo producciones similares a ésta 1/, lo cual indíca que son factores manejables los que están incidiendo en las bajas producciones obtenidas, más que las circunstancias ecológicas.

Dentro de las posibles causas de ésta situación, un aspecto fundamental sería el de fertilización. En general, exíste consenso de que ésta aumenta la productividad de los huertos. Sin embargo, el abonado se efectúa de ordinario sin un diagnóstico previo de las probables deficiencias minerales, y por ello no sorprende la gran variación de tipo y dosificación de fertilizantes, aún bajo condiciones agroecológicas similares, como se aprecia en los datos tabulados a continuación:

---

* Anuario Estadístico Agropecuario. M.A.C., 1972

1/ Comunicación personal: Ing. Eddie Ramírez. Proyecto Cítricas FUSAGRI.

Fertilizante usado 1/	Kgs/árbol por año	Porcentaje de huertos que la emplean
S A	3,0	2,7
E	9,9	8,1
10-10-15	3,9	24,3
12-6-12	8,0	2,7
14-0-15	6,0	2,7
15-10-15	6,0	2,7
E y 10-10-15	31,5 3,1	8,1
S A y 10-10-15	1,9 1,7	13,5
U y 10-10-15	6,0 4,0	2,7
N A C y 10-10-15	5,0 5,0	2,7
S A y 6-12-18	2,0 1,0	2,7
E y S A 10-10-15	23,9 2,4	18,9
S A, S K, S P T.	1,2	2,7
F A S A, S K E	2,0 2,0 50,0	2,7
S A, U y 6-12-18	5,0	2,7

1/ SA; sulfato de amonio, E; estiercol, U; úrea, NAC; nitrato de amonio cálcico, SK; sulfato de potasio, SPT; superfosfato triple, FA; fosfato de amonio.

Entre los nutrientes requeridos por las plantas cultivadas, el nitrógeno suele provocar uno de los mayores aumentos en la producción y crecimiento de cítricas, como lo atestiguan numerosos trabajos efectuados al respecto. En este cultivo, el nitrógeno debe ser agregado anualmente debido, por una parte, a la gran extracción por frutas, hojas y ramillas, y por otra, a que es un elemento generalmente escaso o de bajo aprovechamiento en los suelos.

La técnica más frecuentemente usada para diagnosticar el estado de la nutrición del nitrógeno en frutales, consiste en medir la concentración de este elemento en tejidos vegetales, particularmente hojas. Esta técnica se basa en dos premisas fundamentales: la primera, que existe una correlación positiva entre la cantidad de nutriente suministrado y la concentración del elemento en hojas u otros tejidos vegetales. La segunda, que dentro de ciertos límites, exíste una correlación positiva entre la concentración del elemento en la planta y el crecimiento y producción. Estas conclusiones deben ser ajustadas por vía empírica, en base a resultados obtenidos en diferentes condiciones climáticas, edáficas, de variedades, sistemas de muestreo, etc.. En estos trabajos se busca correlacionar la concentración del elemento en la hoja con la sintomatología de carencia, con el desarrollo foliar, la calidad del producto, u otro tipo de apreciación cualitativa, siendo pocos los investigadores que hayan obtenido correlaciones directamente con la producción. Las relaciones así establecidas han experimentado un perfeccionamiento lento con el transcurso del tiempo, a medida que aumentaba la información experimental. Sin embargo, la limitación de este ajuste empírico radica en que los resultados pueden aplicarse con cierta certeza sólo en las condiciones edafoclimáticas, a las variedades, al sistema de muestreo y otras restricciones que se han establecido. Incluso se ha expresado la opinión (Smith, P. F. 1966)

de que "todos los standards analíticos deben ser calibrados en ensayos de campo bien diseñados y de larga duración en las diferentes regiones", y de que los experimentos efectuados bajo condiciones controladas de invernadero, no son concluyentes sino que aún pueden llevar a conclusiones erróneas.

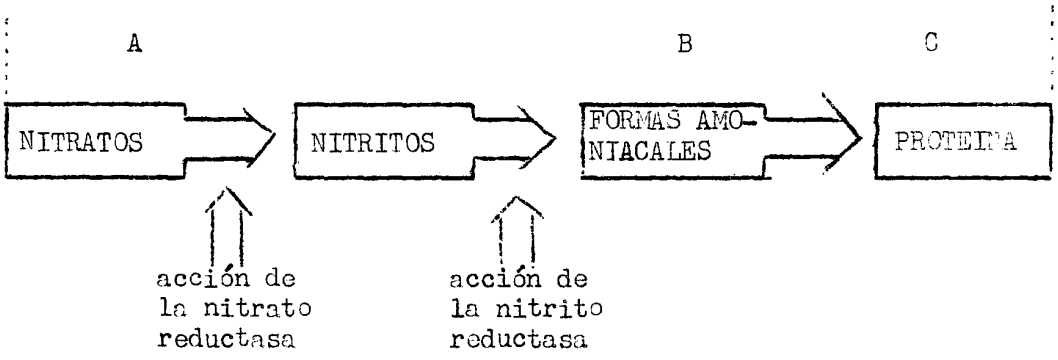
Por lo tanto, uno de los caminos que se sigue en aquellas regiones en que se carece de información de tantos años, es adptar los valores standards desarrollados en otras regiones, pero semejantes en cuanto a clima, variedades, etc., mientras se realizan experiencias para ajustar mejor dichos valores a las condiciones particulares. Es probable que si se ha hecho una buena elección en cuanto a los standards a considerar, en muchos casos los valores que se obtengan no difieren mucho de aquellos. Esto se comprueba al revisar trabajos en diferentes regiones geográficas y dentro de un régimen climático similar, en los cuales se observa un cierto concenso, particularmente en cuanto a valores deficitarios. Desgraciadamente, toda la información respecto a cítricas proviene de regiones subtropicales, mediterráneas y templadas, donde se concentra la producción mundial, siendo muy escasa o nula la información en zonas tropicales.

Dentro de esta situación, el nitrógeno que es el elemento más importante, y en muchos casos el único de que haya que preocuparse, es el que ofrece la correlación más incierta con respecto a producción y otras características vegetativas. Comunmente ocurre que cosechas excepcionalmente altos aparecen asociados a valores "bajos" de nitrógeno según el análisis químico; en otros casos ocurren diferencias de producción atribuíble a una fertilización nitrogenada, y ésta no aparece reflejada en la concentración foliar (Smith, P. F., 1966). El análisis de nitrógeno total, en un tejido dado, y en un

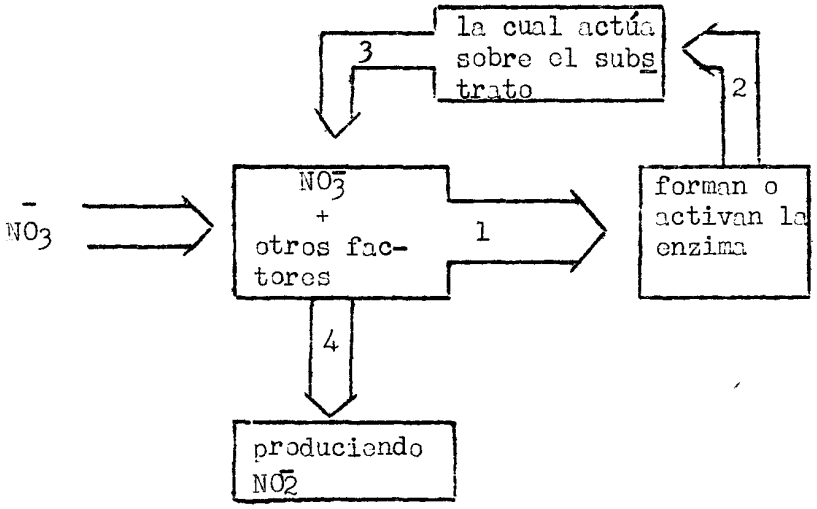
momento dado, representa una situación nutricional más bien estática, contraria a la dinámica propia de la nutrición mineral, que involucra absorción, translocación y crecimiento contínuo del frutal, procesos estos que afectan directamente la concentración de elementos nutritivos en los tejidos vegetales. De acuerdo a estos conceptos, el análisis total reflejará una condición general respecto a la nutrición nitrogenada y no siempre será un buen estimador de la suficiencia de este elemento, respecto a cosechas futuras.

La actividad enzimática como factor indicativo del estado nutricional se ha venido desarrollando en los últimos años, pero solamente un investigador lo ha propuesto claramente como una técnica que permitiría evaluar mejor la condición nutricional en cultivos de interés agrícola. Esta técnica ha sido propuesta en forma todavía provisional para nitrógeno, en cítricas y pastos, obteniéndose resultados promisorios.

La acción de la enzima reductasa del nitrógeno, la nitrato reductasa, presente en el tejido foliar consiste en reducir a nitritos los nitratos, que es la forma en que el nitrógeno es absorbido y transportado hasta las hojas. Este es un paso previo a su transformación en formas amoniacales intermedias que finalmente son incorporadas como proteína, tal como aparece en el esquema siguiente:



Existen muchas pruebas de que la nitrato reductasa es una enzima de tipo "adaptable"; vale decir que ella se forma o activa (no está bien claro) en presencia del substrato, en este caso el ion nitrato. También se sabe que otros factores de tipo fisiológico y relacionados a la síntesis de proteína, estarían relacionados a su actividad. De esta forma el esquema anterior (parte A), se transformaría en el siguiente:



Como conclusión de este esquema, se puede apreciar que si el tejido está deficiente en nitrógeno, la actividad de la enzima sería baja; si el suministro aumenta, habría mayor formación de enzima y la mayor actividad de ésta conducirá a una mayor producción de nitritos, a expensas de los nitratos que se reducen.

Los primeros trabajos se basaron probablemente en estas ideas, y los resultados no fueron muy concluyentes, por cuanto la actividad de las enzimas es susceptible de modificarse por factores del medio ambiente o de origen fisiológico, los cuales señalan en el esquema como "otros factores".

Posteriormente el método ha sido perfeccionado, expresando los resultados en términos relativos, es decir, relacionando los nitritos producidos en el tejido foliar al introducirle forzadamente una solución de nitrato de potasio (ANRi), con los que se producen espontáneamente (ANRe). Dicha relación ANRi/ANRe, representaría entonces el déficit de "nitrógeno activo" en los tejidos. Tendrá valores altos en tejidos deficitarios en nitrógeno y bajos si mejora el aporte nitrogenado. De esta manera se espera que cualquier otro factor ecológico que haya influído sobre la actividad de la enzima, afectará por igual al tejido intacto y al que fué infiltrado artificialmente con la solución de nitrato de potasio.

Aparentemente, la determinación de la actividad enzimática, que es un valor integrado por factores fisiológicos, del medio ambiente y sus interacciones, puede diferenciar entre la fracción del nitrógeno metabólicamente activa y la inactiva. De esta manera, dicha medición se efectúa sobre factores dinámicos que evaluarían mejor el estado nutricional presente, y más directamente vinculado al desarrollo y producción próxima de los árboles.

II. OBJETIVO

El propósito de la presente tesis es evaluar la técnica enzimática de la nitrato reductasa para diagnosticar el estado de la nutrición nitrogenada en cítricos.

III. REVISION BIBLIOGRAFICA

A. La concentración de los elementos químicos en tejidos vegetales como métodos de diagnóstico.

Ya ha sido señalado en forma general que existe una serie de restricciones y condiciones sobre las cuales son válidos los postulados del análisis foliar convencional. Al respecto, se han efectuado trabajos muy completos referentes a cítricas (Smith, P. F., 1966 y Chapman, H. D., 1966). La que sigue pretende ser una revisión crítica, estudiando mejor aquellos puntos conflictivos, y centrando la atención fundamentalmente en el nitrógeno. Previamente se hace un somero análisis de la metodología química y tratamiento de la muestra.

1. Preparación de la muestra y análisis.

Una vez colectada la muestra en el campo, debe guardarse en bolsas de material poroso, preferentemente abiertas, o si se trata de bolsas de polietileno, habría que guardarlas en un refrigerador portátil. Estas condiciones no son muy rígidas, y pueden variar de acuerdo a la condición climática o el tiempo que demore el traslado al laboratorio. En todo caso, lo que se persigue con estas medidas es evitar pérdidas de algunos nutrientes que ocurrirían si se descompone la materia vegetal por efecto de la humedad y del calor. Esto puede afectar particularmente al nitrógeno. La muestra debe guardarse en refrigerador a una temperatura de 4 - 5°C., en cuyo caso puede almacenarse por un tiempo considerable. Sin embargo, es conveniente lavarla, secarla y molerla lo antes posible, para evitar cambios químicos y biológicos apreciables. El lavado en el caso del nitrógeno es simple: agua corriente con detergente y enjuague con agua destilada. Además, en el caso de cítricas, la posibilidad de pérdida de elementos durante el lavado son escasas, por la naturaleza cerosa y coroácea de las hojas.

El secado se efectúa en la mayoría de los casos a 65-70°C., hasta peso constante (24-48 hrs.). No obstante, hay divergencia de opiniones al respecto; pués algunos investigadores recomiendan secar a 105°C. Steyn, W. J. A.,(1961) estudió el efecto de la temperatura y del tiempo de secado en hojas de cítricas ya molidas. Sus resultados aparecen tabulados a continuación:

Tiempo de secado horas	Pérdida de Peso (%) 65°C	105°C
2	4.09	5.79
4	4.25	5.92
8	4.35	5.94
16	4.40	6.30
24	4.42	6.35
48	4.47	6.48
96	4.64	6.68
168	4.64	7.16

Se observa que el peso se hace aproximadamente constante desde las 24 horas, tanto a 65°C, como a 105. Además, se advierte que a 105°C se perdió un 2% más de peso, que a 65°. En este caso, las diferencias de los resultados analíticos serían sin embargo, pequeñas: una muestra por ejemplo, con 2.0% de nitrógeno, secada a 105°C, excedería en 0.04% a la misma muestra secada a 65°. No obstante lo anterior, el autor citado antes, afirma que el secado a 105°C., promovería la descomposición térmica del material, e implicaría pérdida de algunos elementos.

Terminado el secado, se procede a moler el material, lo cual se realiza habitualmente en forma mecánica (molino). Con respecto al nitrógeno, no se requieren en esta fase precauciones especiales en relación con contaminaciones metálicas, como es el caso del análisis de elementos menores. La muestra molida se almacena en frascos herméticos en lugar seco y fresco. Antes de realizar

los análisis, conviene volver a secar el material.

La forma en que de ordinario se extrae el nitrógeno orgánico es mediante el procedimiento de Kjeldahl: oxidación de la materia orgánica con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores u otros oxidantes (sulfato de cobre, selenio, agua oxigenada, etc.). Algunos autores incorporan al análisis las formas inorgánicas de nitrógeno (nitritos), previa reducción a formas amoniacales con ácido salicílico (Chapman, H. D. y P. F. Pratt, 1961., Black, C. A., 1963).

2. Interpretación de los análisis

Los resultados del análisis foliar no sólo dependen directamente de la nutrición mineral de los cultivos, sino también de variados factores ambientales y fisiológicos que lo condicionan. La interpretación de los valores analíticos por lo tanto, no es sencilla, y requiere considerar ciertas variables entre las cuales cabe destacar las siguientes:

a) Portainjerto y variedades

Los primeros trabajos efectuados a este respecto, señalaron una gran influencia del tipo de patrón empleado en la composición mineral de las hojas de la copa. Así, Embleton, (1945), en un extenso trabajo comparó la composición mineral de hojas de árboles Valencia, que crecieron sobre 30 diferentes patrones. Esta comparación la efectuó en "hojas maduras libres de moteados" (deficiencia de cinc), en huertos bajo condiciones de suelos homógéneos de "buena fertilidad", y en los cuales el riego se efectuó en forma normal.

Los resultados en el caso del nitrógeno tuvieron una variación en concentración desde 2,01% hasta 2,73%, siguiendo la distribución que señala el Cuadro 1.

Cuadro 1. Rangos de concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en hojas de árboles Valencia, creciendo sobre diferentes patrones.

	Rangos de nitrógeno			
N %	2.00 - 2.19	2.20 - 2.39	2.40 - 2.59	2.60 - 2.79
Nº de casos	5	17	7	1

	Rangos de fósforo					
P %	0.10-0.11	0.11-0.12	0.12-0.13	0.13-0.14	0.14-0.15	0.15-0.16
Nº de casos	3	12	10	2	1	2

	Rangos de potasio			
K %	0.55 - 0.65	0.65 - 0.75	0.75 - 0.85	0.85 - 0.95
Nº de casos	14	8	3	7

Además el calcio presentó una variación desde 4.45% hasta 6.64%, el magnesio varió desde 0.289% en algunos patrones hasta 0.511% y el azufre varió desde 0.222 a 0.319%.

Concluye el autor que el efecto del patrón es muy importante, por cuanto las distintas propiedades de los diferentes sistemas radiculares producirían una diferencia en cuanto a facilidades de absorción, lo que se manifiesta en la composición foliar. En este trabajo no se menciona la edad de los árboles.

En otro trabajo efectuado en esa época por Smith et al. (1940), se concluye también que el patrón es determinante en la composición mineral de las hojas del injerto, al influir sobre la selectividad de absorción de los diferentes iones en el suelo. En este caso se comparó la concentración de macro y micro nutrientes en hojas de seis meses, del ciclo de primavera, del brote sin fruto, de árboles Valencia que crecieron en seis diferentes patrones. La fertilización fué completa, incluyéndose macro y micro elementos.

Los resultados obtenidos fueron los señalados en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Efecto de diferentes patrones en la composición mineral de hojas de Valencia.

	Concentración de nutrientes en hojas %				
Patrones	N	P	K	Ca	Mg
Nar. agrio	2.55	0.136	2.11	2.26	0.483
Grapefruit	2.56	0.141	2.62	2.11	0.369
Cleopatra	2.50	0.140	1.97	2.33	0.482
Nar. dulce	2.63	0.150	2.30	2.16	0.408
K. Citrange	2.81	0.145	1.76	2.41	0.514
Limón Rug.	2.74	0.141	1.18	2.44	0.510
D.M.S. 5%	0.13		0.22	0.20	0.049
D.M.S. 1%	0.17	0.010	0.30	0.26	0.066

Este autor en sus conclusiones señala que el patrón tiene efecto de considerable importancia en la composición mineral de las hojas, y que se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a nitrógeno, potasio, calcio, magnesio. Diferencias más amplias se obtuvieron en cuanto a la concentración de microelementos.

La menor variabilidad que señalan los resultados de Smith y Reuther, respecto a los de Haas se deberían a una selección más rigurosa de las muestras.

Chapman y Brown (1950) estudiaron el efecto de diferentes patrones sobre la composición mineral de hojas Valencia y California. En este caso, los árboles utilizados fueron de mayor edad, y se tomó la hoja del ciclo de primavera del brote frutal. Sus resultados aparecen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Efecto de diferentes patrones en la composición mineral de árboles Valencia y California.

Patrón	nitrógeno		fósforo		potasio		calcio		magnesio	
	V+	C	V	C	V	C	V	C	V	C
Nar.dulce	2.37	2.91	0.105	0.126	0.49	0.90	5.97	4.83	0.40	0.37
Nar.agrio	2.20	2.79	0.096	0.120	0.42	0.80	6.75	5.43	0.44	0.37
Grapefruit	2.24	2.79	0.097	0.124	0.53	1.04	6.49	5.31	0.37	0.35
L. Rygoso	2.63	2.85	0.114	0.120	0.42	0.64	5.35	4.86	0.48	0.45

+ V: Valencia; C: California

Lo interesante de estos resultados en árboles de mayor edad, es que se observa en ellos mayor efecto de la variedad que del patrón sobre la composición mineral, especialmente en el caso de nitrógeno y potasio, que son notablemente más altos en árboles de variedad California. El autor concluye que esta diferencia se debería más a una mayor habilidad para absorberlos, que a un mayor requerimiento o necesidad.

Wallace et al (1952), por su parte trabajando con hojas provenientes de plantas jóvenes, concluye que tanto el injerto como el portainjerto influye significativamente en la composición mineral de las hojas, según se aprecia en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Efecto de injertos y portainjertos en la composición mineral de las hojas.

	INJERTOS		
Portainjerto	Limón rugoso	Naranja Valencia	Marsh Grape fruit
Limón rugoso	0.93	1.14	1.24
Naranja dulce	1.29	1.54	1.63
Grape fruit	1.47	1.63	2.24

D.M.S. al 5%: 0.21

Embleton et.al (1960), en experiencias similares, demostró que ciertas combinaciones injerto - portainjerto, producían árboles más o menos resistentes a toxicidades y deficiencias. Así, por ejemplo, una determinada relación injerto - portainjerto produjo una concentración de boro mucho menor que otras, y mostró comparativamente mayor resistencia a la toxicidad de este nutriente. Además, las concentraciones a las cuales aparecerían síntomas de exceso o deficiencia variaron de acuerdo a la combinación injerto - portainjerto.

Benito, Ruiz y Zuñiga (1970) observaron en huertos de manzanos que ciertas variedades mostraban síntomas de deficiencia de magnesio y cinc, mientras que otras variedades injertadas sobre patrones iguales, no los mostraban. Estos autores no encontraron diferencias en la concentración de dichos elementos en las hojas, y sugirieron que el injerto (variedad) era un factor determinante en la composición foliar de las hojas.

Gallo, J. R., et.al., (1960) en Sao Paulo, Brasil, comparó la composición mineral de hojas de árboles de las variedades Baianinha (California) y Pera, de 14 años que crecían sobre distintos patrones. Las muestras consistieron en hojas de brotes frutales y sus resultados aparecen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Efecto de la relación injerto - portainjerto en la composición mineral de las hojas.

Porta injerto	C O P A					
	nitrógeno		fósforo		potasio	
	B+	P	B	P	B	P
naranja pera	2.69	2.51	0.131	0.121	2.27	1.36
mand. cleopatra	2.67	2.40	0.129	0.120	1.86	1.19
naranja caipira	2.77	2.43	0.121	0.116	1.94	0.93
lima oravo	2.71	2.40	0.119	0.116	1.77	0.81
limón rugoso nacional	2.70	2.28	0.117	0.109	2.01	0.71

+ B: Baianinha; P: Pera

Se observa que el patrón influyó poco en árboles en plena producción. En cambio, la variedad si determinó diferencias notables en las concentraciones de nitrógeno y potasio en las hojas. Estas fueron más altas en la variedad Baianinha, cualquiera fuera el patrón utilizado.
En resúmen, an árboles en producción, el injerto parece determinar en mayor grado la composición mineral en hojas. Los distintos trabajos muestran grandes diferencias entre las variedades que se utilizan como injerto. No obstante, muchos autores consideran que dichas diferencias no implícan requerimientos nutricionales diferentes, ni standards distintos para definir su condición nutricional (Smith, P. F., 1966). Otros autores, por el contrario, sí las consideran (De Villiers, J. I. y C. I. Beyiers, 1961).

b) Tejido empleado

Hay consenso mayoritario en que el tejido que mejor representa el estado nutricional de los árboles es la hoja, Además, desde un punto de vista práctico tienen la ventaja de que se puede tomar fácilmente del árbol, sin daño para éste. Sólo en pocas especies y en algunos nutrientes se ha visto que el análisis de pecíolos puede tener mayores ventajas. Chapman, H. D. y S. M. Brown, (1950) compararon la concentración de nutrientes en pecíolos y lámina, y concluyeron que esta última era más sensible que los pecíolos, como indicadora del suministro de nutrientes provocados por diferentes tratamientos fertilizantes.

c) Posición de la hoja

La concentración de nutrientes varía de acuerdo a la posición de la hoja en la ramilla. Esta variación tiene según

Smith (1966), la tendencia que se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Composición mineral de hojas de naranjo pineapple a lo largo del brote (%)[+].

Posición hoja	N	P	K	Ca	Mg
2a.	2.35	0.17	1.95	1.59	0.38
4a.	2.35	0.16	2.00	1.63	0.37
6a.	2.47	0.16	2.00	1.61	0.38
8a.	2.50	0.17	2.14	1.60	0.38
10a.	2.52	0.16	2.27	1.58	0.37

[+] Hojas de 2 meses del brote de verano, sin fruta.

Se observa una clara tendencia al aumento de nitrógeno y potasio hacia las hojas basales, mientras los restantes elementos no acusan mayor variación. Koo et al, (1955), concuerdan con los resultados de Smith en cuanto al potasio, pero encontraron una tendencia inversa para el nitrógeno. Estos autores utilizaron hojas de 4 - 5 meses, es decir, más viejas que las anteriores, pero en brotes similares. Otros investigadores (Embleton et al, 1963), encontraron muy pequeñas diferencias en la concentración de nutrientes en diferentes hojas de una ramilla.

Los datos no son por lo tanto consistentes. No obstante muchos investigadores recomiendan arbitrariamente tomar la hoja media del brote no frutal con el fin de estandarizar la muestra. Los autores que prefieren utilizar brotes frutales recomiendan tomar cualquier hoja cercana al fruto, siempre que corresponda al ciclo de primavera (Chapman, H. D., 1960).

d) Ramillas frutales y no frutales

Las experiencias demuestran que las hojas de ramillas frutales difieren sustancialmente de las hojas de ramillas no frutales, en cuanto a composición mineral. Esta variación es consistente, con muy pocas excepciones, se observa una misma tendencia en la concentración de nutrientes, cualquiera sea la variedad o relación injerto - portainjerto. El trabajo probablemente más completo al respecto fué efectuado por Embleton et.al, (1963), quienes compararon 5 tipos de hojas en brotes con y sin fruto, en dos variedades, Valencia y California. Parte de los resultados obtenidos por estos investigadores aparecen en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Efecto de la fructificación en la composición mineral de hojas cítricas de 5 meses de edad del ciclo de primavera.

Tipo de hoja		VALENCIA			CALIFORNIA		
		N	P	K	N	P	K
No frutal	Terminales	2.36	0.128	0.86	2.81	0.151	1.77
	basales	2.26	0.128	0.90	2.49	0.122	1.73
frutal	Adyacente al fruto	1.53	0.083	0.38	2.30	0.108	1.04

A juicio de estos autores, las diferencias acusan el efecto competitivo que ejerce el fruto con respecto a las hojas por los nutrientes. Las concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio, son notablemente menores en los brotes con fruta en ambas variedades. Con respecto a otros nutrientes, que no se señalan en el Cuadro 7, se observaron efectos diferentes. Por ejemplo, la concentración de calcio y magnesio fué mayor

en hojas de ramas frutales, mientras que la concentración de micronutrientes no se vió muy afectada en estos tres tipos de hojas del ciclo de primavera, al menos en la variedad California.

Estos resultados sirven para ilustrar las dificultades que plantean para el diagnóstico las muestras provenientes de diferentes tipos de brotes; en el Cuadro 7, se observa una concentración de nitrógeno en la variedad Valencia, de aproximadamente 2,30%. Este valor es casi igual a 2,40% que según Smith y Reuther, indicaría un nivel adecuado para hojas de cuatro a siete meses en ramillas no frutales. Por su parte, la concentración en hojas de ramillas frutales fue de 1,50%. Para este tipo de hojas, ese valor correspondería, según las experiencias y criterios de Chapman a una condición francamente deficiente.

Otro investigador (Harding, R. B., et.al., 1962), tomaron hojas de cinco meses en 22 huertos representativos de California de ambos tipos de brotes y obtuvieron resultados semejantes (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de brotes con o sin fruto en composición mineral.

	N	P	K	Ca	Mg	S	Cl	Na
1 hojas del brote sin fruto	2.60	0.118	0.950	4.54	0.278	0.398	0.060	0.076
2 hojas del brote con fruto	2.19	0.096	0.671	4.94	0.310	0.369	0.104	0.072
exceso o déficit de 1 respecto a 2	16%	19%	30%	-9%	-11%	8%	-57%	6%

Se observa que la concentración de nitrógeno, fósforo, potasio y azufre, resultó significativamente mayor en hojas de brotes sin frutos. La concentración de calcio y magnesio fué por el contrario notoriamente mayor en hojas cercanas al fruto.
Por otra parte Chapman, et al., (1950), han informado casos en los cuales el potasio no acusaba igual tendencia.

e) Edad de la hoja

Este factor afecta fuertemente la composición mineral de las plantas. Por lo tanto, es preciso conocer la variación en concentración mineral en función del tiempo en forma precisa, para decidir la edad más conveniente de la hoja, por muestrear. Las figuras 1 y 2, ilustran los resultados de experiencias efectuadas al respecto en California y Florida. Ellas demuestran una tendencia semejante en lo que a concentración de nitrógeno se refiere. Se observa que la concentración de este elemento decrece con la edad para estabilizarse aproximadamente a los tres meses en un caso, y a los cinco en el otro. Posteriormente, se acusa una nueva, aunque leve, tendencia a decrecer.
Sin embargo, al variar las condiciones climáticas se producen cambios en los ciclos vegetativos que alteran estas tendencias. Así, en cítricas en Sao Paulo (Brasil), Gallo, et all, (1960), en un experimento con tres niveles de fertilización nitrogenada en árboles variedad Baianinha, de trece años encontró una tendencia muy diferente a las anteriores. En esta zona, ubicada en la latitud 22 aproximadamente, el ciclo de crecimiento vegetativo se inicia a comienzos de Agosto (ciclo de primavera), y ocurren otros ciclos menores en Diciembre y Marzo. En este experimento las hojas se tomaron a partir de 1 $\frac{1}{2}$ mes de edad, en brotes frutales. La

Figura N° 1 Variación de la Concentración de Nitrógeno con la Edad en Hojas del Ciclo de Primavera y Verano. (Cameron, S.H., et al., 1952)

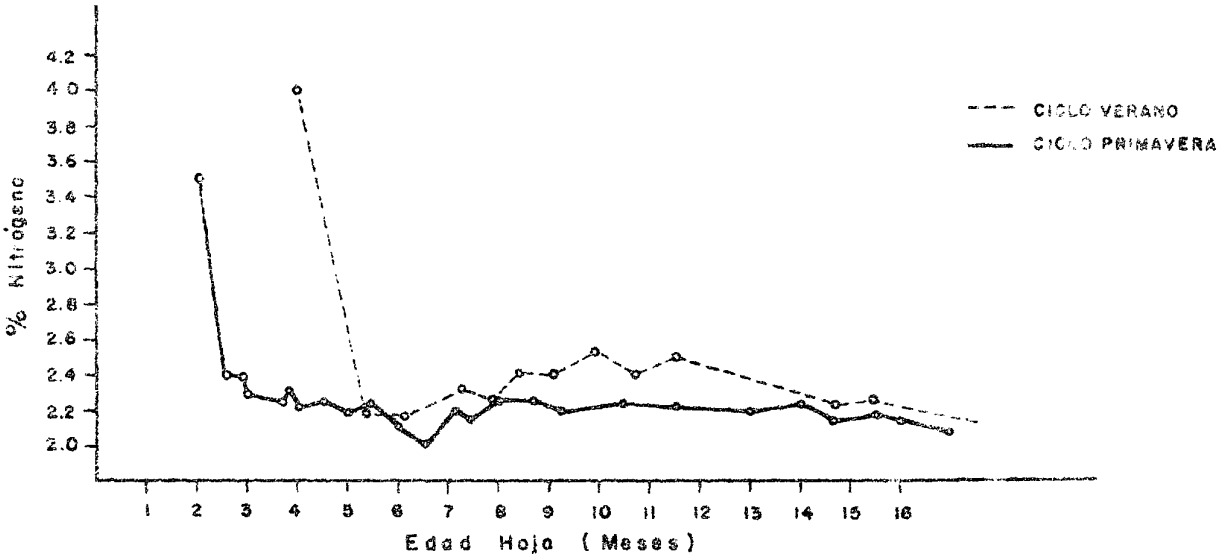
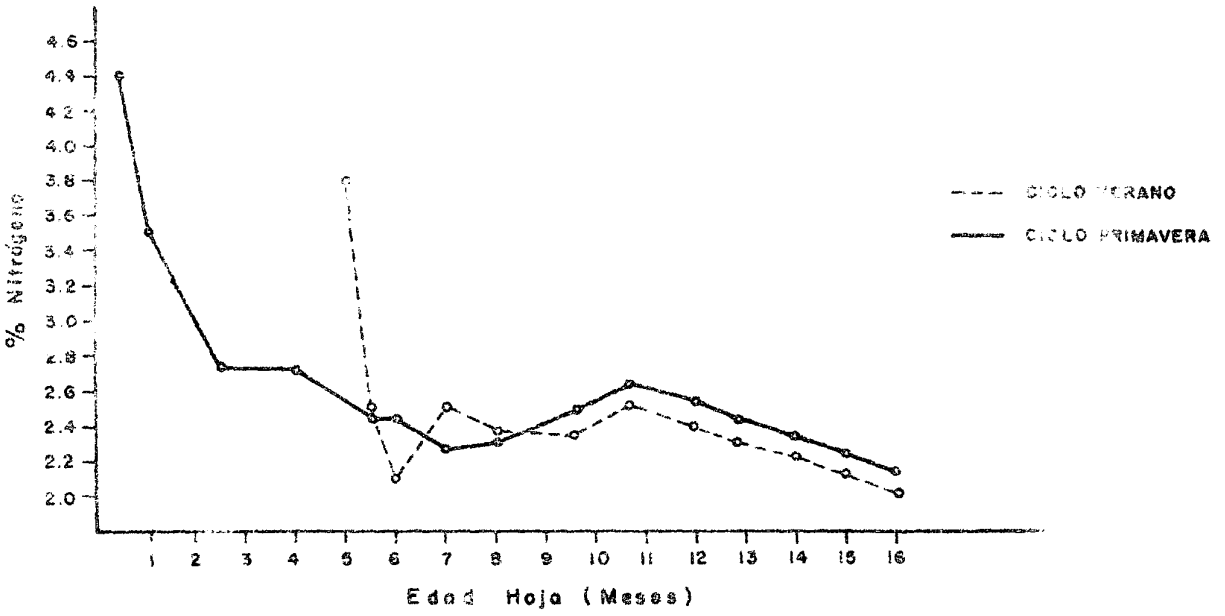


Figura N°2 Variación de la Concentración de Nitrógeno con la Edad en Hojas del Ciclo de Primavera y Verano. (Smith, P.F., y W. Reuther, 1950)



variación en concentración con distintos niveles de nitrógeno aparece en la figura 3.

El autor explicando las curvas, concluye que la edad más adecuada para el muestreo es la de 10 meses aproximadamente (9 - 11 meses).

En Sud-Africa, los cambios de concentración en el tiempo son un tanto diferentes a los de California, a pesar de encontrarse aproximadamente en la misma latitud (De Villiers, J. ., y C. . Beyer, 1961). La variación de concentraciones, tanto en variedad Valencia como Navel en hojas de brotes frutales se muestra en la figura 4.

Se observa que desde la edad de tres meses el nitrógeno en las hojas de la variedad Navel se eleva rapidamente, para alcanzar su máximo a los cinco meses. Después hay un decrecimiento paulatino y una tendencia a la estabilización alrededor de los 10 - 11 meses. En variedad Valencia la concentración permanece prácticamente constante a partir de los tres meses. Las diferencias de las experiencias de California y Sud-Africa, probablemente se deben a factores climáticos y de variedades en cuanto influyen en la dinámica del crecimiento vegetativo. Este hecho ha determinadoque los autores hayan recomendado épocas diferentes para muestrear.

En condiciones tropicales no se conocen experiencias similares que sirvan de guía para decidir la edad más conveniente para ellas.

f) Variabilidad de año en año

La concentración de elementos en hojas de un mismo árbol, incluso en iguales condiciones de manejo, muestreados de igual forma, muestran sin embargo, una notable variación de año en año. Las experiencias realizadas en este sentido de-

Figura N° 3 Variación de la Concentración de Nitrógeno en Hojas de Acuerdo a la Edad, Bajo Tres Dosis de Fertilización Nitrogenada. (Gallo, J.R., et al, 1960)

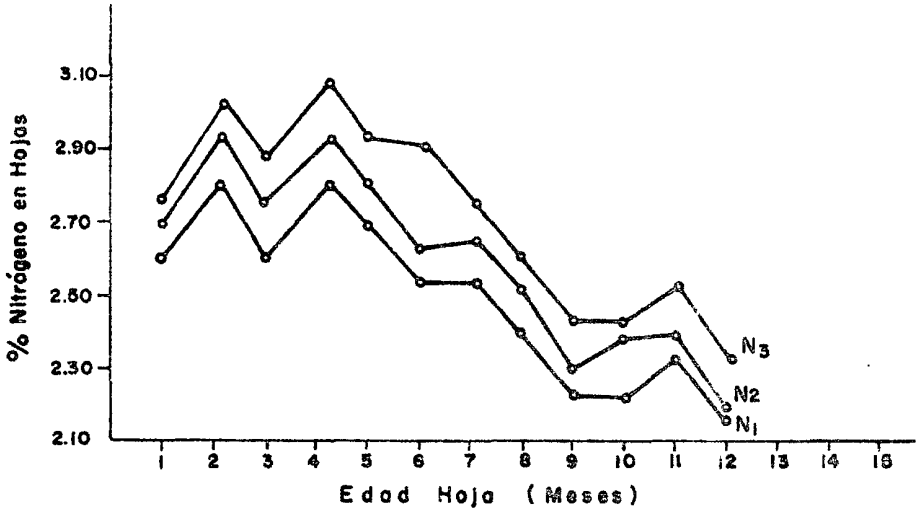
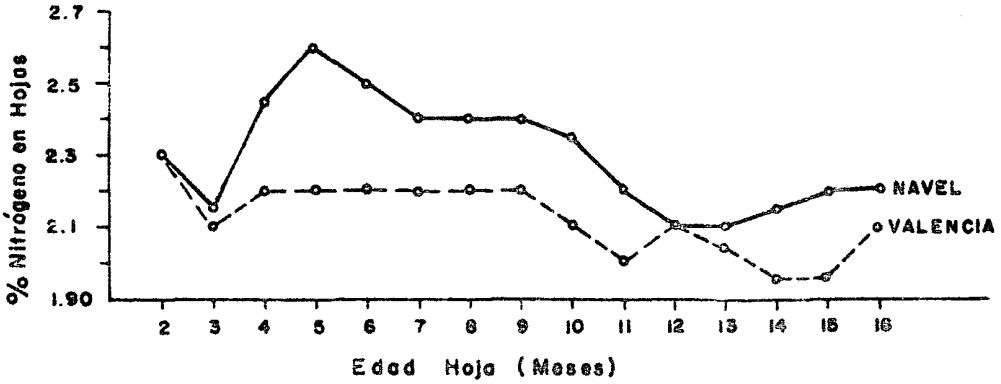


Figura N° 4 Variación en la Concentración de Nitrógeno en Hojas de Brotes Frutales de Acuerdo a la Edad. (J.I. De Villiers y C.J. Beyers, 1961)



muestran que gran parte de estas variaciones se anulan si los árboles crecen en condiciones controladas de invernadero (Chapman, H. D., y S. M. Brown, 1950). Ellas se deberían por lo tanto, fundamentalmente a factores de tipo climático (temperatura, humedad relativa, radiación, viento, precipitación), con variaciones imprevisibles año a año.

Las variaciones aludidas han sido observadas en experimentos de larga duración, muy bien controlados, y en donde sistemáticamente se han colectado muestras siguiendo un mismo patrón. Un ejemplo de ello lo constituye un experimento sobre fertilización fosfatada en naranjos Pineapple, en Florida (Smith, P. F., 1963). Los valores de nitrógeno y potasio medidos año a año, desde los ocho a los veinte años aparecen en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Variación "año a año" en la concentración de nitrógeno y potasio en hojas cítricas. 1/.

Año	1950	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	DMS5%
N %	2.35	2.35	2.41	2.48	3.05	2.82	2.87	2.74	2.56	2.62	2.74	2.64	2.52	0.12
K %	1.63	1.60	1.46	1.75	1.68	1.55	1.38	1.48	1.86	2.08	1.50	1.76	1.41	0.11
Prod. lb/árbol	224	285	372	356	534	534	491	550	561	383	549	569	431	

1/ Hojas de 5 meses tomados de brotes sin fruta.

Si se acepta que los principales factores que condicionan estas diferencias son de tipo climático, cada región climáticamente diferente, deberá conocer por la vía experimental, acumulando gran cantidad de resultados, la magnitud que puede alcanzar esta variación "año a año".

g) Ciclos vegetativos

En cítricas y otras especies de hoja perenne, se produce una superposición de flujos vegetativos. Como resultado de ésto, cuando se colectan hojas del ciclo primaveral, puede existir en esa época un nuevo auge vegetativo que corresponde al de verano. Este nuevo crecimiento ocasiona cambios en la concentración mineral del ciclo anterior.
Reuther, et al (1957), estudiaron el fenómeno en un experimento factorial de fertilización nitrogenada y sus resultados aparecen en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Efecto del crecimiento de verano en la composición nitrogenada de las hojas del ciclo de primavera.

Año	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956
+	SNC	CNC	SNC	CNC	SNC	CNC	SNC
N %	2.96	2.58	3.00	2.79	3.39	2.90	3.05

+) SNC: sin flujo de verano; CNC: con flujo de verano
1/ mayoría de las hojas colectadas del brote con nuevo crecimiento de ramillas no frutales.

Se observa que el nuevo crecimiento bajo la concentración de nitrógeno en las hojas. La magnitud de esta variación dependerá probablemente de la diseminación del nuevo flujo, y afectará a los distintos nutrientes de acuerdo a su movilidad. Como resultado de esta variación y con fines de estandarizar el muestreo se debe decidir entonces, entre tomar muestras con o sin el nuevo crecimiento vegetativo, o adoptar una posición arbitraria como la que sustenta Smith (1966). Este autor recomienda "tomar la muestra esté o no presente el

nuevo crecimiento, pero considerando que si un 25% de los brotes de primavera sustentan nuevo crecimiento, un cuarto de las hojas serían tomadas de dicho tipo de brotes".
Esta variedad del muestreo no se detalla normalmente en la bibliografía, y probablemente muchos investigadores lo efectúan en forma arbitraria, lo cual representa un nuevo elemento de imprecisión al tratar de comparar los valores de diagnóstico propuestos por distintos investigadores.
No existe información respecto a este fenómeno en condiciones tropicales, donde se superponen contínuamente los flujos vegetativos. Es un tema que habría que estudiar con particular detención antes de adoptar o ajustar los patrones de diagnóstico establecidos en otras regiones climáticas.

b) Riego

El contenido de humedad del suelo afecta la absorción de los elementos esenciales por las raíces. A su vez una deficiencia de agua provoca alteraciones de diferente magnitud en el desarrollo vegetativo (masa vegetal). Como resultado de ambos efectos, se producirá una variación en la concentración de nutrientes, según el balance de ambos.
Existen pocas experiencias efectuadas al respecto, y no todas ellas concordantes respecto al efecto del riego en la concentración mineral. Así, Embleton, et al (1958), estudiaron el efecto del déficit hídrico en la composición mineral de aguacate, aplicando riego por aspersión cuando el suelo alcanzaba diferentes succiones, controladas por tensiómetros y bloques de yeso. Los resultados obtenidos por estos escritores, aparecen en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Efecto del déficit hídrico en la concentración de nitrógeno en hojas de aguacate.

Succión (barias+)	% N en hojas
1/2	2.27
1	2.35
10	2.43

+ Riego aplicado a esa succión en la zona de mayor enraizamiento.

Los valores obtenidos fueron significativamente diferentes al 5%.

En otra experiencia (Merrill, S. et al., 1952), efectuada también en árboles de hoja perenne (tung) se comparó el efecto del riego con secano en la composición mineral de las hojas. A pesar de que la comparación fue algo burda, los resultados obtenidos muestran igual tendencia que la anterior, es decir, las hojas de árboles cuyo aporte de agua provino de escasas lluvias acusaron mayor concentración de nitrógeno. Esta alcanzó un 2.87% comparada con 2.51% en los bloques que recibieron riego.

Experiencias similares (Hibbard, et al, 1959), en cultivos de hoja caduca han mostrado un efecto inverso, si bien se trató de fósforo y potasio y no de nitrógeno. En éstas se compararon los efectos de distintos regímenes de riego en la composición de hojas de diferentes frutales (Cuadro 12).

Cuadro 12. Efecto del déficit hídrico en la concentración de potasio y fósforo en hojas de tres especies.

	Potasio			Fósforo		
% agotamiento +	90	60	30	90	60	30
durazno	0.94	0.80	1.34	0.07	0.11	0.15
manzano	1.11	1.31	1.60	0.07	0.09	0.13
fresa	1.64	1.92	2.02	0.17	0.23	0.26

+ Se regó cuando se agotaba el 90, 60, y 30% de la "humedad aprovechable" (Capacidad de campo - Punto de marchitéz permanente).

Como puede notarse, ambos elementos acusaron mayor concentración en el tejido foliar con el régimen más húmedo, en los tres cultivos. Relativamente, el déficit hídrico afectó más al fósforo que al potasio; la reducción en concentración alcanzó un 88% en promedio para las tres especies, en el caso del primer elemento, comparado con una reducción de sólo un 36% en el segundo, al reducirse la humedad del suelo. Los experimentos demuestran que el factor hídrico puede ser de gran importancia en la interpretación de los análisis. En la condición de los Valles Altos se encuentra toda la gama de condición hídrica, desde aquellos huertos en que no se riega hasta otros que efectúan más de 12 riegos. El peso de este factor podría ser de consideración al momento de evaluar los resultados analíticos. Por desgracia, la relación entre humedad del suelo y la concentración de elementos en el tejido vegetal no ha sido perfectamente esclarecido.

i) Interacción entre nutrientes

La interacción nutricional puede hacer variar la concentración de un nutriente dado en la hoja, sin que este hecho se encuentre necesariamente relacionado a una mayor o menor fertilidad del suelo, en ese elemento.

Una concentración estimada "baja", puede resultar por ejemplo, de la acción antagónica de un segundo elemento que se encuentre en concentración excesiva. También es posible el caso inverso, o sinergismo, por el cual la concentración excesiva de un nutriente puede ser causada por la presencia de otro ión. Los aspectos cuantitativos del fenómeno de interacción son extremadamente complejos, y hasta el momento no existe una explicación satisfactoria. Afortunadamente, estos tipos de interacciones no parecen afectados por condiciones ambientales; incluso parecen tener validez intraespecífica, como lo demuestran las revisiones bibliográficas al respecto (Emmert, F. H., 1961).

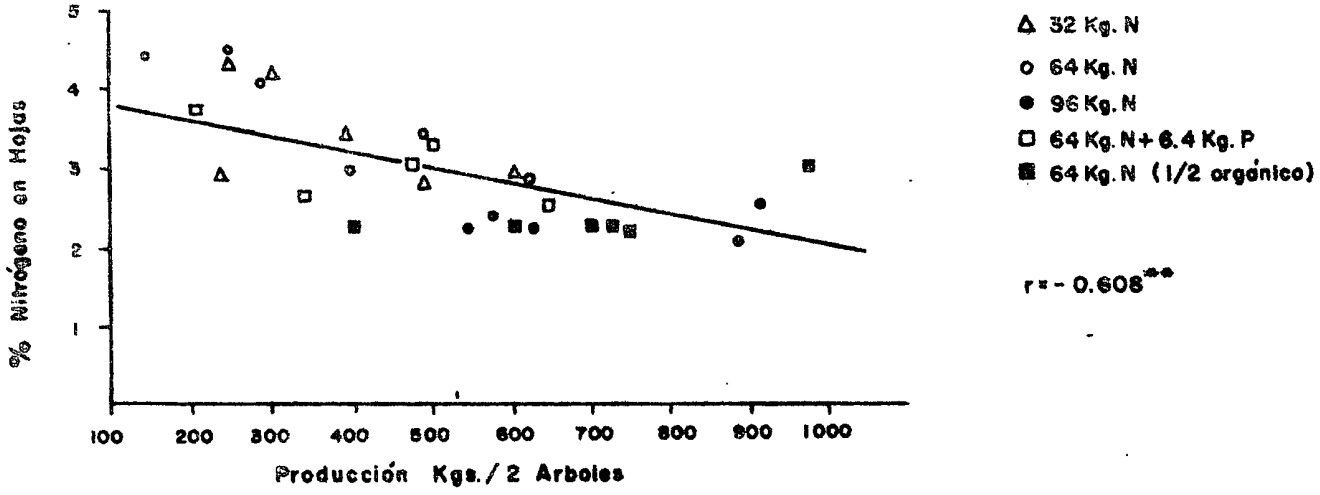
En el caso de las cítricas, dicha interacción ha sido reportada por Smith (1966), y por Rodney et al (1961). Estos autores señalan que un alto contenido de nitrógeno en las hojas se encuentra asociado frecuentemente a contenidos de fósforo bajos.

Un ejemplo de como esta relación antagónica N/P puede producir una distorsión de los datos analíticos lo constituye un experimento de fertilización nitrogenada en grapefruit, en suelos pobres de fósforo (Bar-Akiva, A., et al., 1967). La figura 5, señala una relación inversa entre concentración de nitrógeno foliar y producción. Cabe aclarar que de no existir la deficiencia de fósforo, la producción no descendería en la magnitud que lo hace al cambiar la concentración de nitrógeno de un valor de aproximadamente 2,5% a 3,5%, rango este que en condiciones normales de fósforo no estaría asociado a depresión de rendimientos.

j) Muestras representativas

A pesar del gran uso que se hace del análisis foliar, hay poca información estadísticamente válida para decidir lo que

Figura N°5 Correlación entre Producción y Concentración de Nitrógeno en Hojas de Grapefruit. (A. Bar Akiva, et al, 1967)



debe ser una muestra representativa. Steyn (1959), después de una extensa revisión de literatura, concluye que en la mayoría de los trabajos no se ha efectuado un estudio estadístico previo de la variabilidad y la intensidad del muestreo necesaria se ha decidido arbitrariamente, considerando más bien el trabajo involucrado. Así, Chapman (1960) por ejemplo, recomienda tomar 25 hojas por cada 10 árboles de citrus representativos de un área de muestreo. Sin embargo, Steyn (1959), en un estudio estadístico acucioso, determinó que en citrus deben muestrearse un 10% de la población para obtener una muestra representativa. Determinó también que 25 hojas son suficientes para representar un árbol. Bathurst, citado por el autor anterior, estudió la variación del nitrógeno en hojas de cítricas, concluyendo que se necesita muestrear sólo 10 a 16 hojas, de 2 a 3 árboles, en un bloque de 192, para obtener un 10% de variación en el valor analítico del nitrógeno.

Como se puede apreciar no existen opiniones muy consistentes en cuanto a lo que se debe considerar una muestra representativa.

3. Confección de patrones o standards

La mayoría de los standards de diagnóstico propuestos en la bibliografía han sido elaborados tras muchos años de experimentación, relacionando la concentración mineral en los tejidos vegetales con síntomas visuales de carencia o exceso, comportamiento vegetativo, producción e incluso calidad del producto cosechado. Los patrones recomendados por los distintos autores difieren entre sí. Esto es fácil de comprender por los antecedentes expuestos en la discusión precedente: las condiciones locales y regionales, los factores climáticos, el tipo y edad de la muestra, etc., implícitos en estos estudios, son muy variados.

Otra dificultad que confronta el usuario del análisis foliar para el diagnóstico nutricional de los cultivos estriba en los términos con que los diferentes autores describen los niveles o rangos de concentración, tales como: "nivel satisfactorio", "zona de hambre oculta", "adecuado", "nivel crítico", "alto", "excesivo", etc. Estos no aparecen claramente definidos y solo en muy raras ocasiones se asocian dichos valores a niveles específicos de producción.

Respecto a este punto, Chapman (1960), en una exhaustiva revisión trató de unificar la diferente terminología agrupándola en cinco categorías: deficiente, bajo, satisfactorio, alto y excesivo.

Posteriormente, Smith (1966), mantiene esas cinco categorías, pero las delimita con mayor precisión. Las figuras 6 y 7, muestran gráficamente los patrones para el diagnóstico de la nutrición nitrogenada y potásica propuestos. Se ha tomado como base para estas figuras, la revisión presentada por Chapman (1960), y se refieren sólo al naranjo.

Respecto al nitrógeno (figura 6), se observan diferencias en los rangos asociados a las distintas condiciones nutricionales. Esto se debe fundamentalmente a diferencias en condiciones climáticas, varietales y de muestreo. Se observa también que existe mayor consenso respecto del rango deficiente que de los otros. En el caso del potasio (figura 7), los rangos propuestos por los distintos autores acusan una mayor concordancia.

B. La actividad enzimática como método de diagnóstico.

La enzima nitrato reductasa (NR) se conoce desde hace unos 50 años. Se han realizado desde entonces una gran cantidad de trabajos tendientes a esclarecer diversos aspectos fisiológicos, fisico-químicos o bioquímicos de esta enzima.

Figura N° 6 Standards propuestos para Nitrógeno.

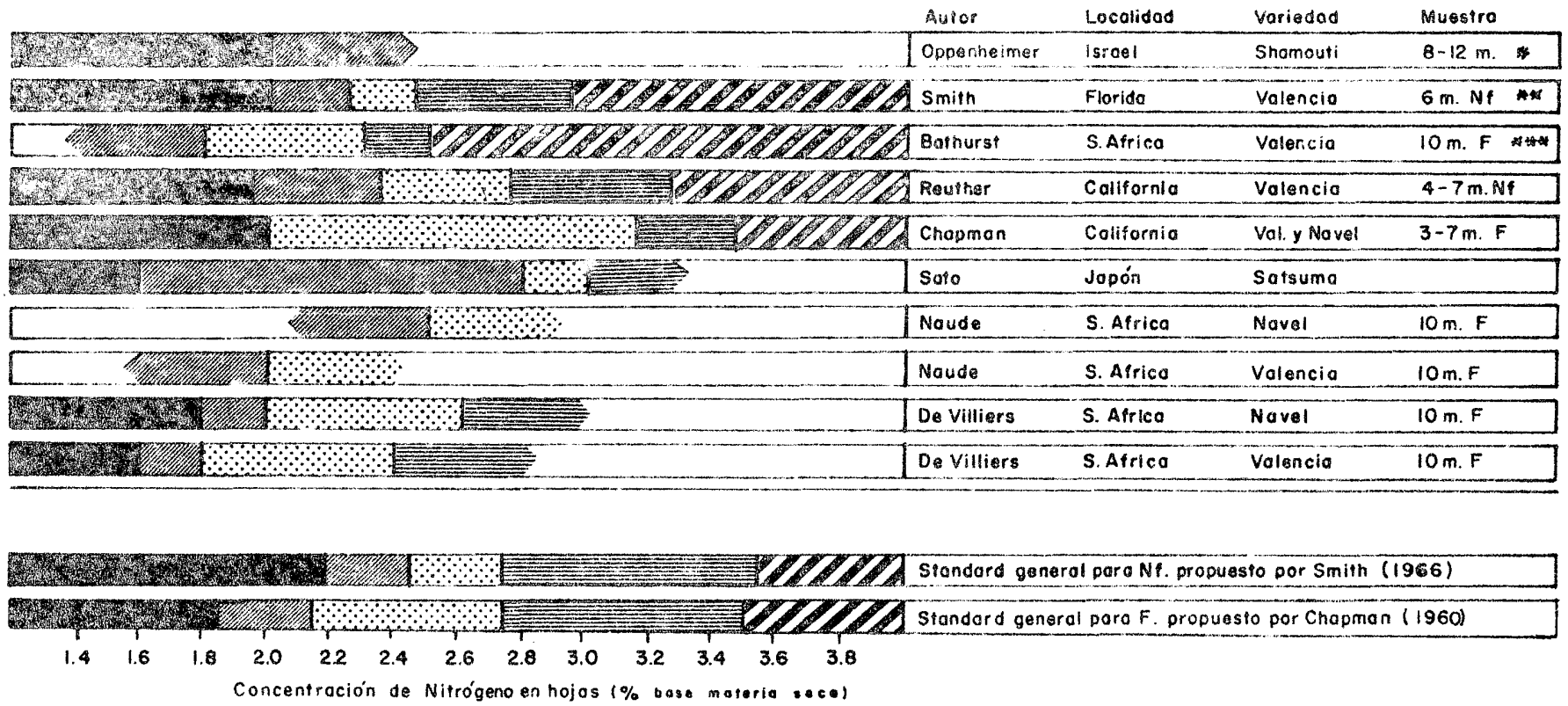
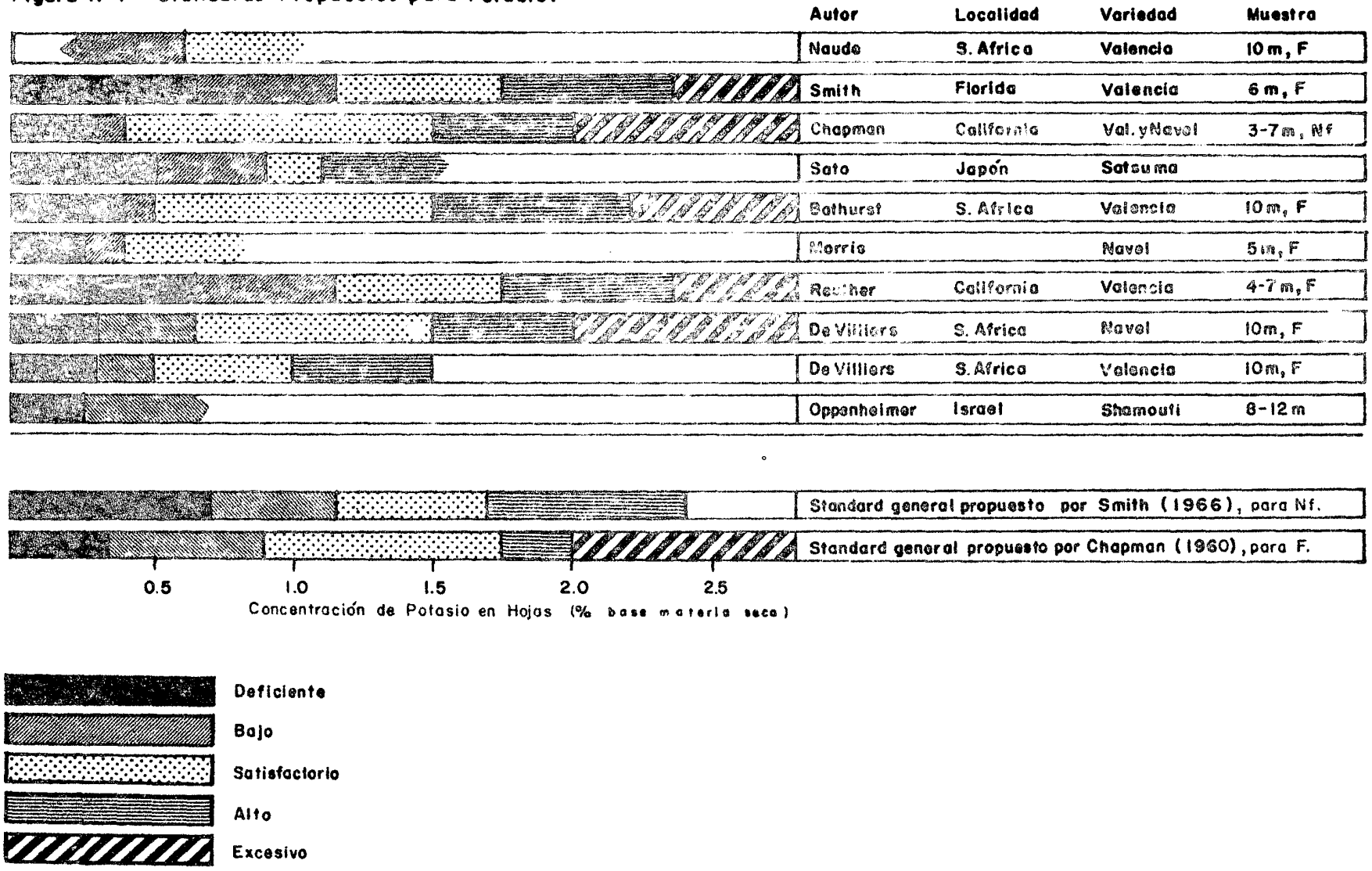


Figura N°7 Standards Propuestos para Potasio.



En los últimos años estos tipos de investigaciones encierran más implicaciones agronómicas, sin enfrentar no obstante directamente problemas de este tipo. Por ejemplo, se ha relacionado la actividad de la NR con los siguientes aspectos de los cultivos agrícolas: inducción floral (Eskew, D. D. et al., 1973), síntesis de proteína (Croy, L. I., et al., 1970), susceptibilidad al ataque de ciertos hongos (Yoder, O. C., 1973) desarrolló de plántulas (Radin, J. W., 1974), deficiencias de microelementos (Nason, A., et al., 1963) y condición nutricional del nitrógeno (Mulder, E. G., et al., 1959).

1. Antecedentes acerca de la nitrato reductasa.

El primer investigador que intuyó la presencia de una enzima reductora del nitrógeno fué Eckerson (1924), quién comprobó la formación de nitritos al incubar la savia de varias plantas, en presencia de nitratos y glucosa.

Sus sospechas fueron confirmadas diez años más tarde en experiencias en microorganismos y plantas superiores, que comprobaron la presencia de un sistema enzimático capaz de reducir los nitratos (Green, D. E., et al., 1934). El interés por estudiar este fenómeno bioquímico se reavivó con el descubrimiento de varios investigadores de que la deficiencia de molibdeno, afectaba estrechamente la actividad de la NR. Se observó por ejemplo, que una carencia aguda de molibdeno provocaba una acumulación tóxica de nitratos en los tejidos, pero sin comprenderse la causa (Hewitt, E. J. 1951). Posteriormente, Nason, et al. (1953), en investigaciones con hongos (Neurospora), se llegó a la conclusión de que existía una enzima identificada como una flavoproteína, que reducía los nitratos en esos organismos simples. En un trabajo posterior (Nicholas, D. J. D., et al, 1954) se comprobó que la enzima contenía molibdeno como metal específico dentro de su estructura y la agregación de este elemento a plantas deficientes, inducía la formación de la enzima NR.

Paralelamente, Evans, et al (1953), también comprobaron fehacientemente la presencia de la NR, en plantas superiores y Candela, et al (1957) corroboraron las experiencias sobre hongos en plantas superiores; es decir que la agregación de molibdeno a un extracto de hojas provenientes de plantas desarrolladas sin este elemento, aumentaba considerablemente la actividad de la NR.

Este último trabajo reveló también que la actividad de la NR, era mayor en las plantas que habían crecido con mayores cantidades de nitrógeno; y que la actividad enzimática de las hojas jóvenes excedía a las de mayor edad.

Estas primeras investigaciones se hicieron en extractos de material vegetal macerado, en presencia de NADH (nicotinamida reducida), sin cuya adición casi no se obtenía actividad.

El efecto de la maceración en la actividad reductora fué estudiada por Mulder, et al (1959), quienes demostraron que la capacidad reductora de nitratos depende de la presencia de células intactas.

Al romperse las células por maceración, el sistema enzimático se inactiva, y la adición de coenzimas (NADH o NADPH), el extracto produce una recuperación solo parcial. Los mismos autores observaron además otros hechos importantes:

1°) cuando las plantas experimentales se cultivaron en suelos pobres en nitrógeno, la actividad de la enzima era muy baja; al agregar nitratos al suelo se producía un notable incremento en ella.

2°) la actividad era aún mayor si a las plantas deficientes se les infiltraba forzadamente una solución nítrica (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto de la infiltración en la actividad de la N R, en hojas de tomate que crecieron con bajo aporte de nitrógeno.

Medio de incubación	Tiempo (horas)	Actividad enzimática (umM NO_2/g).
agua destilada	3½	26
nitrato de potasio	3½	129
sulfato de amonio	3½	16
sulfato de potasio	3½	20

3°) aún en plantas que crecieron con adecuado aporte de nitratos, se obtenía un incremento adicional en la producción de nitritos, al infiltrar los discos con la solución nítrica, comparado con el tejido intacto, por lo cual, los autores concluyeron que la enzima es "inducida" por el propio substrato. Estas apreciaciones de Mulder et al., serían confirmadas más tarde por otros autores en otros cultivos (Sanderson, G. W., 1964; Zielke, H. R., et al., 1971, y Oaks, A., et al., 1972).

Una revisión de trabajos efectuados en suspensiones de células, o con enzimas aisladas de extractos en su mayoría de raíces, ha sido presentada por Beevers, et al., (1969). Estos, han puesto de manifiesto una serie de características de la NR, además de las ya señaladas: a) su peso molecular de alrededor de 550.000. b) un pH óptimo en casi todas las especies de 7.5. c) actúa en el citoplasma. d) su actividad es mucho mayor en hojas que en raíces. e) su actividad está relacionada con la síntesis de proteína. f) poco activa en tejidos seniles y muy activa en tejidos que maduran, y g) su actividad no es inducida sólo por nitratos.

Uno de los aspectos aún conflictivos se refiere al efecto de la luz en el proceso. La mayoría de los autores opina que los electrones involucrados en el proceso reductivo, proceden de la fotosíntesis, es decir, requiere de energía luminosa. En condiciones de oscuridad, en cambio, el aporte de electrones está vinculado a la actividad en las mitocondrias. Sin embargo, se han planteado dificultades con la interpretación, tales como los que señala la figura 8, y sin que exista una explicación satisfactoria para ello (Klepper, L., et al, 1971)

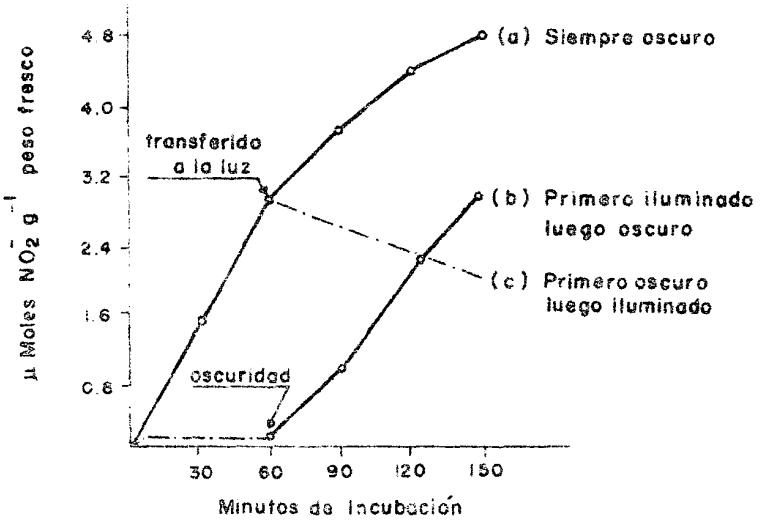
2. La actividad de la nitrato reductasa como herramienta de diagnóstico.

Bar-Akiva (1965), basado en los resultados de Mulder (1959), propuso por primera vez el empleo de la reducción enzimática de nitratos como medio para evaluar la nutrición nitrogenada de los cultivos. Sin embargo, sin proponérselo directamente, también otros autores habían aportado antecedentes para esta posibilidad.

a) Relación entre la nitrato reductasa, contenido de proteína y producción.

Croy, et al., (1970), cultivaron trigo a dos niveles de fertilidad nitrogenada, con el fin de establecer la relación entre la actividad de la NR, proteína en las hojas y granos y la producción de grano. La actividad de la enzima se midió a lo largo de todo el período de desarrollo del cultivo. Ellos concluyeron: a) que la cantidad de nitratos en el tejido fué el principal factor en la actividad de la N R.. b) la inducción de la N R por efecto del nitrógeno agregado. c) una correlación positiva entre actividad de la N R y el contenido de proteína de las hojas. d) que el aumento de actividad enzimática por suplemento de nitrógeno coincidió con un aumento en el contenido de proteína del grano, y e) una correlación

Figura N° 8 Efecto de la Luz sobre la Actividad de la N.R. en Discos de Hojas de Maiz. (Klepper, L. et. al., 1971)



entre la sumatoria de la reducción total de nitratos, durante todo el desarrollo vegetal, expresada como "unidades de nitrógeno reducido por Ha." y proteína del grano, medida en Kg/Has. En experimentos paralelos con 32 variedades de trigo, estos autores advierten que esas relaciones difieren en diversas variedades y que están aparentemente vinculadas a la constitución genética de las mismas.

b) Actividad enzimática en relación a deficiencias de microelementos.

Existe ya amplio consenso en que el rol primordial de muchos microelementos en la fisiología celular, está vinculado a los grupos prostéticos de importantes enzimas. Entre estas enzimas cabe diferenciar un primer tipo en el cual el metal activante no está unido firmemente a ella, y cuya acción puede ser reemplazada por otros metales, y un segundo tipo en el cual el metal es parte integrante e insustituíble de la enzima. Estas últimas son conocidas como metalo-enzimas (Mason, A., et al., 1963), y su actividad se halla estrechamente relacionada a la presencia de determinados metales en los tejidos. Si el tejido es deficiente en éstos, la agregación de los mismos, producirá un incremento en la actividad de las enzimas. La condición de metal específico de alguna enzima se cumple sólo para el molibdeno, hierro, cinc, cobre y manganeso.

En experiencias efectuadas en cítricas (Bar-Akiva, A., 1969) cultivadas en medio artificial para controlar el aporte de estos microelementos, se demostró que la actividad de cuatro enzimas guardaba estrecha relación con la presencia de determinados nutrientes en la solución (Cuadro 14).

Cuadro 14. Efecto de deficiencias nutricionales en la actividad relativa de metalo-enzimas, medida en hojas de cítricas.

Enzima	Metal activo	Solución completa. % de actividad	-Mn	-Fe	-Cu	-Zn	-Mo
Peroxidasa	Fe	100	209	64	105	95	111
Ascorbato Oxidasa	Cu	100	112	93	18	55	110
Anhidrasa Carbónica	Zn	100	91	97	120	34	72
Nitrato Reductasa	Mo	100	100	63	88	51	9

Basado en estos resultados, Bar-Akiva, propuso el "ensayo enzimático de diagnóstico". Dado que los valores de actividad del Cuadro 14, no son muy buenos indicadores, porque ellos estarían influenciados por variados factores, el autor sugiere expresar los resultados en términos relativos entre la actividad obtenida por la agregación del elemento y la inicial o endógena.

c) La técnica de la nitrato reductasa para el diagnóstico de la nutrición nitrogenada en cítricas.

Bar-Akiva, A., y J. Sternbaum (1965a), comprobaron la presencia de la enzima NR en hojas de cítricas, siguiendo el método de Mulder, et al, (1959). En uno de sus ensayos en condiciones ambientales Bar-Akiva, A., y J. Sternbaum, (1965b), controladas compararon la actividad y la concentración de nitrógeno total, obtenidas en árboles bajo distintos niveles de nitrógeno (Cuadro 15).

Cuadro 15. Efecto de la fertilización nitrogenada en la actividad de la nitrato reductasa y el contenido de N total en hojas de Grapefruit.

Tratamiento	Act. nitrato reductasa (umli de NO_2/g/2h.	N total (% de la materia seca
25 g $(NH_4)_2SO_4$	89.5	1.80
25 g $(NH_4)SO_4$ + aspersión 4% KNO_3	140.0	1.88
50 g $(NH_4)_2SO_4$	132.5	2.19
100 g $(NH_4)_2SO_4$	242.4	2.35
150 g $(NH_4)_2SO_4$	406.0	2.64

Los resultados demuestran una estrecha correlación entre la actividad de la nitrato reductasa y el aporte de nitrógeno. Experimentos posteriores en condiciones de campo, confirmaron la correlación entre la actividad enzimática y los niveles de nitrógeno, aunque no mostraron una correlación tan estrecha con los rendimientos como en el ensayo en potes (figura 9).

Más tarde (Bar-Akiva, A., 1970), obtiene una mejoría notable en sus correlaciones cuando expresa los resultados de la actividad enzimática en términos relativos, es decir, como una proporción entre la actividad inducida mediante la agregación de nitrato al tejido (ANRi) y la actividad endógena o espontánea (Cuadro 16 y Figura 10). De este modo llega a sugerir el valor crítico ANRi/ANRe = 1.4-1.5, para definir la condición nutricional adecuada del nitrógeno en cítricas. Resulta de interés destacar que el mismo autor, aplicando este método

Figura N°9 Correlación entre Cosecha y ANRi en Hojas de Grapefruit de un Ensayo de Fertilización. (A. Bar Akiva, et. al., 1967)

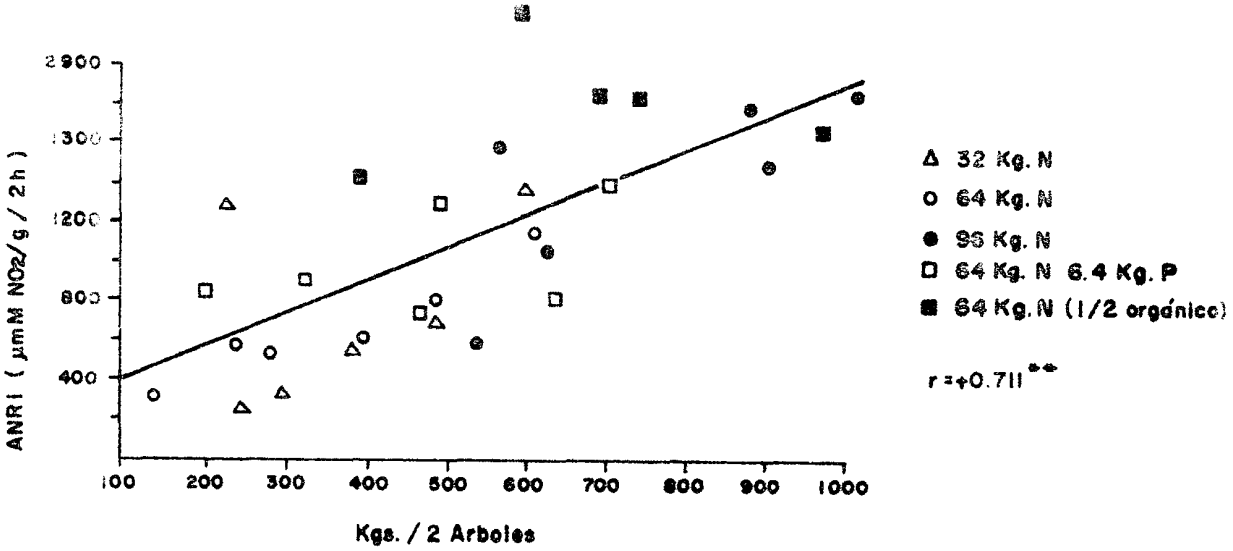
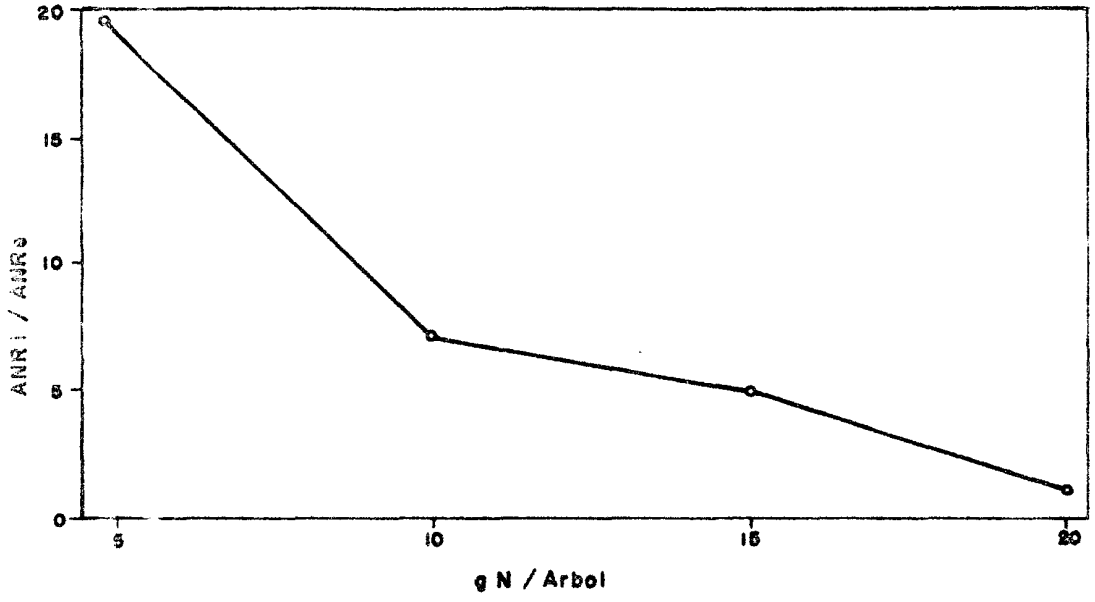


Figura N° 10 Efecto del Aporte de Nitrógeno en la Relación ANR i / ANR e en Arboles Nuevos de Grapefruit. (A. Bar Akiva, 1970)



en pastos (Bar-Akiva, A., et al, 1970), obtuvo también claras correlaciones (figuras 11 y 12) y una relación ANRi/ANRe óptima semejante de 1.5 (figura 13).

Cuadro 16. Efecto de la fertilización nitrogenada en la cosecha, nitrógeno total y la relación ANRi/ANRe, en naranjos.

Variedad	Kgs N/ha.	Prod. Kg/árbol	N(%)	ANRi/ANRe
Shamouti	60	95	2.02	1.72
Shamouti	150	119	2.30	1.27
Valencia	60	77	1.93	2.10
Valencia	120	106	1.93	1.40

IV. PROCEDIMIENTO

A. Investigación de variables operativas en la técnica enzimática.

Inicialmente se ensayó la metodología descrita por el autor del método en su última versión (Bar-Akiva, A., et al. 1970). Sin embargo, al aplicarla a huertos cítricos en el Estado Aragua, se presentaron problemas inesperados, particularmente en lo que a tratamiento a la muestra se refiere. Por tanto, fué necesario investigar previamente la influencia en una serie de factores de operación, antes de poner a punto una técnica consistente. Ya el mismo autor había advertido sobre la necesidad de estudiar adaptaciones de la técnica para su uso en otras condiciones agroecológicas. De esta manera, y como resultado de estas investigaciones previas, se mantuvieron algunos elementos del método primitivo, y se cambiaron o agregaron otros nuevos. En definitiva, ésta concluyó los siguientes aspectos:

1. Muestras

La muestra consistió en un mínimo de 50 hojas de la zona me-

Figura N°11 Relación entre Fertilización Nitrogenada, Concentración de Nitratos y Actividad Endógena de la Nitrato Reductasa. (Bar Akiva, A et al., 1970)

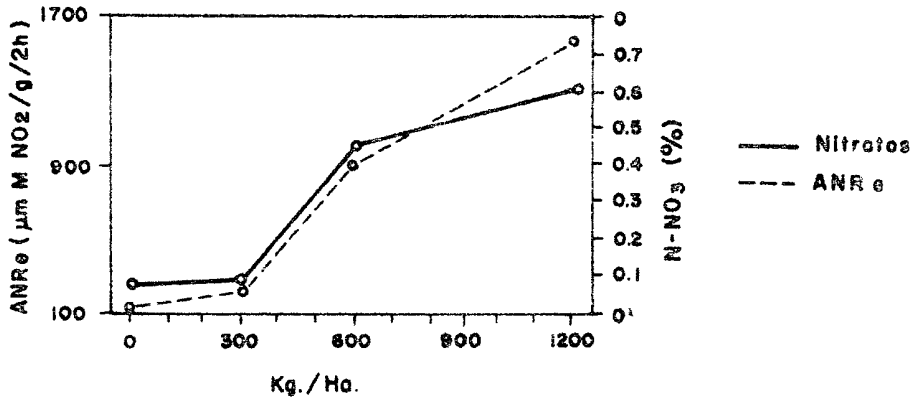


Figura N°12 Relación entre Fertilización Nitrogenada, Cosecha y ANR i y ANR e. (A. Bar Akiva, et al., 1970)

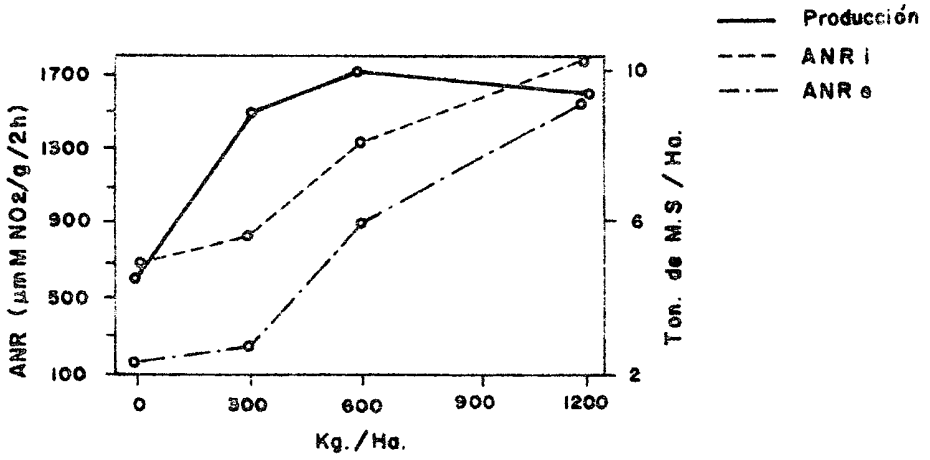
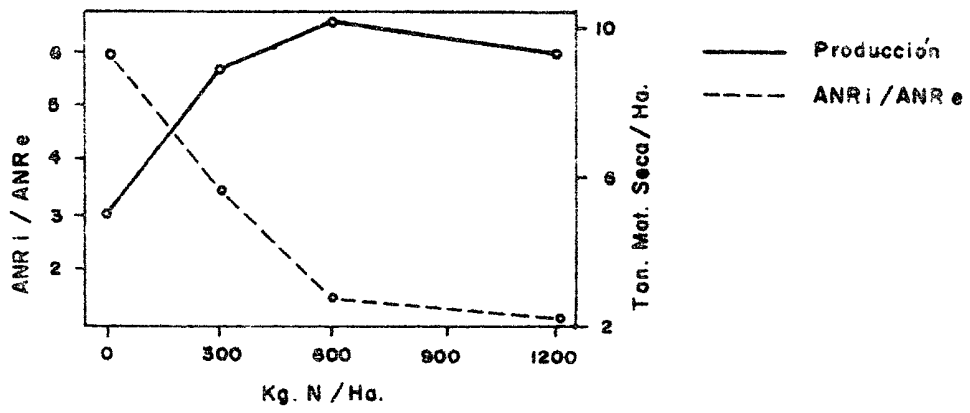


Figura N°13 Efecto de la Fertilización Nitrogenada sobre la Relación ANR i / ANR e en Pastos. (Bar Akiva, A. et al., 1970)



dia de los brotes nuevos. Las hojas se limpiaron con paño húmedo para eliminar los restos de pesticidas y polvo que pudieran interferir con la acción enzimática.

2. Técnica analítica

El procedimiento analítico consistió en:

a) extraer 500 mg. de discos del limbo foliar, de aproximadamente 3 mm . de diámetro y separarlos en dos grupos iguales.

b) sumergir un grupo de discos agregando sucesivamente: 1. Agua destilada, 3 mls.; 2. Tris buffer, (pH 7.4, HCl) 1 ml.; 3. Acido succínico 0.1 M, neutralizado con hidróxido de sodio, 1 ml.; 4. Agitación, seguida de la agregación de alcohol etílico al 95%, 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 nitrato de potasio 0.25 M.

d) impregnar los discos al vacío: 1. ejercer una succión hasta alcanzar 0.85 atmósferas, en un tiempo aproximado de un minuto; 2. volver a presión atmosférica, dejando entrar aire lentamente (aproximadamente en un minuto); 3. ejercer una nueva succión de 0.83 atms. y mantenerla.

e) incubación a 30 grados de temperatura durante dos horas en oscuridad.

f) determinar químicamente los nitritos (Chapman, H. D., y F. P. Pratt, 1961), no antes de cinco minutos, ni más de 30 minutos de terminar la incubación y retornar el material a presión atmosférica. La valorización comprende los siguientes pasos:

1°) decolorar, si es preciso, con "alúmina cream", decantar, extraer 3 ml. de sobrenadante y pasar a matraz.

2°) agregar 1 ml. de ácido sulfanílico.

3°) agregar 1 ml. de alfa-naftilamina.

4°) desarrollado el color, diluír, si es necesario, a un volumen conocido, antes de efectuar la lectura en fotocolorímetro.

5°) referir la lectura colorimétrica a una curva patrón para deducir la concentración de nitritos, expresada en nano Moles/gramos de materia fresca.

g) expresar los resultados en términos relativos dividiendo la concentración de nitritos en las sub-muestras infiltradas con nitrato de potasio (ANRi) por la concentración en las submuestras no tratadas (ANRe).

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

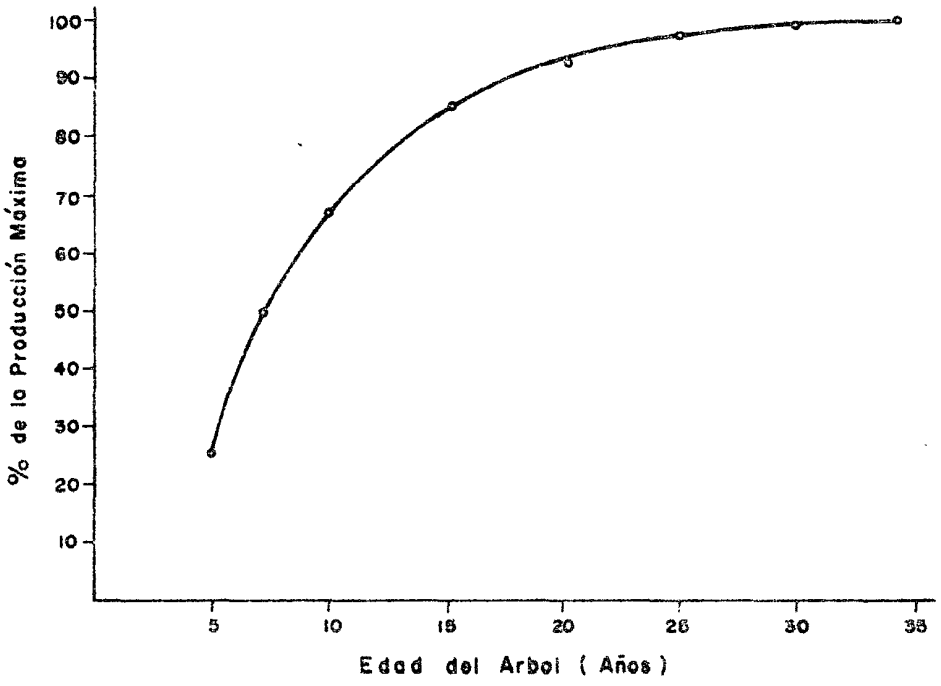
Para lograr este objetivo se relacionaron los valores del índice ANRi/ANRe con la producción frutal.

Dado que la producción es función de la edad del árbol, y las muestras han sido obtenidas de huertos de diferentes edades, se procedió a ajustar dichos valores de producción, a la equivalente a una edad de 15 años (que fué la máxima encontrada), tomando como base para ellos, curvas ya establecidas para estas variables (figura 14). Cabe hacer notar que la relación indicada por esta figura fué establecida en condiciones sub-tropicales; es probable que varíe en condiciones tropicales en el sentido de adelantar la edad a la cual se produce la estabilización en producción.

C. Comparación entre la técnica enzimática y el análisis de nitrógeno total, como medios de disgnóstico.

Esta comparación se efectuó en muestras de hojas de árboles en diferentes estados de nutrición nitrogenada. Dichas muestras fueron

Figura N° 14 Relación entre Edad del Arbol y Producción.
(F.M. Turrell, 1961)



obtenidas de:

a) un ensayo de fertilización con dosis crecientes de nitrógeno y potasio, que efectúa FUSAGRI, en la zona de Montalbán, Edo. Carabobo.

b) cuatro huertos de alta producción y óptimo manejo, en la zona de los Valles Altos de Carabobo y Yaracuy.

c) un ensayo sobre fertilización nitrogenada en riego, que está realizando la Estación Edafológica del Centro - M. O. P. (Cagua, Edo. Aragua).

d) un huerto de cítricas de la Estación Experimental de FUSAGRI, en Cagua, Edo. Aragua.

e) de un ensayo demostrativo que realiza FUSAGRI, en los Valles Altos.

El análisis de nitrógeno total se efectuó sobre ramillas frutales de acuerdo a Chapman (1960), y en otros casos, sobre ramillas no frutales, de acuerdo a Smith y Reuther (1962). El análisis enzimático se efectuó sobre hojas provenientes de la parte media de los brotes jóvenes.

D. Otras especies cítricas

Con fines exploratorios se realizaron algunas pruebas de reducción enzimática en Citrus aurantifolia (limones criollos) y Citrus reticulata (mandarina), siguiendo la misma técnica descrita para Citrus sinensis (naranja).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la actividad enzimática se expresaron por lo general en nanomoles (nM = 10^{-9} moles) 1/, por gramo de materia fresca después de dos horas de incubación. Se designan en el texto, cuadros y gráficos como $\frac{nM}{g2hr}$ ó $nMg^{-1}2hr^{-1}$.

1/ The International System of Units. NASA SP-7012. National Aeronauties and Space Administration, Washington, D. C.

En algunas pruebas preliminares se expresan también en p.p.m. de nitritos en una alícuota del incubado (1 ppm = 1 mgr por litro). Por lo tanto, interesaba investigar que tipo de hoja sería más conveniente en estas circunstancias.

A. Variables operativas en la técnica enzimática

1. Muestreo

Se trató de obtener muestras representativas, basadas en los antecedentes expuestos anteriormente. De ésta manera se muestrearon 5 árboles en los huertos en producción comercial, 8 en los ensayos de fertilizantes, y 3 en los del ensayo de interacción riego-fertilizantes.

En todos estos casos, se tomaron 100 hojas de cada árbol. Estas cifras exceden los mínimos recomendados por autores citados anteriormente.

Al análisis de nitrógeno total, se efectuó en muestras foliares colectadas en ramillas frutales, como lo recomienda Chapman (1960). Sin embargo, como ésto no fue posible en algunos huertos, porque los frutos eran escasos, o la hoja estaba fuertemente atacada por plagas o enfermedades, se tomaron hojas de 4 - 7 meses de edad, de brote sin fruto, como lo recomiendan Smith y Reuther, (1962). Este último tipo de muestreo también planteó problemas, en las condiciones tropicales de la región, porque es difícil precisar la edad de las hojas. Las muestras para el análisis enzimático fueron tomadas en los árboles anteriores, juntándose un total de 100 hojas por muestra, provenientes de la parte media de los brotes jóvenes.

a) Tipo de brote o ramilla

Como interesaba comprar el método enzimático con el método tradicional de análisis foliar, en primera instancia se co-

lectó la misma clase de hojas recomendada para dicho análisis. Estas se obtuvieron de un ensayo de fertilización en Montalbán conducido por FUSAGRI. Se seleccionaron hojas de 4 a 7 meses de edad en brotes sin frutos. Estas ramillas presentaban coloración uniformemente oscura en todas sus hojas y no tenía rebrote. Se colectaron dos muestras de cada tratamiento fertilizante consistentes en: a) sin fertilización; b) 0.4 Kgs. N/árbol/año, y , c) 0.8 Kgs. N/árbol/año. Los resultados obtenidos en esta prueba aparecen en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Actividad de la nitrato reductasa en hojas provenientes de brotes viejos uniformes, en árboles con tres tratamientos de nitrógeno.

Kg. N/árbol/año	Tipo de ensayo enzimático	Prod. de nitritos nM/g/2hr.		Relación ANRi/ANRe	
		I	II	I	II
0	ANRe	236	241	2.12	2.08
	ANRi	502	502		
0,4	ANRe	236	221	2.00	2.06
	ANRi	472	457		
0,8	ANRe	251	251	1.94	1.98
	ANRi	487	472		

I: corresponde al promedio de 2 de ellos, en las 4 repeticiones.

II: corresponde al promedio del otro par que compone la parcela o unidad experimental.

Los resultados no expresan diferencias de significación 1/ en la actividad enzimática, a pesar de que los tratamientos for-

1/ como se verá más adelante, las diferencias anotadas están dentro del margen de variación propia del procedimiento analítico.

tilizantes difieren ampliamente en su aporte nitrogenado. Además, el ensayo revela que existe una deficiencia de nitrógeno en el huerto, puesto que se han obtenido respuestas de consideración. Por consiguiente, este tipo de hoja muestreada no parece ser la más indicada. En vista de estos resultados, se comparó la actividad de la NR de ese tipo de hojas (que se designarán por Hv) con otras provenientes de: a) sector medio de brotes nuevos identificables por su color notoriamente más claro que los anteriores (designada como Hn), y b) del sector más viejo de la misma ramilla (designada Hvn). Esta vez el material fué colectado del huerto de FUSAGRI en Cagua, que no ha sido fertilizado durante seis años, y es claramente pobre en nitrógeno. Los resultados aparecen en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Actividad de la nitrato reductasa en tres tipos de hojas.

Tipo de hoja	Ensayo enzimático	Lectura del fotocolorimetro	Cant. de nitritos (nM/g/2h)	ANR(i)/ ANR(e)
Hn	ANR(e) ANR(i)	5.5 46.0	160 1356	8.47
Hv	ANR(e) ANR(i)	3.5 11.5	101 344	3.40
Hvn	ANR(e) ANR(i)	1 100	28 2942	105

La actividad relativa en hojas de brotes en pleno desarrollo (Hn) fué más amplia que en el caso de las hojas sobre brotes viejos (Hv). Por lo tanto, las primeras aparecen como más sencibles a la situación nutricional, es decir, ofrecen un aspecto de valores más amplios a los fines de discernir con mayor precisión la condición nutricional. Se observa también que la actividad re-

ductora endógena (ANRe) de las hojas más viejas del brote en desarrollo (Hvn) fué prácticamente nula. Al impregnarse el tejido con nitrato de potasio, la actividad fué grandemente estimulada, dando una relación ANRi/ANRe amplísima, Este resultado concuerda con la situación deficitaria del árbol, y con la extracción competitiva por nitrógeno de las hojas sobre la parte nueva del brote. Bar-Akiva (1965), había observado también que la actividad enzimática de hojas que sustentaban nuevo crecimiento bajaba rápidamente a medida que el nuevo brote se desarrollaba. Estas hojas no resultan prácticas a los fines de evaluar la actividad endógena de la enzima (ANRe).

Todo parece indicar entonces que las hojas más adecuadas a tomar serían aquellas ubicadas sobre los brotes nuevos (Hn).

Por otra parte, cabía cuestionar si este tipo de hojas y brotes acusarían una actividad enzimática suficientemente uniforme a través de su ciclo de desarrollo. Para investigar entonces, la influencia de la edad de estas hojas en los resultados analíticos, se tomaron y analizaron muestras en cuatro fechas. La procedencia de ellas fué un huerto en el cual se conducía un ensayo de interacción riego-fertilizantes (M. O. P., Cagua, Edo. Aragua). Los resultados aparecen en el Cuadro 19. Debe destacarse que a pesar de que se trató de un mismo tipo de hojas y ramillas, la actividad enzimática, tanto endógena como inducida, disminuyó en el lapso de aproximadamente dos meses y medio. Los valores relativos de esas actividades por su parte, tendieron a aumentar Será preciso por lo tanto, fijar algún criterio respecto a la edad de las hojas por muestrear. Se observó que en los huertos cítrícolas investigados, las hojas tardaban aproximadamente tres meses y medio en alcanzar su fase madura (tamaño, coloración, consistencia). Las hojas muestreadas el 5 de Abril, tenían aproximadamente dos a tres semanas de edad, es decir, las pruebas

(Cuadro 19), cubrieron casi todo el ciclo de desarrollo de las hojas. Una solución de compromiso práctico sería adoptar la situación intermedia en edad, y que fuese apreciable por las características visuales. Esta condición puede obtenerse en hojas de uno a dos meses de desarrollo, al cabo de las cuales ya ha adquirido su tamaño final, su coloración es intermedia entre el color claro característico de hojas nuevas y el más oscuro de las hojas maduras, y su consistencia no ha alcanzado aún la condición coriácea de estas últimas.

Cuadro 19. Efecto del fertilizante nitrogenado sobre la actividad de la nitrato reductasa medida en tres fechas sucesivas (nM/g/2h).

Kg. úrea/ árbol	5-IV+		22-IV		5-V		16-V	
	NO_2	Relac.	NO_2	Relac.	NO_2	Relac.	NO_2	Relac.
0	207 / 1829	8.83	116 / 1023	8.82	114 / 1064	9.33	66 / 701	10.62
1.30	626 / 1403	2.24	580 / 1328	2.29	531 / 1419	2.67	284 / 935	3.29

+ hoja de aproximadamente 3 semanas de edad.

El muestreo de hojas de árboles desarrolla largos brotes o ramillas que pueden provenir de brotes más antiguos, como prolongación de ellos, o bien directamente de ramas lignificadas. Los primeros suelen ser más abundantes. Por su mayor longitud, los brotes de árboles nuevos contienen un número de hojas que en el caso de árboles de más edad. Interesaba averiguar como se distribuía la actividad enzimática en las diferentes hojas a lo largo del brote. A este fin, se muestrearon árboles Valencia, de dos y medio años de edad, y se eligió para un ensayo el tipo de brote más abundante, o sea, el brote nuevo, que es prolongación de uno un poco más viejo. El análisis se efectuó tomando sucesi-

vamente del brote nuevo, cuatro grupos de cinco hojas cada uno, desde el ápice hacia la base. Los tres primeros grupos consistían en hojas nuevas.

Los resultados aparecen en el Cuadro 20, y están representados gráficamente en la figura 15.

Cuadro 20. Actividad de la nitrato reductasa en hojas en diferente posición en el brote nuevo, en árboles Valencia de dos y medio años.

Tipo de hojas	Posición	Ensayo enzimático	Lectura 3/ fotocolorímetro	Prod. nitritos nM/g/2h.	Relac. ANR(i)/ ANR(e)
Hn	1a - 5a.	ANR(e) ANR(i)	3.0 28.0	267 2.492	9.33
	5a -10a.	ANR(e) ANR(i)	2.75 42.5	245 3.783	15.44
	10a -15a.	ANR(e) ANR(i)	2.5 62.0	223 5.518	24.74
Hvn		ANR(e) ANR(i)	1.5 100	134 882.8	65

+ Arboles no fertilizados.

La actividad relativa es muy alta y variable en este tipo de brote. En este caso sería aventurado emitir algún juicio de diagnóstico, por cuanto en árboles nuevos, en los que el crecimiento vegetativo es tan intenso, se produce un desfasamiento entre el acopio de nitrógeno como nitrato necesario para la construcción de nuevo tejido y la capacidad de absorción del sistema radicular. Como resultado, siempre existirá una relación de déficit fuerte, que es la que señalarían los resultados obtenidos. Por otra parte, es probable que dicha variación se manifieste en brotes de árboles adultos, por lo cual habría que decidirse a uniformar las hojas a muestrear en este caso, tomando las hojas del sector medio del brote jóven.

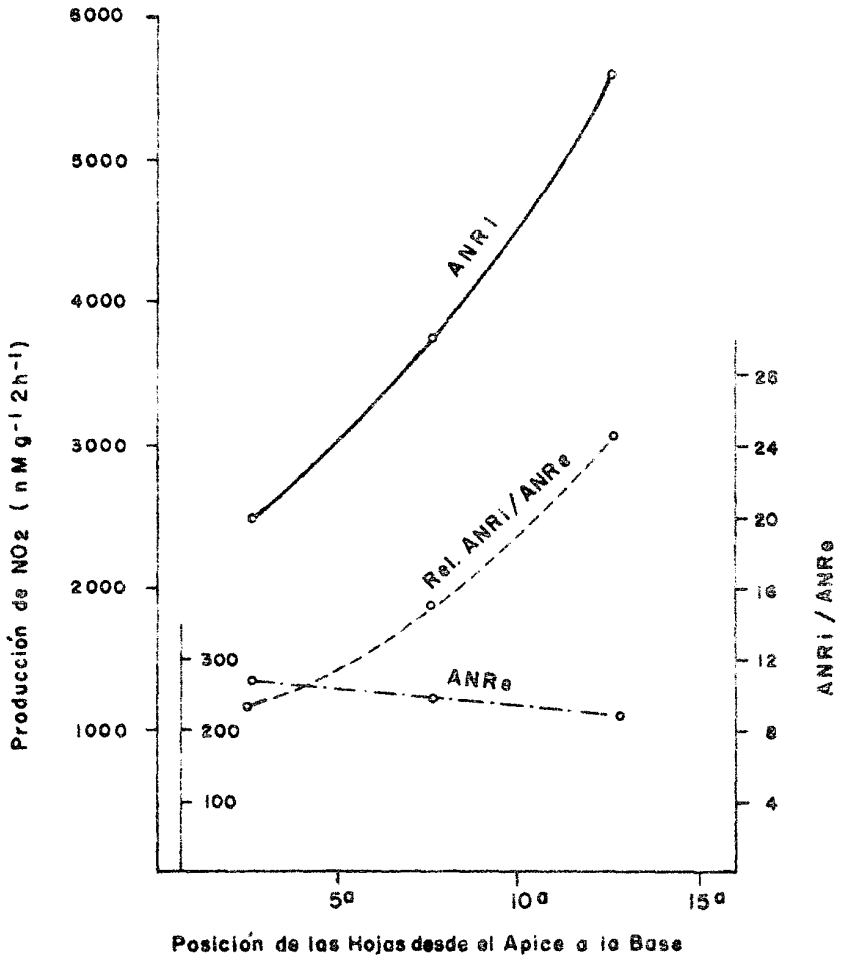



Figura N° 15 Actividad de la N.R. a lo Largo de Brotes de Arboles Nuevos.