

UN METODO PARA ANALIZAR LA ACTIVIDAD DE LA REDUCTASA DEL NITRATO EN CONDICIONES DE CAMPO¹*

Enrique Villalobos y José F. Carvajal**

ABSTRACT

A method of analyzing nitrate reductase activity under field conditions. A factibility study was carried out, to determine the nitrate reductase activity (NRa) under field conditions. The following parameters were investigated: a) the correlation between NRa in leaves of five agricultural crops and both the length of the incubation period and sample weight; b) the molar concentration of the KNO₃ solution used in nitrate reduction potential studies, which does not cause tissue injury; c) the stability of the chemical reagents employed in the determination of the enzyme activity; d) an acceptable method to substitute for the analytical balance and the colorimeter used in a regular laboratory.

A proportional relationship was found between the actual catalytic activity of the NRa and both sample weight and length of the incubation period. This finding allows to select, for each individual plant species, the best combination of such parameters to minimize the analytical error. The behaviour of the different plant species in response to the concentration of the KNO₃ solution used as a spray to induce enzyme activity, indicated that a 0.15 M concentration was safe even in tender leaves. All chemical reagents used in the determination of NRa appeared stable for a six-month period, except the N-1-Naphthylethylene diamine dihydrochloride, which lost its copulant property after 4.5 months. The use of a constant number of leaf discs of 2.5 mm diameter was found suitable as a practical substitute for the analytical balance in the field. The colorimeter can be substituted for a color chart prepared with the magenta color manufactured by George Rowney Co. of London, England.

It is concluded that it is possible to determine NRa directly in the field, for which purpose it is hereby proposed a rapid semiquantitative method, which could eventually be utilized in portable field equipment.

INTRODUCCION

Algunos investigadores han postulado a la actividad de la enzima reductasa del nitrato (aRN) como indicador del estado de nutrición por nitrógeno en algunas especies botánicas de interés agrícola. Bar-Akiva y colaboradores (1,34) encontraron, en cítricos y gramíneas forrajeras, que se obtiene una máxima actividad de la referida enzima mediante infiltración foliar de KNO₃ 0,1 M y que la magnitud de tal incremento puede servir como indicadora del estado de nutrición por nitrógeno, pues cuando el elemento se encuentra en cantidad deficiente en

1 Recibido para su publicación el 13 de octubre de 1977.

* Trabajo presentado en el II Congreso Agronómico Nacional, febrero de 1976. Contiene parte de la tesis de Ingeniero Agrónomo, presentada por el primer autor a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Costa Rica. Los autores agradecen al Dr. Rafael L. Rodríguez, de la Escuela de Biología, su ayuda en la preparación de la carta colorimétrica.

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

la planta, la diferencia entre la actividad inducida y la que se desarrolla sin infiltración previa, es grande. Brealey y Carvajal (7) encontraron en café que cuando las hojas del segundo par tienen una concentración de nitrato por encima del nivel crítico, que es de > 600 ppm (8), la aRN se mantiene prácticamente estable, aun cuando las hojas sean asperjadas veinticuatro horas antes con una solución de KNO_3 0,35 M. Sin embargo, cuando el contenido de nitrógeno es insuficiente, la infiltración de NO_3^- en las hojas, como resultado de la aspersión, eleva hasta un máximo potencial tal actividad enzimática.

Recientemente Shaked, Bar-Akiva y Mendel (12) sugirieron que el cociente que se obtiene de la relación aRN inducida/aRN inicial, puede ser usado como una indicación del potencial total de asimilación de nitrato y a la vez como un criterio útil como guía de la fertilización nitrogenada. Tal relación fue usada posteriormente por Villalobos y Carvajal (15), quienes encontraron en varias especies botánicas de interés agrícola que un cociente cercano a la unidad señala, en la práctica, estados de nutrición adecuados por nitrógeno.

La literatura disponible sobre métodos analíticos para medir la aRN presenta varias alternativas, desde la fase de preparación de la muestra hasta la determinación cuantitativa del NO_2 producido por la enzima. El método de maceración del tejido usado para extraer la enzima fue comparado por Bar-Akiva y colaboradores (2), en cítricos, con el uso de discos de tejido foliar. Estos autores encontraron que, si bien la maceración permite obtener una actividad enzimática mayor, en la práctica el método que hace uso de fragmentos de tejido foliar da resultados más comparables con la actividad enzimática que tiene lugar en condiciones naturales. En contraposición, otros trabajos han indicado que se obtiene una mayor actividad enzimática con el uso de fragmentos de hojas que con el método de la maceración (14). Se estima que esta última alternativa causa una desorganización del sistema enzimático, que conduce a la posterior reducción del nitrito, producto de la actividad de la aRN (11) y, en ciertos casos, como ocurre en ericáceas, promueve la liberación de compuestos fenólicos y de otros componentes celulares, lo que finalmente inactiva totalmente a la enzima (10).

Bidal y Rains (6) observaron en algodón que el tamaño del disco del tejido foliar que producía los

valores más altos de aRN era el de 4 mm de diámetro. Por otro lado, Brealey y Carvajal (7) añaden que la reacción de los discos con el substrato enzimático es una "actividad de borde", ya que el substrato no penetra al interior de los discos, aún bajo la influencia de vacío en el medio de incubación, como fue recomendado por Bar-Akiva y Sternbaum (4,5) al trabajar con fragmentos de hojas de cítricos. Discos de 2,5 mm de diámetro se han empleado con éxito en estudios de aRN en café (7,9,15) y en otras especies (15).

Estudios sobre la metodología para la determinación cuantitativa de la aRN han sido hechos en un número de investigaciones (2,4,5,6,7,10). En todos los casos los diferentes autores han usado indistintamente los métodos inicialmente propuestos por Snell y Snell (13), con o sin modificaciones, para cuantificar colorimétricamente la cantidad de nitrito producido por la actividad de la enzima en referencia.

El objetivo del presente trabajo fue elaborar un método de análisis semicuantitativo de la actividad enzimática de la nitrato reductasa en el campo, para estimar el estado de nutrición por nitrógeno en algunas especies botánicas de interés agrícola.

MATERIALES Y METODOS

En el trabajo experimental se incluyeron cinco especies: café (*Coffea arabica* var. *Typica*), tomate (*Lycopersicon esculentum* var. *Manapal*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), zacate elefante (*Pennisetum purpureum*) y zacate kikuyu (*Pennisetum clandestinum*). Con excepción del tomate, que se cultivó en condiciones de invernadero, las demás especies fueron seleccionadas en plantaciones comerciales.

Análisis de la actividad de la reductasa del nitrato

La aRN fue determinada por el método de Dirr, Barker y Maynard (10), modificado por el empleo de buffer tris hidroximetilamonio metano HCl en lugar de buffer de fosfato. Esta metodología fue usada antes por Villalobos y Carvajal (15) en las cinco especies mencionadas en el párrafo anterior. En todos los casos las muestras foliares se lavaron

previo al análisis con HCl 0,15 N y agua destilada, inmediatamente después de colectadas en el campo o invernadero, para eliminar impurezas y contaminaciones. Seguidamente se obtuvieron discos de tejidos foliares con un sacabocados de 2,5 mm de diámetro, hasta completar un peso de muestra determinado. La muestra se incubó en un tubo de ensayo de 25 ml, donde procedió la actividad enzimática (producción de nitrito) en un medio compuesto por 5 ml de buffer tris HCl 0,05 M, pH 7,4; 1 ml de succinato 0,1 M, neutralizado a pH 7 con NaOH 3 M; 1 ml de KNO_3 0,1 M y 2 ml de agua bidestilada. La incubación se prolongó por 10, 15, 20 ó 30 minutos a temperatura ambiente, en ausencia de luz (5). El líquido se recogió después en un balón aforado de 100 ml luego de filtrar a través de un papel de fieltro "banda azul" y practicar tres lavados consecutivos con aproximadamente 5 ml de agua bidestilada. El color distintivo del contenido de nitrito se desarrolló finalmente al agregar 2 ml de sulfanilamida al 1% p/v en HCl, 1,5 N y 2 ml de dihidrocloruro de N (1-naftil) etilendiamina al 0,02% p/v preparada en HCl 0,2 N. El volumen se ajustó a 100 ml y la intensidad del color desarrollado se midió a una longitud de onda de 525 μm en un espectrofotómetro Fisher Modelo AC.

Tamaño de la muestra y tiempo de incubación

Se estudió la actividad de la enzima en cuatro períodos de incubación a la oscuridad (10, 15, 20 y 30 minutos) y en cuatro tamaños de muestra foliar (0,25 , 0,50 , 0,75 y 1,0 g), en las cinco especies mencionadas, con el propósito de seleccionar luego, para cada especie, la combinación de parámetros más apropiada. En todos los casos se pesó 10 g de discos de tejido foliar; después de mezclar los discos en un recipiente, para homogeneizar la muestra, se tomaron alicuotas en triplicado para ser estudiadas en forma simultánea. En los zacates elefante y kikuyu, tomate, café y caña de azúcar, el análisis de aRN se realizó 24 horas después de infiltrar KNO_3 0,25 M en las hojas mediante atomización, para inducir una mayor síntesis enzimática. Con el fin de sustituir el uso de la balanza analítica en el campo, se determinó en cada caso el número de discos correspondientes a un peso de 10 g.

Efecto de la concentración de KNO_3 en la aRN

Se compararon cuatro concentraciones de KNO_3 en solución acuosa (0,15 , 0,25 , 0,35 y 0,50 M), asperjeadas sobre el follaje de las cinco especies bajo estudio; en todos los casos se añadió el humectante no iónico Tritón X-114 al 0,1% (octil fenoxi polietoxi etanol). Se realizó una sola aplicación sobre ambas superficies de la hoja, mediante un dispositivo manual. Se estudió el efecto de las diferentes concentraciones sobre la síntesis de la reductasa del nitrato, así como los daños físicos que pudieran causar al tejido, 24 horas después de la aspersión.

Para medir el efecto de la concentración de KNO_3 en la síntesis de la aRN, en el caso de los zacates kikuyu y elefante, se escogieron tallos de una misma cepa, de edad fisiológica similar, y se obtuvo la muestra de las primeras cuatro hojas de arriba hacia abajo, eliminando la primera hoja o "candelilla" y 5 cm del ápice y de la base. En caña de azúcar se tomó una porción central de 20 cm, de los quintas hojas de tallos del mismo tamaño y edad fisiológica, pertenecientes a una misma cepa. En tomate se usaron hojas compuestas alternas, a partir de la segunda hoja apical de una misma planta y en café se utilizaron hojas opuestas al tercer par de ramas plagiotrópicas superiores de una misma planta (se tomó el par recién formado como No. 1). En el análisis se la aRN se usó 1 g de muestra foliar (discos de 2,5 mm) y un tiempo de incubación a la oscuridad de 30 minutos.

Estabilidad de los reactivos

Se determinó periódicamente la estabilidad de cada uno de los reactivos usados en la investigación, comparando la intensidad del color desarrollado por ellos y por reactivos recién preparados; en todos los casos se usó una solución patrón de 0,06 ppm de nitrito, reaccionando en cada caso con un reactivo original y con el resto recién preparado. Los reactivos originales permanecieron a la oscuridad en botellas color ámbar, a temperaturas ambiente (aproximadamente a 22 C).

Preparación de una carta colorimétrica

Con el fin de hacer estimaciones semicuantitativas de la aRN en condiciones de campo, se estudió la posibilidad de emplear un patrón de soluciones, del mismo color al obtenido con la reacción del nitrito y los reactivos correspondientes y de intensidad colorimétrica conocida, para usarlo en sustitución del espectrofotómetro en el campo. Sin embargo, en todos los casos en que se usaron colorantes en solución se comprobó la inestabilidad del color. Debido a esto, se elaboró una carta colorimétrica, para lo cual se hizo una curva patrón representativa de 142,8 , 258,6 , 428,4 y 999,6 nM N-NO₂, con el concurso del espectrofotómetro. Posteriormente se reprodujo el color en papel de dibujo blanco, con el colorante magenta para acuarela, producido por la casa George Rowney & Co., de Londres. Finalmente se hizo una impresión en papel cartulina brillante, en cuadros de 1,5 por 4 cm espaciados entre sí 1,5 cm y se comprobó la precisión de la carta colorimétrica contra la curva patrón que se usó originalmente.

RESULTADOS

Relación entre el tamaño de la muestra foliar, el tiempo de incubación y la aRN en las cinco especies.

Se encontró una relación lineal de la actividad de la reductasa del nitrato en función del tiempo de incubación a la oscuridad, así como del tamaño de la muestra de discos de tejido foliar, en las cinco especies agrícolas estudiadas (Figuras 1 a 10). El número promedio de discos correspondiente a cada tamaño de muestra, para las cinco especies, se presenta en el Cuadro 1.

Efecto de la concentración de KNO₃ en la síntesis de la aRN y daños físicos en las hojas.

El efecto de la concentración de NO₃⁻ en la inducción de la síntesis de la reductasa del nitrato, se muestra en los Cuadros 2 y 3. Aunque los resultados obtenidos fueron variables, se observó que tanto en las dos gramíneas forrajeras como en la caña de azúcar, se obtuvo un incremento de la aRN al au-

mentar la concentración de KNO₃ (Cuadro 2). En tomate se observó un aumento en la actividad enzimática con respecto al tratamiento testigo cuando se asperjaron las hojas con KNO₃ 0,15 M, pero las soluciones de mayor concentración produjeron necrosis generalizada que imposibilitó la realización del análisis. En los zacates elefante y kikuyu, las soluciones de concentración 0,35 y 0,50 M produjeron quemaduras hacia los bordes de las hojas. No obstante, se observó un incremento en la aRN con relación al testigo. En caña de azúcar no se produjeron quemaduras en ningún caso.

En café, usando hojas opuestas de un mismo par (Cuadro 3), se observó un incremento gradual de la aRN con el aumento de la concentración de KNO₃ y esporádicamente quemaduras causadas por las soluciones más concentradas (0,35 y 0,50 M).

Estabilidad de los reactivos

Se encontró (Cuadro 4) que el compuesto dihidrocloruro de N (1-naftil) etilendiamina, que se usa como agente copulante en la determinación cuantitativa del nitrito, se oscurece gradualmente al formar un precipitado, debido posiblemente a la oxidación de los grupos NH₂. No obstante, su eficiencia se mantuvo hasta por un período de cuatro meses y medio.

Preparación de la carta colorimétrica

Ante la falta de una estabilidad prolongada en las soluciones colorantes tradicionales, se preparó la carta colorimétrica que aparece en la Figura 11. Se encontró que este patrón permite una cuantificación semicuantitativa satisfactoria de la aRN, al comparar su bondad con las lecturas obtenidas en un espectrofotómetro, utilizando muestras foliares de las cinco especies que se usaron como material experimental.

DISCUSION

Es un hecho bien establecido que la síntesis de la reductasa del nitrato es inducida por la presencia de nitrato en los tejidos (1,7,9,11,15) y que la aRN disminuye marcadamente, hasta alcanzar valores muy bajos, en el momento en que el suministro de

Cuadro 1. Número de discos de 2,5 mm de diámetro de tejido foliar, correspondiente a diferentes pesos de muestra en cinco especies botánicas de interés agrícola.*

Peso muestra (g)	Café	Caña	Tomate	Elefante	Kikuyu
0,25	95 ± 3,14	85 ± 4,58	135 ± 6,69	107 ± 5,91	109 ± 9,32
0,50	190 ± 9,09	168 ± 5,50	275 ± 7,33	218 ± 7,63	224 ± 8,69
0,75	275 ± 6,98	255 ± 5,38	412 ± 8,49	316 ± 6,69	325 ± 10,3
1,00	384 ± 6,53	343 ± 7,63	553 ± 5,76	430 ± 7,32	444 ± 11,6

* Datos promedio de cinco repeticiones.

Cuadro 2. Efecto de la aspersión con soluciones de KNO₃ de diferente concentración en la aRN y en la toxicidad sobre las hojas, en tomate, caña de azúcar y en los zacates kikuyu y elefante.*

Concentración molar de KNO ₃	Elefante		Kikuyu		Tomate		Caña	
	aRN (nM NO ₂ ⁻)	% relativo	aRN (nM NO ₂ ⁻)	% relativo	aRN (nM NO ₂ ⁻)	% relativo	aRN (nM NO ₂ ⁻)	% relativo
0,00	707,5	100	634,9	100	371,9	100	56,7	100
0,15	1179,2	167	1065,8	168	494,3	133	344,7	608
0,25	1417,3	200	1179,2	186	***	—	385,5	680
0,35	1886,6**	267	1462,6	230	***	—	464,9	820
0,50	2199,6**	311	1705,2**	269	***	—	895,7	1580

* Datos promedio de tres repeticiones

** Dato obtenido en tejido foliar con muestras visibles de quema en grado variable

*** Necrosis generalizada

esta forma de nitrógeno se agota. La aspersión de disoluciones de KNO₃ a distintas concentraciones indicó que algunas de estas causan quemaduras, especialmente en aquellas especies con follaje succulento, como tomate (Cuadro 2). Se concluyó que la aspersión con disoluciones de KNO₃, con el objeto

de infiltrar NO₃⁻ en los tejidos para investigar la actividad potencial de la aRN que se induce, tiene un límite de seguridad de 0,15 M (en hojas de tomate concentraciones mayores causaron necrosis generalizada), aún cuando en caña de azúcar inclusive una concentración 0,50 M no causa daño alguno.

Cuadro 3. Efecto de la aspersión con KNO_3 de diferente concentración en la aRN de los segundos pares de hojas del café.*

Concentración molar de KNO_3	Hojas opuestas del segundo par	aRN (nM NO_2^-)
0,00	A	171,9
0,15	A'	238,1
0,15	B	170,1
0,25	B'	170,1
0,25	C	215,4
0,35	C'	294,8
0,35**	D	390,0
0,50**	D'	510,2

* Valores promedio de tres repeticiones. El exponente de cada letra identifica a la hoja opuesta que recibió una concentración diferente de KNO_3 , según se especifica en la primera columna.

** Esta concentración produjo quema esporádicamente.

Respecto al tamaño de la muestra y la duración del período de incubación (Figuras 1 a 10), se encontró que en caña de azúcar y café la actividad enzimática era relativamente baja en comparación con las otras especies estudiadas, y se infiere que se debe recomendar el uso de 1 g de discos de 2,5 mm (o un número de discos equivalentes, Cuadro 1) con un tiempo de incubación de 30 minutos. Para las otras especies se deduce, asimismo, que puede usarse cualquier combinación de tamaño de muestra y tiempo de incubación, siempre que se obtenga una lectura colorimétrica dentro de los límites de confiabilidad del espectrofotómetro (absorbancia entre 0,3 y 0,8) o de la carta colorimétrica preparada con ese mismo propósito. Se sabe que en café, para un peso de muestra de 0,25 g, un período de incubación a la oscuridad superior a 3 horas ocasiona una reducción de la cantidad de nitrato producida (7). En cítricos, un tiempo de incubación de 2 horas, para un peso de muestra de 0,25 g, ha sido considerado como óptimo, en relación a la máxima actividad enzimática que se alcanza (2). En la presente investigación en que se buscó una proyección práctica, se aumentó el tamaño de la muestra hasta 1 g y se estudiaron

tiempos de incubación no mayores de 30 minutos. Ahora bien, en todos los casos se obtuvo una tendencia lineal positiva de la actividad enzimática en función del tiempo de incubación y del tamaño de la muestra (Figuras 1 a 10). Una relación similar se ha encontrado en hojas de soya, hasta por un lapso de 60 minutos y muestras no mayores de 0,20 g (14). En hojas de algodón, Bilal y Rains (6) encontraron una relación lineal positiva entre la actividad enzimática y el tiempo de incubación en un ámbito de 10 a 60 minutos, para un peso de muestra de 0,10 g. En combinación con este aspecto en la presente investigación se determinó además, el número de discos de hojas de 2,5 mm de diámetro que correspondían a un peso determinado de muestra (Cuadro 1). Este parámetro se traduce en un aspecto práctico, cual es la eliminación de la necesidad de contar con una balanza analítica para obtener una muestra de peso estándar fuera del laboratorio. La poca diferencia observada entre repeticiones señaló que el uso de este método es razonablemente confiable para los fines que se persiguen.

Un aspecto que merece mención especial es la factibilidad del uso de una carta colorimétrica, representativa de una escala de actividad de reductasa, que permita eliminar el uso del espectrofotómetro para la estimación cuantitativa de la intensidad del color que se desarrolla al final de la fase analítica. El empleo de una escala de colores reproducida en imprenta, como la que se propone, permite en la práctica hacer una estimación semi-cuantitativa de gran valor para la determinación de la aRN en el campo.

El análisis semi-cuantitativo mediante reacciones colorimétricas requiere de un estudio previo del vencimiento de los reactivos. En una investigación de seis meses de duración, únicamente el agente copulante (dihidrocloruro de N (1-naftil) etilendiamina) mostró vencimiento a los cuatro meses y medio (Cuadro 4). Esto quiere decir que el resto de los reactivos que se emplean son estables, cuando menos por el tiempo en que se realizó el estudio. Se concluye que el presente trabajo permitió estudiar la mayoría de los parámetros fundamentales que se deben tomar en cuenta, con el afán de proponer un método de análisis semi-cuantitativo, para ser empleado en el campo para investigar el potencial de asimilación del nitrato, como guía de la fertilización y aprovechamiento de los fertilizantes nitrogenados.

Cuadro 4. Estabilidad de los reactivos usados en la determinación colorimétrica de la aRN durante un período de seis meses. Los datos se expresan en Absorbancia* 100.

Reactivo original	Reactivos recién preparados *	Fecha del análisis					
		12-2-73	10-3-73	10-4-73	2-5-73	25-6-73	3-8-73
Ninguno	Todos	36**	36	36	35	35	36
Buffer tris HCL pH 7,4	Resto	—	36	36	35	35	36
Succinato	Resto	—	36	36	35	35	36
Sulfanilamida	Resto	—	36	36	35	35	36
Nitrato de potasio	Resto	—	36	36	35	35	36
Dihidrocloruro de N (1-naftil) etilendiamina	Resto	—	36	36	35	32,5	18,5

* El color se desarrolló en todos los casos haciendo uso de una solución de 0,06 ppm de N-NO₂ (como KNO₂) preparada fresca en cada oportunidad.

** Valores promedio de tres repeticiones.

RESUMEN

Se investigó la factibilidad de determinar la actividad de la reductasa del nitrato (aRN) fuera del laboratorio. Con tal propósito se estudió: a) la correlación que existe entre la aRN en hojas de distintas especies y diferentes tiempos de incubación y pesos de muestra foliar; b) la concentración -óptima de la solución de KNO₃ para inducir la actividad de la referida enzima, sin causar daños físicos; c) el vencimiento de los reactivos empleados en la evaluación cuantitativa de la aRN y ch) una sustitución satisfactoria de la balanza analítica y del fotocolorímetro.

Se encontró que existe proporcionalidad entre la actividad catalítica de la enzima y el peso de la muestra, así como entre aquella y el tiempo de incu-

bación. Esto permite elegir para cada especie, el peso de la muestra y el tiempo de incubación conducentes a un menor error analítico. La concentración más apropiada de la solución de KNO₃ varió según la especie. Todos los reactivos resultaron estables durante un período de 6 meses, con excepción del dihidrocloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina, que perdió su acción copulante a los 4,5 meses. Se encontró que es posible sustituir la balanza analítica por un número constante de discos de hojas de 2,5 mm de diámetro, equivalente a un peso de muestra definido. Asimismo, que el fotocolorímetro puede ser sustituido por una carta colorimétrica preparada con el color magenta para acuarela. Se concluyó que es factible determinar la aRN en el campo, para lo que se propone un método rápido semicuantitativo que eventualmente podrá ser utilizado con un equipo analizador portátil.

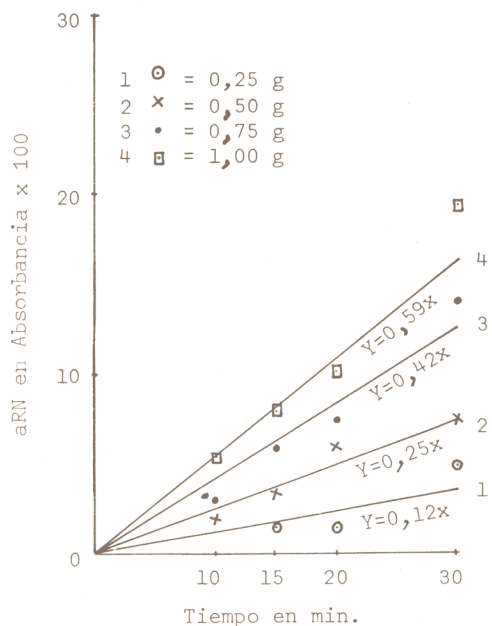


Fig. 1. *Café*: aRN en función del tiempo de incubación para muestras foliares de distinto peso.

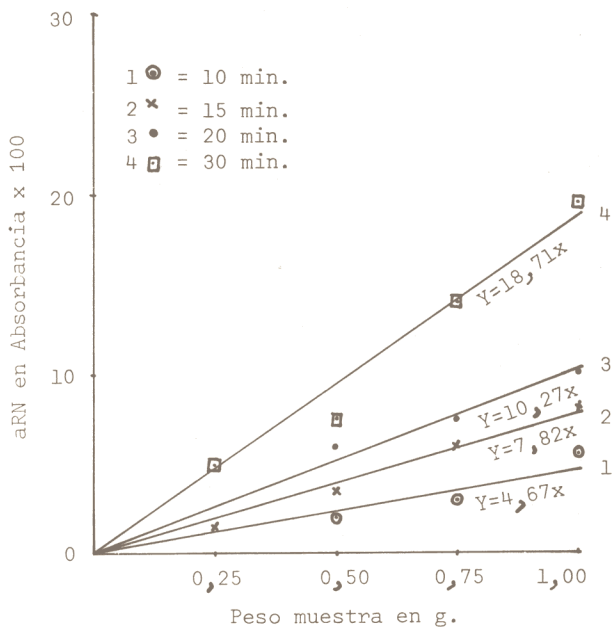


Fig. 2. *Café*: aRN en función del peso de la muestra para diferentes tiempos de incubación.

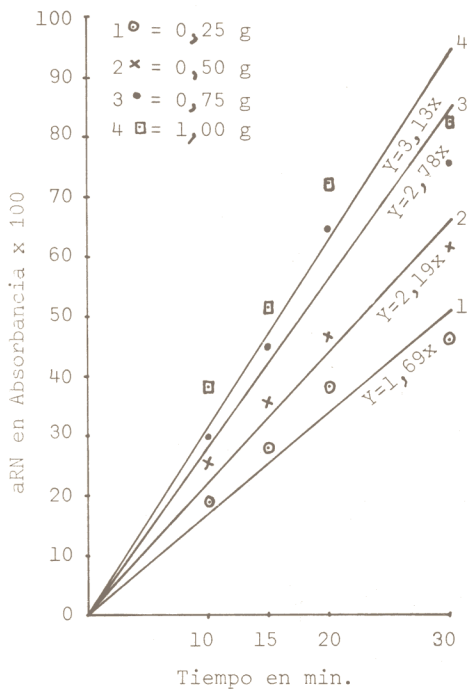


Fig. 3. *Caña*: aRN en función del tiempo de incubación para muestras foliares de distinto peso.

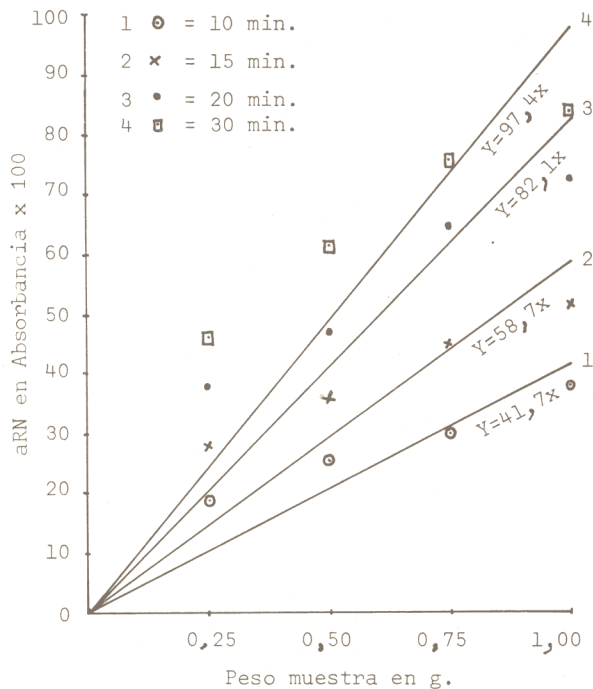


Fig. 4. *Caña*: aRN en función del peso de la muestra para diferentes tiempos de incubación.

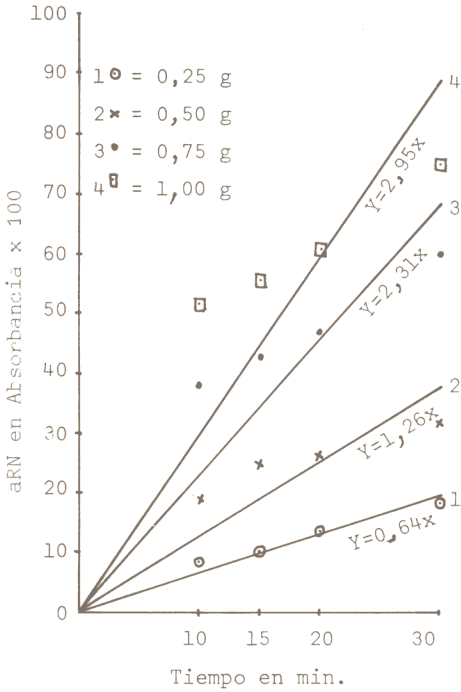


Fig. 5. Tomate: aRN en función del tiempo de incubación para muestras foliares de distinto peso.

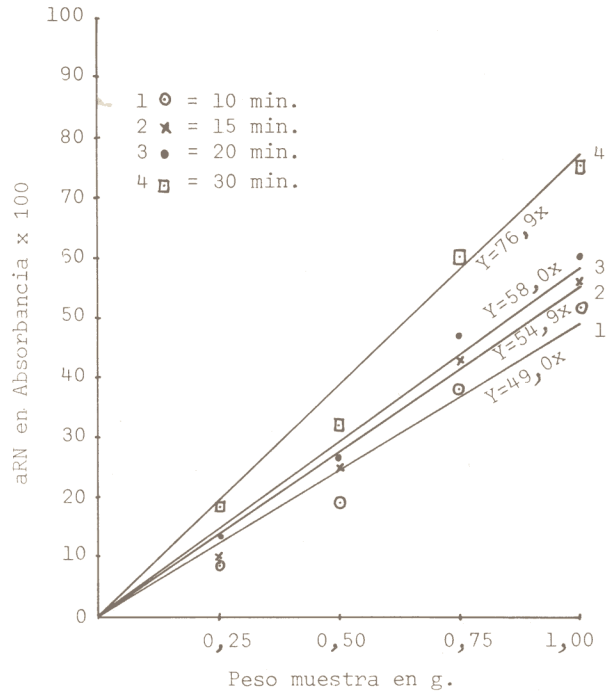


Fig. 6. Tomate: aRN en función del peso de la muestra para diferentes tiempos de incubación.

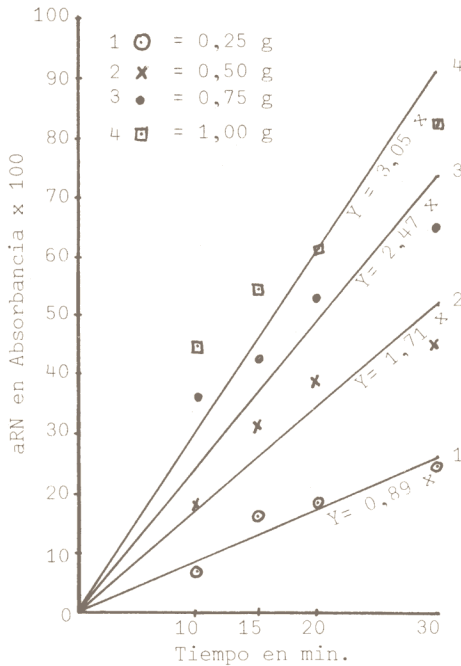


Fig. 7. Elefante: aRN en función del tiempo de incubación para muestras foliares de distinto peso.

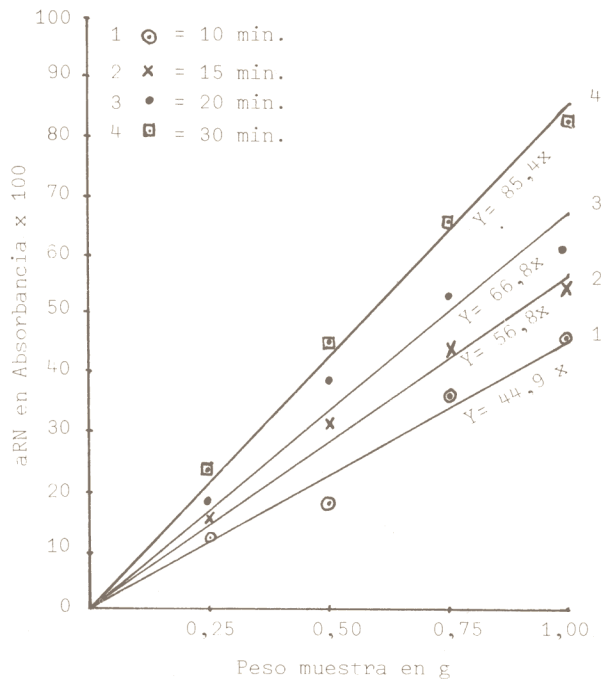


Fig. 8. Elefante: aRN en función del peso de la muestra para diferentes tiempos de incubación.

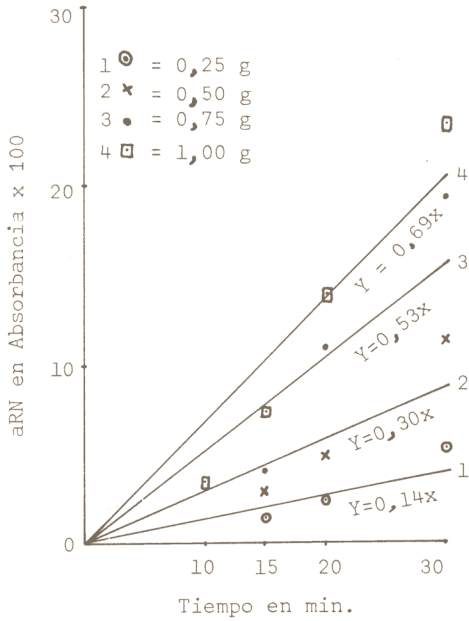


Fig. 9. *Zacate kikuyu*: aRN en función del tiempo de incubación para muestras foliares de distinto peso.

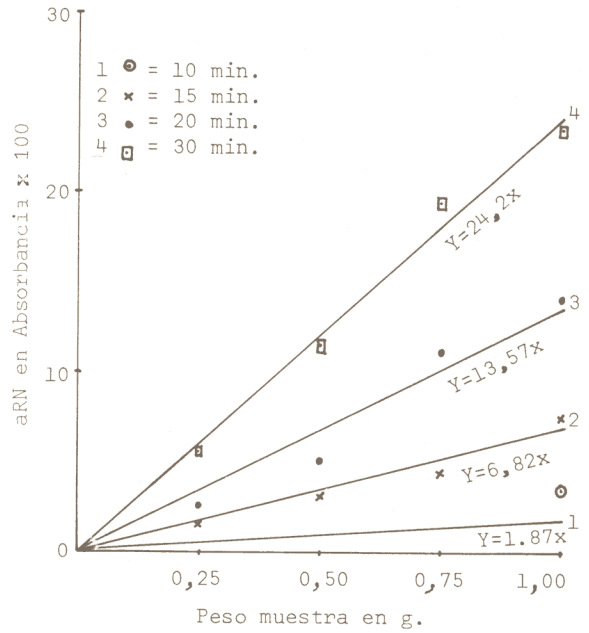
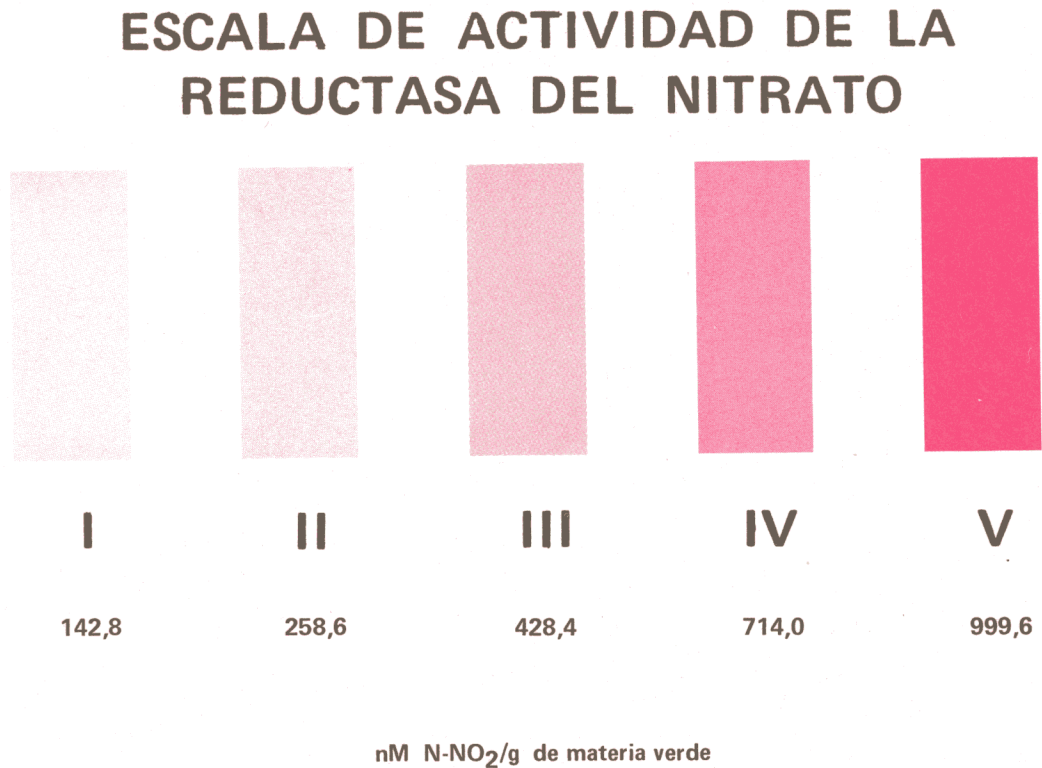


Fig. 10. *Zacate kikuyu*: aRN en función del peso de la muestra para diferentes tiempos de incubación.

Fig. 11. Carta colorimétrica.



LITERATURA CITADA

1. BAR-AKIVA, A., SAGIV, J. y LESHEM, L. Nitrate reductase activity as an indicator for assessing the nitrogen requirement of grass crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 21: 405-407. 1970.
2. _____, _____, SHAKED, A. y LAVON, R. Investigations into new methods for assessing nutrient status in citrus trees and other plants. Rehovot, Israel, The Volcani Institute of Agricultural Research, Department of Horticulture. Project No. 10CR36. 1966. 55 p.
3. _____ y STERNBAUM, J. Possible use of nitrate reductase activity of leaves, as a measure of the nitrogen requirement of citrus trees. *Plant and Cell Physiology* 6: 575-577. 1965.
4. _____ y _____. Nitrate reduction in citrus tree leaves. *Plant and Soil* 23: 141-144. 1965.
5. _____ y _____. Non enzymic reduction of the nitrite by means of ascorbic acid in citrus and other higher plant tissues. *Physiologia Plantarum* 19: 422-428. 1966.
6. BILAL, I.M. y RAINS, G.W. *In vivo* characterization of nitrate reductase activity in cotton. *Physiologia Plantarum* 28: 237-243. 1973.
7. BREALEY, O. y CARVAJAL, J.F. La actividad de la reductasa del nitrato como guía de la fertilización nitrogenada del café. *In IV Simposio Latinoamericano de Fisiología Vegetal*. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Programa y Resúmenes. 1971. pp. 44-45.
8. CARVAJAL, J.F. Café, cultivo y fertilización. Berne, Switzerland, International Potash Institute, 1972. 141 p.
9. CARVAJAL, J.F. y CAVALLINI, J.A. Nitrate reductase activity in coffee trees as affected by mineral deficiency. American Society of Agronomy, Annual Meeting, Miami. 1972. 190 p.
10. DIRR, M.A., BARKER, A.V. y MAYNARD, D.N. Nitrate reductase activity in the leaves of the highbush blueberry and other plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 97: 329-331. 1972.
11. MULDER, E.G., BOXMA, R. y VAN VEEN, W.L. The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissues. *Plant and Soil* 10: 335-355. 1959.
12. SHAKED, A., BAR-AKIVA, A. y MENDEL, K. L'activité de la nitrate réductase: une indication de l'état nutritionnel et des besoins en azote d'agrumes en vergers. *Fruits* 30(2): 125-128. 1975.
13. SNELL, F.D. y SNELL, C.T. *Colorimetric methods of analysis*. New York, Van Nostrand, 1949. v.2, 943 p.
14. STREETER, J.G. y BOSLER, M.E. Comparison of "in vitro" and "in vivo" assays for nitrate reductase in soybean leaves. *Plant Physiology* 49: 448-450. 1972.
15. VILLALOBOS, E. y CARVAJAL, J.F. La actividad de la reductasa del nitrato como guía de la fertilización nitrogenada de cinco especies agrícolas. *Agronomía Costarricense* 1(1): 57-63. 1977.