

EFFECTO DE ALGUNAS ENZIMAS SOBRE LA ABSORCION  
FOLIAR DEL NITROGENO

Por

Julio Lugo Caja

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.  
Centro Tropical de Investigación y Enseñanza para  
Graduados  
Turrialba, Costa Rica  
Diciembre, 1962

EFFECTO DE ALGUNAS ENZIMAS SOBRE LA ABSORCION  
FOLIAR DEL NITROGENO

Tesis

Sometida al Consejo de Estudios Graduados como  
requisito parcial para optar al grado

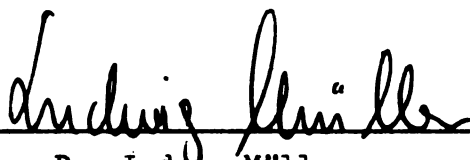
de

Magister Agriculturae

en el

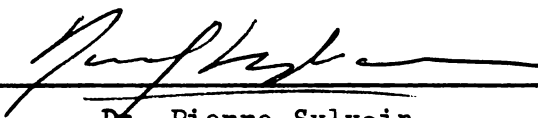
Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.

APROBADA:



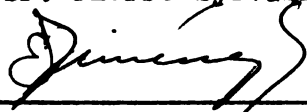
Dr. Ludwig Müller

Consejero



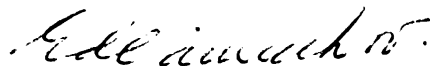
Dr. Pierre Sylvain

Comité



Dr. Eduardo Jiménez

Comité



Ing. Edilberto Camacho

Comité

Diciembre, 1962

A MIS PADRES

A MI ESPOSA

A MIS HIJOS

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su agradecimiento a los miembros de su Comité Consejero, Dr. Ludwig Müller, Dr. Pierre Sylvain, Ing. Edilberto Camacho, Dr. Eduardo Jiménez.

Agradece en forma especial al Dr. Howard Boroughs, a quien pertenece la idea original del presente trabajo.

Al Programa de Energía Nuclear del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de Turrialba, Costa Rica, por haberle concedido la oportunidad de realizar sus estudios post-graduados.

Al Dr. Gerardo Budowski, por brindarle facilidades para la culminación del presente escrito.

Al Ing. Alfonso Cerrate V., Jefe del Programa Cooperativo de Investigaciones en Maíz, Lima, Perú, por su apoyo moral en la realización y continuación de sus estudios.

Al Servicio de Investigación y Promoción Agraria, por haberle concedido licencia oficial durante su permanencia en el Instituto.

A todas aquellas personas que en una u otra forma, prestaron su gentil colaboración para llevar a cabo el presente trabajo.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Lima, Perú, el 28 de julio de 1934. Realizó sus primeros estudios en la Escuela Fiscal No.4307 y los secundarios en la Escuela Nacional Hipólito Unánue de Lima. En 1955 ingresó a la Universidad Agraria de La Molina, en Lima, graduándose de Ingeniero Agrónomo en 1958; realizó estudios post-graduados en la misma Universidad, en Fitotecnia, el año 1959.

En 1960 trabajó en el Programa Cooperativo de Investigaciones en Maíz, Universidad Agraria, destacado por el Servicio de Investigación y Promoción Agraria.

En junio de 1961 ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas para realizar estudios post-graduados, mediante una beca concedida por el Programa de Energía Nuclear, egresando en Diciembre de 1962.

TABLA DE CONTENIDO

	<u>Página N<sup>o</sup></u>
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
MATERIALES Y METODO.....	12
Procedimiento experimental .....	13
Diseño experimental en los experimentos 1,2,3, y 4.....	15
Diseño experimental en el experimento 5.....	16
Diseño experimental en el experimento 6.....	16
Observaciones y datos tomados en el <b>transcurso</b> para el análisis de nitrógeno .....	17
RESULTADOS	
<b>Experimento 1</b>	
Urea mezclada con diferentes enzimas: tratamiento de día..	20
<b>Experimento 2</b>	
Urea mezclada con diferentes enzimas; tratamiento de noche.....	22
<b>Experimento 3</b>	
Aplicación de urea mezclada con diferentes enzimas al haz de las <b>hojas</b> .....	23
<b>Experimento 4</b>	
Aplicación de urea mezclada con diferentes enzimas al envés de las hojas .....	25
<b>Experimento 5</b>	
Aplicación foliar de urea a diferentes pH.....	26
<b>Experimento 6</b>	
Aplicación de urea mezclada con pepsina o pectinasa en plantitas de maíz.....	27
Determinación de la eficiencia de absorción entre los tratamientos de día vs. noche y haz vs. envés.....	29

	<u>Página N<sup>o</sup></u>
Resultados de las observaciones de quemaduras en el follaje .....	30
DISCUSION.....	32
RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	39
SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	41
LITERATURA CITADA.....	43

## INTRODUCCION

Se ha establecido en forma general, que todas las sustancias que son absorbidas por las raíces pueden serlo también a través de las hojas.

En varios casos se ha llegado a determinar que el porcentaje de nutriente absorbido en relación a la dosis aplicada, puede ser mucho mayor, en el caso de la fertilización foliar, en comparación con la fertilización hecha al suelo.

El hecho de que los nutrientes aplicados a las hojas penetren en ellas y se trasladen dentro de la planta, trae implícita la pregunta: Cuál es el mecanismo de absorción que gobierna el fenómeno de la nutrición foliar? Con el objeto de buscar una respuesta a esta pregunta, se ha realizado una serie de trabajos en los cuales los isótopos radiactivos han servido como medios de investigación. Aunque existe alguna información en la literatura sobre el mecanismo de la absorción foliar, las evidencias que podrían servir para definirla son hasta ahora insuficientes, y las conclusiones parecen aún dudosas o contradictorias.

El objetivo del presente trabajo fué tratar de estudiar si el mecanismo de absorción foliar del nitrógeno proveniente de la urea está relacionado principalmente con el metabolismo de la hoja (35), o si puede ser variado por efecto de algunas enzimas agregadas a las aspersiones.

Con base en los resultados de los ensayos preliminares llevados a cabo por Boroughs (6), se seleccionaron cuatro enzimas:



pepsina, pectinasa, tripsina y pronasa, las cuales fueron aplicadas en combinación con urea a dos cultivos, uno de tipo perenne, cacao, y otro, anual, maíz, para estudiar el comportamiento de dichas enzimas en asperciones foliares de urea.

REVISION DE LITERATURA

Las primeras referencias relativas a la aplicación de los elementos nutritivos al follaje datan del siglo XVIII. Meninato (47) informa que en el diccionario de Miller y Cardener del año 1754, ya aparecían datos relacionados a la fertilización foliar. Según Wittwer y Teubner (76), uno de los primeros artículos sobre absorción foliar fué el del francés A. Gris, en 1844. Posteriormente hubo otros trabajos como el de Dowing, en 1869, el de Mayer, en 1874 y el de Bohm, en 1877.

Existen informes en la literatura (71) que evidencian el hecho de que desde 1914-15 ya se usaban asperciones en árboles frutales con fertilizantes nitrogenados; posiblemente sean éstas las primeras aplicaciones de campo conocidas.

La urea, citada en muchos textos de química (8, 22, 38), fué descubierta por Rouelle en 1773 y sintetizada por primera vez por Wöhler en 1828. Como fertilizante en escala comercial, fué propiciada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en 1942 (55). Desde la obtención comercial hasta nuestros días, han transcurrido más de dos décadas, período en el cual se le ha usado ampliamente como nutriente foliar, con indicaciones de que es absorbida, transportada y metabolizada (5,23,24,25, 31). Por esa razón, muchos investigadores ( 5, 57, 76) consideran de importancia aumentar los conocimientos sobre la absorción foliar de este fertilizante.

A efecto de discutir la absorción foliar, Wittwer y Teubner (76) han decidido separar los nutrientes en varios grupos, de acuerdo a las características propias de su absorción y traslado dentro de la planta.

Estos autores propusieron la siguiente clasificación:

- a. Absorción foliar del nitrógeno en forma de urea, por ser el más rápidamente absorbido, transportado y metabolizado.
- b. Absorción foliar de los aniones de los elementos P, S, Cl, I.
- c. Absorción foliar de los cationes monovalentes  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Rb^+$ .
- d. Absorción foliar de los cationes divalentes como el Ca,  $Mg^{++}$ ,  $Sr^{++}$ ,
- e. Absorción foliar de los elementos menores.

Esta clasificación se basa en los resultados de numerosas investigaciones (15, 21, 26, 73), según las cuales se ha encontrado que se requiere tan solo de unas pocas horas para que hojas absorban el 50% del nitrógeno aplicado por aspersión.

En conferencias que han tenido lugar en diferentes países, se han presentado muchos trabajos sobre investigaciones llevadas a cabo con el uso de radioisótopos en el estudio de la absorción foliar (16, 37, 54, 66, 70). Los isótopos que han servido en la determinación de la eficiencia de la absorción y del metabolismo de la urea, son: el  $C^{14}$  y el  $N^{15}$ . Hinsvark (35) trabajando con maíz y utilizando  $C^{14}O_2$  encontró que se requiere de 1 a 6 horas para detectar el 50% de nitrógeno de la solución de urea asperjada en las hojas. Igualmente, Cain (11) determinó que en el caso del cacao, también se requieren de 1 a 6 horas para detectar en las hojas el 50% del nitrógeno asperjado. Con base en estos informes, Wittwer y Teubner (76) han sugerido que la absorción foliar de la urea es un fenómeno de difusión

principalmente, que no depende de una fuente metabólica de energía. No obstante, Reinbothe y Mothes (57) consideraron que hay dos posibles modos de absorción y utilización de la urea por las plantas: por intervención de la enzima ureasa, o bien, sin la participación de esta enzima, por difusión. Sobre estas opiniones existen evidencias que merecen tenerse en cuenta. Por ejemplo: Bollard (5) menciona que la actividad de la ureasa fué reconocida por Shibata desde 1904; además, se reconoce que ésta es una enzima ampliamente distribuida en el reino vegetal. Sumner (68) afirma que tanto en bacterios como en plantas superiores, la ureasa parece ser una enzima constitutiva. Pero aún así, se desconoce el curso de la asimilación de la urea en plantas con ureasa libre. En este caso, se puede afirmar (5) las evidencias de que una molécula de urea puede ser metabolizada sin ser hidrolizada. El hecho de que algunas plantas utilicen la urea sin la intervención de la enzima ureasa, aún carece de explicación (57). Tampoco se puede descartar la posibilidad de que esta enzima esté presente en los cultivos que se considera que no la tienen, porque hay plantas que pueden producir ureasa en respuesta a la presencia de la urea (5). También se puede mencionar los experimentos de Freiberg y Payne (27) en los cuales, a pesar de obtener respuesta de un 65% de absorción foliar de la urea asperjada a plantas de banano, sorpresivamente se encontró que en las hojas asperjadas no había ureasa. Sin embargo se constató luego que si era cierto que las hojas adultas no tenían ureasa, en los extractos de los puntos vegetativos sí existía la enzima. Según Reinbothe y Mothes (57), por no haber mé-

todos exactos, apropiados y seguros para la obtención y detección de la ureasa en las plantas, puede ser que durante la preparación de los extractos se inactive la enzima y al final haya la impresión de que no existe.

En algunos casos en los cuales no ha habido respuesta inmediata a la aspersión de urea, se pensó que uno de los factores que pueden limitar la velocidad de la reacción fuera la actividad de la ureasa. Por esa razón, para determinar la actividad de la ureasa y la respectiva utilización del nitrógeno, se han empleado los métodos siguientes:

- a. Medición de la velocidad relativa de producción de  $C^{14}O_2$  de la urea marcada
- b. Medición de la velocidad de absorción o desaparición de la urea asperjada.

Hinsvark y otros (35) consideran que en el primer caso, presumiblemente ocurre la hidrólisis por la ureasa, dando lugar a dos moléculas de amoníaco y una de dióxido de carbono por cada molécula de urea. Como medida de la hidrólisis se usaron las constantes de eliminación del  $C^{14}O_2$  proveniente de la urea marcada.

En las plantas en las cuales se queman fácilmente las hojas por efecto de las aspersiones, aparentemente hay una alta actividad de la ureasa, lo que resulta en la hidrolización rápida de la urea. Esto da lugar a una acumulación de amoníaco el cual puede ser el agente causante de la intoxicación.

En el segundo caso, Kuykendall y Wallace (44), en vista de no haber encontrado evidencias definitivas de la presencia de ureasa en ci-

trus, consideraron que ésta no es un factor limitante en la absorción y asimilación de la urea, siendo posible que la velocidad de absorción esté en relación directa con la concentración de la solución asperjada. Pavlov (52) utilizando urea marcada con el isótopo estable  $N^{15}$  en estudios para la determinación de la velocidad de absorción y desaparición de la urea asperjada en hojas de maíz, concluyó que la absorción de la urea comienza inmediatamente después de su aplicación sobre la hoja, y que no existe fase latente de absorción, tal como se observa con otras sustancias nutritivas.

El pH de la solución que se asperja es uno de los factores que influyen en la velocidad de absorción de los nutrimentos. Barinov (2) y Biddulph (3) mencionaron que la absorción foliar es inicialmente influenciada por la concentración, pH, polaridad del solvente y polaridad del soluto. Volk y McAuliffe (73) trabajaron con tabaco y encontraron una máxima absorción de nitrógeno de la urea a pH 5 y 8. Cook y Boynton (15) usando el manzano, encontraron mayor absorción de nitrógeno a pH 5,4 y 6,6.

En el estudio del mecanismo de la absorción foliar se ha encontrado que uno de los factores condicionantes en el uso de los nutrimentos aplicados al follaje es el ángulo de contacto entre el líquido y la superficie asperjada. Van Overbeck (72) determinó diferencias en cuanto al ángulo de contacto entre el agua y hojas de diferentes cultivos. Estas diferencias se deben principalmente a la estructura física y composición química exterior de la hoja. Varios investigadores

(49, 61, 64) que han realizado estudios sobre la superficie foliar, demuestran por medio de fotomicrografías, que las formaciones de cera que aparecen sobre la superficie cuticular, juegan un papel importante en las aspersiones, reduciendo o impidiendo la absorción de las sustancias químicas. Además es posible observar la formación de canales muy finos que atraviesan la cutícula, los cuales podrían ser el lugar de excreción de la cera o las terminaciones de los plasmodesmos ( 45, 62, 63).

Con el objeto de que la solución asperjada humedezca la superficie de las hojas y aumente el area de contacto, se ha recomendado el uso de agentes humectantes, los cuales actúan por reducir la tensión superficial de la solución y la tensión interfacial; se disminuyen los ángulos de contacto de las gotitas de solución sobre las hojas, permitiendo así un mayor contacto entre la solución y la superficie foliar. Esto da por resultado una mayor superficie mojada con igual volumen de solución, Cook (15), usando Tween 80 al 0.1%, logró aumentar la absorción de urea por medio del uso de otros humectantes. Dybing (21) demostró que hay una mayor absorción de urea por los estomas abiertos, usando como humectante Vatsel al 0.1%.

En cuanto a los posibles puntos de entrada de los fertilizantes aplicados a la hoja, podemos decir que este es uno de los aspectos más discutidos, y que los resultados son contradictorios o dudosos. Todas las investigaciones se refieren especialmente a la estructura de la hoja. Cook y Boynton (15) trabajando con manzanos encontraron una mayor absorción de urea por el envés de la hoja y sugirieron

dos maneras posibles de entrada:

- a. Movimiento rápido a través de los estomas.
- b. Movimiento lento a través de la cutícula.

Rodney (59) y Krasinskii (41), basados en que la mayoría de los cultivos que pertenecen al grupo de los mesófitos y como regla general no presentan estomas en el haz de la hoja, han comprobado que en realidad hay un movimiento más rápido por el envés, pero esta diferencia sólo tiene lugar al principio, ya que la mayor parte de la absorción se efectúa por la cutícula. Skoss (67), con base en sus observaciones experimentales, opina que los estomas constituyen la principal entrada para las soluciones. Orgell (51) y Biddulph (3) sugieren que la cutícula puede funcionar como membrana semilipoidal de intercambio catiónico. Lambertz (45) afirma: los plasmodios podrían servir de sendero a las iones o pequeñas moléculas nutritivas. Dybing (45) menciona que las interrupciones en la cutícula y las aperturas en la epidermis, tales como los estomas y los hidátodos, son lugares de entrada para las sustancias químicas aplicadas a las hojas. Además, sugiere que también es posible que haya absorción por las células que rodean las venas, por los pelos, las paredes anticlinales de las células epidermales, las células guardas.

Respecto al uso de enzimas en investigaciones sobre absorción foliar, se conocen los trabajos de Boroughs (6, 7), quien utilizó diversas enzimas en combinación con fosfato de amonio a una concentración de 0.05 molar, marcado con  $P^{32}$ . En esos ensayos preliminares él encontró que la pepsina, pectinasa y tripsina incrementaron la absorción del fósforo significativamente (al 1%) en plantas de



Phaseolus vulgaris. En la opinión de dicho investigador, esto indica que dichas enzimas actuaron atacando la superficie foliar.

Numerosos estudios citológicos (20, 43, 46, 60, 75) revelan que ciertos sistemas enzimáticos pueden encontrarse en la superficie celular, donde cumplen procesos de absorción y secreción de varias sustancias provenientes de la célula. Kivilaan y otros (39), investigando la actividad enzimática en extractos de pared celular de coleóptilos de maíz, encontraron que la actividad de la adenosina trifosfatasa es ligeramente mayor en la pared celular que en la proteína soluble, y tres veces más alta en las otras fracciones del mismo tejido. Dichos investigadores formularon la hipótesis de que algunas enzimas sintetizan la pared celular y a la vez la constituyen, aún cuando se desconoce si la enzima está localizada en la propia pared, adsorbida a la membrana plasmática o en los plasmodesmos que atraviesan la pared celular. Glasziou (30) y Bryan y Newcomb (10) mencionan que sobre la pared celular se puede encontrar grupos de enzimas que participan en el metabolismo de la pared, principalmente una de las pectinasas conocida como pectina metil esterasa. Setterfield y Bayley (65) consideran que la cantidad de materia protéica en las paredes celulares puede ser un reflejo de la presencia de enzimas adsorbidas a la pared.

El conocimiento de la reversibilidad de las reacciones enzimáticas fué utilizado en forma práctica por Chayen (14), Orgell (51) y Yager (79), en trabajos de investigación científica. Usando pecti-

nasa común y pectina metil esterasa demostraron que éstas son suficientemente activas para solubilizar y descomponer la pared celular. Nemoto y otros (50) demostraron una eficiencia alta de hidrólisis de una enzima proteinasa denominada pronasa. Dentro de las múltiples aplicaciones de esta enzima se incluye la eliminación de impurezas que se desarrollan sobre tejidos animales y vegetales.

MATERIALES Y METODOS

Para el presente estudio se efectuaron seis experimentos independientes, destinados a determinar el efecto de las enzimas en la absorción foliar de urea. Se escogieron dos tipos diferentes de cultivo: uno perenne, cacao (Clon UF 446), y otro anual, maíz (Híbrido I - 452 x Rocol H- 201).

Para los cinco primeros experimentos se utilizaron plantas de cacao y de maíz de un mes de edad, cultivadas bajo condiciones de invernadero.

En el sexto experimento se usaron solamente plantitas de maíz, de quince días de edad. Con el objeto de acelerar el crecimiento de las plantas, éstos se mantuvieron en una vitrina con luz continua y en condiciones ambientales bien controladas. Los envases y la vitrina fueron debidamente desinfectados con clorox al 5% y alcohol de 95° para reducir al mínimo la proliferación de microorganismos.

Como fuente de nitrógeno se usó urea en todos los experimentos. Tres de las enzimas que se seleccionaron fueron aquellas que se destacaron significativamente en los ensayos hechos por Boroughs (6).

Pepsina : de la casa " The British Drug Houses Ltd."  
Poole, Inglaterra.

Pectinasa: de la casa " National Biochemicals Corporation"  
Cleveland, Ohio.

Tripsina : de la casa "The British Drug Houses Ltd."  
Poole, Inglaterra.

Además, se puso a prueba una nueva enzima proteolítica denominada: Pronasa grado B, de la "Corporation for Biochemical Research", Los Angeles, California.

### Procedimiento Experimental

Semillas de cacao y de maíz se hicieron germinar en arena de río en envases de cartón. En la preparación de la arena se tuvo en cuenta las observaciones de Cardozo (12): fué cernida y lavada con agua de lluvia y luego con ácido clorhídrico al 20%.

Las plantitas fueron regadas en forma controlada con agua desmineralizada al principio y luego, con solución nutritiva de Hoagland # 2 (36) con un contenido más bajo de nitrógeno (56 ppm de N.)

Para todos los experimentos se seleccionaron plantas que tuvieron igual número de hojas y un tamaño más o menos uniforme.

Los tratamientos fueron aplicados solamente una vez en un mismo día, por medio de un atomizador pequeño de vidrio. En el caso del cacao, los cotiledones se eliminaron un día antes de la aspersión.

Para evitar posibles contaminaciones de las raíces, con la urea asperjada, la base de cada planta fué protegida con papel plástico, rodeándose la parte inferior del tallo con papel absorbente, el cual se aseguró con cinta plástica engomada ("Scotch tape").

Tomando en cuenta los resultados encontrados por Cook (15), para asegurar un asperjado más uniforme sobre toda la superficie de la hoja, se usó el humectante "Tween 80" en la concentración de 0.1% en todos los tratamientos.

<u>Experimento</u>	<u>Mezcla a aplicar</u>	<u>Area de aplicación</u>
1	Urea mezclada con cada una de las enzimas	Haz y envés de todas las hojas : día (8 am.)
2.	" " " " "	" " " : noche (8p.m.)
3	" " " " "	Haz de todas las hojas: día
4	" " " " "	Envés de todas las hojas: día
5	Urea mezclada con solución tampón	Haz y envés de todas las hojas: día
6	Urea mezclada con las dos mejores enzimas resultantes de los experimentos ( 1 a 4)	Haz y envés de todas las hojas: día

En los experimentos 1, 2, 3, 4, y 5 se usaron plantas de cacao y maíz. En el experimento 6 se usaron solamente de maíz.

Al hacer las aspersiones se tuvo el cuidado de que las superficies tratadas quedaran debidamente humedecidas. Las cantidades de mezcla usadas en los diferentes experimentos variaron conforme se indica a continuación:

<u>Experimento</u>	<u>Cultivo</u>	<u>Solución/Planta</u> <u>ml.</u>
1 y 2	cacao	1,5
	maíz	1,0
3, 4 y 5	cacao	1,0
	maíz	0,5
6	maíz	0,5

Diseño Experimental en los experimentos 1 - 2 - 3 - 4

Se utilizó un diseño de bloques al azar en disposición factorial 5 x 2 x 2, con las siguientes características:

Cuatro enzimas: Pepsina, pectinasa, tripsina y pronasa

Dos niveles de urea:  $n_1 = 2\%$  y  $n_2 = 4\%$

Dos cultivos : Cacao y maíz

Total de tratamientos por experimento: Veinte

Número de plantas por tratamiento: Tres

Número de repeticiones por experimento: Dos

Las semillas de cacao fueron sembradas el 9 de julio de 1962 y las de maíz, el 18 del mismo mes.

La aplicación de tratamientos se hizo el 25 de agosto del mismo año y la recolección de las plantas el 8 de setiembre.

Para poder hacer las comparaciones y diferencias permitidas por el diseño escogido, todas las enzimas se usaron a una misma concentración y con el pH óptimo para su actividad hidrolítica, según se especifica a continuación:

<u>Enzima</u>	<u>Concentración</u> %	<u>pH</u>	<u>Solución tampón ("buffer")</u>
Pepsina	0.1	2,5	ftalato ácido de potasio+ HCl
Pectinasa	0.1	3,5	" " " " "
Tripsina	0.1	8,0	K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Na OH
Pronasa	0.1	8,0	K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Na OH

Las diferentes soluciones tampón fueron preparadas según la tabla IX de Harrow (35).

Diseño Experimental en el experimento 5

El experimento 5 se realizó paralelamente a los experimentos 1, 2, 3, y 4, con el objeto de poder determinar el pH para la absorción foliar de urea en solución acuosa al 2%, en plantitas de maíz y de cacao de un mes de edad. En este experimento también se utilizó el diseño de bloques al azar, con las siguientes características:

<u>Tratamientos</u>	<u>Solución tampón ("buffer")</u>
pH 2,5	ftalato ácido de potasio + HCl
3,5	" " " " + "
4,5	" " " " + "
5,5	" " " " + "
6,5	K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Na OH
7,5	K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Na OH
8,0	K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Na OH

Número de repeticiones por tratamiento : Dos

Número de plantas por tratamiento: Cinco

Fecha de siembra de las semillas de cacao: 9 de julio de 1962

Fecha de siembra de las semillas de maíz: 18 de julio

Fecha de aplicación de los tratamientos : 25 de agosto

Fecha de recolección de las plantas: 8 de setiembre.

Diseño Experimental en el experimento 6

El planteamiento de este experimento se debió a los resultados aparentemente inconstantes obtenidos de los ensayos 1, 2, 3, y 4.

Se escogieron las dos mejores enzimas, pepsina y pectinasa, y se estudiaron sus efectos en comparación con sus respectivos testigos, en la absorción de urea al 3%, en plantas de maíz solamente.

Se utilizó el diseño de bloques al azar con las siguientes características:

#### Tratamientos

- 1 Pectinasa + tampón pH 3,5 (ftalato ácido de potasio + HCl)  
+ urea 3%
- 2 Tampón pH 3,5 (ftalato ácido de potasio : HCl ) + urea 3%
- 3 Pepsina + tampón pH 2,5 (ftalato ácido de potasio : HCl )  
+ urea 3%
- 4 Tampón pH 2,5 (ftalato ácido de potasio + HCl ) + urea 3%
- 5 Agua desmineralizada ( pH 6,9) + urea 3%

Número de repeticiones: Tres

Número de plantas por tratamiento: Cinco

Fecha de siembra de las semillas: 16 de octubre de 1962

Fecha de aplicación de los tratamientos: 7 de noviembre

Fecha de recolección de las hojas : 12 horas después de su aplicación.

#### Observaciones y datos tomados en el transcurso de los experimentos

a.- Estimación de las áreas necróticas o quemaduras de las hojas tratadas. Se usó la siguiente escala arbitraria:

0 = Hojas sin quemadura

1 = Quemaduras leves en algunas hojas

2 = Quemaduras leves en todas las hojas



- 3 = Quemaduras fuertes en algunas hojas
- 4 = Quemaduras fuertes en todas las hojas
- 5 = Hojas totalmente quemadas.

b.- Peso seco.

Método usado en la preparación de la muestra para el análisis de nitrógeno.

Las plantas de los experimentos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron cosechadas 15 días después de la aplicación de los tratamientos. Las plantas, con todas sus raíces, fueron sacadas de la arena, lavadas con agua corriente y luego con agua desmineralizada. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Hammar (32), los tallos y las hojas fueron lavados primeramente con ácido clorhídrico al 1% y después con agua desmineralizada, para reducir la contaminación de urea que pudo haber quedado sobre la superficie asperjada.

Para el secado, las plantas de cada tratamiento fueron puestas en bolsas de papel debidamente identificadas, y colocadas en una estufa a 70°C. Las plantas de cacao necesitaron 48 horas y las de maíz 24 horas para alcanzar un peso seco constante.

Las muestras secas se pesaron en una balanza Mettler semiautomática, luego, se molieron en un molino Wiley con malla Nº 40. Las muestras molidas fueron agitadas mecánicamente por 20 minutos, a fin de obtener el mayor grado posible de homogeneidad.

La determinación del nitrógeno total se hizo por el método micro-Kjeldahl (48) con tres repeticiones para cada muestra y los resultados se expresaron como porcentaje de nitrógeno al final del ex-

perimento.

En el experimento 6 las hojas fueron sometidas a un lavado similar al ya descrito, antes de proceder a su análisis.

.o.

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados de los experimentos sobre el efecto de las enzimas en la absorción foliar del nitrógeno.

Para determinar el efecto de las enzimas se ha considerado el porcentaje promedio de nitrógeno de cada tratamiento. Este porcentaje promedio de nitrógeno representa la media aritmética de los porcentajes de nitrógeno encontrados en los dos niveles de urea y en las dos repeticiones para una misma enzima.

Todos los incrementos de la cantidad de nitrógeno, se expresan en porcentaje de aumento relativo sobre el testigo, el cual se tomó como base 100%.

Después de cada cuadro se indican los resultados de los análisis estadísticos calculados en forma independiente para cada cultivo.

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO Nº 1.

Urea mezclada con diferentes enzimas: Tratamiento de día

CUADRO Nº 1

PORCENTAJE DE NITROGENO EN PLANTITAS DE CACAO

Enzimas	Contenido promedio de N en %	Aumento relativo en %
Pepsina	3.37	12
Pectinasa	3.08	2
Tripsina	3.04	1
Testigo	3.00	-
Pronasa	2.92	-1

D.L.S. = 0.06

CUADRO Nº 2  
 PORCENTAJE DE NITROGENO DE PLANTITAS DE MAIZ

Enzimas	Contenido promedio de N en %	Aumento relativo en %
Pestinasas	1.83	22
Pepsina	1.68	12
Tripsina	1.66	11
Pronasa	1.62	8
Testigo	1.49	-

D. L. S. = 0.128

El análisis estadístico del porcentaje de nitrógeno de cada tratamiento dió los siguientes resultados:

FUENTE DE VARIACION	CACAO	MAIZ
Repetición	No significativo	No significativo
Enzimas	Significativo al 0.01	Significativo al 0.01
Niveles de urea	Significativo al 0.01	Significativo al 0.01
Interacción E. x N.	No significativo	No significativo
	P. 0.05	P. 0.01
F <sub>c</sub> (enzimas en cacao) = 12.26 <sup>**</sup>	F <sub>t</sub> (4-9) = 3.63	6.42
F <sub>x</sub> (niveles en cacao) = 25.88 <sup>**</sup>	F <sub>t</sub> (1-9) = 5.12	10.56
F <sub>c</sub> (enzimas en maíz) = 120 <sup>**</sup>	F <sub>t</sub> (4-9) = 3.63	6.42
F <sub>c</sub> (niveles en maíz) = 81.7 <sup>**</sup>	F <sub>t</sub> (1-9) = 5.12	10.56

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO Nº 2

Urea mezclada con diferentes enzimas: Tratamiento de noche

CUADRO Nº 3  
PORCENTAJES DE NITROGENO EN PLANTITAS DE CACAO

Enzimas	Contenido promedio de N en %	Aumento relativo en %
Testigo	2.99	-
Tripsina	2.84	-5
Pronasa	2.77	-7
Pectinasa	2.65	-11
Pepsina	2.45	-18

CUADRO Nº 4  
PORCENTAJES DE NITROGENO EN PLANTITAS DE MAIZ

Enzimas	Contenido promedio de N en %	Aumento relativo en %
Pectinasa	1.78	16
Pepsina	1.77	14
Pronasa	1.58	3
Testigo	1.54	-
Tripsina	1.52	-2

D. L. S. = 0.023

Los resultados del análisis de la variación de los porcentajes de nitrógeno fueron los siguientes:

FUENTE DE VARIACION	CACAO	MAIZ
Repetición	No significativo	No significativo
Enzimas	No significativo	Significativo al 0.01
Niveles de urea	Significativo al 0.05	Significativo al 0.01
Interacción E. x N.	No significativo	No significativo
		P. 0.05 P. 0.01
$F_c$ (niveles en cacao) = 9.25 <sup>*</sup>	$F_t(1-9) = 5.12$	10.56
$F_c$ (enzimas en maíz) = 10 <sup>**</sup>	$F_t(4-9) = 3.63$	6.42
$F_c$ (niveles en maíz) = 23 <sup>xx</sup>	$F_t(1-9) = 5.12$	10.56

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO Nº 3

Aplicación de urea mezclada con diferentes enzimas al haz de las hojas

CUADRO Nº 5

PORCENTAJE DE NITROGENO EN PLANTITAS DE CACAO

Enzimas	Contenido promedio de N en %	Aumento relativo en %
Pectinasa	3.21	16
Pepsina	2.84	3
Testigo	2.77	-
Tripsina	2.66	-4
Pronasa	2.60	-6
D.L.S. = 0.062		

CUADRO Nº 6

PORCENTAJE DE NITROGENO EN PLANTITAS DE MAIZ

Enzimas	Contenido promedio de N en %	Aumento relativo en %
Pectinasa	1.61	8
Pepsina	1.54	3
Tripsina	1.53	2
Testigo	1.49	-
Pronasa	1.45	-3

D.L.S. = 0.058

Los resultados estadísticos del análisis de la variancia de los porcentajes de nitrógeno fueron :

FUENTE DE VARIACION	CACAO	MAIZ
Repetición	No significativo	No significativo
Enzimas	Significativo al 0.01	Significativo al 0.05
Niveles de urea	Significativo al 0.01	Significativo al 0.01
Interacción E. x N.	No significativo	No significativo

$F_c$ ( enzimas en cacao ) = 8.64 <sup>x</sup>	$F_t$ ( 4-9 ) = 3.63	6.42
$F_c$ ( niveles en cacao ) = 22.95 <sup>xx</sup>	$F_t$ ( 1-9 ) = 5.12	10.56
$F_c$ ( enzimas en maiz ) = 5.22 <sup>x</sup>	$F_t$ ( 4-9 ) = 3.63	6.42
$F_c$ ( niveles en maiz ) = 149.3 <sup>xx</sup>	$F_t$ ( 1-9 ) = 5.12	10.56

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO Nº 4

Aplicación de urea mezclada con diferentes enzimas al envés de la hoja.

CUADRO Nº 7

PORCENTAJE DE NITROGENO EN PLANTITAS DE CACAO

Enzimas	Contenido promedio de N en %	Aumento relativo en %
Pepsina	3.00	4
Pronasa	2.95	2
Pectinasa	2.94	1
Tripsina	2.90	0
Testigo	2.90	-

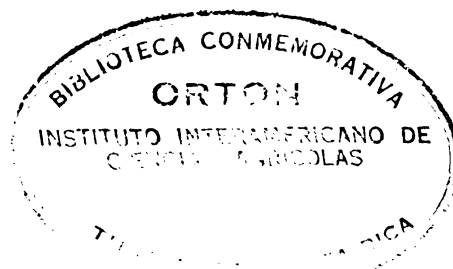
D. L. S. = 0.095

CUADRO Nº 8

PORCENTAJE DE NITROGENO EN PLANTITAS DE MAIZ

Enzimas	Contenido promedio de N en %	Aumento relativo en %
Pepsina	1.54	15
Pronasa	1.47	10
Pectinasa	1.44	8
Tripsina	1.41	5
Testigo	1.33	-

D. L. S = 0.038





Los resultados del análisis de la variencia de los porcentajes de nitrógeno de cada tratamiento son los siguientes:

FUENTE DE VARIACION	CACAO	MAIZ	
Repeticiones	No significativo	No significativo	
Enzimas	Significativo al 0.05	Significativo al 0.05	
Niveles de urea	Significativo al 0.01	Significativo al 0.01	
Interacción E x N	Significativo al 0.01	No significativo	
		P 0.05	P 0.01
$F_c$ (enzima en cacao) = 3.66*	$F_t(4-9) =$	3.63	6.42
$F_c$ (niveles en cacao) = 78.17**	$F_t(1-9) =$	5.12	10.56
$F_c$ (interacción en cacao) = 6.61	$F_t(4-9) =$	3.63	6.42
$F_c$ (enzimas en maíz) = 5.45*	$F_t(4-9) =$	3.63	6.42
$F_c$ (niveles en maíz) = 90.19**	$F_t(1-9) =$	5.12	10.56

#### RESULTADOS DEL EXPERIMENTO Nº 5

##### Aplicación foliar de urea a diferentes pH.

Los resultados de este experimento se resumen en los cuadros siguientes:

CUADRO Nº 9

##### ABSORCION FOLIAR DE UREA A DIVERSOS pH EN PLANTITAS DE CACAO

Tratamiento	Contenido promedio de N en %	Porcentaje a base del valor más bajo
pH = 2.5	1.69	105
pH = 3.5	2.00	124
pH = 4.5	1.79	111
pH = 5.5	1.94	120
pH = 6.5	1.73	107
pH = 7.5	1.61	100
pH = 8.0	1.65	102

Estadísticamente, el pH óptimo de absorción foliar de urea para las plantitas de cacao de un mes de edad fue pH = 3.5

CUADRO Nº 10

ABSORCION FOLIAR DE UREA A DIVERSOS pH EN PLANTITAS DE MAIZ

Tratamiento	Contenido promedio de N en %	Porcentaje a base del valor mas bajo
pH = 2.5	.970	126
pH = 3.5	.907	117
pH = 4.5	.834	108
pH = 5.5	.883	114
pH = 6.5	.779	101
pH = 7.5	.830	108
pH = 8.0	.772	100

Estadísticamente el pH óptimo de absorción foliar de urea para las plantitas de maíz de un mes de edad fué pH = 2.5

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO Nº 6

Aplicación de urea mezclada con pepsina o pectinasa en plantitas de maíz.

Este experimento fué diseñado con el objeto de verificar los resultados obtenidos en los experimentos 1, 2, 3, y 4.

Para observar estadísticamente el efecto de los tratamientos, se hizo un análisis de la variancia de los porcentajes de nitrógeno en conjunto. Para determinar los efectos parciales de cada enzima sobre su respectivo testigo, se realizó un análisis de variancia pareando los porcentajes de nitrógeno encontrados en cada tratamiento. La superioridad en el incremento de nitrógeno se determinó por la prueba de "t".

Los aumentos relativos de cada tratamiento se ha calculado sobre sus respectivos testigos.

CUADRO Nº 11  
PORCENTAJE DE NITROGENO EN PLANTITAS DE MAIZ

Tratamiento	Contenido promedio de N en % a las 12 hs.	Aumento relativo
Pectinasa + urea    tampón pH 3.5	5.50	15
Pepsina    + urea + tampón pH 2.5	4.98	5
Urea + tampón pH 3.5 (testigo pectinasa)	4.78	3
Urea + tampón pH 2.5 (testigo pepsina)	4.74	2
Urea + agua desmineralizada pH 6.9 (testigo pH)		-

CUADRO Nº 12  
COMPARACION DE EFECTOS DE TRATAMIENTO

EFECTO DE	CORRESPONDE A	
Pectinasa sobre su testigo	= Pectinasa + urea + tampón pH 3.5- urea + tampón pH 3.5	0.720 % N
Pepsina + sobre su testigo	= Pectinasa + urea + tampón pH 2.5- urea + tampón pH 2.5	0.250 % N
Enzimas Pectinasa vs. pepsina	= Pectinasa + urea +tampón pH 3.5- Pepsina + urea + tampón pH 2.5	0.530
pH 2.5 sobre su testigo	= Urea + tampón pH 2.5- Urea + agua	0.062 % N
pH 3.5 sobre su testigo	= Urea + tampón pH 3.5- Urea + agua	0.122 % N

Resultados del análisis de la variancia del conjunto de los tratamientos:

$$F_c (\text{tratamientos}) = 57.16^{**} \quad F_t (4-8) = \begin{array}{cc} P 0.05 & P 0.01 \\ 3.84 & 7.01 \end{array}$$

Resultados de los análisis estadísticos en los cuales se parearon los porcentajes de nitrógeno de los tratamientos en comparación.

$$t_c (\text{pepsina+urea+ tampón pH 2.5}) = 16.05^{**} \quad t_t (3 \text{ GL}) = 5.81$$

urea+ tampón pH 2.5)

$$t_c (\text{pectinasa+urea+ tampón pH 3.5}) = 55.80^{**} \quad t_t (3 \text{ GL}) = 5.81$$

urea+ tampón pH 3.5)

$$t_c (\text{Urea + tampón pH 2.5}) = 1.86 \quad \text{no significativo}$$

Urea + agua)

$$t_c (\text{Urea+ tampón pH 3.5}) = 1.31 \quad \text{no significativo}$$

Urea + agua)

#### DETERMINACION DE LA EFICIENCIA DE ABSORCION ENTRE LOS TRATAMIENTOS DIA vs. NOCHE Y HAZ vs. ENVES

Las determinaciones de la eficiencia de absorción de urea entre los tratamientos día vs. noche y haz vs. envés, se hicieron por la prueba de "t", que se obtuvo del análisis de la variancia, en la cual se parearon los porcentajes de nitrógeno encontrados en los dos niveles de urea para un mismo tratamiento.

Los resultados de estos cálculos se resumen en el cuadro siguiente:

CUADRO Nº 13

COMPARACION DE EFICIENCIA DE ABSORCION ENTRE LOS TRATAMIENTOS  
DIA vs. NOCHE - HAZ vs. ENVES

T R A T A M I E N T O S		
Cultivo	Día vs. Noche	Haz vs. Envés
Cacao	Día significativamente superior al 0.01 en los dos niveles de urea.	No hay significancia, diferencia a favor del envés.
Maíz	Día significativamente superior nivel $n_1$ significativo al 0.05 nivel $n_2$ significativo al 0.01	No hay significancia, diferencia a favor del haz

$t_c$ ( cacao nivel $n_1$ ) = 18.11 <sup>**</sup>	$t_t$ ( 4 GL) =	P 0.05 = 2.766	P 0.01 = 4.604
$t_c$ ( cacao nivel $n_2$ ) = 20.14 <sup>**</sup>	$t_t$ ( 4 GL) =	2.766	4.604
$t_c$ ( maíz nivel $n_1$ ) = 3.66 <sup>*</sup>	$t_t$ ( 4 GL) =	2.766	4.604
$t_c$ ( maíz nivel $n_2$ ) = 4.69 <sup>**</sup>	$t_t$ ( 4 GL) =	2.766	4.604

Resultados de las observaciones de quemaduras en el follaje

En los experimentos 1, 2, 3, 4 y 5 se observó lo siguiente: todas las plantas de cacao tratadas con urea al 2%, presentaron síntomas de quemaduras leves. Estas quemaduras fueron más acentuadas en las puntas y bordes de la hoja; solamente en algunos casos, en el centro. Para las plantas de maíz, se notó el mismo efecto. En las plantas tratadas con urea al 4%, las quemaduras abarcaban mayor area que las tratadas con 2%.

Relacionando el area quemada con los tratamientos de urea mezclada con enzima, resultó que las plantas tratadas con urea, más pectinasa o pepsina, presentaban mayor frecuencia de areas levemente quemadas.

En el Experimento 6, en los tratamientos de urea con pectinasa y urea con pepsina, se observó que todas las plantitas de maíz mostraban un aspecto de flacidez, especialmente en las hojas más tiernas.

## DISCUSION

Para el presente estudio se adoptó la siguiente hipótesis: "La absorción foliar del nitrógeno proveniente de la urea puede ser incrementada por efecto de la acción enzimática." Esta hipótesis, tácitamente implica la posibilidad de que la absorción foliar del nitrógeno proveniente de la urea, puede depender de los procesos metabólicos de la hoja. Por lo tanto, los diferentes aspectos de este trabajo, se condujeron en forma que permitiera probar la hipótesis planteada y seleccionar la enzima de mayor efecto en la absorción de la urea.

Los resultados obtenidos en todos los experimentos realizados parecen indicar que sí puede incrementarse la absorción de la urea por efecto de algunas enzimas, como por ejemplo: pectinasa y pepsina. Las otras enzimas ensayadas, tripsina y pronasa, resultaron ineficaces, según se desprende de los análisis estadísticos correspondientes.

A pesar de que en varios trabajos sobre el metabolismo de la urea aplicada al follaje se asume la participación de la ureasa, algunos investigadores (5, 75) dudan que la absorción de la urea esté únicamente relacionada a la acción hidrolítica de esta enzima. Hinsvark (35), basado en una medición de la radiactividad del dióxido de carbono, eliminado por las plantas tratadas con urea marcada con  $C^{14}$ , supuso que el  $CO_2$  provenía de la hidrólisis catalizada por la ureasa. Sin embargo, Bollard (5) criticó el método usado por Hinsvark para la determinación de la ureasa, ya que el  $C^{14}O_2$  eliminado, puede provenir de varias reacciones en el tejido epidérmico; por lo tanto, es posible que la asimilación de la urea no esté sujeta a la presencia o acción de la ureasa. Wittwer y Tukey (75) no encontraron ureasa en las plantas de maíz, papa, pepino y apio, en las cuales Hinsvark afirma haber encontrado dicha enzima, lo cual parece

confirmar la opinión de Bollard. Otra de las razones que hacen pensar que la absorción de la urea no está directamente relacionada en la actividad de la ureasa, es que se ha comprobado que ésta pierde su actividad cuando el pH es menor de 4 (19, 68). Además, en numerosos trabajos sobre acciones enzimáticas, según se pueden ver en el resumen de literatura por Sumner (68), se ha demostrado que la pepsina inactiva la ureasa. Si se relacionan estos conocimientos con los resultados obtenidos, se puede decir que en el tratamiento en el cual se agregó pepsina a la urea, esta enzima pudo haber actuado como inhibidor e inactivador de la ureasa si ésta estaba presente en la hoja. La mayor absorción de urea por las hojas de cacao y de maíz ocurrió a un pH 3,5 y 2,5 respectivamente. Por lo tanto, el efecto de incrementar la absorción de la urea puede deberse a la acción hidrolítica de cada enzima sobre algún sustrato de la pared celular, ya fuera disminuyendo la viscosidad o solubilizando los compuestos pécticos, en el caso de pectinasa (14, 18, 51), o desdoblado los compuestos proteicos para el caso de la pepsina (19, 22, 29).

En los experimentos en los cuales se aplicaron los tratamientos separadamente al haz o al envés de la hoja, se encontró una notable diferencia en cuanto a la actividad de las enzimas, tanto en el cacao como en el maíz. En los tratamientos aplicados al haz se destacó significativamente al 1% el efecto de la pectinasa. En cambio en los aplicados al envés sobresalió significativamente al 5% la pepsina. Estos resultados no pueden atribuirse al efecto del pH de las soluciones, según se pudo comprobar posteriormente (ver el experimento 6), donde se encontró que el incremento en el contenido de nitrógeno en hojas de maíz se debió a la acción de las enzimas pectinasa y pepsina respectivamente.

El hecho de que se observaran efectos enzimáticos diferentes en el haz y en el envés de las hojas puede indicar que ambas superficies tienen una composición química diferente. Si en el haz se destacó la acción de la pectinasa, fue por que quizás el contenido de sustancias pécticas es mas alto en esta cara de la hoja que en el envés.

Según estudios morfológicos realizados por Hayward (34) en hojas de maíz, se sabe que ambas superficies epidérmicas están cutinizadas,



pero la superior más que la inferior. Además se sabe que las dos superficies tienen estomas dispuestos en hileras longitudinales paralelas, teniendo la superficie inferior mayor número de éllas. De igual manera, los estudios realizados por Brooks (9) en cacao indican que la epidermis superior difiere de la inferior en que la primera está constituida por células grandes, con paredes delgadas y cutícula mucho más gruesa. Este mismo autor menciona que es muy común observar en la epidermis superior cavidades lisogénicas que secretan sustancias mucilaginosas a través de la cutícula. Carletto (13) señala que la epidermis inferior del cacao consiste de células pequeñas y es la única que contiene estomas numerosos y pequeños.

De las investigaciones conocidas que pueden contribuir a la interpretación de los resultados obtenidos en el presente trabajo se desprende lo siguiente:

1. Está ampliamente reconocido que casi todas las reacciones catalizadas por la acción enzimática son reversibles (1, 19, 56).
2. Todas las enzimas tienen cierta especificidad sobre determinado substrato (1, 56).
3. Numerosas investigaciones han determinado la presencia de varios sistemas enzimáticos localizados extracelularmente o en la pared celular (20, 39, 46, 53, 75).
4. La proteína presente en la pared celular puede considerarse como componente de ésta, de los plasmodesmos que la atraviesan, o de los sistemas enzimáticos adsorbidos a la pared (4, 28, 29, 40, 42, 65, 74).
5. Numerosas investigaciones citológicas indican como hipótesis o como conclusión, que la pared celular y sus componentes son productos de síntesis enzimática (10, 39, 53, 65, 79).

Chayen (14) y otros investigadores (51, 79) demostraron que las pectinasas que se ofrecen en el mercado con diversos nombres son suficientemente activas para solubilizar y descomponer la lamela media. Resultados de análisis químicos de la pared celular podría confirmar si ésta contiene el substrato para que las enzimas actúen.

CUADRO Nº 14

RESULTADOS DE ANALISIS QUIMICOS CUANTITATIVOS DE LA PARED CELULAR  
EXPRESADOS EN PORCENTAJE DEL TOTAL DE MATERIA SECA

AÑO	INVESTIGADOR	MATERIAL	CELULOSA	HEMICE- LULOSAS	SUSTANCIAS PECTICAS	PROTEINAS	LIPIDOS	REFERENCIA
1933	Thimann Bonner	Coleóptilo de avena	42	38	8	12	-	(65)
1938	Nakamura Hess	Coleóptilo de maíz	28	22	-	30	-	(65)
1954	Tripp Mocre	Fibra de algodón	50	-	10	13	-	(65)
1958	Bayiev Setterfield	Coleóptilo de avena	25	51	1	10	4	(65)
1958	Bishop	Coleóptilo de avena	----	25----	0,3	9	4	( 4 )
1959	Roelofsen	Mesocótilo de maíz	30	----	50 ----	3	2	(65)
1960	Lamport Northcote	Sicómoro	30	40	10	1	-	(46)
1960	Korn	Levadura	-	-	1,4	1,5	-	(40)
1961	Kivilaan	Coleóptilo de maíz	27	-	8	2,5-5	-	(39)
1961	Ginzburg	Raíz de guisante				Comprobó ser componente		(28)
1962	Ginzburg	"				intercelular		(29)

En el cuadro N<sup>o</sup> 14 se han resumido los resultados de algunos trabajos sobre la composición química de la pared celular y las sustancias encontradas en ella.

Admitiendo el ataque enzimático a la epidermis, cabría preguntar: En qué forma actúan las enzimas aplicadas si existen capas de cera y cutícula que pueden interferir en dicho proceso? Como respuesta a esta pregunta pueda señalarse que las capas de cera y de cutícula no son uniformes, tal como lo han demostrado los estudios sobre la estructura submicroscópica de las superficies foliares realizados por varios investigadores (49, 64, 63). Además la gran susceptibilidad de las hojas en desarrollo a los yerbicidas y demás sustancias se relaciona con algunas zonas inmaduras de poco desarrollo cuticular, por donde podrían servir de lugares de entrada para las sustancias aplicadas a las hojas (64). Así pues existe la posibilidad, de que la sustancia asperjada pueda entrar en contacto no sólo con la cutícula sino con otras partes de la epidermis. Roberts (58) buscó explicación al por qué de la penetración de urea en hojas de manzano a través de la cutícula, siendo ésta impermeable al agua (67), y encontró, mediante observación de cortes anatómicos y del uso de colorantes específicos, rojo de rutenium para pectinasa y sudan III para cutina, que hay mucha sustancia péctica que se extiende vertical y paralelamente entre las capas de la pared celular y las áreas cutinizadas y salen hasta la superficie exterior de la hoja. Así mismo observó que en las paredes de las células que rodean las venas se encuentra también grandes cantidades de material péctico. Con base en esto, Roberts afirma que no puede considerarse que la hoja del manzano esté cubierta por una capa continua de cutícula. La calidad y característica de la pectina presente, por ser permeable al agua, sería el lugar de entrada para los fertilizantes, hormonas y fungicidas que se aplican al follaje.

Deuel (18) y Wood (78) mencionan, que muchos microbios saprofiticos y patógenos contienen enzimas pécticas que la utilizan como agentes de las células epidérmicas para lograr penetrar hacia los tejidos interiores de la hoja. Por lo tanto, existiendo el substrato para la enzima es de esperarse que en el tratamiento en el cual se mezcla la urea con la pectinasa pueda haber un efecto hidrolizador de la pectina

que favorezca la difusión de la urea. Además de las sustancias pécticas que se encuentran en las paredes celulares, Ginzburg (28) sugirió que éstas contienen proteínas y que las células se encuentran cementadas y unidas por un complejo proteico. Posteriormente este mismo investigador (29) comprobó su hipótesis usando enzimas proteolíticas, entre ellas la pepsina y encontró que dicha enzima producía un 15% de separación de las células en los tejidos tratados. También consideró, que si se utiliza un tratamiento con urea previo al ataque de la pepsina, se puede incrementar la separación de las células. Esta acción de la pepsina de actuar como agente dispersante de las células por su acción hidrolítica, explicaría los resultados obtenidos en este estudio, donde se encontró un mayor efecto de la pepsina en los tratamientos aplicados al envés de la hoja.

Analizando los resultados de los tratamientos aplicados durante el día, con respecto a los aplicados en la noche a toda la hoja, se encontró que en el cacao no hubo efecto de las enzimas en los tratamientos aplicados en la noche. Aun no tenemos una explicación satisfactoria del comportamiento diferente mostrado por el cacao. Tanto en el cacao como en el maíz se encontró una mayor absorción en los tratamientos realizados en el día. Este resultado no está de acuerdo con los encontrados por Cardoso (12), quien trabajó con plantas de cacao y halló igual eficiencia de absorción de nitrógeno en las aplicaciones de urea en el día y en la noche.

Comparando la eficiencia de absorción entre los tratamientos aplicados al haz y al envés de la hoja, no se detectó significación en los análisis estadísticos. Al respecto Cook y Boynton (15) mencionan que a pesar de haber una rápida absorción de urea por el envés de la hoja, este efecto se pierde al cabo de una semana y la diferencia existente no alcanza una magnitud significativa.

En las comparaciones de eficiencia de absorción entre las dos enzimas seleccionadas, pectinasa y pepsina, se puede distinguir claramente que la pectinasa fue mucho más eficiente. Esto se pudo confirmar mediante los resultados obtenidos en el experimento 6, donde en igualdad de condiciones respecto a su pH óptimo, el tratamiento de urea

mezclada con pectinasa fue tres veces superior en cuanto a la cantidad de nitrógeno encontrado en las hojas.

Por todas las razones expuestas se puede decir que las enzimas pectinasa y pepsina tienen efectos positivos en la absorción del nitrógeno proveniente de la urea, pero no se sabe si aplicaciones repetidas puedan afectar la fisiología de la planta. No se sabe todavía si el síntomas de flacidez de las hojas de maíz observado en el experimento 6 fue debido a la toxicidad de los productos hidrolizados (78) o por muerte de algunas células (17).

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se estudió el efecto de algunas enzimas sobre la absorción foliar del nitrógeno, utilizándose como fuente de nitrógeno la urea. Se escogieron dos tipos diferentes de cultivo, uno de tipo perenne (cacao) y otro anual (maíz), para estudiar su comportamiento cuando fueron sometidos a aspersiones foliares de urea mezclada con diversas enzimas.

Las enzimas utilizadas fueron pepsina, pectinasa, tripsina y pronasa, las cuales se combinaron con urea al 2% y 4%. Cada enzima fue aplicada a su pH óptimo para su actividad hidrolítica. Los tratamientos se aplicaron solamente una vez cuando las plantas tenían un mes de edad.

En general los resultados parecen indicar que hay efecto positivo de las enzimas en incrementar la absorción foliar de urea. Aparentemente las enzimas actuaron atacando la superficie foliar.

Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes:

1. En el experimento 1, entre los tratamientos aplicados en el día y en ambas superficies de todas las hojas, se encontraron resultados altamente significativos para enzimas, destacándose por orden de mérito, la urea mezclada con pepsina para el cacao, y urea mezclada con pectinasa para el maíz. Estos resultados pueden indicar diferente composición química de las hojas de estos dos cultivos.
2. En el experimento 2, en el cual las aplicaciones de los tratamientos fueron hechas por la noche, se obtuvo significancia para enzimas y urea en maíz, pero no para el cacao.
3. En el experimento 3, los tratamientos aplicados al haz de la hoja resultaron en una diferencia significativa en favor de urea mezclada con pectinasa para el cacao y el maíz.

Estos resultados indican que puede haber una mayor cantidad de material péctico sobre el haz de las hojas de estos cultivos.

4. En el experimento 4, entre los tratamientos aplicados al envés de las hojas sobresalió el efecto de la pepsina mezclada con la urea en el cacao y maíz.

Es posible que haya una mayor cantidad de substrato proteínico en el envés de las hojas de estos dos cultivos, que favorecería el ataque de la pepsina e incrementar la absorción del urea.

5. La comparación de los resultados de los tratamientos aplicados al haz con los del envés, parece indicar que hay una composición química diferente entre las dos superficies de las hojas de estos cultivos.
6. Se ha encontrado que el mayor efecto sobre la absorción no se debe al pH de la solución, sino a la presencia de la enzima.
7. Resumiendo los resultados de los seis experimentos realizados parece haber una mayor eficiencia de absorción de urea por efecto de la urea mezclada con la pectinasa.

## SUMMARY AND CONCLUSION

The effect of certain enzymes on leaf absorption of nitrogen was studied using urea as the source of nitrogen. Two different crops were chosen, a perennial crop (cacao) and an annual crop (maize) to study the effect of leaf spraying of a mixture of several different enzymes with urea.

The enzymes used were pectinase, pepsin, trypsin and pronase, in combinations with urea at 2% and 4%; each enzyme was applied at the optimum pH for its hydrolytic activity. A single application was made when plants were one month old.

In general, the results seem to show certain positive effects of the enzymes to increase the foliar absorption of urea. Apparently the enzymes affected the leaf surface.

The following conclusions were obtained.

1. In Experiment 1, highly significant results were found with enzymes among treatments during the day to both leaf surfaces, mainly with urea mixed with pectinase for maize and urea mixed with pepsin for cacao. This seems to indicate a difference in chemical composition of the leaves for each crop.
2. In Experiment 2, (in which applications were made at night) significance was obtained for enzymes and urea in maize plants, but not for cacao.
3. In Experiment 3, (in which applications were made on upper surface of the leaves) a significant difference was obtained in favour of urea mixed with pectinase for both cacao and maize plants; this is possibly due to a higher content of pectic substance in the upper surface of the leaves.
4. In Experiment 4, (in which applications were made on the lower surface) the best effect was obtained with urea mixed with pepsin in both cacao and maize; this is possibly due to a higher content of protein substratum in the lower surface of the leaves. This protein substratum may be broken down by



pepsin-attack, favouring an increase in urea absorption.

5. The comparison of the results of the applications made to the upper & lower surface of the leaves, seems to indicate a difference in chemical composition of surface between leaves of cacao and maize plants.
6. It was found the presence of enzymes rather than the pH of the solution had the major effect on foliar absorption of urea.
7. From the results of the six experiments it seems that the enzyme pectinase has the greatest effect on the absorption of the urea by the leaves.

LITERATURA CITADA

1. BALDWIN, E. Dynamic aspects of biochemistry. 3<sup>a</sup> ed. Cambridge, University Press, 1959. 525 p.
2. BARINOV, G. V. & RATNER, E. L. Some features of the assimilation of substances through the leaves after foliar application. Plant Physiology (Fiziologiya Rastenii) 6(3):330-340. 1959.
3. BIDDULPH, O. Radioisotopes in plants: foliar entry and distribution. In A Symposium on Radioisotopes in the Biosphere. Edited by R. S. Caldecott and L. A. Snyder, Minneapolis, University of Minnesota, 1960. pp. 73-85.
4. BISHOP, T. C., BAYLEY, T. S. & SETTERFIELD, G. Chemical constitution of the primary cell walls of avena coleoptiles. Plant Physiology 33:283-289. 1958.
5. BOLLARD, G. E. Ureasa, urea and ureidos in plants. In Society for Experimental Biology. Symposia. XIII. Utilization of nitrogen and its compounds by plants. New York., Academic Press, 1959. pp. 304-329.
6. BOROUGHS, H. La aplicación de energía nuclear a la agricultura; informe anual a la Comisión de Energía Atómica de los Estados Unidos. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1962. pp. 9-15.
7. \_\_\_\_\_ El uso de isótopos radiactivos y de radiaciones en la agricultura tropical. Turrialba (Costa Rica) 12(1):9-15. 1962.
8. BREWSTER, J. R. Química orgánica thonisen. 2<sup>a</sup> ed. Buenos Aires, Editorial Médico Quirúrgica, 1950. 971 p.
9. BROOKS, E. R. & GUARD, A.J. Vegetative anatomy of Theobroma cacao. Botanical Gazette 113(4):444-454. 1952.
10. BRYAN, H. W. & NEWCOMB, H. E. Stimulation of pectin methyl-esterase activity of cultured tobacco pith by indoleacetic acid. Physiologia Plantarum 7:290-297. 1954.
11. CAIN, C. J. Absorption and metabolism of urea by leaves of coffee, cacao, and banana. American Society for Horticultural Science. Proceedings 67:279-286. 1956.

12. CARDOSO, ARMINDO, P. Aspersión foliar de urea en plantas jóvenes de cacao. Tesis. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1960. 99 p.
13. CARLETTO, G. M. Densidade e tamanho dos estomas em caucuerios En: Conferencia Interamericana de Cacao, 6a, Salvador, Bahía, Brasil, 1956. Bahia, Brazil, Instituto de Cacau da Bahia, 1957. pp. 79-82.
14. CHAYEN, J. Pectinase technique for isolating plant cells. Nature 170(4338):1070-1072. 1952.
15. COOK, J. & BOYNTON, D. Some factors affecting the absorption of urea by McIntosh apple leaves. American Society for Horticultural Science. Proceedings 59:82-90. 1952.
16. CONFERENCIA INTERNACIONAL sobre la utilización de la energía atómica con fines pacíficos, Ginebra, 1955. Los isótopos radiactivos y las radiaciones ionizantes en agricultura, fisiología, bioquímica. Ginebra, Naciones Unidas, 1956. Vol. 12, 684 p.
17. CURTIS, G. S. A. Cell contact and adhesion. Biological Reviews 37(1):82-129. 1962.
18. DEUEL, L. A. & STOTZ, E. Pectic substances and pectic enzymes. Advances in Enzymology 20:341-382. 1958.
20. DIXON, M. & WEBB, E. Enzymes. New York, Academic Press, 1958. 782 p.
20. DOUNCE, L. A. Cytochemical foundations of chemistry of cell surface. In Sumner, J. B. & Myrback, K., eds. The Enzymes; Chemistry and mechanism of action. New York. Academic Press, 1950. Vol. 1, pt. 1, p. 225.
21. DYBING, D. C. & CURRIER, B. H. Foliar penetrations by chemicals. Plant Physiology 35:169-174. 1961.
22. EDLBACHER, S. & LEUTHARDT, F. Tratado de química fisiológica Madrid, Edit. Aguilar, 1958. 853 p.
23. FISHER, E.G. The principles underlying foliage applications of urea for nitrogen fertilization of the McIntosh apple. American Society for Horticultural Science. Proceedings 51:91-98. 1952.

24. FESHER, E. G. BOYNTON, D. & SKODOVIN, K. Nitrogen fertilization of the McIntosh apple with leaf sprays of urea. American Society for Horticultural Science. Proceedings 51:23-32. 1948.
25. \_\_\_\_\_ & COOK, J. A. Nitrogen fertilization of the McIntosh apple with leaf sprays of urea. American Society for Horticultural Science. Proceedings 55:35-40. 1950.
26. \_\_\_\_\_ & WALKER, D. R. The apparent absorption of phosphorus and magnesium from sprays applied to the lower surface of McIntosh apple leaf. American Society for Horticultural Science. Proceedings 65:17-24. 1955.
27. FREIBERG, E. R. & PAYNE, P. Foliar absorption of urea and urease activity in banana plants. American Society for Horticultural Science. Proceedings 69:226-234. 1957.
28. GINZBURG, B. Z. Evidence for a protein component in the middle lamella of plant tissue. Nature 181(4606):398-400. 1958.
29. \_\_\_\_\_ Evidence for a protein gel structure cross-linked by metal cations in the intercellular cement of plant tissue. Journal of Experimental Botany 12(34):85-107. 1961.
30. GLASZIOV, T. K. The localization and properties of pectic methylsterase of avena coleoptiles. Physiologia Plantarum 12:670-680. 1959.
31. HAMILTON, J. M., PALMITER, D. H. & ANDERSON, L. C. Preliminary test with uramon in foliage sprays as a means of regulation; the nitrogen supply of apple trees. American Society for Horticultural Science. Proceedings 42:123-126. 1943.
32. HAMMAR, E. H. Effect of spray residues and other contaminants on leaf analysis. Plant Physiology 31:256-257. 1956.
33. HARROW, B. Tratado de bioquímica. Traducido por José Giral. 2ª ed. México, D.F., Editorial Atlante, 1950. 782 p.

34. HAYWARD, E. H. Estructura de las plantas útiles. Versión española por Ovidio Núñez. Buenos Aires, Editorial Acme, 1953. 667 p.
35. HINSVARK, O. N., WITWER, S. H. & TUKEY, H. B. The metabolism of foliar applied urea: relative rates of  $C^{14}O_2$  production by certain vegetable plants treated with labeled urea. *Plant Physiology* 28:70-76. 1953.
36. HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. L. The water - culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular No 347. 1950. 32 p.
37. KAINDL, K. Foliar fertilization with phosphatic nutrient labelled with  $P^{32}$ . In *Radioisotope Conference*, 2d., Oxford, 1954. Proceedings. Edited by J. E. Johnston. London, Butterworths Scientific Publications, 1954. Vol. 1. pp. 397-404.
38. KARRER, P. Tratado de química orgánica. 2ª ed. Traducido por Cándido Torres G. México, Editora Nacional. 1951. 1098 p.
39. KIVILAN, T., CABRERA, B. & BANDURSKI, S. R. Enzymatic activities associated with cell wall preparations from corn coleoptiles. *Plant Physiology* 36:605-610. 1961.
40. KORN, E. D. & NORTHCOPE, D. H. Physical and chemical properties of polysaccharides and glycoproteins of the yeast cell wall. *Biochemical Journal*. 75:12-17. 1960.
41. KRASINSKII, P. N. Several questions about the physiology of mineral nutrition of plants. *Plant Physiology (Fiziologiya Rastenii)* 6(4):477-484. 1959.
42. KREGER, D. R. Observations on cell walls of yeast and some other fungi by X-ray diffraction and solubility test. *Biochemistry et Biophysics Acta* 13:1-9. 1954. Citado en Ruhland W., ed. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Berlin, Springer-Verlag, 1959. p. 359.
43. KREMERS, E. R. The lignins. *Annual Review of plant physiology* 10:195-196. 1956.
44. KUYKENDALL, R. J. & WALLACE, A. Absorption and hydrolysis of urea by detached citrus leaves immersed in urea solutions. *American Society for Horticultural Science. Proceedings* 64:117-127. 1954.

45. LAMBERTZ, P. Untersuchungen ueber das Vorkommen von Plasmodiesmen in den Epidermisaussenwaenden. *Planta* 44(2): 147-190. 1954.
46. LAMPORT, D. T. A. & NORTHICOTE, D. H. The use of tissue cultures for the study of plant cell walls. *Biochemical Journal* 76:52. 1960.
47. MENINATO, O. R. Estudio preliminar sobre los factores influyentes en la absorción aerea y transporte de elementos nutritivos. Bonplandia; Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional del Noreste. 1(1):21-37. 1960.
48. MULLER, L. Un aparato micro Kjeldahl simple para análisis rutinario rápido de materia vegetal. *Turrialba* 2(1):17-25. 1961.
49. \_\_\_\_\_ CARR, H. P. & LOOMIS, W. E. The submicroscopic structure of plant surfaces. *American Journal of Botany* 41(7):593-600. 1954.
50. NOMOTO, M., NARAHASHI, Y. & MURAKAMI, M. A proteolytic enzyme of *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry* 48(4):593-602. 1960.
51. ORGELL, W. H. The isolation of plant cuticle with pectic enzymes. *Plant Physiology* 30:78-80. 1955.
52. PAVLOV, N. A. Certain peculiarities of urea nitrogen intake by corn plant leaves from direct supplementary applications. *Doklady* 134(1-6):205-207. 1961.
53. PHAFF, J. H. The production of certain extracellular enzymes by micro-organism. In Ruhland W., ed. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. Berlin, Springer-Verlag, 1959. Vol. 11, pp. 76-109.
54. RADIISOIOTOPE CONFERENCE, 2nd., OXFORD, 1954. Proceedings. London, Butterworths Scientific Publications, 1954. Vol. 1, 418 p.
55. RANDALL, J. J. & ROGERS, J. H. New fertilizer practices. *Advances in Agronomy* 1:39-76. 1949.

56. REINER, M. J. Behavior of enzyme systems. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing, 1959. 317 p.
57. REINBOTHE, H. & MOTHE, K. Urea, ureides and guanidines in plants. Annual Review of Plant Physiology 13:129-150. 1962.
58. ROBERTS, E. A., SOUTHWICK & PALMITER, D. H. A microchemical examination of McIntosh apple leaves showing relationship of cell wall constituents to penetration of spray solutions. Plant Physiology 23:557-559. 1948.
59. RODNEY, D. R. The entrance of nitrogen compounds through the epidermis of apple leaves. American Society for Horticultural Science. Proceedings 59:99-102. 1952.
60. ROTHSTEIN, M. & HAYES, D. A. The relationship cell surface to metabolism. Archives of Biochemistry and Biophysics 63(1):87-99. 1959.
61. SCOOT, F. M. Internal suberization of tissues. Botanical Gazette 111:378-394. 1951.
62. \_\_\_\_\_ BAKER, K. C. Anatomy of Washington navel orange rind in relation to water spot. Botanical Gazette 108:459-475. 1947.
63. \_\_\_\_\_ ET AL. Electron microscope studies of the epidermis of Allium cepa. American Journal of Botany 45:449-461. 1958.
64. SCHIEFERSTEIN, R. H. & LOOMIS, W. E. Wax deposits on leaf surfaces. Plant Physiology 31:240-247. 1956.
65. STTERFIELD, G. & BAYLEY, S. T. Structure and physiology of cell walls. Annual Review of Plant Physiology 12:35-62. 1962.
66. SHEREVERIA, I. N. Application of the tracer method in the study of foliar nutrition plants. Plant Physiology (Fiziologiya Rastenii) 6(5):560-564. 1959.
67. SKOSS, J. D. Structure and composition of plant cuticle in relation to environmental factors and permeability. Botanical Gazette 117(1):55-72. 1955.

68. SUMNER, B. J. Urease. In Sumner, J. B. & Myrback, E., eds. The Enzymes; chemistry and mechanism of action. New York, Academic Press 1961. Vol. 1, pt. 2, pp. 873-892.
69. SYMPOSIUM INTERAMERICANO sobre la aplicación de la energía nuclear para fines pacíficos, 2<sup>a</sup>, Buenos Aires, 1959. Los radioisótopos y la radiación en las ciencias biológicas. Washington, D. C., Unión Panamericana, 1960. 248 p.
70. SYMPOSIUM ON radioisotopes in the biosphere. Edited by Richard Caldecott and Leon A. Snyder. Minneapolis, University of Minnesota, Center for Contamination Study, 1960. 579 p.
71. TUKEY, H. B. & OTHERS. Absorption of nutrients by stems and branches of woody plants. Science 116(3007):167-168. 1952.
72. VAN OVERBEEK, J. Absorption and translocation of plant regulators. Annual Review of Plant Physiology 7:355-372. 1956.
73. VOLK, R. & MCAULIFFE, C. Factors affecting the foliar absorption of N15 labelled urea by tobacco. Soil Science, Proceedings 18:308-312. 1954.
74. WARDROP, B. A. Cell wall organization in higher plants; the primary wall. Botanical Review 28(2):241-285. 1962.
75. WAYGOOD, E. R. Physiological and biochemical studies in plant metabolism II. Respiratory enzymes in wheat. Canadian Journal Research 28:7-62. 1950.
76. WITTWER, H. S. & TEUBNER, G. F. Foliar absorption of mineral nutrients. Annual Review of Plant Physiology 10:13-32. 1959.
77. \_\_\_\_\_ & TUKEY, H. B. Isotopic tracer in fruit nutrition. In Childers, Norman F., ed. Fruit Nutrition, Somerville, New Jersey, Somerset Press, 1954. pp. 758-774.
78. WOOD, S. K. R. Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease. Annual Review of Plant Physiology 11:299-322. 1960.
79. YAGER, E. R. Possible role of pectic enzymes in abscission. Plant Physiology 35:157-167. 1960.