

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 186 507**

② Número de solicitud: 200002985

⑤ Int. Cl.7: **G01N 33/84**

G01N 21/75

G01N 21/83

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **13.12.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2003**

Fecha de la concesión: **16.07.2004**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2004**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.08.2004**

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada  
Acera de San Ildefonso, 42  
18071 Granada, ES**

⑱ Inventor/es: **Romero Monreal, Luis**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Test rápido para diagnóstico de N, P y K en plantas.**

㉒ Resumen:

Test Rápido para diagnóstico de N, P y K en plantas.

El Test Rápido para diagnóstico de N, P y K en plantas es un método eficaz y simple que nos permite realizar una aproximación semi-cuantitativa del estado nutricional de un cultivo. Para ello, se requieren algunas tomas de muestras foliares durante su ciclo biológico y poder así determinar las necesidades, o excesos, de nutrientes del cultivo.

El test consta de una caja que contiene cinco tubos de ensayo con los reactivos (difenilamina, ácido sulfúrico, Molibdato amónico, ácido clorhídrico, cloruro de estaño, cobalto nítrico sódico, nítrico sódico, ácido acético y etanol) una tabla patrón de colores para lectura de resultados y un manual de instrucciones. El manejo es muy simple y en unos minutos nos permite conocer de forma rápida el contenido de N, P y K de las plantas analizadas.

ES 2 186 507 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Test rápido para diagnóstico de N, P y K en plantas.

## Sector de la técnica

Análisis agrícola.

## Estado de la técnica

El análisis de material vegetal, está generalmente definido como un método de control para la determinación del contenido total de un elemento basado en un análisis en el laboratorio de material vegetal recolectado, mientras que el *Test de tejidos* se lleva a cabo en savia extraída de la planta o en un extracto de una parte determinada de la planta (Jones, J.B., Jr., 1997; Hydroponics, St. Lucie Press Ed.; Boca Raton, Florida, USA); el test se realiza *in situ* utilizando kits diseñados específicamente como el de Spectrum Technologies Inc. (12010 South Aero Drive, Plainfield, Illinois, 60544, USA), denominado "*The Plant Check Tissue testing kit*".

Así como el "*HACH Plant Testing kit*" de HACH Company, P.O. Box 389, Loveland, Colorado, 80539, USA. Este tipo de aparataje para *Test de Tejidos* se asemeja más a un laboratorio de campo, que por su volumen e infraestructura imposibilita su utilización práctica por el agricultor.

Los *Test de tejidos* comúnmente se realizan con tejido conductor, como peciolo, nervios foliares o tallos (Hoel, B.O., 1999; Acta Agric. Scand. Sect. B- Soil & Plant Sci. 49, 82-91). Estos *test rápidos* son útiles en ciertas circunstancias, pero nunca sustituirán el análisis de laboratorio. No obstante, los procedimientos de los *test rápidos* en sí mismos son relativamente fáciles de realizar, la dificultad llega en la interpretación de los resultados, ya que requiere considerable cualificación y práctica que capacite para un uso efectivo de los resultados del test. Además, el usuario necesita tener disponibles unos estándares (patrones) adecuados para asegurar que el resultado obtenido es analíticamente correcto.

Nicholas (Nicholas, D.J.D., 1957; Plant Anal. Fert. Problems, Prevot (ed.). I.H.R.O., Paris, p. 119-139) indica que la aparente simplicidad de los *Test de tejidos* puede dar lugar a confusiones, y es solamente mediante el estudio intensivo de las cosechas cultivadas bajo condiciones de suministro iónico experimental como se pueden determinarse los valores generales para el nivel normal y el de deficiencia o toxicidad. Esta labor requiere frecuentes tomas de muestras de diversas partes de la planta durante su ciclo biológico. Solamente entonces se pueden usar los *Test de tejidos* de manera satisfactoria para determinar el estado nutricional de las cosechas.

Syltie y colaboradores (Syltie et al., 1972; Commun. Soil Sci. Plant Anal. 3, 38-49) emplearon los *Test de tejidos* para identificar el nivel de nitratos, fósforo, potasio, magnesio, y manganeso en campo, y para plantas de maíz y soja. Para cada determinación, se obtenía una cantidad de savia y jugo celular procedentes de la maceración del nervio central (maíz) y peciolo (soja), que se depositó sobre tiras de papel de filtro previamente impregnadas con el reactivo identificador del nutriente correspondiente. El color desarrollado se comparó con el color óptimo apropiado. De esta forma se establecieron las concentraciones críticas de nutrientes presentes en el tejido conductor con respecto al nitrógeno, fósforo, potasio y manganeso, no siendo posible con el otro nutriente. Este método de campo demostró que eran factibles buenos resultados de utilidad práctica para el potasio en ambas cosechas.

Scaifer en 1978 (Scaifer, A., National Veg. Res. Stn., Wellesbourne, Reino Unido), demostró que el método anterior era útil para mediciones rápidas de nitratos, potasio y calcio, presentes en el tejido conductor, bien en el peciolo, o en la base de tallo. El procedimiento puede realizarse en pocos minutos, y en casi todas las especies vegetales.

Besford (Besford, R.T., 1980; Ann. Bot. 45, 225-227), sugiere que la medida de la actividad de la enzima fosfatasa ácida, puede ser utilizada como *Test rápido de tejidos* en muchas plantas hortícolas, para detectar deficiencias en fósforo. Para realizar el ensayo, utiliza discos de hojas que se introducen en una solución de para-nitrofenil fosfato, encontrando que la actividad fosfatasa ácida es proporcional a la intensidad del color amarillo del paranitrofenol fosfato formado. Este autor muestra que, discos de hojas deficientes en fósforo, colorean de amarillo una solución incolora de para-nitrofenil-fosfato, gracias al incremento de actividad enzimática que se produce en los tejidos deficientes.

Bar-Akiva y colaboradores (Bar-Akiva et al., 1978; HortScience 13, 284-285), utilizan la actividad de la peroxidasa, como *Test rápido* para diagnosticar la deficiencia del hierro. Miden la actividad enzimática en discos de hojas y la reacción es rápida. El test puede realizarse bajo condiciones de campo. Para realizar el test, sitúan los discos de hojas en una solución 2:2:1 de tampón acetato: ácido ascórbico: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

a la que se añaden unas pocas gotas de solución de bencidina. Si las plantas están bien nutridas, se desarrolla un color azul, correspondiente a la actividad enzimática.

5 Con el rápido desarrollo que se ha llevado a cabo en todos los aspectos de la química analítica y de diagnóstico, la introducción de técnicas como el *Test Rápido en Plantas para N, P y K* en el mercado tendrá una gran aplicación tanto para la agricultura tradicional como para las nuevas técnicas de cultivo intensivo.

10 La agricultura e industrias satélites de esta actividad son el principal motor dinamizador de la economía de nuestra sociedad. El progreso tecnológico alcanzado en este sector hace que las prácticas culturales se adecuen al devenir de los tiempos; si a todo lo anterior le añadimos que los ciclos biológicos y productivos de los vegetales han sido transformados para obtener más y mejores rendimientos, se hace imprescindible una actualización de todas las técnicas relacionadas con dicho sector económico.

15 Es por todo lo antes expuesto, que adecuar las nuevas técnicas químicas y bioquímicas haciéndolas simplificadas, sencillas y rápidas, permiten un buen control del cultivo pudiendo dirigir día a día el estado nutricional de las plantas en cuestión. Es más, con estos *test rápidos* podemos prever las alteraciones nutricionales, e impedir una reducción en la cosecha, tanto en calidad, como en cantidad.

20 Nuestro objetivo principal consiste en desarrollar este método rápido de análisis que permite cuantificar en cualquier momento el estado nutricional de un cultivo, además de simplificar las técnicas más habituales en el campo analítico relacionadas con la producción agrícola, ya que una adecuada nutrición de los vegetales resulta de vital importancia sobre la nutrición de los consumidores inmediatos de estos (el hombre), puesto que la alta concentración de algunas sales en las plantas puede resultar altamente tóxica para el consumo humano.

### 25 Explicación de la invención

30 El uso de los *Test rápidos* de tejidos nos es muy útil para identificar en cada momento la evolución de la aplicación de los fertilizantes y su eficacia, permitiendo por lo tanto, una rectificación rápida e impedir así el daño antes de que se produzca, evitando con ello una reducción importante de la cosecha y de su calidad. Así mismo, nos permiten conocer las demandas nutricionales del cultivo en cada momento según su fase fenológica (crecimiento, floración, fructificación, etc..).

35 Por todo ello, se hace imprescindible un control riguroso del estado nutricional de las plantas cultivadas. Así, el *Test Rápido en Plantas para N, P y K* es un método eficaz ya que por su aparente simplicidad, nos permite realizar una aproximación semicuantitativa de este estado nutricional del cultivo. Para ello, se requiere la toma de algunas muestras foliares durante el ciclo biológico y poder así determinar las necesidades o excesos de nutrientes en el cultivo.

40 Este método analítico es rápido, sencillo y simplificado para que de forma inmediata, y en cualquier momento pueda cuantificarse el estado nutricional de un cultivo, si bien, no podemos perder el concepto de que es un método de aproximación.

45 Los otros procedimientos empleados para cuantificar el nivel nutricional de las plantas son muy poco adecuados, tanto por el elevado coste económico, como por la infraestructura en sí de los componentes, que conlleva utilizar muchos componentes, llevar un maletín de campo, requieren muchos de ellos aparatos de precisión (colorímetros, pH-metros, etc.), y todo ello encarece, dificulta y prácticamente impide su utilización por el agricultor, jardinero o extensionista agrícola, dada la escasa formación en los conocimientos necesarios para el manejo de estas técnicas que este colectivo normalmente tiene. Todo lo contrario de el método que aquí se propone, que es fácil y rápido de realizar y muy sencillo de utilizar e interpretar.

50 De la población a estudiar (cultivo, plantación, invernadero, semillero, etc..) se muestrean pecíolos o bien nervios principales de un número determinado de plantas, tomándose las muestras de la parte media o central del tallo, que se corresponde con la edad madura de la planta.

55 Estas muestras vegetales se trocean en un tamaño fino, con una longitud no superior a los 3 - 6 mm.

60 Una vez obtenidas así las muestras para el *Test rápido* se introducen en la cápsula indicada para cada análisis y se procede a continuación a agitarla vigorosamente, de manera que el reactivo entre en contacto con la mayor superficie disponible de material vegetal.

Pasados unos segundos, el grado de color que se ha desarrollado se compara con el patrón que se

## ES 2 186 507 B1

facilita, y así se obtiene la indicación rápida del estado nutricional para el elemento en cuestión.

El test consta de tres tubos de ensayo principales donde se llevará a cabo la reacción marcados respectivamente como N (conteniendo 10 ml de reactivo  $A_N$ ), P (conteniendo 10 ml de reactivo  $A_P$ ) y K (conteniendo 10 ml de reactivo  $A_K$ ), y dos tubos adicionales marcados como P1 (que contiene el reactivo  $B_P$ ) y K1 (que contiene el reactivo  $B_K$ ). Los tubos son de vidrio transparente excepto el marcado como K que lleva una tira de 3 mm de color negro colocada verticalmente en su superficie. Además de los tubos el test se compone de una tabla de colores o patrón para la visualización de resultados y un manual de utilización.

### Preparación de los reactivos

#### *Test de nitrógeno*

*Reactivo  $A_N$ .* Disolución de 0.5 - 2.5 % de difenilamina en ácido sulfúrico de una pureza del 90 - 98 %

#### *Test de fósforo*

*Reactivo  $A_P$ .* Molibdato amónico del 0.4 - 4 % que contiene de 5 - 10 mL de ClH, en 100 mL de agua destilada.

*Reactivo  $B_P$ .* 5 - 10 agujas de  $SnCl_2$

#### *Test de potasio*

*Reactivo  $A_K$ .* Disolver 2 - 6 g de Cobalto-nitrito-sódico, 20 40 g de nitrito sódico y 2 - 8 mL de ácido acético concentrado en 100 mL de agua. Se toman 5 - 10 mL de la solución anteriormente preparada y se diluyen junto con 15 - 30 g de nitrito sódico hasta completar un volumen final de 100 mL, con agua destilada.

*Reactivo  $B_K$ .* Etanol de 90 - 96 %

### TABLA DE COLORES

*La tabla de colores o patrón consta de tres secciones distintas con cuadros de colores dispuestos de la siguiente forma:*

	Color	Explicación
TEST DE NITROGENO	Azul oscuro (Pantone 281)	Exceso de N
	Azul pálido o verde azulado (Pantone 286)	Nivel adecuado
	Ausencia de color (Pantone 283)	Deficiencia de N
TEST DE FOSFORO	Azul oscuro, casi negro (Pantone 196)	Abundancia de P
	Azul tenue (Pantone 2728)	Nivel adecuado de P
	Verde o azul verdoso (Pantone 326)	Deficiencia de P
	Sin color o amarillo pálido (Pantone 101)	Gran deficiencia de P
TEST DE POTASIO	Altamente turbio (Pantone 1525)	Muy alto contenido de K Apenas se ve la raya negra
	Fuertemente turbio (Pantone 138)	Optimo contenido de K Apenas se ve la raya negra
	Ligeramente turbio (Pantone 124)	Contenido bajo de K Se ve bien la raya negra
	Sin turbidez (Pantone 116)	Contenido muy bajo de K Se ve muy bien la raya negra

**Manera de realizar la invención**

5 1.- Utilizar tiras finas del limbo foliar, o mejor, trozos (pequeños) de diferentes peciolos. El número de tiras de limbo foliar, o de trozos de peciolos debe ser igual para cada muestra, con el objeto de comparar mejor entre ellas.

2.- Las tiras finas o trozos de peciolos se introducen en cada tubo de ensayo y a continuación se le añaden reactivos según el caso:

*Test de Nitrógeno*

10 Las tiras o trozos de material vegetal se introducen en tubo de ensayo marcado como N. Se agita enérgicamente hasta aparición de color azul.

*Test de Fósforo*

15 Las tiras o trozos de material se introducen en el tubo de ensayo marcado como P. se agita enérgicamente durante unos 2 - 3 minutos. Se le añade al tubo de ensayo el contenido del tubo marcado como P1. Agitar de nuevo y esperar dos minutos.

*Test de Potasio*

20 Antes de iniciar el proceso el tubo de ensayo debe enfriarse por debajo de los 20°C. Las tiras o trozos de material se ponen en tubo de ensayo marcado como K y se agita enérgicamente durante 2 - 3 minutos. Se añade al tubo anterior el contenido del tubo marcado como K1. Agitar y dejar reposar tres minutos, aparece turbidez que se contrasta con la franja negra del tubo de ensayo.

25 3.- Una vez realizada la agitación y el reposo correspondiente, se leen los resultados por comparación con la tabla patrón de colores que se adjunta en el test.

30

35

40

45

50

55

60

**REIVINDICACIONES**

1. Test rápido para diagnóstico de N, P y K en plantas **caracterizado** porque se compone de una serie de cinco tubos donde se produce la reacción de una muestra vegetal con los reactivos contenidos en los mismos y marcados como N para análisis de nitrógeno con los siguientes reactivos: ácido sulfúrico, difenilamina, P y P1 para análisis de fósforo con los siguientes reactivos P: molibdato amónico, ácido clorhídrico y P1: cloruro de estaño, K y K1 para análisis de potasio con los siguientes reactivos K: cobalto nitrito sódico, nitrito sódico y ácido acético y K1: etanol.

2. Test rápido para diagnóstico de N, P y K en plantas según reivindicación primera **caracterizado** porque el tubo marcado como N lleva en su interior 10 ml de un reactivo que se realiza disolviendo 0.5 a 2.5% de difenilamina en ácido sulfúrico de una pureza del 90-98%.

3. Test rápido para diagnóstico de N, P y K en plantas según reivindicación primera **caracterizado** porque el tubo marcado como P lleva en su interior 10 ml de un reactivo formado por disolución de molibdato amónico en una proporción del 0.4 al 4% y 10 ml de ácido clorhídrico en 100 ml de agua destilada. Y el tubo marcado como P1 lleva en su interior de 5 a 10 agujas de cristales de cloruro de estaño.

4. Test rápido para diagnóstico de N, P y K en plantas según reivindicación primera **caracterizado** porque el tubo marcado como K lleva en su superficie una franja pintada de 3 mm de color negro y en su interior 10 ml de un reactivo formado por disolución de 2 a 6 g de cobalto nitrito sódico, 20 a 40 g de nitrito sódico y 2 a 8 ml de ácido acético concentrado en 100 ml de agua, de esta solución se extraen 10 ml y se diluyen junto a 15 a 30 g de nitrito sódico hasta completar un volumen final de 100 ml, de esta disolución se extraen los 10 ml que van en el interior del tubo marcado como K. El tubo marcado como K1 lleva en su interior de 5 a 7 ml de etanol de 90 a 96%.

5. Test rápido para diagnóstico de N, P y K en plantas según reivindicación primera **caracterizado** porque para la interpretación de resultados se usa la siguiente tabla:

Test de nitrógeno:

- 1.- Azul oscuro (Color Pantone 281): exceso de N.
- 2.- Azul pálido o verde-azulado (Color Pantone 286): nivel adecuado.
- 3.- Ausencia de color (Color Pantone 283): deficiencia en N.

Test de Fósforo

- 1.- Color azul oscuro, casi negro (Color Pantone 196): abundancia de P.
- 2.- Color azul tenue (Color Pantone 2728): nivel adecuado de P.
- 3.- Color verde o azul verdoso (Color Pantone 326): deficiencia de P.
- 4.- Ausencia de coloración, o un color amarillo (Color Pantone 101), indica una gran deficiencia de P.

Test de Potasio

- 1.- Altamente Turbio (Color Pantone 1525): Muy alto contenido de K. Apenas se ve la franja negra.
- 2.- Fuertemente turbio (Color Pantone 138): óptimo contenido de K. Apenas se ve la franja negra.
- 3.- Ligeramente turbio (Color Pantone 124) Contenido bajo de K. Se ve bien la franja negra.
- 4.- Sin turbidez (Color Pantone 116): contenido muy bajo de K. Se ve muy bien la franja negra.

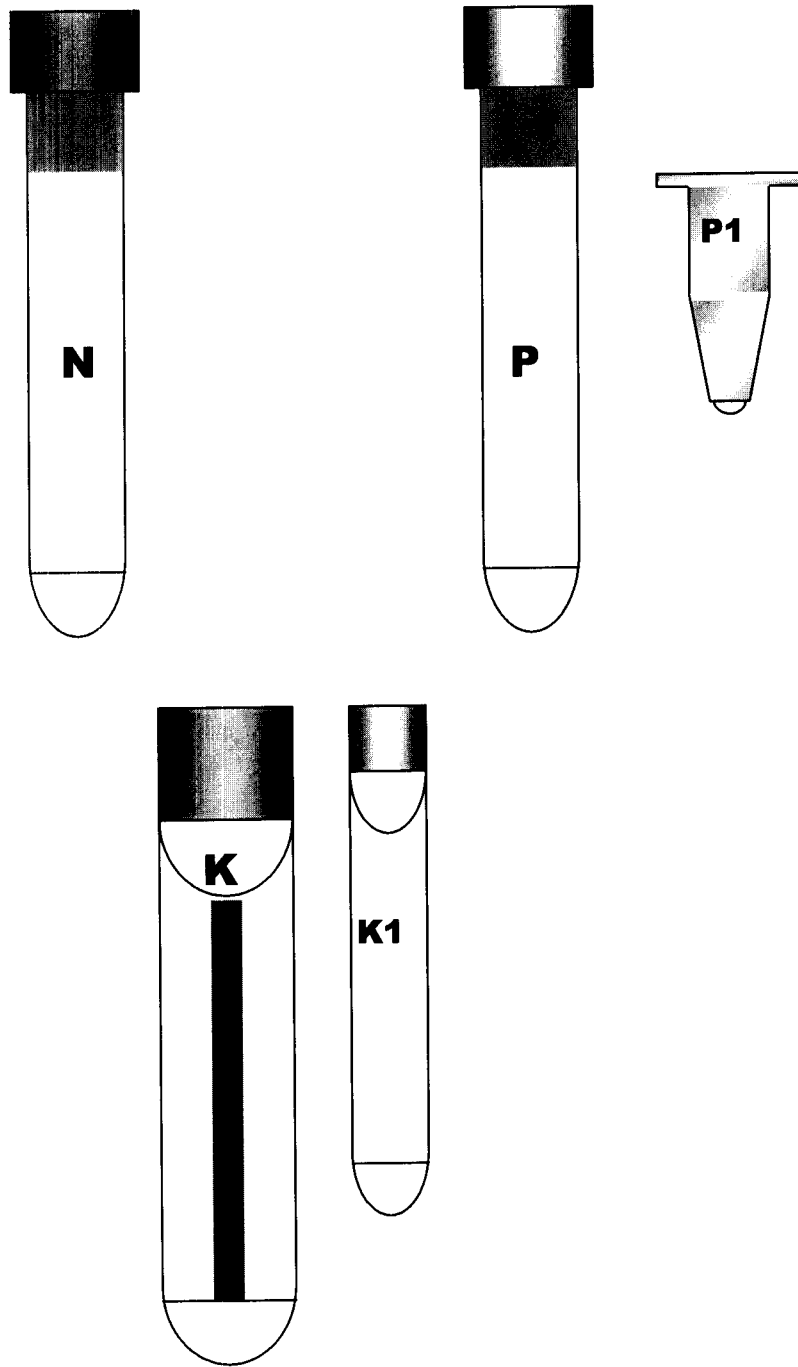


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 186 507

② Nº de solicitud: 200002985

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.12.2000

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: G01N 33/84, 21/75, 21/83

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	FR 2729469 A1 (CHALLENGE AGRICULTURE SOCIETE A RESPONSABILITE LIMITEE - FR) 19.07.1996, páginas 1-4.	1-5
Y	BURRIEL MARTI, F. et al. Química Analítica Cualitativa. 11ª edición. Madrid: Editorial Paraninfo, 1983, páginas 234,547,725-726,903-904.	1-5

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

02.04.2003

Examinador

E. Relaño Reyes

Página

1/1