

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Vegetal



**Influencia de la fertirrigación y el
agua salobre sobre el metabolismo
mineral y bioquímico en plantas de
melón (*Cucumis melo* L. var. *Galia*)**

TESIS DOCTORAL

Juan Luis Valenzuela Manjón-Cabeza

Granada, 1990



01533980

T. pros. 10-112

J
14
1

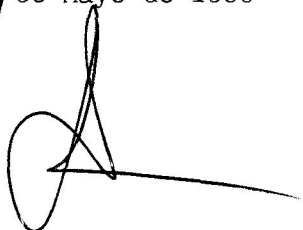
UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 28 MAYO 1990
ENTRADA NUM. 817

INFLUENCIA DE LA FERTIRRIGACION Y EL AGUA SALOBRE
SOBRE EL METABOLISMO MINERAL Y BIOQUIMICO
EN PLANTAS DE Cucumis melo L. var Galia.

por

Juan Luis Valenzuela Manjón-Cabeza

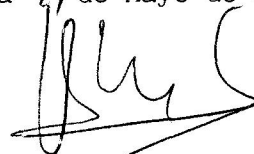
Visado en Granada,
a 2/de Mayo de 1990



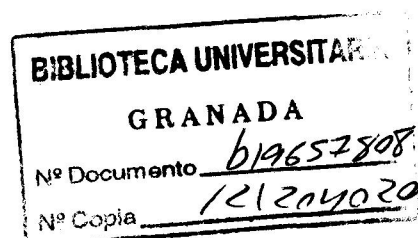
Luis María Romero Monreal
Doctor en Ciencia Bioló-
gicas, Profesor Titular

Trabajo presentado para aspirar al
Grado de DOCTOR en CIENCIAS BIOLÓ-
GICAS.

Granada a 2/de Mayo de 1990.



Juan Luis Valenzuela Manjón-Cabeza
Licenciado en Ciencias Biológicas.



A mi padre, naturalmente.

Quiero expresar mi gratitud:

Al Profesor Dr. D. **Luis M^a Romero Monreal**. Por la confianza depositada en mí, por sus orientaciones y dedicación. Por todo esto, y por lo que científicamente yo sea capaz de desarrollar en el futuro, gracias.

Muy especialmente al Profesor Dr. D. **Enrique Barahona** de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), mi sincera gratitud por su valiosa ayuda en la realización de los trabajos estadísticos.

A los compañeros del equipo de investigación en el que estoy integrado: **Miguel Guzmán, Miguel Urrestarazu; Agustín Sánchez, Antonio del Río, Francisco Lorente; M^a José Hurtado, Inmaculada López-Cantarero y Olga Castro**, quienes siempre han estado conmigo y con mis ilusiones.

Qisiera destacar especialmente la labor de D. **Francisco Alex Bruque**, miembro del C.I. D.H., pues sus amplios y profundos conocimientos técnicos nos han permitido llevar a buen término el trabajo. Así mismo, he de agradecer sus consejos y apoyo humano desinteresados permitiendo con ello el nacimiento de una cálida y larga amistad.

Agradezco al Centro de Investigación y Desarrollo Hortícola el apoyo y prestación de infraestructura sin la cual hubiera sido imposible realizar este trabajo, también quiero hacer notar que el trabajo se inició siendo Director del Centro **D. F. Capdevila**; continuado durante el mandato de **D. E. López-Con** y finalizado en el período de dirección que sustenta **D. J. Rojo**.

También quiero destacar a **J. Ros**, **A. Sánchez-Mantero**, **A. Pérez** y **L. Vargas**, miembros y colaboradora en su día, del C.I. D.H. que con su ayuda y amistad nos permitieron superar algunas dificultades.

A los compañeros del Departamento de Biología Vegetal, en especial a la Dra. **I. Agüí**, Tutora de esta Tesis.

A mi madre, **Carmen**; hermanas: **Esperanza**, **Aurora** y **M^a Carmen**, por el completo apoyo y la total comprensión demostrados.

A **Esperanza**, **Eloisa** y **Araceli Manjón-Cabeza** y a **Esperanza Palop**, por todo el cariño y hospitalidad que me han brindado durante tanto tiempo.

Por último agradecer a la Srta. **Aurora** su ayuda en la realización de las Tablas.

Los efectos del amor o de la ternura son fugaces,
pero los del error, los de un solo error, no se
acaban nunca, como una carnívora enfermedad
sin remedio.

BELTENEBROS (ANTONIO MUÑOZ MOLINA)

INDICE

| INDICE | Página |
|---|--------|
| 1. OBJETO DEL TRABAJO..... | 1 |
| 2. REVISION BIBLIOGRAFICA..... | 5 |
| 2.1. Diagnóstico según sintomatologías..... | 7 |
| 2.2. ¿Cual es el diagnóstico?..... | 8 |
| 2.3. Diagnóstico por medio del análisis de la planta (Análisis foliar)..... | 10 |
| 2.3.1. Organos que pueden ser analizados..... | 11 |
| 2.3.1.1. Análisis de la hoja..... | 11 |
| 2.3.1.1.1. Generalidades..... | 11 |
| 2.3.1.1.2. Nutrientes totales..... | 12 |
| 2.3.1.1.3. Nutrientes solubles..... | 16 |
| 2.3.1.1.3.1. Introducción..... | 16 |
| 2.3.1.1.3.2. Material seco..... | 17 |
| 2.3.1.1.3.3. Material seco..... | 25 |
| 2.3.1.2. Análisis del peciolo..... | 27 |
| 2.3.1.3. Análisis del fruto..... | 28 |
| 2.3.1.4. Análisis de la corteza..... | 30 |
| 2.3.2. Muestreo y preparación del órgano analizado..... | 31 |
| 2.3.3. Factores que afectan a la concentración de nutrientes en el órgano analizado..... | 33 |
| 2.3.3.1. Generalidades..... | 33 |
| 2.3.3.2. Edad del órgano..... | 33 |
| 2.3.3.3. Interacciones iónicas..... | 39 |
| 2.3.3.4. Factores endógenos..... | 45 |
| 2.3.3.5. Factores exógenos..... | 46 |
| 2.3.4. Relación positiva entre el diagnóstico visual y el análisis foliar..... | 53 |
| 2.4. Indicadores bioquímicos..... | 55 |
| 2.4.1. Generalidades..... | 55 |
| 2.4.2. Actividad enzimática específica..... | 56 |
| 2.4.2.1. Macronutrientes..... | 56 |
| 2.4.2.1.1. Nitrógeno..... | 57 |
| 2.4.2.1.2. Fósforo..... | 58 |
| 2.4.2.1.3. Potasio y magnesio..... | 59 |
| 2.4.2.1.4. Calcio..... | 60 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.2.2.1. Hierro y manganeso..... | 63 |
| 2.4.2.2.3. Cobre..... | 65 |
| 2.4.2.2.4. Boro..... | 66 |
| 2.4.2.2.5. Molibdeno..... | 66 |
| 2.4.3. Reactivación o inducción enzimática..... | 67 |
| 2.4.4. ¿Son útiles los pigmentos en el diagnóstico?..... | 69 |
| 2.4.5. Productos metabólicos como indicadores de la distorsión iónica..... | 70 |
| 2.5. Indicadores histológicos..... | 73 |
| 2.6. Consideraciones finales..... | 74 |
| 3. MATERIAL Y METODOS..... | 75 |
| 3.1. Características del invernadero..... | 77 |
| 3.2. Características de las parcelas..... | 77 |
| 3.3. Planta empleada..... | 77 |
| 3.4. Tratamientos..... | 78 |
| 3.5. Parámetros ambientales..... | 79 |
| 3.6. Suelos..... | 79 |
| 3.6.1. Toma de muestras..... | 79 |
| 3.6.2. Preparación de las muestras..... | 81 |
| 3.6.3. Análisis de las muestras..... | 81 |
| 3.6.3.1. Análisis físico..... | 81 |
| 3.6.3.2. Análisis químico..... | 83 |
| 3.7. Agua..... | 85 |
| 3.7.1. Recolección de las muestras de agua..... | 85 |
| 3.7.2. Análisis de las muestras..... | 85 |
| 3.8. Plantas..... | 86 |
| 3.8.1. Toma de muestras vegetales y su preparación..... | 86 |
| 3.8.2. Análisis del material vegetal seco..... | 88 |
| 3.8.2.1. Mineralización por vía húmeda con sulfúrico..... | 88 |
| 3.8.2.1.1. Determinaciones..... | 88 |
| 3.8.2.2. Mineralización por vía húmeda con nítrico/perclórico..... | 89 |

| | |
|---|-----|
| 3.8.2.2.1. Determinación..... | 89 |
| 3.8.2.3. Extracción de la forma soluble de los nutrientes..... | 89 |
| 3.8.2.3.1. Con medio ácido..... | 89 |
| 3.8.2.3.2. Con medio acuoso..... | 90 |
| 3.8.2.3.2.1. Determinaciones..... | 90 |
| 3.8.2.4. Fracciones iónicas..... | 90 |
| 3.8.2.4.1. Fósforo..... | 91 |
| 3.8.2.4.1. Calcio..... | 92 |
| 3.8.2.5. Hidratos de carbono..... | 92 |
| 3.8.2.6. Proteínas totales..... | 93 |
| 3.8.3 | |
| 3.8.3.1. Proteínas solubles..... | 93 |
| 3.8.3.2. Aminoácidos solubles..... | 94 |
| 3.8.3.3. Pigmentos..... | 94 |
| 3.8.3.3.1. Clorofilas..... | 94 |
| 3.8.3.3.2. Carotenos..... | 94 |
| 3.8.3.3.3. Antocianinas..... | 95 |
| 3.8.3.4. Fenoles..... | 95 |
| 3.8.3.4.1. Fenoles totales..... | 95 |
| 3.8.3.4.1. O-difenoles..... | 95 |
| 3.8.3.5. Acido ascórbico..... | 96 |
| 3.8.3.6. Acidez..... | 96 |
| 3.8.3.6.1. Acidez iónica..... | 96 |
| 3.8.3.6.2. Acidez valorable..... | 96 |
| 3.8.3.7. Hidrogeniones y oxidrilos..... | 96 |
| 3.8.4.8. Enzimas..... | 97 |
| 3.8.4.8.1. Nitrato-reductasa..... | 97 |
| 3.8.4.8.1.1. Nitrato-reductasa endógena.. | 97 |
| 3.8.4.8.1.2. Nitrato-reductasa inducida con nitratos..... | 98 |
| 3.8.4.8.1.3. Nitrato-reductasa infiltrada o reactivada con Mo..... | 98 |
| 3.8.4.8.2 Fosfatasa ácida endógena..... | 98 |
| 3.8.4.8.3. Peroxidasas..... | 99 |
| 3.8.4.8.3.1 Peroxidasa endógena..... | 99 |
| 3.8.4.8.3.1. Peroxidasa infiltrada con Fe | 99 |
| 3.8.4.8.3.1. Peroxidasa infiltrada con Mn | 100 |

| | |
|---|-----|
| 4.4. Concentración y/o actividad en hoja..... | 161 |
| 4.4.1. Efecto medio del N, P y K..... | 161 |
| 4.4.1.1. Macronutrientes..... | 161 |
| 4.4.1.2. Micronutrientes..... | 169 |
| 4.4.1.3. Índices fisiológicos..... | 175 |
| 4.4.1.4. Balance iónico y productividad | 180 |
| 4.4.1.5. Fracciones..... | 183 |
| 4.4.1.5.1. Fósforo..... | 184 |
| 4.4.1.5.2. Calcio..... | 188 |
| 4.4.1.6. Nitrato-reductasa y fosfatasa | |
| ácida..... | 191 |
| 4.4.1.7. Algunos metaloenzimas..... | 200 |
| 4.4.1.8. Pigmentos..... | 208 |
| 4.4.1.9. Hidratos de carbono..... | 213 |
| 4.4.1.10. Otros parámetros..... | 217 |
| 4.5. Actividad iónica/metabólica durante | |
| la vida de una hoja..... | 226 |
| 4.5.1. Macronutrientes..... | 227 |
| 4.5.2. Micronutrientes..... | 231 |
| 4.5.3. Índices fisiológicos..... | 234 |
| 4.5.4. Balance iónico y productividad..... | 236 |
| 4.5.5. Fracciones..... | 238 |
| 4.5.5.1. Fósforo..... | 238 |
| 4.5.5.2. Calcio..... | 240 |
| 4.5.6. Nitrato-reductasa y fosfatasa ácida... | 241 |
| 4.5.7. Algunos metaloenzimas..... | 244 |
| 4.5.8. Pigmentos..... | 249 |
| 4.5.9. Hidratos de carbono..... | 252 |
| 4.5.10. Otros parámetros..... | 255 |
| 4.6. Intervalo óptimo..... | 261 |
| | |
| 5. CONCLUSIONES..... | 269 |
| | |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 275 |
| | |
| 7. APENDICE..... | 343 |
| 7.1. Análisis estadístico..... | 345 |
| 7.2. Datos analíticos..... | 415 |
| 7.3. Productividad..... | 477 |
| 7.4. Intervalo óptimo..... | 483 |

OBJETO DEL TRABAJO



El cultivo del Cucumis melo L. en la zona costera ha alcanzado en los últimos años un desarrollo importante. Esto se debe, principalmente, al avance en las técnicas de cultivo, uso de fertilizantes, mejora de la calidad de las semillas y otras circunstancias.

Los fertilizantes, tanto por su alto precio como por las elevadas dosis que se aplican, tienen una fuerte incidencia sobre el costo total de la producción.

El adecuado uso de la interacción fertilizantes-salinidad requiere un conocimiento de las relaciones que existen entre suelo, fertilización, necesidades nutritivas de la planta y producción. Uno de los métodos de introspección para lograr dicho conocimiento es el empleo conjunto del Análisis Foliar y Bioquímico de los nutrientes.

Se creyó de interés, por consiguiente, investigar si estas técnicas podrían ser adecuadas para el diagnóstico del estado nutritivo del Cucumis melo L., en condiciones de invernadero industrial y en lo relativo a algunos nutrientes disueltos en agua salobre y empleados en la fertilización de estos cultivos. Conocido es que, una vez establecidos los niveles óptimos de los nutrientes o su relación entre ellos, se dispone de un criterio con el cual se pueden efectuar recomendaciones para corregir las deficiencias o toxicidades y lograr así, las más altas producciones.

En consecuencia, el objeto principal de este trabajo fue establecer la influencia en la planta de los fertilizantes: N, P y K en un medio fuertemente salino y su relación entre sí. Así mismo, se pretendió establecer los índices iónicos, enzimáticos y fisiológicos más adecuados para las plantas de Cucumis melo L. durante su ciclo biológico.

Para la realización de este trabajo se partió de muestras de hojas procedentes del ensayo, con distintos niveles de fertilización N, P y K, permaneciendo constantes las dosis

de Mg y de micronutrientes. Todos los nutrientes fueron disueltos en el agua de riego que presentaba unos niveles altos de concentración salina. Se utilizó la variedad Galia y el ensayo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo Hortícola de la provincia de Almería.

REVISION BIBLIOGRAFICA

2.- INTRODUCCION.

Cuando la concentración de un nutriente alcanza, de manera normal, niveles altos o bajos en planta, aparecen síntomas característicos en hojas, tallos o frutos. Estos síntomas incluyen: clorosis marginal e intervenosa, necrosis marginal foliar, áreas o manchas necróticas del tejido foliar o del fruto, necrosis en la corteza, muerte de los meristemos y de las yemas terminales; alta pigmentación en el limbo foliar, tallos y frutos; hojas agrupadas en forma de roseta; fracaso de la expansión y desarrollo del limbo foliar y enanismo parcial o completo de la planta. La interpretación de estos síntomas, en términos de trastornos minerales, se denomina diagnóstico visual.

2.1.- Diagnóstico según sintomatologías.

El diagnóstico visual de los trastornos iónicos se puede usar para las cosechas en las que los síntomas específicos de deficiencias y/o toxicidad han sido exactamente descritos e ilustrados (Wallace, 1951; Sprage, 1964; Andrew y Pieters, 1970 a,b y 1972 a,b; Smith, 1972, 1973 y 1974; Smith y Verschoyle, 1973; Robinson, 1974; Bergman y Neubert, 1976; Jones y Clay, 1976; Andrew y Pieters, 1976 a,b; Ishizuka, 1978). Es el método más rápido para diagnosticar las causas del fracaso de la producción debido a trastornos nutricionales, pero en los países desarrollados, actualmente, son raras las deficiencias graves y los síntomas visuales inducidos por factores no iónicos. Por ejemplo: regulación del crecimiento (Gutler, 1982), herbicidas (M.A.F.F., 1981), fungicidas (Hancock y Huisman, 1981), algunas enfermedades y plagas (Perrenoud, 1977) y agentes causantes de la contaminación ambiental (Jacobson y Hill, 1970), frecuentemente dan como resultado síntomas visuales que podrían ser confundidos con trastornos o alteraciones nutricionales. Además, cuando más de un ion es deficiente, pueden presentarse síntomas totalmente diferentes de los producidos por uno de los iones considerado aisladamente. En tales circunstancias, el confiarse únicamente al diagnóstico por síntomas visuales puede dar lugar a interpretaciones erróneas.

2.2.- ¿Cual es el diagnóstico?.

Los árboles Laburnum vossii frecuentemente muestran clorosis marginal e intervenosa de las hojas, distorsión de las mismas, éstas se agrupan en forma de roseta y los brotes terminales mueren, síntomas que podrían ser confundidos con una deficiencia en Cu, Zn o B. Sin embargo, los análisis químicos de las hojas muestran concentraciones normales de los tres micronutrientes. Las investigaciones micológicas han demostrado la presencia de hongos patológicos en los tejidos afectados cuya eliminación hacía remitir la sintomatología y la reinoculación los inducía. Así pues, lo que visualmente parece ser un problema nutricional, es producido por una infección de hongos, con posibles lesiones secundarias debido a los Thysanopteros (Chupp y Sherf, 1960).

A veces, es difícil diferenciar visualmente entre la necrosis marginal de la hoja debida a la deficiencia de K y la causada por toxicidad o exceso de cloro. La alteración por exceso de Cl^- , en plantas de fresa produce un aspecto bronceado de la hoja y necrosis marginal, sintomatología que comienza en las hojas seniles. Más tarde, las hojas jóvenes muestran clorosis intervenal y necrosis, teniendo una fuerte tendencia a ahuecarse hacia dentro. Los síntomas de carencia en K son similares respecto al aspecto general pero, además de la necrosis foliar, las plantas deficientes en K desarrollan necrosis en el peciolo y las hojas afectadas se secan totalmente. El análisis químico "versus" foliar, es la única manera segura de diferenciar entre las dos causas de necrosis del limbo foliar. Las hojas dañadas por exceso de Cl^- pueden contener más de 5 mg/g de Cl^- en peso seco, mientras que las hojas normales contienen de 1 a 4 mg/g de Cl^- en materia seca. La susceptibilidad a la lesión por Cl^- varía con la variedad, y las concentraciones desde 4.7 a 6.8 mg/g de Cl^- en peso seco de la hoja representan una zona de transición donde sólo puede tener lugar una ligera lesión en la hoja. Las que son deficientes en K contienen desde 2 a 7 mg/g de K en peso seco y las normales 10 mg/g en peso seco (Bould, 1983).

Una anomalía sintomática de la hoja con múltiples deficiencias iónicas se debe a la combinación de carencia de K y Mg en las hojas de Ribes nigrum. La carencia de K (3.9 mg/g p.s.) cuando está asociada a Mg foliar normal o alto (4.2 mg/g p.s.) produce clorosis marginal e intervenosa, y necrosis en las hojas maduras. Las hojas deficientes en Mg (0.6 mg/g p.s.) cuando están asociadas a niveles normales o altos de K (18.4 mg/g p.s.) muestran coloración púrpura, de las hojas medias del tallo, con una estrecha banda marginal verde. Sin embargo, cuando tanto el K (5.9 mg/g p.s. de K) como el Mg (0.9 mg/g p.s. de Mg) son deficientes, en la misma planta, los síntomas visuales son totalmente distintos: los márgenes de las hojas son de color marrón rojizo, mientras que las zonas adyacentes a las venas principales permanecen con un color verde-oscuro (Hewit, 1983). Así pues, mientras que las deficiencias aisladas de K y Mg en hojas de R.nigrum pueden ser diagnosticadas por sus síntomas visuales con cierta seguridad, es dudoso si la combinación de ambas deficiencias pueden o no ser identificadas sin la ayuda del análisis foliar.

Algunos síntomas virásicos pueden ser muy similares, en algunas cosechas, a los inducidos por trastornos minerales. Por ejemplo: la deficiencia de Mn y el "amarilleo por virus" en la remolacha azucarera inducen ambos a una clorosis de los limbos foliares. Sin embargo, los datos procedentes del análisis foliar diferencian claramente entre ambos trastornos. Las hojas invadidas por virus pueden tener más de 30 $\mu\text{g/g}$ en peso seco de Mn, mientras que las hojas deficientes en Mn tienen valores inferiores a 20 $\mu\text{g/g}$ en peso seco, cuando el grado de carencia foliar de Mn es grave el nivel de dicho ión está por debajo de 15 $\mu\text{g/g}$ en peso seco (Duffus, 1972).

El objetivo de este apartado es resaltar la existencia de algunas limitaciones de los síntomas visuales utilizados para diagnosticar los trastornos nutricionales y para expresar la importancia de su confirmación mediante el análisis foliar.

2.3.- Diagnóstico por medio del análisis de la planta (Análisis foliar).

La utilización del análisis químico ("versus" foliar) de la planta como método de diagnóstico no es nuevo. Fue usado por el químico alemán Liebig hace más de un siglo, para evaluar la fertilidad del suelo. Desde entonces, se ha venido usando ampliamente para evaluar el estado nutricional de los vegetales (Arnon y Stout, 1939; Goodall y Gregory, 1947; Lundegårdh, 1951; Chapman, 1966; Bergman y Neubert, 1976; Molina, 1982; Sánchez, 1985; Guzmán, 1987). Antiguos investigadores emplearon la planta completa para realizar sus análisis, pero los investigadores actuales prefieren, generalmente, partes de la planta para obtener información de su actividad metabólica, por ejemplo: hojas, peciolo, cortezas, raíces, frutos, yemas, tomados como muestras en determinadas y concretas etapas del crecimiento, y estableciendo escalas o niveles de actividad y concentración de iones en dichas partes de las plantas (Bould et al., 1960).

Algunos investigadores determinan, solamente, fracciones de nutrientes que son solubles en ácidos débiles o en soluciones tamponadas (Nicholas, 1957) o en tejido conductor (Syltie et al., 1972; Scaife, 1978). Generalmente, los nutrientes solubles suelen ser empleados para el diagnóstico de plantas anuales, mientras que los iones totales se usan para el análisis foliar de plantas plurianuales.

2.3.1.- Organos que pueden ser analizados.

2.3.1.1.- Análisis de la hoja.

2.3.1.1.1.- Generalidades.

Cuando los científicos en agricultura del siglo pasado, comenzaron a darse cuenta que los elementos minerales en la planta eran captados del suelo, en el cual se encontraba dicha planta, era lógico sugerir que el análisis químico del vegetal podría usarse como medio para valorar el abastecimiento de nutrientes en el suelo.

En aquel tiempo, parecía también razonable sugerir, como lo hizo von Liebig en el siglo pasado en su "Ley de la restitución", que el análisis de las plantas se podía usar para determinar las cantidades de nutrientes tomadas en el suelo por una determinada cosecha y que, por lo tanto, las cantidades necesarias para mantener la fuente de abastecimiento del suelo.

La mayoría del trabajo referente al análisis químico de las plantas fue potenciado por el deseo de desarrollar técnicas que pudieran suplantar o, incluso sustituir el análisis del suelo y así proveer de un método biológico para el análisis del suelo.

La idea de usar el análisis de las plantas para determinar las necesidades de nutrientes del suelo, ha dominado el área de la nutrición de las plantas durante muchos años. En los últimos 20 años, aproximadamente, una gran cantidad de trabajo experimental ha causado un gradual, pero fundamental, cambio en la forma de pensar, ya que se ha hecho progresivamente aparente que en muchas situaciones, y para una gran variedad de especies de plantas en agricultura y horticultura, la composición química de las plantas o de sus tejidos pueden reflejar directamente el estado de los nutrientes o las necesidades por parte de las plantas.

Recientemente, y quizás como resultado de los avances en los conocimientos y entendimiento de los papeles y funciones de los elementos, nuevas aproximaciones al estudio están siendo desarrolladas y que difieren en principio de las técnicas analíticas para las plantas. Estas están basadas en cambios fisiológicos o bioquímicos específicos causados por deficiencias o, alternativamente, en respuestas específicas que pueden ser inducidas en las plantas o en sus tejidos mediante la adición de elementos deficientes.

2.3.1.1.2.- Nutrientes totales.

Los elementos nutritivos minerales reaccionan unos con otros, tanto en la biosfera como después de su absorción por la planta, produciendo complejos fenómenos de sinergismo y antagonismo.

De todo esto se deduce que es necesario conocer, como primera medida, el gradiente nutritivo de un cultivo y lograr posteriormente un estado óptimo de nutrición, de acuerdo con los fines de calidad y rendimiento perseguidos.

Es en este sentido donde el análisis químico de tejidos juega un papel fundamental, pues, entre otros aspectos, se pueden lograr mejores conocimientos sobre los elementos nutritivos; las cantidades y especies químicas que se encuentran en la planta y en el suelo; su absorción y movilización; su distribución a lo largo del ciclo vegetativo y reproductivo; el papel que desempeña cada elemento y su utilización final.

El análisis de tejidos, basado en un método apropiado de recolección de muestras y una correcta interpretación de los datos analíticos, es útil, además, para confirmar los síntomas de deficiencias o excesos de elementos esenciales para la planta y evaluar los existentes en el suelo.

Lundegårdh (1951) describe las bases fisiológicas del análisis como dependiente de dos procesos generales:

- La absorción y distribución de minerales por las plantas.
- La relación cuantitativa entre los elementos nutritivos absorbidos y el crecimiento.

Las consideraciones fundamentales (Fernández, 1966) en que se basa el sistema de trabajo son:

-En un medio homogéneo y bajo los mismo factores externos las hojas fisiológicamente homogéneas (de la misma edad) dan los mismos resultados analíticos.

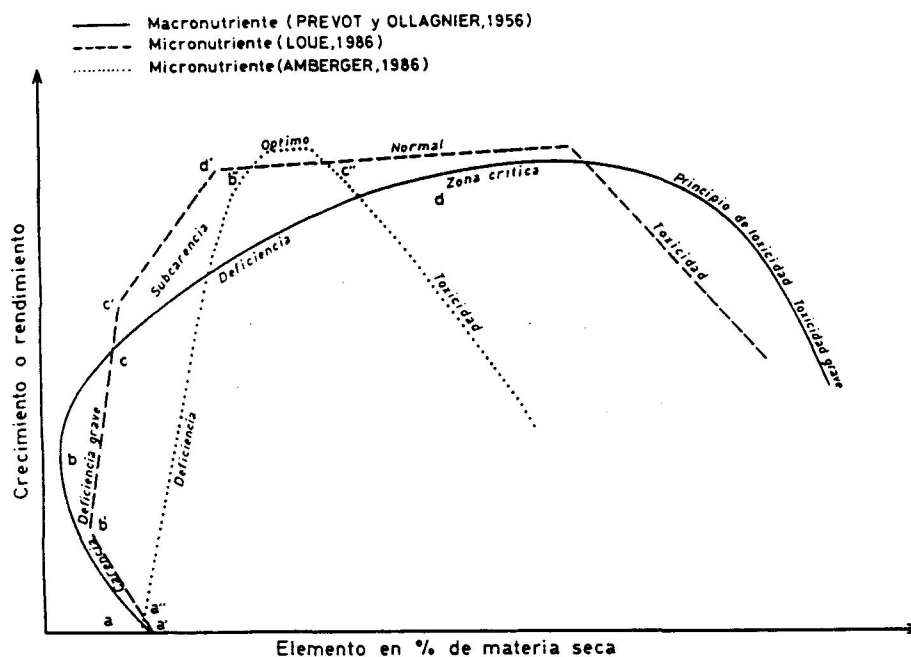
-Hojas de plantas de la misma especie, cultivadas en medios desiguales o sometidas a factores externos distintos, tendrán, en general, diagnósticos foliares distintos. Si las plantas muestran respuestas (usando como criterio, por ejemplo, el desarrollo o rendimiento) a diferentes medios, factores o tratamientos con fertilizantes, dichas respuestas serán reflejadas automáticamente por la composición química de la hoja.

-Como los diagnósticos foliares están sujetos a variaciones de origen externo, como clima, suelo u otros, no es posible utilizar, en sentido absoluto, los valores obtenidos. Estos valores podrán tener utilización práctica cuando se usen hojas del mismo tipo, de la misma ubicación en la planta, de la misma especie y cultivadas en condiciones similares en cuanto a factores externos.

Una vez determinados los contenidos de los nutrientes en el tejido adecuado, debe evaluarse la información a través de uno o varios sistemas de interpretación. En todo caso, cualquiera que sea el o los sistemas a emplear si se desea utilizar el análisis foliar como elemento de estudio para los problemas nutritivos, es necesario establecer previamente los

patrones o índices de referencia.

Las concentraciones de nutrientes en hoja, y en etapas específicas del crecimiento, se usan como índice del nivel nutricional en planta. El análisis se basa en la opinión de que la hoja es el lugar principal de la actividad metabólica, que los cambios en el suministro de iones se reflejan en la composición de nutrientes de la hoja, que estos cambios son más pronunciados en algunas etapas del crecimiento que en otras y que las concentraciones de nutrientes de la hoja en ciertas etapas del crecimiento están relacionadas con el rendimiento o desarrollo de la planta y el rendimiento de la cosecha (Bould, 1968). Trabajando en base a estos principios es posible determinar, de manera experimental, la fase óptima del desarrollo de la planta y la posición de la hoja más apropiada que refleje el nivel nutricional de la planta (Bould, 1964) y luego cuantificar las escalas o niveles nutricionales de la hoja que estén asociados a deficiencias (síntomas presentes), deficiencia sub-clínica o subcarencia (ausencia de síntomas), niveles críticos (cerca de la suficiencia) y toxicidad (ver Fig. a) (Chapman, 1966; Guzmán, 1987).



Los niveles críticos de nutrientes totales en hoja, como los definió originariamente Ulrich (1948) son "la escala de concentraciones a la cual el crecimiento de la planta es restringido en comparación con el de las plantas a un nivel superior". Más tarde, el mismo autor (Ulrich, 1952) redefinió las concentraciones críticas como "la concentración de nutriente a la cual es justo deficiente para el crecimiento máximo". Los valores críticos de nutrientes en hoja y los niveles de deficiencia establecidos por Ulrich y Hills (1967), para la remolacha azucarera fueron cuantificados. Partiendo de dicho trabajo se puede ver que la escala de concentraciones de nutrientes foliares normales de la remolacha es muy amplia. La experiencia muestra que las plantas con composición de nutrientes muy diferentes dan rendimientos similares si los nutrientes de la hoja están por encima de sus niveles críticos pero por debajo de sus niveles de toxicidad (Beckett y Davis, 1977; Davis et al., 1978). Trabajos recientes han demostrado que los niveles críticos y por lo tanto el rendimiento, difieren entre variedades, mostrando una gran diferencia de concentración entre las distintas variedades de melón (Sánchez et al., 1989) y sandía (Vargas et al., 1990 a).

Loneragan y Snowball (1969) propusieron el término "necesidades funcionales de nutriente" para indicar la concentración mínima de iones dentro de la planta que puede sustentar sus necesidades metabólicas a tasas que no limiten el crecimiento. Usando soluciones nutritivas que fluían constantemente, encontraron que la necesidad funcional media de Ca presente en las partes vegetativas de las gramíneas y de las leguminosas oscilaban desde 1 a 2 mg/g en peso seco y que las pratenses y cereales iban desde 0.5 a 1 mg/g de Ca en peso seco. Estos valores son muchos más bajos que los valores críticos del ion de lo que se dijo para el Ca (Chapman, 1966; Guzmán, 1987), diferencia que los autores atribuyen a las condiciones de suministro del Ca.

2.3.1.1.3.- Nutrientes solubles.

2.3.1.1.3.1.- Introducción.

Como se sabe, las raíces, tallos y hojas de la planta representan la suma de sus procesos de crecimiento, procesos que están influenciados por muchos factores ambientales, los cuales no podrán ser jerarquizados de acuerdo con su importancia ya que todos son esenciales. Sin embargo, puede asegurarse que ninguno es más importante que la nutrición mineral. Ello no solamente porque proporcionan la base para la organización de los elementos y la subsecuente composición y cuantía del material vegetal producido, sino porque ejerce ciertas influencias reguladoras que a menudo determinan la respuesta de la planta a ciertas agresiones fitopatológicas.

La hoja se compone de la red terminal de los tejidos conductores y un parénquima asimilador formado por células mesofílicas. Como la planta tiende a mantener constante la composición mineral de los tejidos asimiladores, con el análisis de éstos tejidos no se puede realizar un diagnóstico precoz o corregir, por ejemplo el abonado en un momento dado del ciclo vegetativo y no se pueden estudiar los fenómenos que pueden producirse a lo largo de este ciclo ni tampoco la respuesta de las plantas a la variación de los diversos factores del medio (Carpena et al., 1976). Contrariamente, los tejidos conductores se componen de células esqueléticas que han perdido el citoplasma, las vacuolas y hasta el núcleo y así, su composición propia no afecta a la composición de la savia.

La savia y vacuola reflejan fielmente las condiciones metabólicas que existen en el momento de la toma de muestras y de hecho presentan variaciones importantes de composición química. Esta variabilidad no será un obstáculo si se separa la parte relativa a la absorción, de la parte relativa a la organización. La composición química del material utilizado es sensible, a la intervención de cualquier factor externo (intensidad y duración de la luz, temperatura, régimen de agua, etc.) y

permite descubrir la manifestación de un fenómeno nutricional o un cambio en el medio, medir su intensidad y seguir su evolución y el diagnóstico será posible en cualquier momento del ciclo vegetativo.

Es evidente que un elemento absorbido en cantidad equivalente a las necesidades de la planta puede no estar presente en savia más que en forma de trazas, mientras otro que entra en la planta con un ritmo superior a su utilización, se acumulará en la vacuola. Esto hace difícil el estudio de las deficiencias en la alimentación y pone en evidencia la deficiencia o exceso de cualquier elemento. La diferencia de composición química entre ellos, se debe también a las distintas condiciones de paso de los iones minerales a través de las paredes celulares (Marigo et al., 1986).

2.3.1.1.3.2.- Material seco.

El estudio de los solubles es antiguo (Oserkowky, 1932 y 1933; Stuart, 1935) pero dicha línea de interpretación se ha continuado hasta nuestros días (Molina, 1982; Guzmán et al., 1986; Sánchez et al., 1989; Urrestarazu y Romero, 1989; Valenzuela et al., 1989 c). El empleo de material seco posibilita el estudio de los nutrientes que están como reserva o en vías de integración (transporte). Ello permite poder definir la potencialidad nutritiva del vegetal en estudio y también es posible identificar en que forma química se encuentra, así como en que estructura orgánica está formando parte.

El método de Oserkowky (1932 y 1933) permite obtener el Fe "activo" presente en el material vegetal y está basado en la disolución con HCl del Fe más lábil. Este método ha sido utilizado por diversos autores (Torrecillas, 1972; Carpena et al., 1976) y con ciertas variaciones por Takkar y Kaur (1984). Estos últimos determinan el Fe^{2+} en el extracto ácido, mediante el método de la O-fenantrolina, considerando más importante el ion ferroso y no el férrico.

Stuat (1935) extrae el N soluble del material vegetal por medio de una solución de citrato (0.05M, ph 5.0) durante 24 horas y el valor del N es determinado por medio de un microkjieldahl. El método ha sido modificado por Holland et al. (1967). Recientemente (Carpena-Ruiz et al., 1986) emplean un procedimiento que diferencia cada una de las formas del N no integrado en la estructura del vegetal.

Smith en 1962 decía que "fracciones solubles en extractos se usan a veces sin que se haya demostrado la existencia de alguna ventaja en especial". Desde aquella época parece haberse demostrado cierta ventaja con el SO_4^- y con el NO_3^- en ciertos casos. Varios investigadores creen que los métodos analíticos usados con fracciones solubles son más fáciles de usar, principalmente porque evitan que el material vegetal se convierta en cenizas.

Muy frecuentemente el contenido en materia seca de un nutriente total, es lo que se determina en el análisis de plantas (por ejemplo: digestión con un ácido o cenizas). La determinación de sólo una fracción del contenido, por ejemplo, que es soluble en agua o ácidos diluidos o agentes quelantes, a veces suministra una mejor indicación del estado nutricional de la planta. Esto ha sido demostrado para el Zn, donde la fracción soluble en agua refleja el nivel nutritivo mejor que la actividad del Zn total o la de la anhidrasa carbónica (Rahimi y Schorpp, 1984).

Por diversas razones (Machold, 1967; Cumbus et al., 1977; Dekock et al., 1979) el contenido de Fe total no es un indicador fiable del estado nutritivo de Fe. Por lo tanto los datos sobre niveles críticos de deficiencia o sobre los niveles adecuados se dan, si es que se dan, sólo con reserva (Chapman, 1966; Romero, 1986; Guzmán et al., 1986). Ello se debe a que el contenido en Fe, en las hojas cloróticas puede que sea análogo o incluso superior al que hay en las hojas verdes. Esta discrepancia está relacionada, en parte con la forma del Fe en las

hojas. El Fe ferroso (Fe^{2+}) es la forma fisiológicamente disponible y la que sufre oxidación-reducción reversible $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (Macchold et al., 1968). La determinación del Fe^{2+} en extractos de hojas o la extracción con ácidos diluidos para la caracterización del Fe^{2+} (Oserkowky, 1932 y 1933; Torrecillas, 1972; Carpena et al., 1976; Mengel et al., 1984; Miyazawa et al., 1984; Takkar y Kaur, 1984; Mehrotra et al., 1985; Guzmán et al., 1986 a; Vargas et al., 1988) mejora considerablemente la correlación entre el contenido de clorofila y el Fe (Dekock et al., 1979; Mengel y Bubl, 1983). Parece que también es un indicador apropiado para la caracterización del nivel crítico de la producción (Katyayal y Sharma, 1984). Análogo proceso se ha realizado con el Se, obteniéndose resultados alentadores (Gissel-Nielsen, 1987), y Razaque y Yatazawa (1982) con el Mn.

Nicholas (1956), Hunt (1982), Molina (1982) y Miyazawa et al. (1984) compararon diversas fracciones solubles, de cierto número de nutrientes, con el total y en general encontraron que estaba estrechamente correlacionados excepto en el nivel denominado consumo de lujo.

En especies o tejidos con capacidad de acumular el N en forma de NO_3^- , el contenido de dicha forma es frecuentemente un indicador óptimo del estado nutritivo de N de lo que es el N total (Ulrich, 1942; Hylton et al., 1965 a). La concentración de NO_3^- en la base del tallo de trigo, medida de manera semicuantitativa (Beringer y Hess, 1979) o cuantitativa (Papastylilianou et al., 1982), así como la cantidad de NO_3^- en los peciolos de las hojas plenamente expandidas de la remolacha azucarera (Ulrich, 1942; Gilbert et al., 1983), el algodón (Tabor et al., 1984), centeno (Hylton et al., 1965 a), girasol (Homenaouth et al., 1986), kiwi (Prasad et al., 1987) es un indicador fiable del estado nutritivo del N. Durante algunos años este test rápido se ha usado con éxito como base para recomendaciones del nivel de fertilizante nitrogenado que se debería aplicar durante la estación de crecimiento (Wollring y Werhman, 1981; Werhman et al., 1982). En principio este método es apropiado para todas las especies anuales (Gilbert et al., 1983), en las que el NO_3^- es la

forma principal absorbida radicularmente y desplazada a los brotes. En las especies que preferentemente reducen el NO_3^- radicularmente (por ejemplo, miembros de las rosáceas), o cuando el N se aplica y absorbe en forma de NH_4^+ , el test rápido de ciertos aminoácidos o amidas puede que sea una alternativa al de los NO_3^- .

Las formas solubles del N presente en las hojas u otros órganos, frecuentemente muestran mayores diferencias asociadas al estado nutritivo de dicho ion de lo que lo hace el N total, como sucede con Pseudotsuga menziesii o melocotón (Taylor y May, 1967; van den Driessche y Webber, 1975). Por ejemplo, los compuestos de guanidina mostraron una diferencia de hasta 19 veces entre los tratamientos en comparación con el 40% para el N total. Sin embargo, debido a que la variación analítica y probablemente a la variación de un árbol a otro es mayor para estos compuestos en comparación con el N total, ya no son sensibles para detectar diferencias entre los niveles de N. Además, los compuestos solubles de N son también más sensibles a cambios en la temperatura y humedad que el N total, pudiendo limitar su uso como instrumento de diagnóstico.

En las plantas de Tsuga heterophylla crecidas de forma natural, se ha visto que la clorofila a y la total están estrechamente correlacionadas con el N total ($r=0.91$ y 0.94 respectivamente) y las tres medidas estaban correlacionadas con el llamado índice del lugar ($r=0.84$, 0.79 y 0.91 respectivamente) o con el crecimiento final o máximo (Radwan y De Bell, 1980). De manera similar la forma insoluble en alcohol de N y Fe total estaban positivamente correlacionadas con el índice del lugar ($r=0.72$ y 0.79 respectivamente), pero las fracciones de N soluble y la mayor parte de otros nutrientes no lo estaban. Esto sugiere que la clorofila puede ser útil como simple medida del estado de N total. Sin embargo las formas de N solubles en alcohol no prometen ser especialmente prometedoras.

Hylton et al. (1968) demostraron que el $\text{SO}_4^{=}$ era superior para diagnosticar que el S orgánico o el total en tallos de centeno. El empleo de $\text{SO}_4^{=}$ impide que las curvas de respuesta se alteren como sucede con el S total o con el orgánico y por ello se prefirió la metodología analítica del $\text{SO}_4^{=}$. Para calcular el estado nutritivo del S en planta, el contenido de $\text{SO}_4^{=}$, principal forma de almacenamiento del nutriente, es un indicador mejor que el solo contenido de S total (Ulrich y Hylton, 1968; Spencer et al., 1977; Freney et al., 1978) y en arroz (Islan y Ponnampertuma, 1982) parece ser la proporción de $\text{SO}_4^{=}$ respecto al S total. En plantas plurianuales la determinación de los niveles de $\text{SO}_4^{=}$ se reconoce como medida útil del estado de S total y también en Pinus radiata y Pseudotsuga menziesii (Turner, 1979). Se ha demostrado que los niveles de $\text{SO}_4^{=}$ pueden ser un importante método de determinar si una respuesta al N es posible y si se requiere un nivel que exceda de las 400 ppm para asegurar una buena respuesta de crecimiento a la aplicación de una fertilización nitrogenada, suponiendo que otros nutrientes no sean limitantes. Este estudio es también ejemplo de la necesidad de medir más de un nutriente para poder determinar el estado nutricional del árbol. En las plantas herbáceas la cantidad de $\text{SO}_4^{=}$ como porcentaje del S total, es una medida prometedora del nivel de S ya que parece estar menos influido por la edad de la planta que las concentraciones de $\text{SO}_4^{=}$ (Spencer et al., 1978). Es también interesante el que la razón N/S no ha demostrado ser una guía útil para el S total ni en las herbáceas ni en las plantas plurianuales (Spencer et al., 1978).

Lorenz et al. (1964) compararon los nutrientes totales con los extraídos con ácido acético al 2% en plantas de Solanum tuberosum, encontraron que estaban muy altamente correlacionados con respecto al N, K y Mg, pero menos con respecto al P y Ca solubles.

El P se encuentra en las plantas en forma de radical fosfato, bien como fosfato inorgánico, bien combinado con numerosos compuestos orgánicos, formando fosfolípidos, fitinas, azúcares fosforilados, ácidos nucleicos ARN y ADN y nucleótidos libres.

El empleo del P en forma de PO_3^{3-} soluble en acético es preferido al P total por algunos investigadores (Ulrich y Berry, 1961; Hylton et al., 1965 b). Con un incremento en el suministro de P desde un nivel bajo a uno óptimo, todas las fracciones de este ion en hoja aumentan (Kakie, 1969) e incluso dichas fracciones distorsionan sus proporciones cuando la planta ha sido sometida a una fertilización nitrogenada (Valenzuela, 1987).

En 1959 gracias al trabajo de Ergler y Guinn se identifican numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos que tenían al P como ion acompañante, pero el trabajo fue realizado con semillas de algodón y los cambios morfológicos y metabólicos que se realizan durante la germinación no permiten extrapolar los conocimientos a plantas enteras. Samotus y Schwimmer (1962 a) realizan un estudio sobre la forma en que el P se almacena en tubérculos de patata, llegando a la conclusión de está en forma de fitatos, que son sales del ácido fítico (Samotus y Schwimmer, 1962 b), llegando a ser dicha forma el 15-30% del P total (Quick y Li, 1976).

En el siguiente paso se intenta en plantas enteras, para ello se utiliza Cuscuta reflexa y logrando identificar dos clases de P: ácido soluble y ácido insoluble inorgánico (Tewary y Singh, 1964). Más tarde Barker y Manson (1964) extraen el denominado P inorgánico y el orgánico, ambas formas se obtienen en hojas de fresas, llegando a la conclusión de que la actividad de síntesis de ciertos azúcares, y por lo tanto su metabolismo, es más fácilmente seguido y cuantificado gracias a dichas formas que teniendo en cuenta el P total. Bielecki (1968) identifica las numerosas formas y compuestos de P en Spirodela oligorrhiza, facilitando con ello el trabajo de posteriores estudios, y así tenemos, que plantas con un adecuado suministro de P, el 85-95% de P inorgánico se encuentra localizado en las vacuolas (Bielecki y Ferguson, 1983). El estudio de las diferentes formas del P en hojas de plantas plurianuales con fines de diagnóstico es tardío, siendo Carpena et al., (1973 a) los iniciadores de dicho método de trabajo aplicado a frutales. Hellín et al., (1975)

determinan el P inorgánico en Citrus. Por otra parte, el estudio de las formas del P se ha realizado, casi siempre en estudios de fertilización con dicho ion, pero rara vez en relación con la deficiencia férrica y en hojas de cítricos (Hellín y Raya, 1975; Hellín et al., 1980). De ambos trabajos se deduce que hay una acumulación gradual del P inorgánico, debido quizás a una mayor demanda de esta forma en los órganos de desarrollo, y a una menor síntesis de azúcares fosforilados y nucleótidos, todo ello en hojas con claros síntomas de clorosis férrica. Hellín y Alcaraz (1980) aplican una técnica análoga, pero el nutriente distorsionador de las plantas de limonero Verna es el Mn, obteniendo una disminución en hoja de las formas fosforadas como la soluble en ácido, inorgánica y el P total, cuando aumenta la clorosis debida a la deficiencia del ion limitante, y las restantes formas fosforadas varían su concentración foliar a lo largo del ciclo.

La importancia de determinar solamente una fracción definida de Ca se encuentra en el trabajo de Brumagen y Hiatt (1966). Las diferencias en la susceptibilidad de las variedades de tabaco respecto a la deficiencia de Ca no estaba relacionada con el Ca total, sino con la fracción soluble presente en las yemas. Estas diferencias eran debidas a la tasa de síntesis del ácido oxálico y por lo tanto a la precipitación de oxalato cálcico apenas soluble. De acuerdo con ello el nivel crítico de la deficiencia de Ca total es mayor en la variedad B 21 que en la Ky 10. Proceso análogo sucede en algunas variedades de sandía, donde el Ca inorgánico era la forma mayoritaria en todas, menos en el caso de la variedad Panonia que resultó ser la fracción soluble (Vargas, 1987), mientras que en foliolos de tomate la forma soluble y orgánica tenían igual concentración, y en pepino la forma predominante fue la inorgánica (Valenzuela, 1987). Trabajos de análogas características realizados en plantas plurianuales son escasos y se pueden destacar el realizado por Carpena et al. (1972) donde relacionan las fracciones de Ca en plantas de limonero cuando éste crece en condiciones deficientes de Fe, llegando a la conclusión de que la carencia de dicho ion induce a una caída de la concentración de Ca en forma de oxalato y

aumentando las formas solubles e insolubles orgánicas al aumentar la concentración foliar de Fe. En un trabajo posterior (Carpena et al., 1973 b) identifican la importancia de las fracciones de Ca en órganos como: botón, capullo, flor, cáliz, corola, androceo y gineceo, teniendo todos ellos una concentración predominante el denominado Ca ligado a estructuras orgánicas, y en muy baja concentración los denominados Ca soluble y Ca insoluble orgánico. La proporción de las distintas formas de Ca en hojas de árboles fue realizado por Carpena et al. (1977 y 1978) llegando a la conclusión de que el predominio de la forma denominada Ca insoluble orgánico es indiscutible, independientemente de referirse al peso o a la superficie foliar y siendo la fracción Ca insoluble inorgánica la de menor presencia. La incidencia de los fitosanitarios sobre algunas fracciones de Ca fue estudiada por Sánchez (1985) en dos clases de Prunus avium y P.domestica.

El estudio de las fracciones de Mg es mucho más reciente, pues Todd lo inició en 1961 y lo continuó hasta 1962, reiniciándose en 1973 gracias al trabajo de McIntosh et al. y continuando en nuestros días por medio de Shockey y Reid (1984). Todos los autores anteriores identifican tres formas de Mg ligadas a diferentes componentes de los vegetales estudiados y cada una de ellas era extraída con un diferente extractante: el Mg clorofílico se obtenía en la primera extracción con acetona, una segunda extracción con agua les permitía obtener el Mg que estaba en las células y savia, la última fracción es la denominada insoluble en agua-acetona y el Mg obtenido es el que forma parte de las fibras vegetales. Todos los autores coinciden en que el Mg aplicado incide sobre las distintas fracciones y que el desarrollo vegetativo produce alteraciones en alguna de las fracciones del nutriente. Se ha de resaltar que los trabajos se han realizado sobre plantas forrajeras debido a la importancia del Mg sobre el metabolismo de los poligástricos.

Por lo tanto, la determinación de sólo la fracción soluble, o una de ellas, sería un método más apropiado para calcular el estado nutricional del nutriente en la planta. Es decir, la investigación en el análisis de fracciones de iones, más bien que los totales, ha demostrado por consiguiente orientacio-

nes prometedoras para predecir si las respuestas a la fertilización son posibles y en qué grado. Por ello, quizás una investigación más a fondo de estas cuestiones mejore la efectividad del análisis foliar como instrumento de diagnóstico.

2.3.1.1.3.3.- Material fresco.

El análisis de los nutrientes solubles en material vegetal, a veces fresco, denominado "test de tejidos", se basa en el cálculo de los nutrientes solubles extraídos de las hojas, tallos, peciolo, etc... (Nicholas, 1957). Cuando a los vegetales se les suministra ampliamente iones, una proporción de éstos no está totalmente integrada en el tejido y suele estar en forma soluble. Por ejemplo; muchas plantas acumulan NO_3^- en el tejido conductor y asimilador (Ulrich y Fong, 1973) si el suministro de dicha forma nitrogenada excede a la capacidad de la planta para reducir NO_3^- (Schrader et al., 1968), si el Mo es el factor limitante (Notley y Wilson, 1960), o en plantas con deficiencias de Ca, Fe, Mn u otros nutrientes. De manera similar se acumula el P-inorgánico si el aporte de P excede a la demanda (Bradfield, 1969). Por el contrario, si el suministro de nutrientes es restringido la concentración de iones solubles en el tejido conductor decaerá (Bollars, 1943 y 1953 a, b). Estos cambios pueden ser controlados mediante el análisis de los tejidos o de la savia, y las concentraciones pueden ser comparadas con los valores normales u óptimos establecidos para la parte apropiada de la planta y su correspondiente etapa de crecimiento. Un resumen magnífico sobre el tema fue realizado por Krantz et al. (1948).

Muchos disolventes se han usado y se usan, en el análisis del tejido vegetal para extraer los nutrientes solubles. Los extractantes empleados pueden ser: agua, ácidos minerales u orgánicos diluidos, compuestos reguladores o tampones como es el caso del "reactivo Morgan" (Nicholas, 1948 y 1957). Estos análisis, o test rápidos de tejidos, se llevan a cabo sobre extractos de pequeñas porciones de tejido conductor recolectadas de numerosas hojas. El procedimiento es: aproximadamente 4 g de tejido finamente cortado se introduce en un bote con 40 ml. de "reacti-

vo de Morgan" durante 15 minutos, pasado dicho tiempo se filtra. Si aparece coloración se debe de eliminar mediante la adición de 0.2 gramos de carbón activo, agitación y posterior filtración. Sobre el extracto depurado se realizan las determinaciones analíticas correspondientes y los resultados se comparan con los valores previamente establecidos para cada cultivo, a diferentes etapas de crecimiento y asociado a síntomas visuales de deficiencia o toxicidad (Nicholas, 1948).

Nicholas (1957) 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 determinar 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 et al. (1972) emplearon los test de tejidos para identificar el nivel de NO_3^- , P, K, Mg y Mn 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 manera se establecieron las concentraciones críticas de nutrientes presentes en el tejido conductor con respecto al NO_3^- , P, K y Mn, no siendo posible el otro nutriente. Este método de campo demostró que era factible buenos resultados de utilidad práctica para el K en ambas cosechas.

Scaifer en 1978 demostró que el método anterior era útil para mediciones rápidas de NO_3^- , K y Ca presentes en el tejido conductor, bien en el peciolo o en la base del tallo. El procedimiento puede realizarse en unos pocos minutos y en casi todas las especies vegetales.

2.3.1.2.- Análisis del peciolo.

En la elección de un órgano para el análisis pueden usarse distintos criterios (Emmert, 1959), pero generalmente los más importantes son la sensibilidad de la respuesta y la estabilidad hacia los factores que no sean el abastecimiento de un nutriente en particular que se esté tratando. Un cambio en el abastecimiento de los nutrientes puede afectar marcadamente la morfología de la planta, y por lo tanto, alterar la proporción de la materia seca distribuida en los diferentes órganos. Es importante que ésto no deteriore la correlación entre el contenido de nutrientes y el crecimiento o producción (Gooddall y Gregory, 1947).

Aunque generalmente se coja toda la hoja, la concentración en la materia seca del peciolo puede ser ocasionalmente muy diferente a la del limbo, por lo que la inclusión de los peciolos de diferente longitud puede dar resultados diferentes (Bould, 1961). Ocasionalmente, el peciolo dará una indicación mejor del estado de nutrientes que el limbo. Esto, sin embargo, puede ser cierto para unos elementos y no para otros. Así, por ejemplo, los peciolos dan un índice mejor del estado del K que el limbo foliar (Shaulis, 1961). Esto, se encontró también para el estado del K en las moras, mientras que el N se comportaba de forma inversa (Bould, 1964 a). En la remolacha, los peciolos dan la mejor indicación del estado del N mientras que el limbo foliar es preferible para el estado del S (Ulrich, 1961).

2.3.1.3.- Análisis del fruto.

Las alteraciones producidas por la deficiencia de B y/o Ca en las semillas de los frutos, están confirmadas satisfactoriamente por el análisis de los frutos afectados. El moteado de la manzana, trastorno típico de la carencia de Ca, se caracteriza por depresiones en la piel asociadas a áreas necróticas de la subcapa en la piel de la manzana (Van Goor, 1971; Bünemann, 1972; y Van der Boon, 1972; Perring y Jackson, 1975; Wills et al., 1976). En algunas variedades de manzana las áreas necróticas pueden hallarse situadas a gran profundidad (Askew, 1935; Chiu y Bould, 1977) y entonces los síntomas se podrían confundir con una suberificación interna, trastorno producido por una deficiencia en B. Se usa el análisis del fruto o de la piel solamente para diferenciar entre estos dos trastornos nutricionales.

Cuando la concentración de Ca en fruto era inferior a 3 mg por 100 g de peso fresco la senescencia del fruto se interrumpía y el fruto se desprendía del árbol sin haber madurado (Perring, 1968). El moteado de la manzana, en manzanas maduras, se presenta cuando los frutos contienen menos de 5 mg de Ca en 100 g de peso fresco (Perring y Jackson, 1975), aunque el umbral o límite varía con el tamaño del fruto y con las concentraciones del Ca y Mg. La distribución del Ca en la manzana es desigual siendo máxima cerca de la piel y del peciolo, mínima en la pulpa y en el cáliz (Faust et al., 1967). Aunque muchos investigadores usan porciones del fruto para el análisis, se ha demostrado que la composición química de la piel de la manzana está más estrechamente relacionada con la incidencia de la formación de las manchas de lo que está la composición del corazón y la pulpa (Drake et al., 1966; Chiu y Bould, 1977). Estos autores encontraron una relación lineal altamente significativa entre el Ca existente en la piel (cv. Baldwin) y la incidencia del moteado tras cinco meses de almacenamiento. Muestras con un valor medio de Ca en piel que sería el 0.07% en materia seca (700 µg/g de Ca peso seco) mostraron poco o pequeña superficie (12%) afectados por el moteado mientras que más del 50% de los frutos tenían di-

2.3.1.4.- Análisis de la corteza.

En ausencia de hojas, el análisis de la corteza puede usarse para diagnosticar ciertos trastornos iónicos, como por ejemplo la necrosis interna de la corteza en el manzano (Berg et al., 1958) en comparación con el virus cuyo efecto es un grieteo en forma de estrella, asociado al exceso de Mn (Berg y Clulo, 1946), la existencia de granos internos en los brotes del manzano y peral, debido a la deficiencia de Cu (Bould et al., 1953 b), la aparición de la cisticercosis y granos en los vástagos jóvenes del manzano, causado por una deficiencia en B (Rogers et al., 1965), o la aparición de dichas protuberancias granuladas en los vástagos de albaricoque y ciruelo debidas a toxicidad de B (Eaton, 1935; Eaton et al., 1941), o para determinar el nivel de P en Hevea brasiliensis (Marel, 1957), o en el suelo donde crecen dichos árboles (Bolle-Jones, 1957).

Shelton y Zeiger (1970) encontraron que el Mn se acumulaba en zonas específicas de la corteza de los brotes del manzano, y ello sucedía antes de la aparición de necrosis interna en la corteza y que los valores medios de Mn en corteza no siempre reflejaban la gravedad de los síntomas. El trabajo de Nagai et al. (1965) realizado con manzano demuestra que cuando la concentración de Mn es 1570 $\mu\text{g/g}$ en peso seco de corteza, aparecen unas pústulas en la corteza y ésta se necrosa; mientras que cuando la concentración es de 345 $\mu\text{g/g}$ en peso seco solamente aparecen las pústulas (Bould y Bradfield, 1955). Ello nos demuestra que las variedades de manzano varían notablemente en su susceptibilidad al exceso de dicho nutriente.

La deficiencia de Zn suele estar marcada porque las hojas son de menor tamaño y se agrupan en forma de roseta, ello sucede cuando la concentración de Zn en corteza es inferior a 10 $\mu\text{g/g}$ en peso seco (Bould et al., 1953 a).

Domoto y Thompson (1976) encontraron que las altas concentraciones de K y bajas en Ca, estimulaban la necrosis interna de la corteza en el manzano.

2.3.1.4.- Análisis de la corteza.

En ausencia de hojas, el análisis de la corteza puede usarse para diagnosticar ciertos trastornos iónicos, como por ejemplo la necrosis interna de la corteza en el manzano (Berg et al., 1958) en comparación con el virus cuyo efecto es un grieteo en forma de estrella, asociado al exceso de Mn (Berg y Clulo, 1946), la existencia de granos internos en los brotes del manzano y peral, debido a la deficiencia de Cu (Bould et al., 1953 b), la aparición de la cisticercosis y granos en los vástagos jóvenes del manzano, causado por una deficiencia en B (Rogers et al., 1965), o la aparición de dichas protuberancias granuladas en los vástagos de albaricoque y ciruelo debidas a toxicidad de B (Eaton, 1935; Eaton et al., 1941), o para determinar el nivel de P en Hevea brasiliensis (Marel, 1957), o en el suelo donde crecen dichos árboles (Bolle-Jones, 1957).

Shelton y Zeiger (1970) encontraron que el Mn se acumulaba en zonas específicas de la corteza de los brotes del manzano, y ello sucedía antes de la aparición de necrosis interna en la corteza y que los valores medios de Mn en corteza no siempre reflejaban la gravedad de los síntomas. El trabajo de Nagai et al. (1965) realizado con manzano demuestra que cuando la concentración de Mn es 1570 µg/g en peso seco de corteza, aparecen unas pústulas en la corteza y ésta se necrosa; mientras que cuando la concentración es de 345 µg/g en peso seco solamente aparecen las pústulas (Bould y Bradfield, 1955). Ello nos demuestra que las variedades de manzano varían notablemente en su susceptibilidad al exceso de dicho nutriente.

La deficiencia de Zn suele estar marcada porque las hojas son de menor tamaño y se agrupan en forma de roseta, ello sucede cuando la concentración de Zn en corteza es inferior a 10 µg/g en peso seco (Bould et al., 1953 a).

Domoto y Thompson (1976) encontraron que las altas concentraciones de K y bajas en Ca, estimulaban la necrosis interna de la corteza en el manzano.

2.3.2.- Muestreo y preparación del órgano analizado.

Kenworthy (1964) y Chapman (1966) han descrito algunos procedimientos de toma de muestras para muchas cosechas. Los órganos y/o tejidos a usar, como índice del nivel nutricional, deberán seleccionarse sobre la base de su edad fisiológica y movilidad de los nutrientes, más que sobre los cambios estacionales anuales (Guzmán, 1987). Para la mayor parte de las cosechas, y para muchos nutrientes, se usan hojas fisiológicamente maduras (Sánchez, 1987; Valenzuela, 1987; Vargas, 1987), siendo las excepciones el uso de hojas jóvenes para determinar el nivel de Ca, Cu y S (Loneragan, 1968; Loneragan et al., 1976 y 1980). Estos nutrientes son relativamente inmóviles una vez metabolizados y no se mueven desde hojas viejas a las jóvenes bajo condiciones de alteraciones iónicas (Guzmán, 1987). De 25 a 100 o más, unidades (hojas y/o peciolo) por muestra es recomendable recolectar para la determinación de nutrientes, dicho número varía con la superficie a muestrear, con objeto de reducir al mínimo los posibles errores que puedan surgir al tomar las muestras (Holland et al., 1967; Guzmán, 1987). Detalles más completos de lo anteriormente expuesto se dan en la Tabla A.

Tabla A.- Órgano analizado y estadio fenológico para distintos nutrientes y especies según diversos autores.

| ESPECIE | NUTRIENTE | ESTADIO | TEJIDO | REFERENCIA |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| <u>Beta vulgaris</u> | P | Mitad del ciclo biológico | Peciolo | Hills y Ulrich 1978 |
| <u>Capsicum annum</u> | K | Inicio de la fructificación | Peciolo | Lorenz y Tyler 1978 |
| | P | | | |
| <u>Chrysanthemum morifolium</u> | N | Madurez | Hojas | Lunt y Kofranek 1964 |
| | P | | | |
| <u>Citrullus lanatus</u> | K | Fructificación temprana | Peciolo de la 6ª hoja | Lorenz y Tyler 1978 |
| <u>Cucumis melo</u> | NO ₃ ⁻ | Primer fruto maduro | Peciolo de la 6ª hoja | Lorenz y Tyler 1978 |
| <u>Dianthus cariophyllus</u> | B | Mitad del ciclo biológico | 4ª 6 5ª par de hojas desde la base | Oertli 1964 |
| <u>Gossypium hirsutum</u> | Fe | Plantas de dos meses de edad | Limbo foliar | Vretta-Kouskoleha y Kallinis 1968 |
| <u>Junglans nigra</u> | Fe | Madurez | Hojas | Hacskaylo et al. 1969 |
| <u>Lycopersicon esculentum</u> | P | Floración temprana | Peciolo de la 4ª hoja | Lorenz y Tyler 1978 |
| <u>Nicotiana tabacum</u> | Fe | Madurez | Hojas | Oertli y Jacobson 1960 |
| <u>Persea americana</u> | Fe | Madurez | Hojas | Bingham y Beutel 1957 |
| <u>Pisum sativum</u> | Fe | Madurez | Hojas | Oertli y Jacobson 1960 |
| <u>Solanum tuberosum</u> | NO ₃ ⁻ | Inicio del ciclo biológico | Peciolo de la 4ª hoja | Lorenz y Tyler 1978 |
| | P | | | |
| <u>Zea mays</u> | Fe | Madurez | Hojas de la porción media | Jacobson 1945 |

Las muestras normalmente no deberían tomarse de plantas dañadas por enfermedades, plagas o lesiones químicas, a menos que tal daño sea el objeto de estudio. Para el diagnóstico de los trastornos iónicos se requieren dos muestras, a menos que se disponga de los valores normales y deficientes o tóxicos de los nutrientes (Johnson, 1973; Leece, 1976; Guzmán, 1987; Sánchez, 1987; Vargas, 1987), consistiendo, una en hojas que muestren síntomas típicos de trastorno y la otra, para hacer la comparación, de hojas normales de la misma edad fisiológica y variedad tomada de una zona adyacente o diferente.

Si las muestras se contaminan por una aplicación foliar de los nutrientes, o polvo, y se requieren para el análisis de los iones, se debería usar en primer lugar un procedimiento de limpieza (Arkley et al., 1960). Una vez cogidas las muestras, antes de secarse, deberían primeramente enjuagarse rápidamente en una solución ligeramente ácida (Mason, 1952) o diluida de detergente (Lachica, 1967), y a continuación efectuar dos o más enjuagues rápidos en agua destilada. A veces se usan líquidos de lavar acidificados en el caso de que haya que someter a ensayo el Fe (Nicholas et al., 1957). La contaminación del suelo puede ser determinada mediante el contenido de Ti de la muestra (Mitchell, 1960).

Tras eliminar el exceso de agua de la superficie del órgano, con papel de filtro, las muestras se deberían secar a 65-80 °C en estufa con corriente de aire forzado (Steyn, 1959), molerlas en un molino de acero inoxidable o mortero de ágata y volverlas a secar a 80-90 °C durante seis horas antes del análisis (Lachica, 1967). Las muestras preparadas de esta manera pueden almacenarse al menos dos años sin cambios significativos en la composición iónica (Bradfield y Bould, 1963; Sánchez, 1977).

2.3.3.- Factores que afectan a la concentración de nutrientes en el órgano analizado.

2.3.3.1.- Generalidades.

Las concentraciones de nutrientes en la hoja resultan influidas por el medio ambiente (Anonimus, 1954), el suministro de iones (Hewitt, 1966), la edad y posición de la hoja (Guzmán, 1983), así como el tamaño del fruto (Sánchez, 1987; Vargas, 1987). El N foliar y las concentraciones de P y K, generalmente disminuyen, mientras que las concentraciones de Ca, y hasta cierto punto las de Mg, aumentan con la edad de la hoja (Guzmán, 1987). Los efectos posicionales y de edad sobre el porcentaje de N y Ca en las hojas de Ribes nigrum fueron estudiados por Bould (1955) más intensamente. Los factores estacionales y de otro tipo que afectan a la concentración de nutrientes foliares deberían tenerse en cuenta en el momento de interpretar los datos del análisis foliar para objetivos de diagnóstico (Bould, 1966; Bates, 1971).

2.3.3.2.- Edad del órgano.

Smith (1962) afirma que "junto al suministro de elementos, la edad fisiológica del tejido es probablemente el factor más importante que afecta a la composición mineral de una especie dada". Parece haber un acuerdo general con esta afirmación. El efecto de la edad del tejido sobre la concentración de nutriente puede estar notablemente afectado por cambios en el suministro de nutriente, como por ejemplo por el abonado nitrogenado y su influencia en el ápice terminal (Ulrich y Hills, 1967). Smith (1962) afirma que la tendencia "no es alterada fundamentalmente por el suelo, el clima o los factores de cultivo, pero puede ser alterada por el nivel de suministro". El clima y los factores de cultivo pueden obviamente cambiar el modelo si afectan al suministro de nutriente.

El modelo de contenido de nutriente, en función de la edad varía según la especie (Guha y Mitchell, 1966) y según el nutriente (Mason y Whitfield, 1960; Howlett, 1961; Hanway, 1962; Gorsline et al., 1965). Cualquier programa de análisis de plantas tiene que tener en cuenta los grandes cambios que se producen en el contenido de nutriente en función de la edad y tiene que ser útil para predecir la necesidad de nutrientes. Por consiguiente es importante que la edad fisiológica del tejido sea la misma en cada planta, campo o parcela de la que se haya tomado la muestra, independientemente del grado de deficiencia. Si se tuvieran que analizar plantas enteras de maíz deficientes en P y las que tuvieran el P adecuado, ambas sembradas al mismo tiempo, la edad fisiológica media del tejido en las dos podría ser muy diferente. Como la frecuencia del P afecta a la tasa de crecimiento y al desarrollo de la planta, la planta deficiente podría tener tres hojas, mientras que la planta no deficiente tenga cinco. Las hojas más viejas de las plantas de cinco hojas serían fisiológicamente más viejas que las hojas más viejas de las plantas de tres hojas, dando como resultado una edad media diferente para las plantas deficientes y no deficientes. Gorsline et al. (1965) demostraron que la concentración de P en una planta de maíz disminuye con la edad. Así pues, aunque sería de esperar que la planta deficiente fuera inferior en P a causa de la deficiencia, esto se compensaría por su menor edad fisiológica. Este cambio en la concentración de un nutriente en función de la edad es, probablemente, debido tanto al contenido de nutriente cambiante de un tejido dado con la edad, las hojas por ejemplo, como el cambio de las proporciones de ciertos tejidos en función de la edad, como por ejemplo un incremento en la proporción del tallo y una disminución en la proporción de tejido de la hoja.

Loneragan y Snowball (1969) destacan que la edad fisiológica es particularmente importante para el Ca y otros nutrientes que no son fácilmente desplazados en el floema. Cuando se suministra a niveles mayores de los necesarios, el Ca se acumula en el tejido. Si entonces se reduce el suministro de Ca el nuevo tejido puede ser deficiente y quedar reducido el creci-

miento mientras que en el tejido más viejo sea aún alta la concentración de dicho ion. A menos que el suministro de Ca a la planta haya permanecido constante durante todo el crecimiento, el análisis será, por consiguiente, significativo solamente si se usa tejido joven de una edad fisiológica común.

Una técnica de muestreo muy corriente usada por cierto número de investigadores con experiencia en el análisis de plantas es el tomar muestras de las últimas hojas plenamente expandidas. Esta es probablemente una manera tan efectiva como cualquier otra de suministrar tejido de la misma edad fisiológica tanto sobre plantas deficientes como sobre las adecuadamente fertilizadas (Loneragan y Snowball, 1969).

Un examen del cuadro adjunto muestra que muchas de las curvas de respuesta con forma de C se obtuvieron con tejidos tales como la planta completa, paja, grano, o los tallos inferiores que no se podía esperar que suministraran tejido de la

Tabla B.- Ejemplos de tejido y órgano analizado para la obtención del nivel óptimo.

| NUTRIENTE | MEDIO DE CULTIVO | ESPECIE | TEJIDO | REFERENCIA |
|-----------|------------------|--------------------------------|------------------|----------------------------|
| Cu | Suelo | <u>Avena sativa</u> | Planta entera | Steenbjerg 1945 |
| Mn | Suelo | <u>Avena sativa</u> | Planta entera | Steenbjerg 1945 |
| P | Suelo | <u>Hordeum vulgare</u> | Paja | Poulsen 1950 |
| Cu | Suelo | <u>Hordeum vulgare</u> | Paja | Steenbjerg 1951 |
| Cu | Suelo | <u>Hordeum vulgare</u> | Granos | Steenbjerg 1951 |
| Mn | Arena | <u>Lycopersicum esculentum</u> | Tallo inferior | Hewitt 1956 |
| Zn | Solución | <u>Zea mays</u> | Planta entera | Hiatt y Massey 1958 |
| Zn | Campo | <u>Zea mays</u> | Planta entera | Hiatt y Massey 1958 |
| Mg | Suelo | <u>Avena sativa</u> | Paja | Jakobsen y Steenbjerg 1964 |
| Zn | Solución | <u>Beta vulgaris</u> | Limbo foliar | Rossel y Ulrich 1964 |
| Zn | Solución | <u>Beta vulgaris</u> | Peciolos maduros | Rossel y Ulrich 1964 |
| B | Solución | <u>Betula sp</u> | Raices | Ingestad 1964 |
| S | Suelo | <u>Lolium multiflorum</u> | Hojas | Saalbach y Judel 1966 |
| S | Solución | <u>Lolium multiflorum</u> | Tallos | Ulrich 1968 |
| Zn | Solución | <u>Medicago sativa</u> | Tallos | Lo y Reisenauer 1968 |

misma edad fisiológica, tanto sobre las plantas bien abonadas como sobre las deficientes. Incluso el grano ya desarrollado de Avena sativa (Piper, 1942) puede que no sea de la misma edad fisiológica, ya que puede ser que el grano no madure plenamente sobre las plantas deficientes. Las plantas de avena deficientes, frecuentemente producen la mayor parte de las vainas vacías y por lo tanto sería de esperar que tuvieran un contenido de nutriente diferente al de las plantas bien fertilizadas con granos grandes y de contenido alto en almidón. Un cambio en el procedimiento de muestreo probablemente habría eliminado la curva en forma de C en estas situaciones. En los trabajos de Ingestad (1964), Rosell y Ulrich (1964), Saalbach y Judel (1966) y Ulrich (1968) puestos en las lista del cuadro adjunto, el tejido escogido sería de esperar que suministrara la misma edad fisiológica en cada una de las muestras. Todos estos autores pudieron evitar la curva en forma de C, bien mediante el uso de un tejido diferente, bien mediante el uso de una fracción diferente de nutriente. Así pues, parece que teniendo un razonable cuidado, especialmente al elegir el tejido, se puede evitar la curva en forma de C.

Incluso el tejido seleccionado, para suministrar información, de igual edad fisiológica pero recolectado en fechas diferentes, hay normalmente cambios en su concentración iónica al ir avanzando la estación (Proebsting y Brown, 1951; Emmert, 1959; Bradley y Fleming, 1960; Smith, 1962; Clements, 1964 a; Lorenz et al., 1964; Ulrich y Hills, 1967). Por consiguiente, las concentraciones de nutrientes en las muestras solamente pueden ser interpretadas si está definida la fase de crecimiento en el muestreo. En cualquier caso esto requerirá el muestreo de plantas deficientes y normales en momentos diferentes. Comúnmente se sugiere que para la mejor interpretación se debería tomar una serie de muestras durante una parte considerable de la estación de crecimiento.

Aunque la concentración de nutrientes en el tejido de la planta, cambia con la edad de la misma, hay duda respecto a si la concentración crítica cambia con la edad de ésta.

Clements (1964 a) y Lorenz et al. (1964) han llegado a la conclusión de que sí cambia. Lorenz et al (1964) tomaron muestra del peciolo y nervio central de la cuarta hoja procedente del ápice en crecimiento en Solanum tuberosum a intervalos de dos semanas. Mostraron la existencia de una rápida caída en las concentraciones de K , NO_3^- y PO_4^{3-} solubles en ácido acético. Sin embargo, como las concentraciones de los nutrientes en el tejido, del que se ha tomado la muestra en diferentes etapas, están todos relacionados con el mismo rendimiento final, no es posible determinar en qué momento o momentos, durante el periodo de crecimiento, eran críticas las concentraciones en las plantas.. Mostrando la existencia de un modelo similar en la concentración de nutrientes con el tiempo, Mackenzie (1967) y Ulrich y Hills (1967) muestran solamente una concentración crítica. Ulrich y Hills (1967) sugieren que el "nivel de seguridad" de la aplicación de fertilizante es aquel que evita que el nivel de nutriente en la planta caiga por debajo del nivel crítico y sea demasiado tarde en la estación como para dar tiempo a una respuesta a las cantidades adicionales del nutriente en cuestión. En teoría, los conceptos de Lorenz et al. (1964) y de Ulrich y Hills (1967) son totalmente diferentes. Los primeros autores suponen una concentración crítica cambiante de nutriente en función del tiempo en un tejido determinado. Los segundos suponen una concentración crítica constante, pero concentración cambiante, de manera que el momento en que las plantas se hacen deficientes puede variar, pero no la concentración en el tejido seleccionado en el que se presenta la deficiencia. Aunque hay pocas razones para dudar de que la concentración crítica del nutriente en un planta completa cambie con la edad. Parece ser cuestión abierta el que un tejido seleccionado por su edad fisiológica, en momentos diferentes de muestreo tiene o no una concentración crítica cambiante. Esta es una cuestión difícil de resolver y en la práctica no es de gran importancia. Lorenz et al. (1964) y Ulrich y Hills (1967), aunque difiriendo en su concepto de nivel crítico, llegan a una respuesta similar respecto a lo adecuado de una particular concentración de nutriente en el tejido de la planta.

La composición de cada órgano o tejido cambia durante su desarrollo bajo la influencia de varios factores y para el total de la planta. Cada elemento presenta normalmente un patrón característico del cambio en un tejido dado a medida que se desarrolla, madura y finalmente envejece. Los datos que han sido tabulados por Smith (1962) indican que las concentraciones de N, P y K en la materia seca disminuyen siempre con la edad, mientras que otros como el Ca y el Mg aumentan normalmente.

Pero el comportamiento de los micronutrientes depende de la especie vegetal estudiada, y así tenemos que en habas el Fe desciende con el tiempo, el Zn aumenta y el Mn permanece estable durante todo el ciclo (Sánchez et al., 1984), pero en plantas plurianuales Fe y Mn aumentan su concentración con el tiempo y el Zn permanece constante (Guzmán y Romero, 1986; Guzmán et al., 1986 b; Romero, 1986).

Estas diferencias probablemente reflejan las variaciones en la movilidad. Estos cambios de desarrollo con respecto a las hojas han sido extensamente estudiados para muchas cosechas, por ejemplo, manzana (Reuther y Boyton, 1939), melocotones (Epstein y Lilleland, 1942), naranjas (Jones y Parker, 1950; Smith y Reuther, 1950), moras (Bould, 1961), nogal (Guzmán et al., 1984) y castaño (Guzmán et al., 1986 b). Emmert (1959) concluyó después de una revisión de la literatura que unos conocimientos de ese tipo pueden ayudar a seleccionar el mejor tiempo de muestreo para un análisis de tejidos. En general, existen tres o más periodos de crecimiento distintos. En el primer periodo, cuando las hojas se están expandiendo rápidamente, los cambios en la concentración y las variaciones de un día para otro pueden ser bastante grandes. Cambios importantes pueden ocurrir también al final de la estación de crecimiento, cuando el envejecimiento está acompañado normalmente por la reorganización de los elementos móviles a los tejidos leñosos. El periodo intermedio es normalmente de estabilidad relativa y puede durar de 3 a 6 meses. La mayoría de los diagnósticos estandarizados para los árboles frutales han sido desarrollados para hojas de esta edad (Romero, 1986). En algunos casos es posible reducir la

variación debida a las diferencias en la edad de la hoja muestreando hojas de la misma edad fisiológica, por ejemplo las más jóvenes y totalmente maduras o las hojas expandidas. Esto es particularmente útil en la comparación de los tratamientos nutricionales o durante los muestreos que tienen lugar en la estación de crecimiento.

La selección del criterio está totalmente gobernada por consideraciones de variabilidad, reproducibilidad y la necesidad obvia de obtener una indicación fiable del estado de los nutrientes en la planta, cosecha o árbol. Así Mason (1958) concluyó que para las manzanas, la posición de las hojas más apropiada y el tiempo de muestreo más conveniente eran aquellos en los que las variaciones de la composición de la hoja eran las menores. Los mejores tejidos no son necesariamente los que muestran mayores diferencias en composición. Además, los tejidos óptimos y las condiciones varían entre los elementos y necesitan ser estudiados separadamente.

2.3.3.3.- Interacciones iónicas.

Las interacciones iónicas de los nutrientes, que incluyen un cambio en la concentración de un elemento en el tejido de la planta causado por otro, es bastante común. Normalmente es difícil de entender pero se ha de tener en cuenta en los diagnósticos basados en el análisis de las plantas. Un cambio en el contenido de un elemento invariable está acompañado por cambios secundarios en el contenido de otros elementos, incluso aunque no haya cambio en la disponibilidad de los nutrientes interaccionantes (Emmert, 1961; Guzmán y Romero, 1985). Las interacciones de los nutrientes pueden ser positivas o negativas (Prevot y Ollagnier, 1961).

Expresiones alternativas para el mismo fenómeno son sinergismo y antagonismo (Smith, 1962). El antagonismo puede ocurrir durante la captación de los iones, durante la translocación y la acumulación en los tejidos o en el metabolismo (Prevot

y Ollagnier, 1961). Puede también entrar a formar parte la competición entre dos o más elementos, pero también la precipitación de los nutrientes u otros fenómenos (Romero y Alvarez-Tinaut, 1984).

El antagonismo durante la captación puede ocurrir entre los cationes pero también entre los aniones. Ejemplos bien conocidos de antagonismo entre los cationes son aquellos entre el K y Ca, K y Mg, Fe y Mn, por mencionar sólo unos pocos (Smith, 1962; Bould, 1964 a). El abastecimiento de N en forma de NH_4^+ es antagónico a otros cationes, pero cuando se abastece en forma de NO_3^- puede competir con otros aniones, por ejemplo, PO_4^{3-} . Aumentando el nivel de K a los vegetales se observa que se induce deficiencias de Mg acompañadas de aumentos en la concentración de K en las hojas (Reuther et al., 1958). Inversamente, cambios en la concentración de Mg en los tejidos de las hojas se encuentran acompañados normalmente por cambios opuestos en el K de las hojas (Emmert, 1961). Efectos antagónicos han sido extensivamente documentados para los micronutrientes. Altos niveles de Cu en el suelo pueden inducir deficiencias de Fe. Cultivos en maceta han indicado que altos niveles de Cu, Zn o Mn pueden inducir marcados efectos antagónicos entre pares de estos iones en las concentraciones de las hojas (Reuther et al., 1958; Hara et al., 1976).

El antagonismo durante la traslocación está causado normalmente por precipitación en los tejidos de las raíces o en cualquier lugar de la planta. El exceso de PO_4^{3-} en los alrededores de la raíz causan precipitación del Zn y también del Fe a lo largo de los tejidos conductores y esto puede provocar la clorosis férrica (Guzmán et al., 1986 a) o al moteado de las hojas como señal de deficiencia de Zn (West, 1938). En ambos casos, una precipitación de los elementos a niveles de traza en forma de fosfatos parece ser que es lo que ocurre. Otro caso de deficiencia de Zn inducida fue publicado para el trébol subterráneo que crecía en el suelo bajo en Zn. Un aumento en el abastecimiento de N, además de las fuentes de N, disminuía el contenido de Zn en los extremos. Esto fue atribuido a la retención del Zn

en las raíces como resultado de la formación de complejos inmóviles cinc-proteína (Ozanne, 1955; Dogar y van Hay, 1980). En cultivos hidropónicos la concentración crítica del Zn de diversos tipos de trébol subterráneo depende de la edad de las plantas y del abastecimiento de P. La severidad de la deficiencia de Zn estaba relacionada con la relación P/Zn y no con la concentración de Zn en los tejidos (Millikan, 1963; Loneragan et al., 1979).

Existe otro tipo de interacción referida a lo denominado pseudo-antagonismo por Lundegårdh (1966) o deficiencia inducida (Emmert, 1961), la cual no envuelve una competición directa de los iones, y la cual puede tener distintas causas. Un ejemplo corriente de este tipo de interacción existe cuando los elementos son deficientes pero diferentes en severidad, así por tanto la deficiencia de un elemento está marcada por el más deficiente. Cuando el abastecimiento del último se aumenta, se logra un punto en el cual el primer elemento se hace más deficiente y entonces comienza a determinar la respuesta de la planta. Este principio es de una importancia considerable en la diagnosis basada en el análisis de las plantas y es frecuentemente referido como la "Ley del Mínimo". La interacción entre el N y el P es un ejemplo muy bien conocido (Williams y Shapter, 1955; Bouma, 1956 y 1961). En los experimentos en campo diseñados para desarrollar criterios para la detección de la deficiencia de S en los cultivos de trébol subterráneo, Bouma et al. (1969) encontraron las correlaciones entre los cultivos del campo y el S total o la concentración de $SO_4^{=}$ en las hojas de los tréboles que estaban más altas en aquellos casos en que habían recibido más cantidad de fosfato. De forma similar, las correlaciones entre las respuestas en el campo a las aplicaciones de fosfato y la concentración total de P en las hojas de los tréboles eran más altas cuando las deficiencias de S habían sido corregidas. La implicación de estos ejemplos es, como dice Chapman (1966) y otros, que el análisis de las plantas sólo puede detectar la deficiencia de un nutriente cada vez. También parece que, en general, el análisis del tejido de la planta para un sólo elemento tiene poco valor en el diagnóstico, al menos que

se sepa que el abastecimiento de otros elementos es el adecuado.

La bibliografía sobre interacciones entre nutrientes es voluminosa y no hay duda de que pueden ser amplias y variadas tanto respecto a la captura de nutrientes como a su concentración en las plantas (Brown, 1963).

Chapman (1967) y Ulrich y Hills (1967) han destacado que el análisis de la planta es solamente capaz de detectar la deficiencia de un solo nutriente a la vez. Esto se puede ilustrar mediante los datos de Tyner y Webb (1946). Con la aplicación de 200 U.F de N por hectárea, el rendimiento del maíz era bajo, como lo era el K de la hoja indicando la deficiencia de K. Cuando se aplicaba K el rendimiento aumentaba y disminuía la concentración de N, indicando la deficiencia de N que no existía hasta que la adición de K había aumentado el rendimiento y por consiguiente, la necesidad de N.

Aunque lo arriba dicho es una simple ilustración de la ley del mínimo de Liebig, apenas si se puede exagerar su importancia para el análisis de la planta. El análisis de una planta que sea deficiente en K (o algún otro nutriente, agua o luz), puede demostrar que tiene un adecuado suministro de N. Esto no da indicación respecto a si el suministro de N sería limitante si se aumentara el K. El análisis del suelo, aunque teniendo sus propias debilidades particulares, no es afectado por este problema y, por consiguiente, puede complementar el análisis de la planta.

Complicando aún más los problemas del análisis de plantas, cierto número de investigadores han demostrado que un solo nutriente puede afectar no solamente la concentración de otro nutriente de las plantas, sino incluso su concentración crítica. Esto es claramente cierto para algunos diferentes nutrientes, cosechas y condiciones de cultivo (ver cuadro adjunto). Hay considerable diferencia de opinión sobre la importancia de estas interacciones, no obstante, Jakobsen y Steenbjerg (1964) encontraron que las interacciones eran un problema tan

Tabla C.- Nutrientes que pueden afectar a la concentración crítica de otros nutrientes.

| NUTRIENTE CRITICO | OTRO NUTRIENTE Y SU ACCION SOBRE LA CONCENTRACION CRITICA | ESPECIE | MEDIO DE CULTIVO | REFERENCIA |
|-------------------|---|---------------------------|------------------|----------------------------|
| N | P + | <u>Rubus idaeus</u> | Arena | Bould 1964 ^a |
| P | N + | <u>Rubus idaeus</u> | Arena | Bould 1964 ^a |
| K | Mg + | <u>Rubus idaeus</u> | Arena | Bould 1964 ^a |
| Mg | K + | <u>Rubus idaeus</u> | Arena | Bould 1964 ^a |
| N | P + | <u>Ribes nigrum</u> | Arena | Bould 1969 |
| P | N + | <u>Ribes nigrum</u> | Arena | Bould 1969 |
| N | P + | <u>Zea mays</u> | Campo | Dumenil 1961 |
| P | N + | <u>Zea mays</u> | Campo | Dumenil 1961 |
| N | K ± | <u>Beta vulgaris</u> | Campo | Gutstein 1968 |
| K | N + | <u>Beta vulgaris</u> | Campo | Gutstein 1968 |
| K | Na - | <u>Lolium multiflorum</u> | Solución | Hylton et al. 1967 |
| Mg | K ± | <u>Avena sativa</u> | Suelo | Jakobsen y Steenbjerg 1964 |
| P | K + | <u>Glicine max</u> | Campo | Miller et al. 1961 |
| Cu | Fe ± | <u>Lactuca sativa</u> | Solución | Moore et al. 1957 |
| P | N + | <u>Arachis hypogaea</u> | Campo | Prevot y Ollagnier 1956 |
| K | Na - | <u>Beta vulgaris</u> | Solución | Ulrich et al. 1959 |
| N | P + | <u>Zea mays</u> | Campo | Voss et al. 1970 |
| P | K + | <u>Poa pratensis</u> | Campo | Voss et al. 1970 |
| K | P + | <u>Poa pratensis</u> | Campo | Walker y Pesek 1967 |

importante que "la interpretación del análisis de la planta es fundamentalmente muy difícil, y en la práctica frecuentemente será imposible dar solución correcta". Este punto de vista bastante pesimista y no hay duda de que es parte del hecho de que estos autores analizaron el grano maduro y la paja, tejido que generalmente se creía que era inapropiado para objetivos diagnósticos. Shear et al. (1946), Moore et al. (1957), Dumenil (1961) y Bould (1964 a) destacan todos la importancia de considerar las interacciones de los nutrientes para determinar los niveles críticos. Mediante la inclusión de las interacciones de los nutrientes Walker et al. (1969) y Peck et al. (1969) pudieron mejorar su predicción del rendimiento de maíz y soja a partir del contenido de nutriente. Por otra parte Smith (1962)

afirmó que "la experiencia acumulada parece indicar que se pueden presentar rangos o escalas bastante amplias de todos los elementos en muchas combinaciones sin alterar la conducta de la planta".

La mayor parte de los investigadores indudablemente reconocen la importancia de las interacciones de nutriente en concentraciones extremas. El argumento de Smith parece ser el de que no son importantes si se trata de una escala bastante amplia de valores casi óptimos. Cierta número de curvas de respuesta presentadas para nutrientes aislados, por ejemplo: las de Ulrich y Hills (1967), sí que muestran una larga porción plana en la que la concentración de nutriente tiene poco efecto sobre el rendimiento. Sin embargo, los que han presentado datos procedentes de experimentos en los que se ha variado más de un nutriente, muestran escalas óptimas más estrechas (Moore et al., 1957; Dumenil, 1961; Miller et al., 1961). Cuando Bould (1964 a) puso en un gráfico el rendimiento contra la concentración de K a diferentes niveles de Mg, obtuvo una brusca ruptura en la curva de respuesta y una larga parte plana solamente cuando el Mg era limitante. Se puede mostrar un modelo algo similar a partir de los datos de Dumenil (1961) y Miller et al., (1961). Parece posible que haya solamente una ancha escala de concentración sobre la que resulta inafectado el rendimiento cuando algún otro nutriente, o el agua, es limitante.

Bould (1964 b) afirmó que "el equilibrio de nutrientes se hace más crítico al aproximarse al nivel óptimo". Este parece que es el punto de vista totalmente opuesto al expresado por Smith (1962). Si es cierto, el rendimiento máximo solamente se puede obtener con una combinación bastante específica de combinaciones de nutriente. También resulta importante el disponer de medidas bien exactas de las combinaciones críticas. Si lo que dice Smith (1962) es correcto, la exactitud es mucho menos importante.

En dos casos aislados los investigadores con larga experiencia en el análisis de plantas han sido capaces de evitar

los efectos directos de las interacciones de nutrientes. Ulrich et al. (1959) encontraron que la concentración de Na afectaba a la concentración crítica del K en los peciolos de la remolacha azucarera, pero no en las hojas, mediante el análisis de las hojas pudo evitar esta interacción. Clements (1964 a) encontró que parecía haber una interacción N-K en la caña de azúcar. Tanto las concentraciones de N como de K fueron fuertemente afectadas por la humedad del tejido no obstante, y la interacción N-K no era importante en la ecuación de regresión cuando se incluía la humedad del tejido como variable. Cassidy (1966) ha destacado la importancia de expresar la concentración de elementos solubles como porcentaje del contenido de humedad.

2.3.3.4.- Factores endógenos.

La concentración de los nutrientes en los tejidos de la planta está fuertemente influenciada por el desarrollo de la fruta o cosecha (Emmert, 1959; Smith, 1962). En general, las concentraciones de N, Ca y Mg aumentan con la carga de fruta, mientras que la concentración de K normalmente disminuye. Los efectos en el P son variables. El quemado de la hoja, causado por la deficiencia de K, ha sido publicado por distintos autores que aumenta con el desarrollo de la cosecha. Existen también marcadas interacciones entre los efectos de las adiciones de los fertilizantes en el desarrollo de la cosecha, de las naranjas Navel, debido a las aplicaciones de N, que fueron acompañadas por una disminución en la concentración de K en las hojas, incluso con un abastecimiento apropiado de K en el suelo (Groenewegen y Bouma, 1960). Esto fue atribuido, por lo menos en parte, a la dilución seguida de la respuesta del cultivo y del crecimiento al N. Sato (1961) consideraba que una disminución del K en las hojas, cuando aumenta el desarrollo de las naranjas de Satsuma, se debía principalmente a la translocación del K a la fruta, posiblemente debido a que la fruta tenía unas necesidades relativamente altas de K. Relacionado con esto pueden ser los hallazgos de Florida donde ocurría una respuesta casi lineal en ascenso en relación con la caída de la fruta cuando el K en las

hojas era menor del 0.8% de la materia seca (Wilson, 1961).

La composición de los nutrientes de las hojas también depende de su posición relativa a la fruta. En las naranjas, por ejemplo, las concentraciones de N y P son, por regla general, más bajas en las hojas próximas a los frutos que a los ápices, probablemente debido a que la fruta compite por los nutrientes disponibles (Bouma, 1959 y 1961). Por esta razón, las muestras de hojas se suelen estandarizar, algunos prefieren hojas de las proximidades de los frutos y otros de las partes vegetativas.

Otros factores que pueden afectar a la composición de los nutrientes en los tejidos de las plantas son las plagas y enfermedades, y éstas hay que tenerlas también en cuenta para evitar interpretaciones equivocadas de la composición de los tejidos (Bergmann et al., 1974; Kirkpatrick et al., 1964). Los factores genéticos también pueden ser importantes (Vose, 1984).

2.3.3.5.- Factores exógenos.

El tiempo varía no sólo de una zona a otra, sino en cualquier zona de un año a otro, de semana en semana, e incluso de un día a otro. El tiempo y las variables afectadas por el tiempo, tales como la humedad del suelo, tienen dos formas de afectar al análisis de la planta como instrumento de diagnóstico. Puede que afecten a la concentración de nutrientes en el momento en que se tomen las muestras de la planta, y posteriormente puede afectar a la respuesta a los nutrientes aplicados, en este sentido el análisis de la planta es más vulnerable que el análisis del suelo, ya que la mayoría de los análisis del suelo no están apreciablemente afectados por las condiciones ambientales en, o antes del muestreo (Mitchell, 1964).

Debido a que las condiciones ambientales sí que varían durante cortos periodos de tiempo, afectarán a la validez del análisis de la planta si alteran la concentración de nu-

triente en la toma de muestras, tanto si afectan a la concentración crítica como si no lo hacen.

Cierta medida del efecto de las condiciones ambientales sobre el contenido de nutriente en un área dada es suministrada por la variación de un año a otro en la concentración de nutriente en plantas uniformemente fertilizadas. Cierta número de autores que han investigado sobre la variación de un año a otro en el contenido de nutriente, han considerado las condiciones ambientales como una causa principal (Boynton et al., 1944; Proebsting y Brown, 1951; Titus y Boynton, 1953; Gouny, 1956; Popenoe y Scott, 1956; Emmert, 1959; Mederski y Wilson, 1960; Reitz y Koo, 1960; Heeney y Hill, 1961; Baird et al., 1962; Archibald, 1964; Christensen, 1969; Melsted et al., 1969).

Los efectos de los cambios en la humedad del suelo en las concentraciones de los nutrientes en los tejidos de las plantas son complejos. Algunos efectos obvios de una excesiva humedad son una pérdida de nutrientes por drenaje, erosión y una disminución de la disponibilidad de algunos elementos debido a la poca aireación (Waldleigh y Richards, 1951). Algunos elementos pueden hacerse más disponibles debido a los procesos de reducción en un suelo poco aireado, por ejemplo, Fe y Mn. La captación de los nutrientes, particularmente de los aniones, puede verse también reducida por una falta de oxígeno en los suelos saturados. Cambios en la aireación pueden afectar a la morfología de las raíces. En general, todos estos factores pueden influenciar la concentración de los nutrientes en los tejidos de las plantas, dependiendo de la intensidad en la que afectan la captación de los nutrientes, utilización y crecimiento.

Las publicaciones en relación con los efectos de bajos abastecimientos de humedad al suelo en la concentración de los nutrientes en la planta son conflictivos. Wadleigh y Richards (1951) concluyen que, para un determinado nivel de fertilidad, la disminución de la humedad del suelo causa un aumento en la concentración de N en el tejido de la planta, una disminución en la concentración de K, y un efecto variable en el P, Ca

y Mg. Por otro lado, Williams y Shapher (1955) concluyeron que en la cebada y centeno, la humedad hace aumentar las concentraciones de K, N, Mg y Ca en las hojas, aunque los efectos del tratamiento en el centeno eran inicial y relativamente bajos. Esto mismo fue comprobado para el caso del Cu y B en árboles (Guzmán et al., 1984).

Lundegårdh (1951) con experimentos de campo y de invernadero demostró que grados diferentes de estrés de humedad alteraban la composición de N, P, K y Ca en avena. Sin embargo llegó a la conclusión de que las correcciones para el suministro de humedad eran sólo necesarias en el caso del N y solamente cuando las condiciones del tiempo atmosférico eran muy escasas.

Cierto número de investigadores (Lundegårdh, 1951; Embleton et al., 1958; Cannell et al., 1959; Hibbard y Nour, 1959; Clements, 1964 b; Finn y Mack, 1964; Doss y Scarsbrook, 1969) han demostrado que la concentración de N en el tejido de la planta es superior con alto que con bajo estrés de humedad. Esto parece concordar bastante bien para cierto número de cosechas tanto en estudios de invernadero como de campo. Cannell et al. (1959) demostraron que las concentraciones de P, B y Mo en el apio disminuían al aumentar el estrés de humedad ambiental mientras que aumentaban el Ca, Mg y Mn. Hibbard y Nour (1959) demostraron que las concentraciones de P y K disminuían al aumentar el estrés de humedad. Con el P las disminuciones llegaron a alcanzar hasta el 56%, pero con el Ca eran algo más pequeñas. Los autores dieron cierto número de referencias sobre este tema. Emmert (1959) también dió cierto número de referencias en relación con el efecto tanto de la sequía como del exceso de humedad sobre el contenido de nutriente.

Mederski y Wilson (1960) demostraron que la humedad relativa en el aire tenía un efecto sobre la concentración de P, K, Ca y Mg en las plantas de maíz. Wilberg y Kousiahi-Tork (1968) encontraron que el contenido de Ca en las hojas de tabaco era aproximadamente la mitad de alto con el 95% de humedad como lo era con el 45%. El crecimiento estaba retardado y los

síntomas de deficiencia de B y Ca eran visibles bajo la alta humedad. Stolzy y Letey (1964) y Grable (1966) en estudios sobre el oxígeno del suelo y la aireación del mismo, respectivamente, demostraron que la aireación del suelo, que es frecuentemente función de la humedad del suelo, puede tener un gran efecto sobre la toma de nutrientes y su concentración en las hojas.

Parece que el suministro de humedad del suelo e incluso la humedad relativa de la atmósfera pueden tener efectos muy notables sobre el contenido de nutriente de las plantas. Mackay y Leefe (1962) encontraron que la concentración crítica del N, P y K eran también afectadas por el suministro de humedad.

Las mayores velocidades de crecimiento de las plantas dependen de los factores ambientales tales como la temperatura, la luz y el abastecimiento de agua. Cuando están presentes en niveles por debajo del óptimo para el crecimiento máximo, o producción, cualquiera de estos factores se hace "limitante" y por tanto causan un requerimiento de nutrientes por parte de la planta. Como resultado, la concentración de nutrientes en la materia seca tiende a aumentar. En los tréboles subterráneos, a tres temperaturas (15° día/10°C noche, 21°/16°C, 27°/22°C), y a dos niveles de P, la respuesta del crecimiento al elemento fue menor a las temperaturas más bajas. La concentración de P en toda la planta (hojas, peciolos y raíces) fue mayor a las temperaturas más bajas y disminuía al aumentar la temperatura. Esto ocurría a ambos niveles de P y S (Bouma y Dowling, 1969; Bouma et al., 1969).

Existe, de forma potencial, un límite donde un mayor aumento en la temperatura no causaría un posterior aumento de la concentración de los nutrientes y puede incluso causar una disminución. Esto dependerá de la intensidad relativa a la cual tanto el crecimiento como la captación de los nutrientes es reducida bajando la temperatura. Zurbucki (1961), por ejemplo, indicó que las concentraciones de N, P y K de las plantas de tomate a 12°C eran más bajas que las que crecían a 20°C. A los 50 días de la recolección había una diferencia de cuatro veces en el peso de la materia seca. En un caso como éste, la temperatura de 12°C era

más baja que la óptima, la captación de los nutrientes tenía que reducirse a una mayor cantidad que el crecimiento, resultando una disminución en la concentración de los nutrientes. Guzmán et al. (1984) comprobaron que había una relación directa negativa entre la temperatura y la concentración de Cu en hoja para árboles frutales, mientras que era positiva en el caso del B.

Las influencias de la luz en las concentraciones de los nutrientes son similares. En un experimento (Bouma y Dowling 1969) con trébol subterráneo a cuatro niveles de P, las concentraciones de P en todas las partes de la planta (hojas, peciolo y raíces) eran más altas bajo una intensidad de luz de $1300 \text{ J/m}^2/\text{s}$ que bajo $2600 \text{ J/m}^2/\text{s}$. Estas deficiencias eran relativamente pequeñas a los niveles bajos de P, pero aumentaban con el abastecimiento de P debido a la gran reducción de la respuesta de crecimiento con respecto al P al nivel más bajo de luz comparado con el de un nivel alto. Esto sugiere que hay un más bajo requerimiento de P a bajos niveles de luz. En los cerezos, valores críticos de N eran más altos en las hojas soleadas que en las que se encuentran en la sombra (Proebsting y Kenworthy, 1954). La luz ejercía una acción positiva sobre la concentración de Cu y B en hojas de árboles frutales (Guzmán et al., 1984).

Burr (1961) mostró que la temperatura del suelo y la intensidad de la luz afectan todas a la concentración de N en las hojas de la caña de azúcar. Afirmó que "la concentración de los valores de N en hoja se alteraban mucho más debido a factores climáticos que al efecto de duplicar el contenido de N de la solución de cultivo". Hubo fuertes interacciones, siendo la concentración mínima de N en el momento de alta intensidad de la luz, hojas calientes y raíces frías; los valores máximos, para las raíces calientes, hojas frías y baja intensidad de la luz. Burr (1961) encontró un efecto similar de la luz y la temperatura sobre la concentración de P. Schmidt y Blaser (1969) encontraron efecto similares de la luz y la temperatura sobre la concentración de N en *Cynodon*, spp. Algunos han demostrado que la temperatura de la solución o del suelo (Roberts y Kenworthy,

1956; Lange et al., 1959; Clements, 1962; Mckell et al., 1962; Power et al., 1963; Knoll et al., 1964; Nielsen y Cunningham, 1964; Martin et al., 1965; Ketcheson, 1968; Korovin et al., 1968; Read y Ashford, 1968; Wallace et al., 1969) y la intensidad de la luz (Blackman y Rutter, 1949; Proebsting y Kenworthy, 1954; Embleton et al., 1958; Lange et al., 1959) afectan a la concentración de nutrientes en las plantas.

Se encontraron dos referencias que mostraron una relación entre la temperatura o la luz y las concentraciones críticas. Proebsting y Kenworthy (1954) encontraron que la concentración crítica del N era apreciablemente más alta en las hojas de cerezo (Prunus cerasus) a plena luz del sol, que con el 50 ó 30% menos de luz del sol. Ulrich (1964) mostró la existencia de algún efecto de luz sobre las concentraciones críticas del NO_3^- -N en las remolachas azucareras, pero consideró las diferencias demasiado pequeñas como para ser importantes.

Se puede esperar que cambie la importancia de la variación ambiental de una región a otra, dependiendo del grado de variación y la escala sobre la cual se presenta. Se podría esperar que la variación de temperatura tuviera la misma importancia en áreas que estén en la media, tanto más frías como más calientes, que el óptimo para la cosecha particular. El suministro de humedad es también probable que sea más crítico en áreas donde sea, por término medio, deficiente o grandemente en exceso. Con algunas excepciones, parece que el análisis de las plantas se ha usado con el mayor éxito en las zonas calientes naturalmente secas, donde se suministra la humedad mediante irrigación. En estas zonas el suministro de humedad es controlado, la cantidad de luz solar es relativamente uniforme y la temperatura es frecuentemente casi óptima. En tales áreas sería de esperar que los efectos ambientales fueran de poca importancia.

Sin embargo, en muchas zonas donde se cultivan cosechas, el suministro de humedad puede ser menor del óptimo y variar ampliamente de año en año y de una semana a otra; las horas de luz solar pueden variar ampliamente y la temperatura puede

fluctuar en una escala frecuentemente por debajo del óptimo. Bajo estas condiciones la variación ambiental puede esperarse que afecte notablemente el uso del análisis de la planta.

Halais (1962) ha recomendado que se deberían tomar muestras de las plantas cuando sean adecuados el suministro de humedad y la aireación del suelo. Esto parece ser un buen consejo, pero claramente coloca una restricción más en la toma de muestras y en años de sequía daría como resultado que no se tomaran muestras. El tomar muestras durante la sequía prolongada no es probable que suministre información útil para las predicciones de necesidades en un año con caída normal de lluvia en ningún caso, ya que la falta de humedad limita las necesidades de nutriente mediante la limitación del crecimiento. Este podría ser un problema muy grave en el uso del análisis de la planta en áreas de humedad deficiente.

Heeney y Hill (1961) han sugerido el uso de árboles standard que son uniformemente fertilizados y tratados durante largos periodos. Las variaciones en la concentración de nutrientes de las hojas procedentes de estos árboles, de un año a otro, se pueden usar para ajustar recomendaciones para otros huertos. Esta técnica parece ser útil para eliminar el efecto de la variación climática, de un año a otro dentro de una zona climática y se usa por Archibald (1964) con este objetivo.

Clements (1964 b) trabajando con caña de azúcar, encontró que mediante la medida del contenido de humedad de las vainas de la hoja y usando éste en una ecuación de regresión múltiple, pudo compensar los efectos de la humedad del suelo sobre el contenido de nutriente. Cassidy (1966) ha destacado la importancia de expresar la concentración de elementos solubles como porcentaje de contenido de humedad del tejido. Voss et al. (1970) han usado la regresión múltiple para hacer el ajuste respecto a efectos ambientales. Diversos tipos de ecuaciones matemáticas se están haciendo populares para otras fases de la producción de cosechas y puede que sean muy útiles como medio de describir las interacciones del contenido de nutrientes de la planta en relación con los factores ambientales.

2.3.4.- Relación positiva entre el diagnóstico visual y el análisis foliar.

Un diagnóstico basado en síntomas visuales y confirmado por el análisis foliar, es uno de los métodos más fiables de diagnosticar trastornos nutricionales. Seguidamente se dan algunos ejemplos que ilustran este método dual. El trabajo de Bould (1968) realizado con Ribes nigrum, muestra los síntomas típicos de deficiencias en K. Es decir, enanismo de los entrenudos, internódulos cortos, clorosis marginal de las hojas basales y necrosis progresiva del margen foliar. El análisis de la hoja indicó un nivel bajo de K (3 mg/g de K en p.s.) combinado con alto nivel de Mg (6.9 mg/g de Mg en p.s.) Ca normal (20 mg/g de Ca en p.s.), confirmándose así la deficiencia en el nutriente estudio.

Otro ejemplo, realizado por Bould (1964) en Fragaria sp. con la deficiencia de B, es más difícil de diagnosticar basándose únicamente en la sintomatología visual. Los síntomas principales son el enanismo (que podría deberse a una infección vírica), la distorsión y el arrugamiento de las hojas jóvenes (que podría deberse a las deficiencias de Ca en la etapa pre-emergente de la hoja), y frutos deformados con un estrangulamiento pronunciado en la unión con el cáliz, (éste es el síntoma más característico de la deficiencia de B en la fresa). El análisis de la hoja indica un contenido en Ca normal (15 mg/g en p.s.) y un contenido de B muy bajo (4 µg/g en p.s.). Las plantas afectadas a las que posteriormente se suministró B se recuperaron completamente, confirmando así la deficiencia de dicho nutriente.

Bould (1983) estudió el efecto de la deficiencia de Mg en grosellas negras. Se caracteriza dicha deficiencia por una coloración rojiza-purpúrea entre los nervios de las hojas seniles, con necrosis marginal y una pequeña reducción del brote juvenil. En algunas variedades de grosellas negras, los síntomas de deficiencia de Mg (color púrpura de la hoja) podrían ser malentendidos y tomados por deficiencia de P, pero el análisis foliar claramente diferencia entre ambos trastornos y se determinó que el Mg presentaba una concentración baja (0.6 mg/g en p.s.)

mientras que el P fue normal (0.6 mg/g en p.s.).

El análisis foliar puede dar lugar a confusiones, especialmente cuando uno trata con elementos inmóviles del floema, tales como el Ca, o con estrés temporal de nutrientes, si se analiza el tipo equivocado de muestra foliar. Con nutrientes no móviles, la deficiencia y la suficiencia pueden existir de manera simultánea en diferentes partes de la misma planta (Loneragan et al., 1976). Una breve interrupción en el suministro de nutrientes (Cu o Ca) dará como resultado una deficiencia de estos nutrientes solamente en las hojas nuevas. El análisis de las hojas seniles puede indicar concentraciones adecuadas de estos dos nutrientes. Las hojas antiguas contienen más de 5 $\mu\text{g/g}$ de Cu en peso seco, mientras que las jóvenes, formadas tras la restricción del suministro de Cu, eran deficientes en dicho nutriente (1 $\mu\text{g/g}$ en p.s.) según el trabajo de Bould (1983).

Bradfield y Guttridge (1978), trabajando con las puntas necróticas de hojas de fresa, trastorno de la deficiencia en Ca, han demostrado que la lesión es producida en la fase pre-emergente de la hoja. Cuando la concentración de Ca en las hojas emergentes excedía del 0.7 mg/g en p.s., la necrosis de las puntas no se veía. Cuando las concentraciones en las hojas era inferior al 0.5 mg/g de Ca en p.s., la subsiguiente necrosis era grave. Tras la emergencia, las concentraciones de Ca en las hojas afectadas aumentaban rápidamente. El análisis de las hojas seniles respecto al Ca es, por consiguiente, insatisfactorio para diagnosticar la causa de la necrosis de la punta en plantas de fresa.

Cualesquiera que sean los posteriores estudios de técnica analítica o partes de la planta que se llevan a cabo, los elementos o sistemas deberían ser considerados más cuidadosamente respecto al estudio iónico de las plantas, así como a la intensidad de la nutrición.

2.4.- Indicadores bioquímicos.

2.4.1.- Generalidades.

A pesar de los progresos en los últimos años en el campo del análisis de los vegetales, siendo éstos muy significantes y de gran trascendencia, existen todavía lagunas en las líneas tradicionales de investigación que hacen difícil aplicar dichos progresos en el diagnóstico nutricional. Haciendo todo ello que el diagnóstico, como tal, se encuentre en un punto de difícil solución. Bar-Akiva (1971) cuestiona dicho argumento basándose en que las numerosas dificultades que plantea el análisis de las plantas provienen del hecho de ser una naturaleza dinámica y muy activa. Así tenemos que Greenwood (1976) duda de la eficacia de las conocidas curvas de respuesta de los nutrientes, obtenidas por medio del análisis de las plantas, basándose para ello en que se logra muy poca información real sobre el grado de la deficiencia o toxicidad, y todo ello debido a los múltiples factores que inciden sobre las curvas de respuesta, pudiendo resultar a veces desconcertante el resultado obtenido.

En los últimos años se están realizando estudios cuyo fundamento reside en los cambios específicos de la actividad metabólica, enzimática o fisiológica producidos por deficiencias, toxicidad o inducción de respuestas en plantas o tejidos por la acción de un nutriente. Estos estudios pueden agruparse en: bioquímicos, fisiológicos o histoquímicos.

Para conocer el nivel nutricional se utilizan los métodos bioquímicos que se basan en el empleo de enzimas específicos de iones. Estos métodos se fundamentan en la diferente actividad de ciertos enzimas dependiendo del nivel nutricional. O bien de la actividad enzimática real se determina en el tejido u órgano tras su extracción o bien se incuba dicha enzima con el nutriente mineral en cuestión durante 1 ó 2 días para determinar las actividades enzimáticas inducibles de, por ejemplo, la nitrato-reductasa por el Mo (Shaked y Bar-Akiva, 1967; Randall, 1969; Witt y Junk, 1977; Gupta y Lipsett, 1981), la peroxidasa

por el Fe (Bar-Akiva et al., 1970), la ácido ascórbico oxidasa por el Cu (Delhaire et al., 1982; Loneragan et al., 1982) y la aldolasa, anhidrasa carbónica o ribonucleasa por el Zn (O'sullivan, 1970; Ohki, 1976; Johnson y Simons, 1979; Sharma et al., 1982). Consulta obligada sobre metaloenzimas es la magnífica revisión realizada por Del Río (1983). Los métodos bioquímicos también se pueden usar para los macronutrientes. La acumulación de putresceína, en plantas deficientes en K, es un indicador bioquímico de la necesidad en dicho ión (Smith et al., 1982). La actividad inducible de la nitrato-reductasa se puede usar como indicador del nivel nutricional del N (Bar-Akiva et al., 1970; Witt y Junk, 1974; Valenzuela et al., 1987). La actividad de la piruvato-kinasa, obtenida de extractos foliares, es dependiente del contenido de K y Mg en hoja (Besford, 1978). En tejido deficiente en P la actividad de la fosfatasa ácida es mayor, especialmente la actividad de cierta fracción de la enzima (Barrett-Lennard y Greenway, 1982). El incremento de la actividad de la fosfatasa en tejidos deficientes en P es un fenómeno interesante, bajo el punto de vista fisiológico y bioquímico, que podría tener relación con el estímulo de la removilización del P (Smith y Chevalier, 1984).

2.4.2.- Actividad enzimática específica.

2.4.2.1.- Macronutrientes.

En términos de necesidades iónicas, se pueden designar dos amplios grupos de enzimas vegetales: los enzimas en los que el ion específico ha demostrado ser un componente integral y los enzimas para los que uno o más iones sirven de activadores (Nason y McElroy, 1963).

2.4.2.1.1.- Nitrógeno.

Bar-Akiva y Sternbaum (1966) cultivaron árboles de pomelo jóvenes en el suelo, con cinco niveles diferentes de sulfato amónico y encontraron que la actividad de la nitrato-reductasa en las hojas recientemente divididas, incubadas durante 2 horas con NO_3^- ("actividad inicial"), aumentó aproximadamente 4.5 veces desde el nivel más bajo al más alto de abastecimiento de N. Midieron también la actividad de la enzima de muestras de hojas incubadas con NO_3^- durante 24 horas antes del ensayo de la enzima, denominándolo actividad incubadora. Este tratamiento causó considerables aumentos en la actividad de las hojas deficientes, pero no en las hojas con suficiente N. Como resultado de esto el hueco entre la actividad inicial e inductible aumentó desde aproximadamente cero hasta el nivel más alto. El procedimiento por lo tanto se admitió como una herramienta útil para valorar el estado del N en los cítricos.

Normalmente, los árboles no acumulan NO_3^- . En trabajos posteriores Bar-Akiva et al. (1970) investigaron esta aproximación para la cizaña anual, la cual puede acumular cantidades considerables de NO_3^- . Encontraron que a pesar de los niveles endógenos altos de NO_3^- en los tejidos normales, la actividad podía estar inducida posteriormente, y que la respuesta estaba negativamente correlacionada con el abastecimiento de N a la planta. Ellos calcularon la relación entre la actividad inducida y la endógena y sugirieron que un valor de 1.5 ó superior indicaba deficiencia de N. Esto era similar al valor encontrado en los cítricos (Shaked et al., 1975) y en Urtica dioica (Hosftra et al., 1985).

Witt y Junk (1974), sin embargo, encontraron esta relación no satisfactoria para la coliflor y las plantas de poinsetia sin modificar la aproximación. Entonces, ellos hicieron uso del hecho de que la actividad adicional de la nitrato-reductasa puede ser inducida incubando los tejidos de hoja con NO_3^- en la luz comparando con la obscuridad. Esta actividad "adicional" de la nitrato-reductasa estaba negativamente correlacio-

nada con el abastecimiento de NO_3^- a las plantas. Se sugirió que esta relación daba una buena indicación del estado del N en la planta (Nicholas et al., 1976).

En la misma línea han de resaltarse los trabajos realizados por Croy y Hageman, (1970). Ulrich y Hageman, (1973); Johnson et al., (1976) que usaron la actividad de la nitrato-reductasa en plantas jóvenes de trigo para predecir las necesidades de N para estas cosechas. Encontraron una buena correlación ($r=+0.90$) entre la actividad de dicha enzima en la hoja superior totalmente expandida y el rendimiento final de la cosecha.

2.4.2.1.2.- Fósforo.

En los tejidos de muchas especies de plantas, la actividad de la fosfatasa ácida se ve aumentada marcadamente por la deficiencia de P (Hewitt y Tatham 1960; Besford 1978 b, 1979 a,b,c; Maclachlan, 1984). La enzima cataliza la hidrólisis de los ésteres fosfato. Las aproximaciones se basan en la hidrólisis de la p-nitrofenil fosfato por los extractos de tejidos, siendo el color amarillo del producto de reacción el p-nitrofenol, proporcional a la actividad enzimática. Besford (1979 a) ha demostrado que en tomates, el aumento de la actividad enzimática era específica para la deficiencia de P. En este y otros trabajos con otras siete plantas (Besford 1979 b) los ensayos enzimáticos daban un índice rápido y sensible del estado del P en las plantas. Después de un gran número de experimentos, Besford (1980) concluyó que la comparación visual del color amarillo durante la incubación de las hojas de tomate puede eliminar la necesidad de los estudios en el laboratorio para la diagnosis de la deficiencia de P.

Maclachlan (1982) en experiencias de campo con diferentes niveles de P y en plantas de trigo, demostró que existía una correlación significativa lineal ($r=-0.89$) entre el rendimiento en grano y la actividad de la fosfatasa ácida. Este mismo autor en 1984, realiza una experiencia similar pero combinando los con los efectos de la sequedad ambiental, fósforo foliar y

