

T
15
56

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha: 17 NOV. 1993
ENTRADA N.º. _____

EFECTO DE LA APLICACION N-K EN CONDICIONES DE SALINIDAD, SOBRE ALGUNOS PARAMETROS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN PLANTAS DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L. cv. LAMUYO).

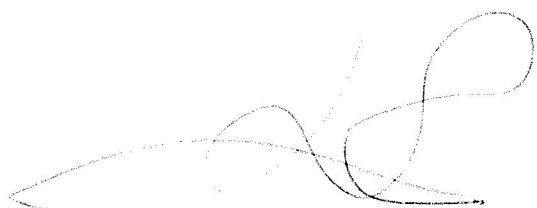
AGUSTIN SANCHEZ PRADOS

TESIS DOCTORAL


GRANADA, 1993

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 49672482
Nº Copia 21221091

El presente trabajo de investigación titulado "Efecto de la aplicación N-K en condiciones de salinidad, sobre algunos parametros fisiológicos y bioquímicos en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L. cv. Lamuyo)", para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas que presenta el licenciado Agustín Sánchez Prados, ha sido realizado en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo la dirección del Profesor Dr. Luis María Romero Monreal.

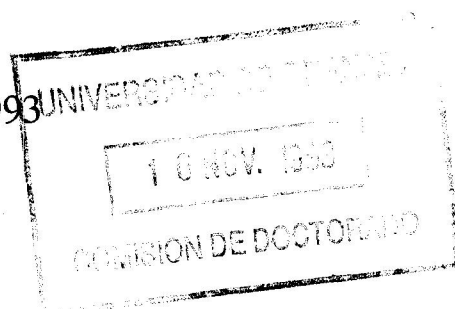


Dr. Luis M^a Romero Monreal



Agustín Sánchez Prados
Aspirante al grado de Doctor

Granada, Noviembre de 1993



A mis Padres y Hermano.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Profesor Dr. D. **Luis M^a Romero Monreal**, que me brindó su amistad y la posibilidad de realizar este trabajo. Por su confianza y dedicación, gracias.

A mis compañeros y amigos del Departamentos de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada: **Antonio del Río, Inmaculada López-Cantarero, M^a José Hurtado, Olga Castro, Joaquín Hernández, Amal Belakbir, Zouhaire Lamrani, Gemma Vállora, Gregoria Pulgar y Mari Carmen Sánchez.**

Igualmente a todos mis amigos y compañeros del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Almería, al cual pertenezco, en especial a **Juan Luis Valenzuela, Miguel Guzmán, Miguel Urrestarazu, Francisco Alejandro Lorente y Juan José Alvarado.**

Agradezco al Centro de Investigación y Desarrollo Hortícola su colaboración por la prestación de la infraestructura para la realización de este trabajo. A **D. Francisco Alex, José Romero y D. José Rojo**, que por sus amplios conocimientos técnicos nos ha sido posible llevar a cabo esta experiencia.

A **D. Joaquín Molero** y **D. Antonio Ortega**, como directores del Departamento de Biología Vegetal, así como a todos y cada uno de sus miembros, en especial a la **Dra. D^a Isabel Agüí**, **D. Manuel Díaz Miguel**, **D. Francisco Valle**, **D^a Consuelo Díaz de la Guardia** y **Francisca Alba**.

Y como no, a mis **padres, hermano y a toda mi familia** por su confianza y constante entrega.

A todos mis amigos, por su continuo apoyo, gracias al cual pude superar los momentos más difíciles, en especial a **Juan Luis Gálvez** y **Manuel Gómez**.

*Como la vela al arder, el
entendimiento humano alumbra
quemándose, consumiéndose y
derramando lágrimas.*

(Santiago Ramón y Cajal).

INDICE

1.- OBJETO DEL TRABAJO	1
2.- INTRODUCCION	4
2.1.- Diagnóstico según sintomatologías	5
2.2.- ¿Cual es el dignóstico?	6
2.3.- Diagnóstico por medio del análisis de la planta.	10
2.3.1.- Organos que pueden ser analizados.	11
2.3.1.1.- Análisis de la hoja	11
2.3.1.1.1.- Nutrientes totales	12
2.3.1.1.2.- Nutrientes solubles	18
2.3.1.1.2.1.- Material seco	19
2.3.1.1.2.2.- Material fresco	29
2.3.1.2.- Análisis del peciolo	31
2.3.1.3.- Análisis del fruto	32
2.3.1.4.- Análisis de la corteza	34
2.3.2.- Muestreo y preparación del órgano analizado	35
2.3.3.- Factores que afectan a la concentración de nutrientes en el órgano analizado	40
2.3.3.1.- Edad del órgano	40
2.3.3.2.- Interacciones iónicas	49
2.3.3.3.- Factores endógenos	55
2.3.3.4.- Factores exógenos	57
2.3.4.- Relación positiva entre el dignóstico visual y el análisis foliar	64
2.4.- Indicadores bioquímicos	67
2.4.1.- Actividad enzimática específica	69
2.4.1.1.- Macronutrientes	69
2.4.1.2.- Micronutrientes	74
2.4.1.3.- Reactivación o inducción enzimática	80
2.5.- ¿Son útiles los pigmentos en el diagnóstico?	82
2.6.- Productos metabólicos como indicadores de la distorsión iónica	83

2.7.- Indicadores histológicos	86
2.8.- Consideraciones finales	88
3.- MATERIAL Y METODOS	90
3.1.- Características del invernadero	91
3.2.- Especie estudiada	91
3.2.1.- Generalidades	91
3.2.3.- Encuadramiento taxonómico y descripción botánica	93
3.3.- Características de las parcelas	96
3.3.1.- Tratamientos o parcelas	96
3.4.- Parámetros ambientales	97
3.5.- Suelos	98
3.5.1.- Toma de muestras	98
3.5.2.- Preparación de las muestras	100
3.5.3.- Análisis de las muestras	100
3.5.3.1.- Análisis físico	100
3.5.3.2.- Análisis químico	102
3.6.- Agua	104
3.6.1.- Recolección de las muestras de agua	105
3.6.2.- Análisis de las muestras	105
3.7.- Plantas	106
3.7.1.- Toma de muestras vegetales y su preparación	106
3.7.2.- Preparación de las muestras para material fresco	108
3.7.2.1.- Material vegetal fresco	108
3.7.2.1.1.- Proteínas solubles	108
3.7.2.1.2.- Aminoácidos solubles	109
3.7.2.1.3.- Pigmentos	109
3.7.2.1.3.1.- Clorofilas	109
3.7.2.1.3.2.- Carotenos	109
3.7.2.1.3.3.- Antocianinas	110
3.7.2.1.4.- Acido ascórbico	110

3.7.2.1.5.- Acido cítrico	110
3.7.2.1.6.- Acidez iónica	110
3.7.2.1.7.- Hidrogeniones	111
3.7.2.1.8.- Enzimas	111
3.7.2.1.8.1.- Nitrato-reductasa	111
3.7.2.1.8.1.1.- Nitrato-reductasa	
endógena (NRe)	111
3.7.2.1.8.1.2.- Nitrato-reductasa inducida	
con NO ₃ (NR ind)	112
3.7.2.1.8.1.3.- Nitrato-reductasa infiltrada	
con Mo (NR inf)	112
3.7.2.1.8.2.- Fosfatasa ácida endógena .	112
3.7.3.- Material vegetal seco	113
3.7.3.1.- Digestión sulfúrica	113
3.7.3.1.1.- Determinaciones	114
3.7.3.1.1.1.- Nitrógeno orgánico	114
3.7.3.1.1.2.- Potasio y Sódio	114
3.7.3.1.1.3.- Calcio y Magnesio	115
3.7.3.1.1.4.- Fósforo	115
3.7.3.2.- Digestión nítrico/perclórico	116
3.7.3.2.1.- Azufre orgánico	116
3.7.3.3.- Extracción de las formas solubles iónicas	116
3.7.3.3.1.- Con medio ácido	116
3.7.3.3.2.- Con medio acuoso	116
3.7.3.3.2.1.- Determinaciones	117
3.7.3.3.2.1.1.- Amonio	117
3.7.3.3.2.1.2.- Nitratos	117
3.7.3.3.2.1.3.- Cloruros	117
3.7.3.3.2.1.4.- Sulfatos	117
3.7.3.4.- Fracciones iónicas	118
3.7.3.4.1.- Fósforo	118
3.7.3.4.2.- Calcio y Magnesio	119
3.7.3.5.- Hidratos de carbono	120

3.8.- Productividad	122
4.- RESULTADOS Y DISCUSION	124
4.1.- Tratamiento estadístico	125
4.1.1.- Análisis de la varianza	125
4.1.2.- Test de Rango Múltiple de Duncan	126
4.1.3.- Coeficiente de regresión lineal	127
4.2.- Condiciones del cultivo	127
4.2.1.- Climatología	127
4.2.2.- Análisis edafológico	135
4.2.2.1.- Interpretación del análisis químico	135
4.2.2.2.- Interpretación del análisis físico	139
4.2.3.- El agua utilizada en el riego: análisis e interpretación	142
4.3.- Productividad	154
4.3.1.- Kilogramos por Hectáreas	154
4.3.2.- Número de frutos por Hectárea	160
4.3.3.- Evolución del número de frutos	164
4.4.- Rango óptimo en plantas de <i>Capsicum annuum</i>	166
4.4.1.- Parámetros del Nitrógeno	168
4.4.2.- Parámetros del Fósforo	170
4.4.3.- Parámetros del Magnesio	173
4.4.4.- Parámetros del Calcio	175
4.4.5.- Algunos nutrientes	177
4.4.6.- Balance iónico	179
4.5.- Respuesta de los parámetros foliares a los tratamientos	181
4.5.1.- Consideraciones sobre el efecto NK	182
4.5.1.1.- Actividad de la nitrato-reductasa, compuestos orgánicos nitrogenados y acidez iónica	182
4.5.1.2.- El Cl ⁻ , fracciones y formas nitrogenadas	191
4.5.2.- Efecto de la concentración externa sobre el contenido foliar	201
4.5.2.1.- Cationes monovalentes y sus formas	201
4.5.2.2.- Cationes divalentes: sus formas y fracciones	211
4.5.2.2.1.- Calcio y Magnesio	211
4.5.2.3.- Aniones	248

4.5.2.3.1.- Formas y razones del azufre	248
4.5.2.3.2.- El fósforo y su indicador bioquímico	252
4.5.2.3.3.- Fracciones de fósforo	257
4.5.3.- Balance iónico	264
4.5.3.1.- Aniones totales: inorgánicos y orgánicos	265
4.5.3.2.- Cationes totales	275
4.5.3.3.- Equilibrio electrostático	279
4.5.3.4.- Importancia de las razones	285
4.5.4.- Posibles indicadores fisiológicos del nivel iónico	289
4.5.4.1.- Pigmentos foliares	289
4.5.4.2.- Carbohidratos no estructurales	299
5.- CONCLUSIONES	307
6.- BIBLIOGRAFIA	310
7.- APENDICE	384
7.1.- Análisis estadístico	385
7.2.- Productividad	440
7.3.- Rango o intervalo óptimo	443

**OBJETO
DEL
TRABAJO**

Debido al avance en las técnicas de cultivo, aplicación de fertilizantes, mejora de la calidad de las semillas, uso de híbridos resistentes a enfermedades, etc..., el cultivo bajo plástico ha sufrido en los últimos años un incremento bastante importante, sobre todo en el sureste español. Una de las especies que su cultivo se ha visto incrementado, es el pimiento (*Capsicum annuum* L.).

Además se requiere un conocimiento más adecuado de las relaciones fertilización-salinidad debido a los requerimientos nutricionales de la especie, cantidad aplicada de fertilizantes y producción, haciendo que ejerza una fuerte influencia sobre el costo de la cosecha. Uno de los métodos de investigación para lograr dicho conocimiento es el uso conjunto del análisis foliar y bioquímico de los nutrientes.

Por consiguiente se creyó de interés investigar si estas técnicas podrían ser utilizadas en la elaboración de un diagnóstico nutricional de *Capsicum annuum*, que había sido cultivado en condiciones de invernadero industrial, empleando un sistema de fertirriego, utilizando para éste un agua bastante salobre.

Es por todo lo antes expuesto, que nuestros objetivos fueron tres:

- Determinar si las condiciones microclimáticas, existentes en el interior del invernadero, pudieran o no actuar como factores limitantes de la producción.

- Establecer la influencia de los fertilizantes N y K, en un medio de cultivo altamente salino, sobre la planta, así como sus relaciones.
- Y por último determinar los rangos o intervalos óptimos de macronutrientes, indicadores bioquímicos, fracciones y formas solubles de éstos.

Para la realización del presente trabajo se partió de muestras de hoja que procedían del ensayo con distintos niveles de fertilización NK, manteniéndose constantes las dosis de P, Mg y micronutrientes. Las sales fueron disueltas en el agua de riego, ésta a su vez presentaba unos niveles altos de concentración salina.

Utilizamos la variedad Lamuyo, y el ensayo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo Hortícola de la provincia de Almería.

INTRODUCCION

Cuando la concentración de un nutriente alcanza, de manera normal, niveles altos o bajos en una planta, aparecen síntomas característicos en hojas, tallos o frutos. Por regla general existe una correlación clara entre la deficiencia de cada elemento y los síntomas externos, de forma que puede permitir sin dificultad su reconocimiento en los casos más corrientes. 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; pigmentación excesiva del limbo foliar, tallos y frutos; hojas agrupadas en forma de roseta; fracaso en la expansión y desarrollo del limbo foliar así como enanismo parcial o completo de la planta. La interpretación de estos síntomas, en términos de trastornos minerales, se denomina diagnóstico visual. Sin embargo, los síntomas de las deficiencias están influenciados en un cierto grado no precisado por las condiciones ambientales como humedad, temperatura, intensidad luminosa, etc. que limitan el valor del diagnóstico visual. Asimismo el ataque de hongos, virus, bacterias, nematodos, artrópodos, etc. pueden provocar la aparición de síntomas que se puedan confundir con los de los verdaderos estados carenciales.

2.1.- Diagnóstico según sintomatologías.

El diagnóstico visual de los trastornos iónicos puede resultar una herramienta útil en aquellos cultivos en los que los síntomas específicos de deficiencias y/o toxicidad hayan sido descritos e ilustrados con exactitud (Weir et al., 1990; Weir y Sarooshi, 1991). Se trata del método más rápido para diagnosticar las causas del bajo rendimiento de las cosechas

debido a trastornos nutricionales, aunque en los países desarrollados, actualmente, son raras las deficiencias graves y los síntomas visuales inducidos por factores no iónicos. Por ejemplo: 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), con frecuencia dan como resultado síntomas visuales que podrían ser confundidos con trastornos o desequilibrios 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?.

El objetivo de este apartado es resaltar la existencia de algunas de las limitaciones que conlleva la utilización de los síntomas visuales como diagnóstico de los trastornos nutricionales y para expresar la importancia de su confirmación mediante el análisis foliar.

Los árboles *Laburnum vossii* muestran con frecuencia clorosis marginal e intervenosa en sus hojas, distorsión de las mismas, agrupaciones en forma de roseta y yemas terminales muertas, síntomas que podrían ser confundidos con una deficiencia en Cu, Zn o B (Weir, 1986; Shorrocks, 1989). Sin embargo, los análisis químicos de las hojas ponen de manifiesto concentraciones normales de los micronutrientes. Investigaciones a nivel micológico han demostrado la presencia de hongos

patógenos 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 resulta difícil diferenciar visualmente entre la necrosis marginal de la hoja debida a la deficiencia de K y la motivada por toxicidad o exceso de cloro. La alteración por exceso de Cl⁻, en plantas hortícolas, produce un aspecto bronceado de la hoja y necrosis marginal, sintomatología que comienza en las hojas seniles. Más tarde, las hojas más jóvenes muestran clorosis intervenal y necrosis, mostrando 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 forma 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 el cultivar, 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 12 a 17 mg/g de K en peso seco y las normales 20 mg/g en peso seco (Valenzuela, 1990).

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.) como el Mg (0.9 mg/g p.s.) 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, se duda de si la combinación de ambas 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 infectadas 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 ion está por debajo de 15 $\mu\text{g/g}$ en peso seco (Duffus, 1972).

Los virus pueden inactivar el hierro en las plantas. Investigaciones realizadas en camelias han puesto de manifiesto que plantas viróticas pueden responder al tratamiento con quelatos de hierro, aunque el contenido en hierro de las hojas sea bastante elevado para que éstas no respondan normalmente a la aplicación de dicho elemento. Las hojas reverdecen aliviándose los síntomas cloróticos debidos a la presencia del virus, que impide que el hierro, en cantidad suficiente para el normal funcionamiento de las hojas, pueda ser incorporado, sin embargo, al metabolismo de las mismas, ocasionando unos falsos síntomas de carencia de hierro. Los árboles infectados por el virus *stubborn* presentan frecuentemente síntomas de clorosis férrica, carencia de cinc y otras deficiencias.

El amarilleo de los árboles de pie franco en vivero es un virus de los agrios, pero que se puede confundir con una clorosis, frío, etc. El amarilleo de los nervios ha sido atribuido a varias causas, como tiempo frío, aguas freáticas elevadas, daño a las raíces, deficiencia de boro o fósforo y carencia estacional de nitrógeno, observándose que los síntomas fueron más acusados cuando los pies eran sensibles a los virus, como tristeza, xiloporosis y exocortis.

Como caso límite de la influencia de los virus en los niveles de nutrientes en las hojas está el hecho de que aparezcan diferencias no sólo cuantitativas entre los elementos, sino también cualitativas, en este caso más probablemente entre compuestos químicos, ya que resulta de gran interés para el diagnóstico bioquímico del virus. Se trataría de detectar modificaciones bioquímicas, especialmente las prematuramente iniciadas

por los virus, de carácter cualitativo y específicas, es decir, por ejemplo, la presencia de una planta afectada por un determinado virus de un producto que no se encontrara en una planta análoga sana 100 por 100, lo cual podría ser de gran interés para la detección de los virus por la precisión y muy probablemente gran sencillez del diagnóstico.

Se han visto diferencias significativas en la corteza de los árboles enfermos de oxocortis en relación con árboles sanos, en lo concerniente al contenido de aminoácidos y ciertos ácidos orgánicos. Realizando estudios sobre árboles enfermos de psoriasis se ha visto que la actividad peroxidásica es mucho más activa en la corteza que en las hojas de los árboles enfermos. Esto permite quizá establecer diagnósticos bioquímicos que pueden, además, diferenciarse de los concernientes a las verdaderas carencias, discriminando de esta forma si se trata de árboles enfermos por una u otra causa.

2.3.- Diagnóstico por medio del análisis de la planta.

El empleo del análisis químico ("versus" foliar) de una planta como método de diagnóstico no es nada 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 (Lundergårdh, 1951; Chapman, 1966; Bergman y Neubert, 1976; Molina, 1982; Sánchez, 1985; Guzmán, 1987; Valenzuela, 1990; Benton Jones Jr. et al., 1991). Los investigadores más antiguos emplearon la planta entera para realizar sus análisis, en tanto que los investigadores actuales prefieren, generalmente, partes de la planta para

obtener información referente a su actividad metabólica; por ejemplo, hojas, peciolo, cortezas, raíces, frutos, yemas, muestreadas en etapas del crecimiento muy concretas, y estableciendo escalas o niveles de actividad y concentración de iones en dichas partes de la planta.

Algunos investigadores determinan, solamente, fracciones de nutrientes que son solubles en ácidos débiles o en soluciones tamponadas (Nicholas, 1957; Yoneragan et al, 1991) o en tejido conductor (Scaifer, 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 (Sánchez et al., 1989).

2.3.1.- Organos que pueden ser analizados.

2.3.1.1.- Análisis de la hoja.

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 que ésta crecía, era lógico suponer que el análisis químico del vegetal podría usarse como método para valorar el aporte de los nutrientes necesarios en el 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.

La idea de usar el análisis de las plantas para determinar las necesidades de nutrientes del suelo, ha dominado el área de la nutrición vegetal durante muchos años. En los dos últimos decenios han surgido gran cantidad de trabajos experimentales que han provocado un cambio gradual, pero fundamental, en la forma de pensar, ya que se ha puesto de manifiesto que en muchas situaciones, y para una gran variedad de especies vegetales, la composición química de las mismas o de sus tejidos pueden reflejar directamente el estado de los nutrientes o las necesidades por parte de las plantas (Heinen et al., 1991).

Recientemente, y quizás como resultado de los avances en el conocimiento y entendimiento de los papeles y funciones que ejercen los elementos minerales, se están desarrollando nuevas metodologías que difieren, en principio, de las técnicas analíticas. Estas están basadas en cambios fisiológicos o bioquímicos específicos provocados por deficiencias o, alternativamente, en respuestas específicas inducidas en las plantas o en sus tejidos mediante la adición de elementos deficientes (Usuda y Shimogawara, 1991).

2.3.1.1.1.- 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.

En este sentido, 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, así como 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.

Lunderghårdh (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 mismos 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 (Sánchez et al., 1992). 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 (Sarooshi et al., 1991; Thys et al., 1991; Guzmán et al., 1992; López-Cantarero et al., 1992).

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 laboratorio donde transcurre la mayor parte 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. 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 para luego cuantificar las escalas o niveles nutricionales de la hoja que estén asociados a deficiencias (síntomas presentes), deficiencias sub-clínica o deficiencia oculta (ausencia de síntomas), niveles críticos (cerca de la suficiencia) y toxicidad (ver Fig. 1) (Guzmán, 1987).

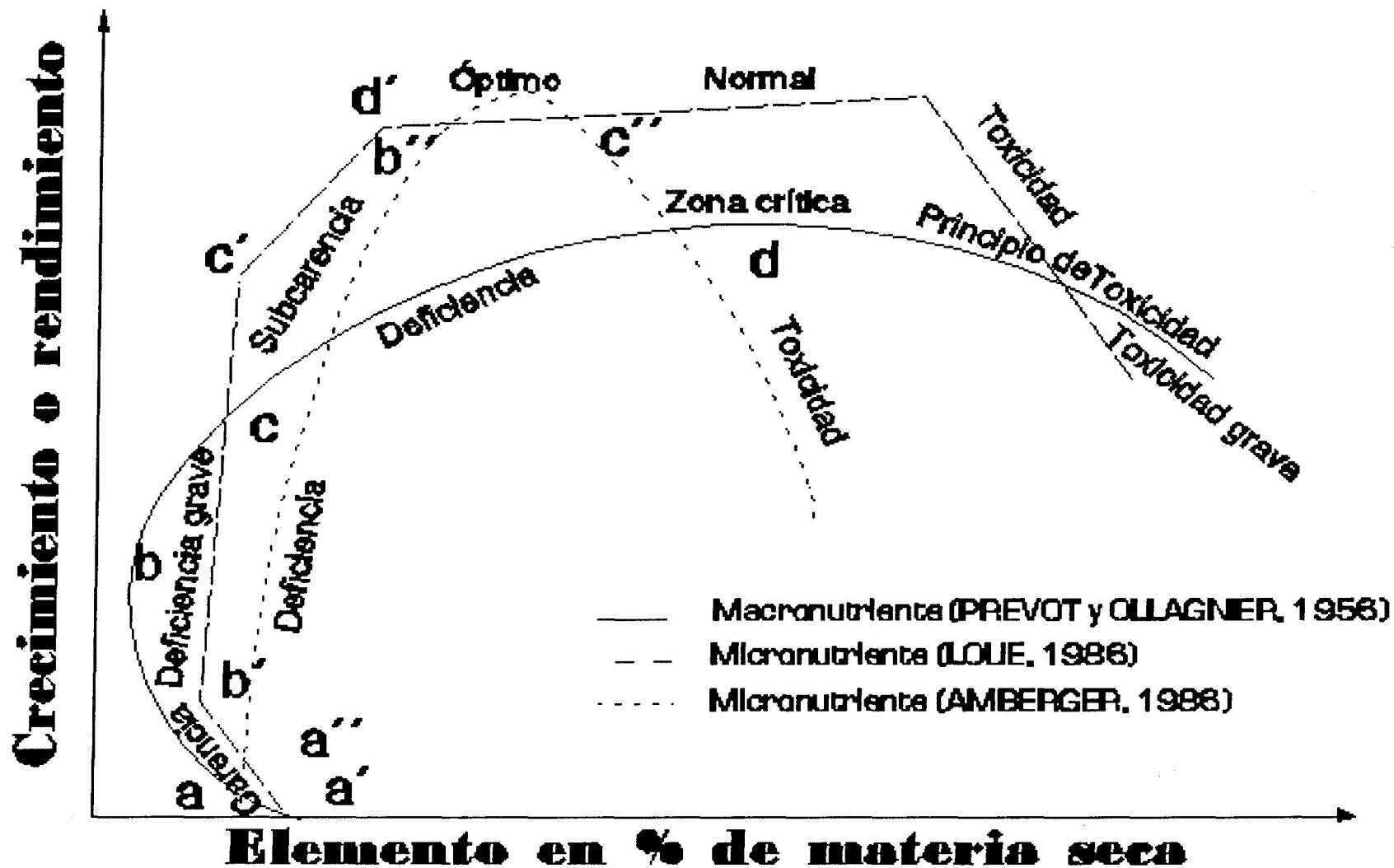


FIGURA 1.- Relación entre el rendimiento y el nivel en un elemento nutritivo.

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 nutriente 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 (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), sandía (Vargas et al., 1989) o en otras hortícolas (Guzmán et al., 1990).

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 prateras y cereales iban desde 0.5 a 1 mg/g de Ca en peso seco. Estos valores son mucho más bajos que los valores críticos del ion de lo que se dijo para el Ca

(Guzmán, 1987), diferencia que los autores atribuyen a las condiciones de suministro del Ca.

2.3.1.1.2.- Nutrientes solubles.

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 estos 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 la 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 resultando posible el diagnóstico 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 la 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 nutrición 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).

2.3.1.1.2.1.- Material seco.

El estudio de los nutrientes solubles es antiguo (Oserkowky, 1932 y 1933) pero dicha línea de interpretación se ha continuado hasta nuestros días (Sánchez et al., 1989). 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 potenciabilidad nutritiva del

vegetal en estudio y también es posible identificar en qué forma química se encuentra, así como la estructura orgánica de la que forma 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 Takka 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 microkjeldahl. 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 (Carpena-Ruiz et al., 1990).

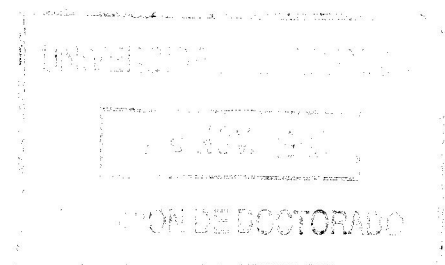
Smith en 1962 decía que "fracciones solubles en extractos se usan a veces sin que se haya demostrado la existencia de alguna ventaja especial". Desde aquella época parece haberse demostrado cierta ventaja con el SO_4^- y con el NO_3^- en ciertos casos. Varios investigadores creen que los métodos analíticos usados con fracciones solubles son más fáciles de usar, principalmente porque evitan que el material vegetal se convierta en cenizas, Oserkowky (1932 y 1933).

Con frecuencia, 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 información del estado nutricional de la planta. Esta 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 anhídrida carbónica (Rahimi y Schropp, 1984).

Por diversas razones (Dekock et al., 1979) el contenido de Fe total no es un indicador fiable del estado nutritivo del 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 (Romero, 1986; Guzmán et al., 1986a). 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 óxido-reducción reversible $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (Bienfait, 1985). La determinación del Fe^{2+} en extractos de hojas o la extracción con ácidos diluidos para la caracterización del Fe^{2+} (Vargas et al., 1988) mejora considerablemente la correlación entre el contenido de clorofila y el Fe. Parece que también es un indicador apropiado para la caracterización del nivel crítico de la producción (Katyal y Sharma, 1984).

Nicholas (1957), Molina (1982) 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 para 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). La concentración de NO_3^- en la base del tallo de trigo, medida de manera semicuantitativa (Beringer y Hess, 1979) o cuantitativa (Papastylianou et al., 1982), así como la cantidad de NO_3^- en los peciolos de las hojas plenamente expandidas de la remolacha azucarera (Gilbert et al., 1983), el algodón (Tabor et al., 1984), centeno (Hylton et al., 1965 a), girasol (Homenauth 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 (Huett, 1985). En principio este método es apropiado para todas las especies anuales, en las que el NO_3^- es la forma principal absorbida radicularmente y desplazada a los brotes. En 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 presentes 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 (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 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 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). Análogamente, 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 solubles en alcohol no prometen ser especialmente prometedoras.

Hylton et al. (1968) demostraron que el SO_4^- era idóneo para diagnosticar el estatus de S orgánico o total en tallos de centeno. El empleo de 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 SO_4^- . Para calcular el estado nutritivo del S en planta, el contenido de SO_4^- , principal forma de almacenamiento del nutriente, es mejor indicador que solo el contenido de S total (Frenergy et al., 1978) y en arroz (Islam y Ponnampereuma, 1982) parece ser la proporción de SO_4^- respecto al S total. En plantas plurianuales la determinación de los niveles de SO_4^- se reconoce como medida útil del S total y también en *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii* (Turner, 1979). Se ha demostrado que los

niveles de SO_4^- pueden ser un importante método para 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 SO_4^- como porcentaje de 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 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*, encontrando que estaban fuertemente 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_4^{3-} soluble en acético es preferido al P total por algunos investigadores (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 incluso dichas fracciones

distorsionan sus proporciones cuando la planta es sometida a una fertilización nitrogenada (Valenzuela, 1987; Valenzuela et al., 1992).

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 (1962a) realizan un estudio sobre la forma en que el P se almacena en tubérculos de patata, llegando a la conclusión de que está en forma de fitatos, que son sales del ácido fítico (Samotus y Schwimmer, 1962b), llegando a ser dicha forma el 15-30% del P total (Quick y Li, 1976).

El siguiente paso se intenta con plantas enteras; para ello se utiliza *Cuscuta reflexa* y se logran identificar dos clases de P: ácido soluble y ácido soluble inorgánico (Tewary y Singh, 1964). Más tarde Barker y Manson (1964) extraen el denominado P inorgánico y el orgánico, ambas formas obtenidas a partir de 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 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 (Valenzuela et al., 1992).

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. Un 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; Vargas et al., 1991), mientras que en folio los de tomate la forma soluble y orgánica tenían

igual concentración, y en pepino la forma predominante fue la inorgánica (Valenzuela, 1987; Valenzuela et al., 1992). 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 éstas crecen 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*. Un estudio realizado por Valenzuela et al. (1992), en plantas de tomate y pepino, demuestra que las fracciones de Ca, orgánico e inorgánico, ambos insolubles, forman el 50% y el 80% del Ca total en tomate y pepino respectivamente.

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. 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 extractante diferente: 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.

La influencia del N o el P, aplicados sobre la rizosfera, sobre la concentración de las diversas fracciones de Mg, pueden quedar enmascaradas por un efecto cruzado de ambos macronutrientes, pero el estudio de la acción individual puede permitirnos eliminar y clasificar la actitud directa, pero dichas formas del Mg en el tejido vegetal, de cada uno de los nutrientes presentes en el substrato de crecimiento. Es en el nivel bajo de N donde se presentan las mayores concentraciones foliares de las diferentes fracciones, salvo en el caso del Mg residual. Esta última fracción así como la del Mg unido a aniones ácidos orgánicos, son las únicas que se dejan sentir por la influencia de las diversas concentraciones rizosféricas del P, mientras que las restantes fracciones nos muestran diferencias entre los tratamientos del anión (N) (López-Cantarero, 1992).

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

orientaciones 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.

2.3.1.1.2.2.- 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... Cuando a los vegetales se les suministra iones en gran cantidad, una proporción de éstos no queda totalmente integrada en el tejido y suele estar en forma soluble. Por ejemplo; muchas plantas acumulan NO_3^- en el tejido conductor y asimilador (Valenzuela, 1990) si el suministro de dicha forma nitrogenada excede a la capacidad de la planta para reducir NO_3^- (Schrader et al., 1968; Maynard et al., 1976; Smirnov y Stewart, 1985), 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 (Valenzuela, 1990). Por el contrario, si el suministro de nutrientes es restringido la concentración de iones solubles en el tejido conductor decaerá (Guzmán, 1987). 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.

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 de Morgan". Estos análisis, o tests 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 "reactivo de Morgan" durante 15 minutos, pasado dicho tiempo se filtra. Si aparece coloración se debe de eliminar mediante la adición de 0.2 g 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 asociados 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 forma se establecieron las concentraciones críticas de nutrientes presentes en el tejido conductor con respecto al NO_3^- , P, K y Mn, no siendo posible con el otro nutriente. Este método de campo demostró que eran factibles 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 pocos minutos y en casi todas las especies vegetales.

2.3.1.2.- Análisis del peciolo.

En la elección de un órgano para su análisis pueden usarse distintos criterios, 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 cuestión que se esté tratando. Un cambio en el abastecimiento de los nutrientes puede afectar de forma acentuada la morfología de la planta, y por lo tanto, alterar la proporción de la materia seca distribuida en los diferentes órganos. Es importante que esto no deteriore la correlación entre el contenido de nutrientes y el crecimiento o producción (Benton Jones Jr. et al., 1991).

Aunque generalmente se emplee 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 mejor indicación 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). 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, quedan 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 (Wills et al., 1976). En algunas variedades de manzana las áreas necróticas pueden hallarse situadas a gran profundidad 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 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 lo está la composición del corazón y la pulpa. 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 $\mu\text{g/g}$ de Ca peso seco) mostraron una pequeña superficie (12%) afectada por el moteado mientras que más del 50% de los frutos manifestaban dicho síntoma cuando la media de la concentración de Ca en piel era inferior al 0.05% en materia seca (500 $\mu\text{g/g}$ de Ca p.s.). Chiu y Bould (1977) también usaron la piel para relacionar el contenido de Ca y la incidencia del moteado de las manzanas, encontrándose que muy pocos frutos (cv. Egremont Russet) desarrollaron el moteado cuando el Ca de la piel excedía de 450 $\mu\text{g/g}$ en materia seca y las manzanas con una concentración en Ca superior a 500 $\mu\text{g/g}$ en materia seca estaban libres de dicho moteado. Parecía, por lo tanto, como si los diversos cultivares pudieran tener diferentes concentraciones críticas de dicho nutriente.

La aparición de necrosis en el extremo de las flores de los tomates está producida por una deficiencia de Ca cuando los frutos se están desarrollando (Lyon et al., 1942) aunque puede que haya una amplia cantidad de Ca en los folíolos. El análisis químico de los frutos afectados por el Ca se puede usar para confirmar dicho trastorno (Chiu y Bould, 1976).

La deficiencia de B en frutos de manzana produce una suberificación del exterior e interior, un acorchamiento del denominado corazón y graves distorsiones del fruto (Demetriades et al., 1963). Estos trastornos están asociados a concentraciones de B en fruto de 5 a 10 $\mu\text{g/g}$ de materia seca, siendo el contenido normal más de 10 $\mu\text{g/g}$ de materia seca.

la deficiencia de B en las peras produce depresiones superficiales en el fruto, extendiéndose por debajo de la pulpa junto con una suberificación de dicho tejido, y un agrietamiento en los frutos afectados gravemente por dicha carencia (Johnson et al., 1955). Estos síntomas pueden ser mal interpretados, pues hay un virus (virus del hueso pétreo) que produce análogos efectos y ello solo puede ser confirmado por medio del análisis del fruto para comprobar el contenido de dicho nutriente (Johnson et al., 1955).

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 del manzano en comparación con el virus cuyo efecto es un agrieteo en forma de estrella, asociado al exceso de Mn (Berg y Clulo, 1946), la existencia de granos internos en los brotes del manzano y del 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 et al., 1941), o para determinar el nivel

de P en *Hevea brasiliensis* (Marel, 1960), 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 de 1750 $\mu\text{g/g}$ en peso seco de corteza, aparecen 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 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 caracterizada por hojas de menor tamaño y agrupadas en forma de roseta, sobre todo 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 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 en base a su edad fisiológica y a la movilidad de los nutrientes, más que sobre los cambios estacionales anuales (Guzmán, 1987). Para la mayoría 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 et al., 1980). Estos nutrientes son relativamente inmóviles una vez metabolizados y no se transportan desde las hojas viejas a las jóvenes bajo condiciones de alteraciones iónicas (Guzmán, 1987). Es recomendable recolectar de 25 a 100 o más unidades (hojas y/o peciolo) por muestra 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 (Guzmán, 1987). Detalles más completos de lo anteriormente expuesto se dan en la TABLA 1.

TABLA 1.- Organo analizado y estadio fenológico para distintos nutrientes y especies según diversos autores.

ESPECIE	NUTRIENTE	ESTADIO	TEJIDO	REFERENCIA
<i>Beta vulgaris</i>	P	Mitad de ciclo biológico	Peciolos	Hills y Ulrich, 1978
<i>Capsicum annum</i>	K	Inicio de la fructificación	Peciolos	Lorenz y Tyler, 1978
	P	"	"	"
<i>Chrisantemun morifolium</i>	N	Madurez	Hojas	Lunt y Kofranek, 1964
	P	"	"	"
<i>Citrullus lanatus</i>	K	Fructificación temprana	Peciolo de la 6ª hoja	Lorenz y Tyler, 1978
<i>Cucumis melo</i>	NO ₃	Primer fruto maduro	Peciolo de la 6ª hoja	Lorenz y Tyler, 1978
<i>Dianthus cariophyllus</i>	B	Mitad del ciclo biológico	4º o 5º par de hojas desde la base	Oertli, 1964
<i>Gossypium hirsutum</i>	Fe	Plantas de 2 meses de edad	Limbo foliar	Vretta-Kouskoleha y Kallinis, 1968
<i>Junglans nigra</i>	Fe	Madurez	Hojas	HacsKaylo et al., 1969
<i>Lycopersicon esculentum</i>	P	Floración temprana	Peciolo de la 4ª hoja	Lorenz y Tyler, 1978
<i>Nicotiana tabacum</i>	Fe	Madurez	Hojas	Oertli y Jacobson, 1960
<i>Persea americana</i>	Fe	Madurez	Hojas	Bingham y Beutel, 1957

TABLA 1.- (Continuación).

ESPECIE	NUTRIENTE	ESTADIO
<i>Pisum sativum</i>	Fe	Madurez
<i>Solanum tuberosum</i>	NO ₃	Inicio del ciclo biológico
	P	"
<i>Cucumis melo</i> vars.	Macronutrientes	Madurez
	Micronutrientes	"
<i>Citrullus lanatus</i> vars.	Macronutrientes	Madurez
	Micronutrientes	"
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Macronutrientes	Madurez
	Micronutrientes	"
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Macronutrientes	Madurez
	Micronutrientes	"
<i>Solanum melongena</i>	Macronutrientes	Madurez
<i>Zea mays</i>	Fe	Madurez

TEJIDO

REFERENCIA

Hojas	Oertli y Jacobson, 1960
Pecíolo de la 4ª hoja	Lorenz y Tyler, 1978
"	"
Hojas	Sánchez, 1987
"	"
Hojas	Vargas, 1987
"	"
Hojas	Valenzuela, 1987
"	"
Hojas	Guzmán, 1987
"	"
Hojas	López-Cantarero et al., 1992
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 requiere un mínimo de dos muestras, a menos que se disponga de los valores normales y deficientes o tóxicos de los nutrientes (Guzmán, 1987; Sánchez, 1987; Vargas, 1987), consistiendo una en hojas que muestren síntomas típicos de trastorno y, la otra, para comparar 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 nutrientes, o polvo, y se requieren para el análisis de los iones, se debería aplicar en primer lugar, un procedimiento de limpieza. Una vez recolectadas las muestras, antes de secarse, deberían enjuagarse rápidamente en una disolución 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.

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, molerlas en un molinillo 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 durante dos años sin cambios significativos en la composición iónica (Sánchez, 1977).

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

La concentración de nutrientes en hoja está influida por el medio ambiente, el suministro de iones (Valenzuela, 1990), la edad y posición de la hoja (Guzmán, 1983; Guzmán et al., 1991), así como el tamaño y calidad del fruto (Sánchez, 1987; Vargas, 1987; del Río et al., 1992). 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 a la hora de interpretar los datos del análisis foliar como método de diagnóstico (Bates, 1971).

2.3.3.1.- 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 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 contenido de nutriente, en función de la edad varía según la especie y según el nutriente. Cualquier método 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 no deficiente tendría cinco. Las hojas más viejas de las plantas de cinco hojas serían fisiológicamente más viejas que las de las plantas de tres hojas, dando como resultado una edad media diferente para las plantas deficientes y no deficientes. Guzmán et al. (1991) demostraron que la concentración de P en plantas hortícolas disminuye con la edad. Así pues, aunque cabría 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 debido, probablemente, tanto al contenido de nutriente cambiante de un tejido dado con la edad, las hojas por ejemplo, como al 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 dosis superiores a las necesarias, 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 crecimiento mientras que en el tejido más viejo permanezca 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 (Guzmán et al., 1991)

Un examen del cuadro adjunto (TABLAS 2 y 3) muestra que muchas de las curvas de respuesta en forma de C se obtuvieron con tejidos tales como la planta entera, paja, grano o los tallos inferiores que no se podía esperar que suministraran tejido de la misma edad fisiológica, tanto sobre las plantas bien abonadas como 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), Rossell y Ulrich (1964), Saalbach y Judel (1966) puestos en las listas 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 en 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 (Guzmán, 1987; Sánchez, 1987; Valenzuela, 1987; Vargas, 1987; Valenzuela, 1990). 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.

TABLA 2.- Ejemplos de tejido y órganos analizado para la obtención del nivel óptimo, en algunos macronutrientes.

NUTRIENTE	MEDIO DE CULTIVO	ESPECIE	TEJIDO	REFERENCIA
P	Suelo	<i>Hordeum vulgare</i>	Paja	Poulsen 1950
Mg	Suelo	<i>Avena sativa</i>	Paja	Jacobsen y Steenbjerg 1964
S	Suelo	<i>Lolium multiflorum</i>	Hoja	Saalbach y Judel 1966
Macronutrientes	Invernadero	<i>Cucumis sativus</i>	8ª hoja	Guzmán et al. 1992
Macronutrientes	Invernadero	<i>Cucumis melo</i>	6ª hoja	Valenzuela et al. 1992
Macronutrientes	Invernadero	<i>Capsicum annuum</i>	4ª hoja	Guzmán et al. 1992
Macronutrientes	Invernadero	<i>Solanum melongena</i>	4ª hoja	López-Cantarero et al. 1992
S	Solución	<i>Lolium multiflorum</i>	Tallos	Ulrich et al., 1968

TABLA 3.- Ejemplos de tejido y órganos analizado para la obtención del nivel óptimo, en algunos micronutrientes.

NUTRIENTE	MEDIO DE CULTIVO	ESPECIE	TEJIDO	REFERENCIA
Cu	Suelo	<i>Avena sativa</i>	Planta entera	Steenbjerg 1945
Mn	Suelo	<i>Avena sativa</i>	Planta entera	Steenbjerg 1945
Cu	Suelo	<i>Hordeum vulgare</i>	Paja	Steenbjerg 1951
Cu	Suelo	<i>Hordeum vulgare</i>	Granos	Steenbjerg 1951
Mn	Arena	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tallo inferior	Hewitt 1956
Zn	Solución	<i>Zea mays</i>	Planta entera	Hiatt y Massey 1958
Zn	Campo	<i>Zea mays</i>	Planta entera	Hiatt y Massey 1958
Zn	Solución	<i>Beta vulgaris</i>	Peciolos maduros	Rossel y Ulrich 1964
Zn	Solución	<i>Beta vulgaris</i>	Limbo foliar	Rossel y Ulrich 1964
B	Solución	<i>Betula sp</i>	Raíces	Ingestad 1964
Micronutrientes	Invernadero	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hojas	Guzmán et al. 1990
Micronutrientes	Invernadero	<i>Cucumis melo</i> vars.	Hojas	Sánchez et al. 1989
Micronutrientes	Invernadero	<i>Cucumis sativus</i>	Hojas	Valenzuela et al. 1988
Micronutrientes	Invernadero	<i>Solanum melongena</i>	Hojas	López-Cantarero et al. 1993
Zn	Solución	<i>Medicago sativa</i>	Tallos	Lo y Reisenauer 1968

Aunque la concentración de nutrientes en el tejido de la planta, cambia con la edad de la misma, existe duda respecto a si la concentración crítica cambia con la edad de ésta. Lorenz et al. (1964), Guzmán (1987), Valenzuela (1990) y Lewis (1992) 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 de *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 todas relacionados con el mismo rendimiento final, no es posible determinar en qué momento o momentos, durante el período de crecimiento, eran críticas las concentraciones en las plantas, mostrando la existencia de un modelo similar en la concentración de nutrientes con el tiempo. 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 los primeros 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 una 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. Los primeros 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 Guzmán et al. (1990) 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, 1985; 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), castaño (Guzmán et al., 1986b), hortícolas (Guzmán, 1987). 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 períodos de crecimiento distintos. En el primer período, cuando las hojas se están expandiendo rápidamente, los cambios en la concentración y las variaciones de un día para otro pueden ser bastantes 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 período 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 Guzmán et al. (1990) concluyeron que para los hortícolas, 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 elementos y necesitan ser estudiados separadamente.

2.3.3.2.- 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 (Guzmán y Romero, 1985). Las interacciones de los nutrientes pueden ser positivas o negativas.

Expresiones alternativas para el mismo fenómeno son sinergismo y antagonismo. El antagonismo puede ocurrir durante la captación de los iones, durante la translocación y la acumulación en los tejidos o en el metabolismo. 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). 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; Ruhl, 1991). Inversamente, cambios en la

concentración foliar de Mg vienen acompañados, normalmente, por cambios opuestos en el K de las hojas. Efectos antagónicos han sido ampliamente 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 el entorno de la raíz provoca la precipitación del Zn y del Fe en los tejidos conductores, pudiendo provocar la clorosis férrica (Guzmán et al., 1986 a) o el moteado de las hojas como señal de deficiencia de Zn (West, 1938). En ambos casos, parece ser que tiene lugar una precipitación de los elementos a niveles traza en forma de fosfatos. 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 (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 esta relacionada con la relación P/Zn y no con la concentración de Zn en los tejidos (Loneragan et al., 1979).

Existe otro tipo de interacción referida al denominado por Lundergårdh (1966) como pseudo-antagonismo o deficiencia inducida, 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 se manifiesta 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 conocido (Bouma, 1961). En experiencias de campo diseñadas para aunar criterios para la detección de la deficiencia de S en cultivos de trébol subterráneo, Bouma et al. (1969) encontraron correlación 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 la aplicación 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 dicen Chapmam (1966) y Valenzuela (1990) 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 para 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.

Chapman (1967) y Valenzuela (1990) han destacado que el análisis de las planta es solamente capaz de detectar la deficiencia de un solo nutriente a la vez. 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 deficiencia. Cuando se aplicaba K el rendimiento aumentaba y disminuía la concentración de N, indicando la deficiencia de éste que no existía hasta que la adición de K había aumentado el rendimiento y, por consiguiente, la necesidad de N.

Aunque lo anteriormente expuesto es una simple ilustración de la ley del mínimo de Liebig, apenas 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 particularmente cierto para diferentes nutrientes, cosechas y condiciones de cultivo (TABLA 3). Existe una considerable discrepancia respecto a la importancia de esta interacción. No obstante, Jakobsen y Steenbjerg (1964) encontraron que las interacciones eran un problema tan importante que "la interpretación del análisis de la planta es fundamentalmente muy difícil y en la parte práctica frecuentemente será imposible dar solución correcta". Este punto de vista

TABLA 4.- 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 +	<i>Rubus idaeus</i>	Arena	Bould 1964
P	N +	<i>Rubus idaeus</i>	Arena	Bould 1964
K	Mg +	<i>Rubus idaeus</i>	Arena	Bould 1964
Mg	K +	<i>Rubus idaeus</i>	Arena	Bould 1964
N	P +	<i>Ribes nigrum</i>	Arena	Bould 1969
P	N +	<i>Ribes nigrum</i>	Arena	Bould 1969
N	P +	<i>Zea mays</i>	Campo	Dumenil 1961
P	N +	<i>Zea mays</i>	Campo	Dumenil 1961
N	K ±	<i>Beta vulgaris</i>	Campo	Gutstein 1968
K	N +	<i>Beta vulgaris</i>	Campo	Gutstein 1968
N y K	Fe ±	<i>Solanum melongena</i>	Invernadero	López-Cantarero, 1992
N, P, K	Fe ±	<i>Cucumis melo</i>	Invernadero	Valenzuela, 1990
K	Na -	<i>Lolium multiflorum</i>	Solución	Hylton et al. 1967
Mg	K ±	<i>Avena sativa</i>	Suelo	Jakobsen y Steenbjerg 1964
P	K +	<i>Glicine max</i>	Campo	Miller et al. 1961
Cu	Fe ±	<i>Lactuca sativa</i>	Solución	Moore et al. 1957
P	N +	<i>Arachis hypogaea</i>	Campo	Prevot y Ollagnier 1956
K	Na -	<i>Beta vulgaris</i>	Solución	Ulrich et al. 1959
N	P +	<i>Zea mays</i>	Campo	Voss et al. 1970
P	K +	<i>Poa pratensis</i>	Campo	Voss et al. 1970
K	P +	<i>Poa pratensis</i>	Campo	Walker y Pesek 1967

bastante pesimista 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. Bould (1964) y Romero (1992) 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 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 representar 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 (Miller et al., 1961). Cuando Bould (1964) 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 parte plana bastante larga solamente cuando el Mg era limitante. Parece posible que haya solamente una escala ancha de concentración sobre la que resulta inafectado el rendimiento cuando algún otro nutriente, o el agua, es limitante.

López-Cantarero (1992) afirmó que "el equilibrio de nutrientes se hace más crítico al aproximarse al nivel óptimo". Este punto de vista es 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. No obstante, tanto las concentraciones de N como de K se vieron fuertemente afectadas por la humedad del tejido y la interacción N-K no era importante en la ecuación de regresión cuando se incluía la humedad del tejido como variable.

2.3.3.3.- Factores endógenos.

La concentración de los nutrientes en los tejidos de la planta está fuertemente influenciada por el desarrollo de la fruta o cosecha (Guzmán, 1987; Valenzuela, 1990; López-Cantarero, 1992) 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, aumenta con el desarrollo de la cosecha. Existen también marcadas interacciones entre los efectos de la adición de los fertilizantes en el desarrollo de la cosecha, de las naranjas Nave, 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 estar los hallazgos encontrados en 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 con respecto 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, 1961). Por esta razón, las muestras de hojas se suelen estandarizar; algunos prefieren hojas de las proximidades de los frutos y otros de las parte 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. Los factores genéticos también pueden ser importantes (Vose, 1984; Clark y Duncan, 1991; Clark, 1991).

2.3.3.4.- Factores exógenos.

El tiempo varía no solamente de una zona a otra, sino en cualquier zona de un año a otro, de semana en semana, e incluso de un día para 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 afectados de forma apreciable por las condiciones ambientales en, o antes del muestreo (Mitchell, 1964).

Debido a que las condiciones ambientales sí que varían durante cortos períodos de tiempo, afectarán a la validez del análisis de la planta si alteran la concentración de nutriente 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 (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 de los efectos propios de una excesiva humedad son una pérdida de nutrientes por drenaje, erosión y una disminución de la disponibilidad de algunos elementos debido a la falta de 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 afecten 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. Waldleigh 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 Shapter (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).

Lundergårdh (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 (Finn y Mack, 1964; Doss y Scarsbrook, 1969; Seligman et al., 1992) 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 el 56%, pero con el Ca eran algo más pequeñas. Los autores dieron cierto número de referencias sobre este tema. Emmert (1959) también dio 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 del aire ejercía efecto sobre la concentración de P, K, Ca y Mg en plantas de maíz. Wilberg y Kousiahi-Tork (1968) encontraron que el contenido de Ca

en 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 con frecuencia es 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.

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, peciolo 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 J/m²/s que bajo 2600 J/m²/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 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 encuentra 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) demostró que la temperatura del suelo y la intensidad de la luz afectan 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, encontrándose la concentración mínima de N en el momento de alta intensidad de la luz, hojas calientes y raíces frías; los valores máximos, para la raíces calientes, hojas frías y baja intensidad de la luz. Este autor encontró un efecto similar de la luz y la temperatura sobre la concentración de P. Schmith y Blaser (1969) encontraron efectos similares de la luz y la temperatura sobre la concentración de N en *Cynodon sp.* Algunos han demostrado que la temperatura de la solución en un cultivo hidropónico o del suelo (Roberts y Kenworthy, 1956; Wallace et al., 1969) y la intensidad de la luz (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 o el 30% menos de luz del sol. Ulrich (1964) mostró la existencia de algún efecto de luz sobre las concentraciones críticas del $\text{NO}_3\text{-N}$ en las remolachas azucareras, pero consideró las diferencias demasiado pequeñas como para ser importantes.

