

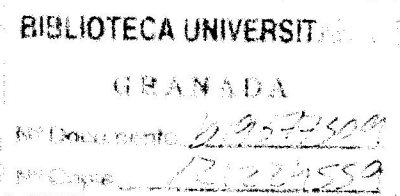


Universidad de Granada-Facultad de Ciencias

**COMPORTAMIENTO DE ALGUNOS ÓRGANOS DEL PEPINO
HOLANDES (*Cucumis sativus* L. c.v. Brunex)
SOMETIDOS A UNA ACCIÓN DEL N, P, K**

Zouhaire Lamrani

**TESIS DOCTORAL
GRANADA , 1995**



PROV. T-15 / 110

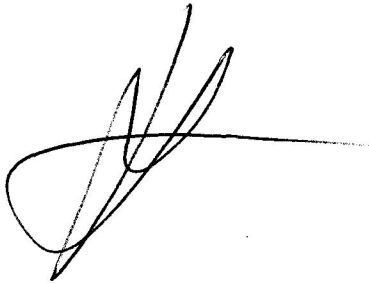
Universidad de Granada-Facultad de Ciencias

**COMPORTAMIENTO DE ALGUNOS ÓRGANOS DEL PEPINO
HOLANDES (*Cucumis sativus* L. c.v. Brunex)
SOMETIDOS A UNA ACCIÓN DEL N, P, K**

Zouhaire Lamrani

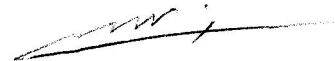
**TESIS DOCTORAL
GRANADA , 1995**

El presente trabajo de investigación titulado "Comportamiento de algunos órganos del Pepino Holandes (*Cucumis sativus* L. c.v. Brunex) sometidos a una acción del N, P, K", para aspirar al grado de Doctor en Biológicas que presenta el Licenciado Zouhaire Lamrani 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 M^a Romero Monreal.



Dr. Luis M^a Romero Monreal

Zouhaire Lamrani
Aspirante al grado de Doctor



Granada, 5 de Junio de 1995

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 19-6-95
ENTRADA N.º 1330



INDICE

1. Objetivos.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Sistema suelo-raíz.....	3
2.2. Diagnóstico según sintomatología.....	7
2.3. ¿Cual es el diagnóstico?.....	11
2.4. Diagnóstico por medio del análisis de la planta.....	15
2.4.1. Organos o tejidos que pueden ser analizados.....	17
2.4.1.1. Análisis de la hoja.....	17
2.4.1.1.1. Nutrientes totales.....	19
2.4.1.1.2. Nutrientes solubles.....	23
2.4.1.1.2.1. Material seco.....	24
2.4.1.1.2.2. Material fresco.....	34
2.4.1.2. Análisis del peciolo.....	36
2.4.1.3. Análisis del fruto.....	37
2.4.1.4. Análisis de la corteza.....	39
2.4.1.5. Análisis de la savia.....	40
2.4.1.6. Análisis de las raíces.....	44
2.4.1.7. Análisis del mantillo.....	45
2.4.2. Muestreo y preparación del órgano analizado.....	46
2.4.3. Factores que afectan a la concentración de nutrientes en el órgano analizado.....	49

2.4.3.1. Edad del órgano.....	49
2.4.3.2. Interacciones iónicas.....	60
2.4.3.3. Factores endógenos.....	67
2.4.3.4. Factores exógenos.....	71
2.4.4. Relación positiva entre el diagnóstico visual y el análisis foliar.....	81
2.5. Indicadores bioquímicos.....	84
2.5.1. Actividad enzimática específica.....	86
2.5.1.1. Macronutrientes.....	86
2.5.1.2. Micronutrientes.....	91
2.5.1.3. Reactivación o inducción enzimática.....	97
2.6. ¿Son útiles los pigmentos en el diagnóstico?.....	99
2.7. Productos metabólicos como indicadores de la distorsión iónica.....	101
2.8. Indicadores histológicos.....	104
2.9. Resumen sobre diagnóstico nutricional.....	105
2.10. Consideraciones finales.....	108
3. Material y Métodos.....	110
3.1. Características del invernadero.....	110
3.2. Especie estudiada.....	110
3.2.1. Generalidades.....	110
3.2.2. Encuadramiento taxonomico y descripción botánica.....	111

3.3. Características de las parcelas.....	111
3.3.1. Tratamientos o parcelas.....	112
3.4. Parámetros ambientales.....	113
3.5. Suelos.....	114
3.5.1. Toma de muestras.....	115
3.5.2. Preparación de las muestras.....	115
3.5.3. Análisis de las muestras.....	116
3.5.3.1. Análisis físicos.....	116
3.5.3.2. Análisis químico.....	117
3.6. Agua.....	119
3.6.1. Recolección de las muestras de agua.....	120
3.6.2. Análisis de las muestras.....	120
3.7. Plantas.....	121
3.7.1. Toma de muestras vegetales y su preparación.....	124
3.7.2. Preparación de las muestras para material fresco.....	125
3.7.2.1. Material vegetal fresco.....	125
3.7.2.1.1. Proteínas solubles.....	125
3.7.2.1.2. Aminoácidos solubles.....	125
3.7.2.1.3. Pigmentos.....	126
3.7.2.1.3.1. Clorofilas.....	126
3.7.2.1.3.2. Carotenos.....	126
3.7.2.1.3.3. Licopenos.....	127

3.7.2.1.4. Hidrogeniones.....	127
3.7.2.1.5. Enzimas.....	127
3.7.2.1.5.1. Nitrato-Reductasa.....	127
3.7.2.1.5.1.1. Nitrato-Reductasa endógena....	127
3.7.2.1.5.1.2. Nitrato-Reductasa inducida con NO ₃	128
3.7.2.1.5.1.3. Nitrato-Reductasa infiltrada con Mo.....	129
3.7.2.1.5.2. Fosfatasa ácida endógena.....	129
3.7.2.1.5.3. Piruvato-kinasa.....	130
3.7.2.1.5.3.1. Piruvato-Kinasa endógena.....	130
3.7.2.1.5.3.2. Actividad de la piruvato- kinasa en presencia de Mg en el medio de ensayo.....	131
3.7.2.1.5.3.3. Actividad de la piruvato- kinasa en presencia de K en el medio de ensayo.....	131
3.7.2.1.5.3.4. Actividad de la piruvato- kinasa en presencia de Ca en el medio de ensayo.....	131
3.7.3. Material vegetal seco.....	131
3.7.3.1. Digestión sulfúrica.....	132
3.7.3.1.1. Determinación.....	132
3.7.3.1.1.1. Nitrógeno.....	132
3.7.3.1.1.2. Potasio y Sodio.....	133
3.7.3.1.1.3. Calcio y Magnesio.....	133

3.7.3.1.1.4. Fósforo.....	134
3.7.3.2. Digestión con nítrico/perclorica.....	135
3.7.3.2.1. Azufre orgánico.....	135
3.7.3.3. Extracción de las formas solubles ionicas.....	135
3.7.3.3.1. Con medio acido.....	135
3.7.3.3.2. Con medio acuoso.....	136
3.7.3.3.2.1. Determinaciones.....	136
3.7.3.3.2.1.1. Nitratos.....	136
3.7.3.3.2.1.2. Cloruros.....	136
3.7.3.3.2.1.3. Sulfatos.....	137
3.7.3.4. Hidratos de Carbono.....	137
3.8. Productividad.....	138
3.9. Análisis estadístico.....	138
4. Resultados y discusión.....	139
4.1. Condiciones del cultivo.....	139
4.1.1. Temperatura.....	139
4.1.2. Radiación y Humedad.....	140
4.1.3. Análisis del suelo.....	141
4.1.3.1. Análisis físico.....	142
4.1.3.2. Análisis químico.....	144
4.1.4. Características del agua de riego.....	147

4.2. Algunos indicadores bioquímicos y fisiológicos.....	156
4.2.1. Parámetros del Nitrógeno.....	156
4.2.1.1. Nitrógeno orgánico y formas iónicas.....	156
4.2.1.2. Fracciones nitrogenadas de bajo y alto peso molecular.....	170
4.2.1.3. Actividad Nitrato-Reductasa.....	175
4.2.1.4. Interacción $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$	179
4.2.1.5. Azufre y sulfatos.....	185
4.2.1.6. Balance cation-anion.....	193
4.2.1.6.1. Aniones totales inorgánicos.....	193
4.2.1.6.2. Cationes totales.....	196
4.2.1.6.3. Equilibrio electroestático.....	198
4.2.1.6.4. Importancia de las razones.....	200
4.2.2. El fósforo, sus distintas formas y su indicador bioquímico.....	202
4.2.3. Otros indicadores bioquímicos.....	210
4.2.3.1. Los pigmentos como indicadores del nivel de Nitrógeno.....	210
4.2.3.2. Carbohidratos no estructurales.....	216
4.2.4. Cationes monovalentes y divalentes.....	221
4.2.4.1. Cationes monovalentes.....	223
4.2.4.2. Cationes divalentes.....	231
4.3. Productividad.....	238

4.3.1. Efecto de la fertilización nitrogenada.....	239
4.3.2. Efecto de la fertilización potásica.....	241
4.3.3. Efecto de la fertilización fosfórica.....	243
4.4. Rango óptimo en plantas de <i>Cucumis sativus</i>	245
4.4.1. Parámetros del Nitrógeno.....	247
4.4.2. Parámetros del Fósforo.....	249
4.4.3. Los cationes mono- y divalentes.....	251
4.4.4. Balance cation-anion.....	253
5. Conclusiones.....	255
6. Bibliografía.....	257
7. Apendice.....	311
7.1. Tratamiento estadístico para hoja.....	311
7.2. Tratamiento estadístico para fruto.....	357
7.3. Rango óptimo para hoja.....	394
7.4. Rango óptimo para fruto.....	414

OBJETIVOS

UNIVERSIDAD DE GRANADA

6 JUN. 1995

COMISION DE DOCTORADO

1. OBJETO DEL TRABAJO.

Fuera de las exigencias climatológicas de cada especie agrícola no puede haber ninguna duda de que la alimentación de la planta es el factor determinante de un desarrollo sano, vigoroso y equilibrado que, a su vez, es la condición necesaria para lograr una producción óptima cuantitativa y cualitativa.

Cada vez son mejor conocidos los procesos fisiológicos, la nutrición vegetal, el papel de cada uno de los elementos nutritivos, la influencia de los diversos factores del desarrollo, los procesos físico-químicos y biológicos que se registran en el suelo y tantos otros aspectos que componen la compleja trama de interrelaciones que determinan los resultados prácticos de la fertilización.

El N, P y K son tres macronutrientes muy importantes para el buen desarrollo de los cultivos, por ello hemos visto interesante el estudio del efecto individual de cada uno de estos nutrientes sobre las concentraciones de los macronutrientes más importantes y de sus indicadores bioquímicos en dos órganos, las hojas y el fruto en plantas de pepino holandés (*Cucumis sativus*) crecidas en condiciones de salinidad.

Toda la parte experimental de este trabajo ha sido realizada en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.



INTRODUCCIÓN

entre los diversos factores que pueden limitar la producción y su calidad, destacan, por su importancia, los nutrientes. Debe recordarse que el fallo en el suministro, en la cantidad correcta, de cualquiera de los nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, dará como resultado una seria reducción en el rendimiento y calidad de la cosecha. Esto sucederá independientemente de lo adecuado que sea el aporte de agua, el control de las plantas invasoras, del potencial genético del cultivo o de la preparación agrícola del terreno. En otras palabras, la ley de Liebig, del mínimo, resultará: " El rendimiento de un cultivo está limitado por aquel nutriente presente en la mínima cantidad relativa a las necesidades del cultivo, estando todos los demás nutrientes presentes en las cantidades adecuadas" (Liebig, 1840).

En muchos casos la corrección de una deficiencia nutricional induce a que otro nutriente resulte inadecuado para el nivel de producción resultante. Por otra parte, puede dar como resultado que otro factor controlador del crecimiento, tal como la disponibilidad de agua, sea el factor limitante para el crecimiento y rendimiento.

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 meristemas 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.

El objetivo de esta revisión es examinar, de forma somera, los principios de la absorción iónica, el movimiento inicial de los iones en la raíz, el diagnóstico de las deficiencias y toxicidades iónicas, así como los métodos de análisis utilizados en dicho diagnóstico.

2.1.- Sistema suelo-raíz.

La captura de nutrientes, es dependiente de la presencia de un sistema de raíces de crecimiento activo en una capa de suelo húmedo que contenga los iones en forma disponible.

Los iones que penetran en la raíz proceden de la solución del suelo, pero la disponibilidad de estos nutrientes por las plantas depende muchísimo de la velocidad a la que son renovados desde y de las superficies de intercambio de las arcillas, de la cantidad de la materia orgánica, de los compuestos de baja solubilidad, de los coloides del suelo, de la actividad microbiana, del pH, de la capacidad catiónica de cambio, del potencial redox, de la aplicación de

fertilizantes, etc....(Sims y Patrick, 1978; Herms y Brummer, 1980; Sanders, 1983). La fisico-química de la velocidad de aporte de nutrientes a la solución del suelo es extremadamente compleja y Lindsay (1981) la describe con cierto detalle. Una ilustración simplificada de los principales contribuyentes a este complejo sistema se muestra en forma de diagrama en la FIG.1.

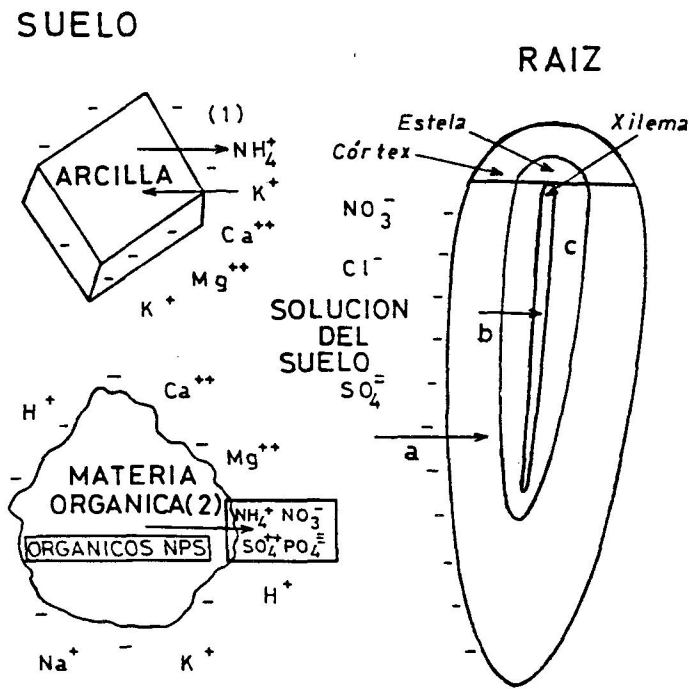


FIG.1.- Modelo del sistema suelo-planta.

Las superficies de la materia orgánica, de las partículas arcillosas y de las raíces están cargadas negativamente y por lo tanto atraen cationes tales como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ y NH_4^+ (Drew et al., 1969). Estas superficies de intercambio son importantes, ya que tienden a reducir la lixiviación, dando lugar a una mayor retención de nutrientes en suelos con alta capacidad de intercambio. Dicha propiedad es importante en las raíces para mantener una buena adsorción iónica y por lo tanto absorción de nutrientes dándose el caso que legumbres y hortícolas tienden a absorber mayor proporción de cationes divalentes que monovalentes. El resultado suele ser que éstas tienden a tener mayores niveles en Ca, pero son también más susceptibles a la deficiencia en K que los cereales, pues éstos suelen tener una baja capacidad de intercambio catiónico radicular (Asher y Ozanne, 1961).

La entrada de nutrientes en la planta se efectúa desde la solución del suelo. Sólo un porcentaje relativamente pequeño de éstos, que están disponibles para la planta, se encuentran en la solución en cualquier momento y la velocidad de nutrientes aportados a la solución del suelo, conforme son absorbidos radicalmente es el principal factor que determina si la concentración de iones es la adecuada o inadecuada para el crecimiento de la planta

Lo mismo que los iones K^+ y NH_4^+ pueden encontrarse en la superficie de las arcillas, dichos iones pueden estar incrustados entre las capas cristalinas de las arcillas, dependiendo del espaciado basal de éstas, y quedar disponibles para volver a la solución del suelo. Hay también, grandes cantidades de otros nutrientes cuyo grado de solubilidad es bajo y que ésta condicionada por el pH, siendo este factor el que controla la liberación de iones como el fosfato de Fe

y Al (Blaker, 1967). La materia orgánica es una fuente importante de nutrientes tales como el N, S y P. La liberación de nutrientes, tras una fase de descomposición biológica, es muy sensible a la temperatura edáfica y a la presencia de oxígeno. La saturación de agua y las bajas temperaturas suelen inducir a la carencia de nutrientes (Blaker, 1967). El movimiento iónico a través de la raíz se muestra con más detalle en la FIG.2 mostrando las distintas etapas de absorción de nutrientes.

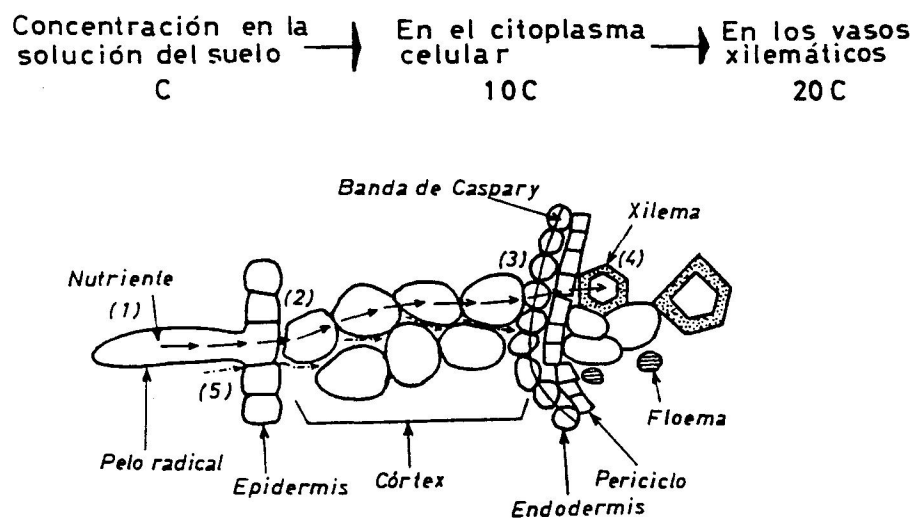


FIG.2.- Movimiento de los iones desde los pelos radicales al tejido conductor.

2.2.- 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.

El diagnóstico exacto de las deficiencias o toxicidades producidas por nutrientes minerales es vital para lograr un rendimiento óptimo. El fracaso en la corrección de la alteración iónica reducirá el rendimiento y calidad de la cosecha, quedando también involucrados todos los otros procesos de gestión del cultivo. El uso innecesario de abono, especialmente cuando los costos son altos no es solamente un derroche económico, sino que también puede dar lugar a una grave contaminación de las aguas frías, ríos o lagos.

El diagnóstico implica la determinación del nivel de nutrientes del lugar y de los árboles. En algunos casos puede que sea suficientemente saber qué nutriente, o nutrientes, están limitando el crecimiento (apreciación cualitativa), pero más frecuentemente es importante saber la gravedad de la deficiencia o toxicidad y también la predicción de la respuesta a cantidades de fertilizantes aplicadas en lugares determinados.

El diagnóstico se puede llevar a cabo por diversos métodos: Síntomas visuales, análisis químico del tejido vegetal y análisis bioquímico. En cada uno de ellos se han intentado muchas variantes y se ha demostrado que algunas son más útiles que otras. Todos tienen limitaciones.

Los síntomas visuales de deficiencia han sido descritos para muchas especies arbóreas y en años recientes se han producido guías útiles para algunos iones. Dichas guías se basan en observaciones de plantas crecidas en semilleros y en condiciones de alteraciones iónicas. Entre todas ellas destacan la experiencias de campo con coníferas en Inglaterra (Binns et al., 1980), y siempre se ha de tener muy presente el ya clásico trabajo de Bauler y Fricker (1970) sobre árboles.

¿Que utilidad tienen tales descripciones?. El método es rápido y barato. Los síntomas de la hoja, cierto de malformaciones del tallo o fruto y cambios en la morfología general del árbol, pueden ser útiles en el diagnóstico cualitativo, pero frecuentemente sólo se ven después de que la deficiencia ha dado ya como resultado una reducción del crecimiento (por ejemplo el N y P) o una malformación (ejemplo: B, Cu y Zn). Un síntoma comúnmente observado

para la deficiencia de N, P o K, es una caída prematura de las hojas más viejas, y cuando esto ha ocurrido puede retrasarse la recuperación de la planta, dependiendo de la velocidad en regenerar nuevas hojas. Por otra parte, las deficiencias incipientes, de muchos nutrientes, pueden también producir una suave clorosis que hace difícil el diagnóstico exacto y también pueden darse situaciones en las que aparezcan síntomas claros procedentes de una situación transitoria, pero en la que sea despreciable la reducción del crecimiento. Will (1966) describió esta última situación en el *Pinus radiata*, en donde la deficiencia de Mg se presentaba, a veces, en la primavera y después de la poda en verde de la copa, especialmente en los años de sequía. Los síntomas pueden variar con la intensidad de la deficiencia o con la especie de árboles, o incluso su procedencia, y una deficiencia puede quedar enmascarada por otra en aquellos lugares que existan deficiencias múltiples (Walker, 1956; Pritchett, 1979; Binns et al., 1980). También puede surgir confusión debido a que se estén induciendo síntomas similares a través de pobres condiciones físicas del suelo, efectos estacionales y climáticos, daños a las raíces y tallos por hongos o animales, incompatibilidad de injerto, lesiones por fitosanitarios o efectos de la contaminación ambiental. Es importante examinar tales posibilidades y si los resultados no son claros, será necesario utilizar otras técnicas de diagnóstico (Faust, 1981)

Holstener-Jorgensen (1964) evaluó la gravedad de la deficiencia de K en *Picea abies* contando los árboles que mostraban los síntomas. Demostró que la adición de fertilizantes de K reducía el número de árboles cuyas puntas de sus hojas eran rojas o amarillas y que la aplicación de otros nutrientes incrementaban dichos síntomas. Sus resultados sugieren que con una mejor

investigación se podría desarrollar una guía práctica de las necesidades de K, aunque tal guía sería más útil para la corrección que para la prevención.

La longitud y peso de las hojas también se han empleado para indicar el vigor general de los árboles (Binns et al., 1980) y para indicar si es o no útil aplicar tratamientos correctores de fertilizantes. Este método se basa en que el observador ya sabe qué nutrientes limitan el crecimiento. El tamaño de la hoja podría servir como método rápido de identificación del grado de deficiencia, aunque la normalización del procedimiento de muestreo y un método de superación de los efectos climáticos se hacen imprescindibles.

El diagnóstico basado en el color de la hoja se fundamenta en las buenas relaciones existentes entre el crecimiento y la pigmentación, y también con la composición química de la hoja. Si éstas existen, entonces se pueden usar para diferenciar entre las deficiencias y/o el grado de alteración nutricional. Swan (1971) encontró que la fotografía con infrarrojos no distinguía las deficiencias de los macronutrientes en plantas arbóreas crecidas en semillero, sin embargo el estudio del espectro era normal, este método aplicado en hojas de maíz normales y deficientes en nutrientes, demostraba la existencia de deficiencias entre ambos espectros, y AL-Abbas et al. (1974) sugirieron que las deficiencias podrían ser identificadas por la simple comparación de los espectros de reflexión y pudiéndose detectar, por éste método, también el grado de distorsión nutricional. Así pues, las conocidas cartas o tablas de color de Munsell se usaron con éxito para determinar el desarrollo de *Picea abies* crecidos en semillero (Luukkonen et al., 1971).

Se ha empleado, y se emplea, la denominada "percepción a distancia" para medir: el rendimiento de un cultivo, los efectos debidos a la baja fertilidad, defoliación, enfermedad y efecto de la contaminación (Reevers et al., 1975; Seevers, 1979). Este método podía ser una buena línea de investigaciones, especialmente para ampliar plantaciones o proyectos de repoblación forestal, ya que puede utilizarse para delimitar zonas donde sean de la máxima probabilidad de respuesta de los nutrientes.

2.3.- ¿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 et al., 1993).

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 exocortis 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.

2.4.- 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 et al., 1993; 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.

Tras el análisis del tejido vegetal el fundamento existente es que la concentración o contenido de nutrientes, fracciones de éstos, y la actividad enzimática de una parte u órgano específico de la planta, refleja el estado nutricional de ésta y por lo tanto su capacidad de crecimiento. Las técnicas, generalmente utilizadas, están orientadas a dar una medida directa de los

nutrientes que la planta ha absorbido de la solución del suelo, o del cultivo hidropónico, más que a valorar el aporte de iones en el medio de cultivo. Sin embargo, el análisis de la planta y del medio de crecimiento están, a veces, relacionados entre sí.

Es importante comprender lo que hay implicado en la expresión " estado nutricional de la planta". Como los elementos esenciales, y algunos que no son estrictamente esenciales, pueden influir en procesos específicos del crecimiento, el estado nutricional debería abarcar la consideración de una amplia escala de nutrientes y la manera en que se relacionan entre sí. Esto, sin embargo, raramente se hace en la práctica actualmente, en parte debido a la falta de conocimientos de estas interacciones.

Por desgracia, los valores obtenidos también resultan influidos por la manera en que se recogen las muestras, y por las interacciones con los factores ambientales (Leaf, 1973; Guzmán et al., 1984c). El método corriente para superar tales problemas es la normalización de las condiciones de recogida, aunque hay indicaciones de que también otros procedimientos valen la pena.

Los criterios fundamentales que hay que utilizar para escoger el método de recogida de muestras para análisis de tejidos son:

- Alta sensibilidad a la alteración nutricional: grandes diferencias en los valores medios entre normales de diferentes niveles nutricionales, acompañados de cálculos precisos, darán alta sensibilidad. La precisión está influida por el tipo de tejido, la posición de éste en el árbol, la variación entre un árbol y otro,

los cambios estacionales, etc...

- Prácticabilidad del método en el campo, así como costo.
- Buen empleo de los criterios de interpretación empleados y tener un concepto de deficiencia o rendimiento.

Se han estudiado varios y diferentes tejidos u órganos, aunque el empleo de la hoja es el más utilizado debido a su fácil cutinización.

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).

2.4.1.- Organos o tejidos que pueden ser analizados.

2.4.1.1.- 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).

Se ha demostrado que el análisis foliar, aplicado a árboles, es sensible para detectar deficiencias o toxicidades y también presenta la ventaja de estar directamente relacionado con la productividad (Robinson, 1980), pues la hoja es el lugar donde se realiza el proceso fotosintético. Muchos de los factores que

influyen en su precisión se han estudiado en profundidad.

2.4.1.1.1.- 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).

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 pratenses 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.

2.4.1.1.2.- 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).

2.4.1.1.2.1.- 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 anhidrasa 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, 1986a; 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 radicalmente y desplazada a los brotes. En especies que preferentemente reducen el NO_3^- radicalmente (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 $\text{SO}_4^{=}$ era idóneo para diagnosticar el status de S orgánico o total en tallos de centeno. El empleo de $\text{SO}_4^{=}$ impide que las curvas de respuesta se alteren como sucede con el S total o con el orgánico y, por ello, se prefirió la metodología analítica del $\text{SO}_4^{=}$. Para calcular el estado nutritivo del S en planta, el contenido de $\text{SO}_4^{=}$, principal forma de almacenamiento del nutriente, es 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 $\text{SO}_4^{=}$ respecto al S total. En plantas plurianuales la determinación de los niveles de $\text{SO}_4^{=}$ se reconoce como medida útil del S total y también en *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii* (Turner, 1979). Se ha demostrado que los niveles de $\text{SO}_4^{=}$ pueden ser un importante método para determinar si una respuesta al N es posible y si se requiere un nivel que exceda de los 400 ppm para asegurar una buena respuesta de crecimiento a la aplicación de una fertilización nitrogenada, suponiendo que otros nutrientes no sean limitantes. Este estudio es también ejemplo de la necesidad de medir más

de un nutriente para poder determinar el estado nutricional del árbol. En las plantas herbáceas la cantidad de $\text{SO}_4^{=}$ como porcentaje 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 $\text{SO}_4^{=}$ (Spencer et al., 1978). Es también interesante el que la razón N/S no ha demostrado ser una guía útil para el S total ni en las herbáceas ni en las plantas plurianuales (Spencer et al., 1978).

Lorenz et al., (1964) compararon los nutrientes totales con los extraídos con ácido acético al 2% en plantas de *Solanum tuberosum*, 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 (1962 a) 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, 1962 b), 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., (1973a) 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 foliolos 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., 1973b) 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 y Romero, 1993).

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.

2.4.1.1.2.2.- 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 suministran 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 et al., 1993) 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; Smirnoff 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 et al., 1993). 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.

2.4.1.2.- 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 peciolo 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 peciolo dan la mejor indicación del estado del N mientras que el limbo foliar es preferible para el estado del S (Ulrich, 1961).

2.4.1.3.- 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).

2.4.1.4.- 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.

2.4.1.5.- Análisis de la savia.

Los antecedentes del análisis de savia, tal y como se utiliza en la actualidad, podrían encontrarse en una serie de publicaciones sobre el análisis químico de tejidos vegetales frescos como los publicados por Gilbert (1926), Thornton et al. (1934), Nicholas (1953) y Magnitski (1954, 1956).

En estos métodos se determinan solamente ciertas formas de algunos

elementos, cuyas variaciones se consideran significativas en relación al nivel de la nutrición de la planta en estos elementos y están basados en el análisis limitado de la fracción mineral. Son, en general, difíciles de interpretar.

El investigador francés Routchenko (1967) da a conocer el método de análisis de savia, compendio de sus anteriores publicaciones sobre el tema: Routchenko (1964, 1965), Delmas, Routchenko y Baudel (1959), Routchenko y Delmas (1962), Routchenko y Lubet (1966), Routchenko y Cadahia (1967), etc. establece que es preciso disponer de una metodología de análisis de planta que informe simultáneamente sobre la intensidad con que los elementos entran en la planta y por otra parte sobre el ritmo de su utilización.

Mientras el análisis foliar valora los elementos químicos como conjunto, el análisis de savia considera diversas formas químicas para cada elemento principal. Mediante el análisis de savia, se pueden poner en evidencia ciertas desviaciones del metabolismo del N o del P, se puede corregir un accidente de nutrición durante la vida del vegetal, mediante el establecimiento de un diagnóstico y permite valorar el grado relativo de importancia de los diversos factores del medio de cultivo.

Los fundamentos fisiológicos del método de análisis de savia están basados en la forma en que se integran y distribuyen los distintos iones absorbidos por la planta. Cuando la actividad organizadora de ésta es insuficiente, parte de los elementos absorbidos se acumulan bajo forma iónica, constituyendo una reserva mineral de la planta. A partir de ésta, irá metabolizando los elementos sintetizadores (N, P, S) transfiriendo a tejidos y

órganos en formación, aquellos elementos que están bajo forma iónica (K, Na, Cl), o integrando parcialmente en compuestos orgánicos, otros elementos como Ca y Mg.

El material utilizado para el análisis, siguiendo esta metodología, es el jugo extraído de tejidos conductores. Veamos porqué:

La hoja se compone de una red terminal de tejidos conductores y un parénquima asimilador formado por células mesofílicas.

La planta dispone de un mecanismo de autorregulación que tiende a mantener constante la composición mineral de los tejidos asimiladores y sólo las vacuolas de las células de dichos tejidos son sensibles a las variaciones de composición del medio de cultivo. Esto limita la efectividad del análisis de la hoja como conjunto, puesto que el jugo vacuolar es solamente una pequeña parte del tejido total analizado. Por el contrario, los tejidos conductores están formados por células que carecen de, entre otras cosas, de vacuolas y por esto, la composición de las células no afecta a la composición de los jugos que circulan a través del tejido conductor. Como por otra parte, la composición mineral de los jugos no se ve modificada por la presencia del xilema y floema (Routchenko, 1967), el material utilizado en la metodología del análisis de savia, será el extracto de tejidos conductores, preferentemente peciolo, nervios centrales, etc.

El análisis de la savia floemática, recogida la muestra a la altura media de la copa, ha demostrado ser prometedor, aunque las muestras son fáciles de

recoger tienen el inconveniente que dañan al tallo. El N presente en el floema y el N total en hoja han sido correlacionados, así como con el crecimiento del árbol en diversas coníferas (White et al.; 1970; Hetherington y Owens, 1979; Timmer, 1979), mientras que Alcubilla y Rehfuess (1975) encontraron que los niveles de N en el floema de *Picea abies* se correlacionaban mejor con el nivel de N en hoja del año anterior. Sin embargo, según Will (1965) en pruebas de fertilización realizadas con *Pinus radiata* en suelos muy deficientes en P no se encontró una notable correlación con el fósforo. Como las muestras del floema tienen mayor edad fisiológica que las foliares, puede que las variaciones iónicas anuales se detecten más difícilmente. En un ensayo de fertilización con *Picea glauca*, los incrementos en la concentración de N, procedentes de la urea aplicada, fueron detectados durante tres años en el floema, pero solamente dos años en hojas normales (Timmer, 1979).

El análisis del contenido floemático tiene algunas desventajas. La concentración, de la mayoría de los iones, es menos de la mitad en hoja, presumiblemente con mayores errores analíticos y con una variación entre árboles muy alta, superior al 40-50 % como sucedió en *Picea sitchensis* (Hetherington y Owens, 1979). Así pues, no es sorprendente que Driessche y Webber (1977) no encontraran el análisis de la savia floemática respecto al N total, u otros compuestos solubles de N, mejor que el análisis foliar para detectar las diferencias entre tratamientos en el caso de *Pseudotsuga menziesii*. De manera análoga, Timmer (1979) encontró que el cambio relativo en los niveles del N floemático respecto a la fertilización con urea, era menor que en hojas normales.

El análisis de jugos vegetales, a pesar de estar basado en un planteamiento riguroso desde el punto de vista fisiológico y analítico y en una interpretación precisa y coherente, no ha tenido la aceptación que podía esperarse debido, a nuestro juicio, a que es un método muy complejo y laborioso que no permite, en un laboratorio de análisis de planta convencional, la realización diaria de largas series de muestras, como en el caso del análisis foliar.

No obstante esto, una considerable cantidad de trabajos publicados con posterioridad a 1967, atestiguan que, pese a su dificultad, el método de Routchenko es un valioso instrumento en manos de los científicos especialistas en nutrición vegetal, para interpretar y resolver problemas en el campo de la fisiología vegetal y la química agrícola. Recogidos en la última publicación de Routchenko (1975), aparecen algunos trabajos recientes de diversos investigadores: Forestier (1968), Cadahia (1968), Aguilar et al. (1971), Rodriguez y Gonzalez (1975), Rodriguez et al. (1972, 1975), Jaime (1973), Jaime et al. (1974, 1976), Calvo y Cordova (1973), Hernando y Cadahia (1973), Hernando et al. (1975), etc.

2.4.1.6.- Análisis de raíces.

Muestras de raíces cuyos diámetros estaban comprendidos entre 10 a 15 cm y a una profundidad de 30 cm, fueron analizadas para ser estudiadas por Van den Driessche y Webber (1975 y 1977). El resultado obtenido fue escalarecedor, pues volvieron a encontrar claras tendencias estacionales en la concentración de N total, N soluble y compuestos de arginina y guanidina, sugiriendo que las raíces eran tan buenas indicadoras del nivel de N como las

hojas y que eran capaces de detectar diferencias entre tratamientos. Se cree que en árboles la arginina es un compuesto importante de almacenamiento del N, y como el N, se almacena aparentemente en esta forma para emplearse en los brotes de primavera y así su valoración o cuantificación en las raíces puede que sea útil para indicar cuándo es necesario el aporte de dicho ion.

2.4.1.7.- Análisis del mantillo.

El análisis del mantillo recientemente formado, que puede ser fácilmente recolectado, ha mostrado ser prometedor en algunos estudios realizados para diferenciar entre plantaciones con diferentes rangos de N (Miller y Miller, 1976). Además, en *Pinus nigra* var. **maritima** cuya plantación se desarrollaba sobre arenas deficientes en N, había una correlación muy buena entre la concentración de N total en hojas normales de la parte superior de la copa y las agujas que caían en el otoño siguiente. Como el crecimiento estaba estrechamente relacionado con el anterior nivel foliar anual de N, estaba también estrechamente correlacionado con el mantillo del año correspondiente. En el caso del *Pinus laeda* se han encontrado débiles, pero significativas, correlaciones entre los nutrientes de las hojas y del mantillo para el caso del N, P, Ca y Mg, pero no el K (Lea y Ballard, 1982). un problema encontrado en este último estudio fue el del incremento de variación entre muestras. Con objeto de poder desarrollar el uso del análisis del mantillo como instrumento de diagnóstico se precisa de más estudios sobre los diversos parámetros que pueden afectar al mantillo, así como un estudio de la influencia ejercida por las variaciones temporales (Van den Driessche y Webber, 1977). Además, es probable que sea necesario medir las concentraciones de los nutrientes y la

razón concentración/nutriente. La valoración de la cantidad de hojas caídas anualmente puede que suministren datos útiles adicionales sobre las condiciones de las plantaciones y su posible respuesta a los fertilizantes (Van den Driessche, 1979).

2.4.2.- 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.- Organó analizado y estadio fenológico para distintos nutrientes y especies según diversos autores.

<u>ESPECIE</u>	<u>NUTRIENTE</u>	<u>ESTADIO</u>	<u>TEJIDO</u>	<u>REFERENCIA</u>
<u>Beta vulgaris</u>	P	Mitad del ciclo biológico	Peciolos	Hills y Ulrich 1978
<u>Capsicum annuum</u>	K	Inicio de la fructificación	Peciolos	Lorenz y Tyler 1978
	P			
<u>Chrysanthemum morifolium</u>	N	Madurez	Hojas	Lunt y Kofranek 1964
	P			
<u>Citrullus lanatus</u>	K	Fructificación temprana	Pecio de la 6ª hoja	Lorenz y Tyler 1978
<u>Cucumis melo</u>	NO ₃	Primer fruto maduro	Pecio de la 6ª hoja	Lorenz y Tyler 1978
<u>Dianthus carioophyllus</u>	B	Mitad del ciclo biológico	4º o 5º par de hojas desde la base	Oertli 1964
<u>Gossypium hirsutum</u>	Fe	Plantas de dos meses de edad	Limbo foliar	Vretta-Kouskoleha y Kallinis 1968
<u>Juglans nigra</u>	Fe	Madurez	Hojas	Hacskeylo et al. 1969
<u>Lycopersicon esculentum</u>	P	Floración temprana	Pecio de la 4ª hoja	Lorenz y Tyler 1978
<u>Nicotiana tabacum</u>	Fe	Madurez	Hojas	Oertli y Jacobson 1960
<u>Persea american</u>	Fe	Madurez	Hojas	Bingham y Beutel 1957
<u>Pisum sativum</u>	Fe	Madurez	Hojas	Oertli y Jacobson 1960
<u>Solanum tuberosum</u>	NO ₃	Inicio del ciclo biológico	Pecio de la 4ª hoja	Lorenz y Tyler 1978
	P			
<u>Cucumis melo vars.</u>	Macronutrientes	Madurez	Hojas	Sánchez 1987
	Micronutrientes	Madurez	Hojas	Sánchez 1987
<u>Citrullus lanatus vars.</u>	Macronutrientes	Madurez	Hojas	Vargas 1987
	Micronutrientes	Madurez	Hojas	Vargas 1987
<u>Lycopersicon sculentum</u>	Macronutrientes	Madurez	Hojas	Valenzuela 1987
	Micronutrientes	Madurez	Hojas	Valenzuela 1987
<u>Phaseolus vulgaris</u>	Macronutrientes	Madurez	Hojas	Guzmán 1987
	Micronutrientes	Madurez	Hojas	Guzmán 1987
<u>Solanum melongena</u>	Macronutrientes	Madurez	Hojas	López-Cantarero et al., 1992
<u>Zea mays</u>	Fe	Madurez	Hojas de la porción media	Jacobson 1945

Las muestras normalmente no deberían tomarse de plantas dañadas por enfermedades, plagas o lesiones químicas, a menos que tal daño sea el objeto de estudio. Para el diagnóstico de los trastornos iónicos se 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).



2.4.3.- 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 et al., 1993), 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).

2.4.3.1.- 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 nutrientes, 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 nutrientes.

El contenido de nutrientes, 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 nutrientes 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 de 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 nutrientes 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 et al, 1993). 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 annum</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 y Hylton , 1968

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

NUTRIENTES	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 vars.</i>	Hojas	Sánchez et al. 1989
Micronutrientes	Invernadero	<i>Cucumis sativus</i>	Hojas	Valenzuela y Romero 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 et al. (1993) 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 relacionadas 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 fertilizantes es aquel que evita que el nivel de nutrientes 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 sus concentraciones con el tiempo y el Zn permanece constante (Guzmán y Romero, 1985; Guzmán et al., 1986b; Romero, 1986b).

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., 1984b),

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 bastante grandes. Cambios importantes pueden ocurrir también al final de la estación de crecimiento, cuando el envejecimiento está acompañado normalmente por la reorganización de los elementos móviles a los tejidos leñosos. El 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, 1986a). 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 las 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.

En árboles perennifolios cuyas hojas tienen diversas edades fisiológicas es, con frecuencia, diferente en la concentración iónica, pero se acepta generalmente que la hoja es la herramienta más útil para el diagnóstico nutricional (Leaf, 1973; Sánchez, 1985). Generalmente, se admite que la fronda, y por lo tanto sus hojas, presenta concentraciones altas y existe una baja diferencia entre árboles (Lowry y Avard, 1969; Mead y Will, 1976), aunque esto no es invariablemente cierto para todos los iones y en todas las posiciones de la copa (Evans, 1979). De manera similar, Comerfor (1981) encontró que los niveles de K, en árboles deficientes, diferían dependiendo de donde se recolectaban las hojas, presentando la anomalía de una mayor diferencia en las concentraciones de dicho ion entre árboles, cuando el análisis era realizado en hojas jóvenes y presentando unas diferencias mínimas si eran hojas seniles. Por ello, dicho autor ha sugerido que como la alteración nutricional da como resultado el desplazamiento de elementos móviles desde hojas viejas a jóvenes o normales, y por ello realizando el análisis de hojas viejas tendríamos una mejor indicación de dicha alteración iónica. Sin embargo, la concentración de nutrientes en hojas seniles no siempre da la mejor correlación con el crecimiento (Van den Driessche, 1974) y en condiciones nutricionales graves las hojas más viejas pueden llegar a caer. Con los elementos inmóviles (Ej. Ca y B) es común que las hojas se empleen en el diagnóstico nutricional, ya que su deficiencia induce a la muerte o marchitamiento de dicho órgano y análogas consecuencias, se dan en la raíz, aunque ello puede presentarse a causa de interrupciones, incluso por breves períodos de tiempo, del suministro en ambos nutrientes (Van den Driessche, 1974).

