

Análisis de clorofila como índice indirecto de clorosis férrica en nectarinos¹

Rafael Ruiz S.², Mónica Helle J.³ y Rosa Espinoza A.⁴

INTRODUCCION

Es conocido el hecho de que el análisis de la concentración de hierro total en hojas no es un buen índice de la situación nutricional de este elemento en la planta (Osserkowsky, 1933; Jakobson, 1945; Mc Clung, 1956; Wallace, 1960; etc.). Dada la importancia de este problema para la fruticultura de la zona central, parece importante desarrollar métodos de diagnóstico que permitan saber con seguridad que el problema que se enfrenta está relacionado a la nutrición férrica y, además, poder cuantificar la magnitud del problema por otros métodos que la apreciación visual. Por otra parte resulta interesante desde el punto de vista de la investigación abordar el problema del hierro por otros caminos que los habituales.

Información proveniente del extranjero señala que la clorosis férrica está en relación con la concentración de clorofila (Wallihan, 1969). Por otra parte también se señala que aparece estrechamente asociada a la actividad de la enzima peroxidasa (Bar-Akiva, 1969), de la cual el hierro es el metal específico. Por el momento el objetivo de este estudio se centrará en el primer punto y, en concreto, se persigue implementar un método confiable de análisis de clorofila

y sus fracciones así como probar en forma preliminar su valor como método de diagnóstico de la clorosis férrica, comparándolo con el análisis de hierro total.

MATERIALES Y METODOS

I. Muestras

En el mes de diciembre de 1978 se colectaron muestras de hojas con diferente grado de clorosis férrica, provenientes de un huerto de nectarinos cv. Le Grand, en la Estación Experimental La Platina. Las muestras se tomaron de árboles con diferente grado de clorosis férrica (en base a apreciación visual), a saber: sanos, leves, moderados, fuerte y severamente afectados. Cada muestra estuvo constituida por aproximadamente 100 hojas del tercio medio de ramillas del año, separándose 20 para análisis de clorofila y el resto para análisis de hierro total.

II. Determinaciones

a) *Hierro total*: Se determinó hierro total por el método convencional de calcinación y determinación por absorción atómica. Las muestras fueron acuciosamente lavadas y posteriormente secadas y molidas mediante mortero de ágata.

b) *Clorofila*: La determinación de clorofila se efectuó siguiendo en gran parte el método sugerido por la Association of Official Analytical Chemist (1970). Este método aparece desarrollado en detalle por Z. Sestak (1971) y permite determinar clorofila *a*, *b* y total (*a* + *b*) con buena aproximación.

En forma resumida el procedimiento sigui-

¹Recepción originales: 25 de mayo de 1980.

²Ing. Agr., M.S., Programa Fertilidad de Suelos, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

³Estudiante Químico Laboratorista. Universidad de Chile, Sede Temuco.

⁴Práctico Agrícola. Laboratorio Suelos y Análisis Foliar, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

do en base a las fuentes anteriormente señaladas, fue el siguiente:

1) Se pesó 1 g de hojas frescas, previamente cortadas en trocitos y se mezclaron con carbonato de calcio y carbonato de sodio (neutralizantes de acidez).

2) Posteriormente la muestra fue macerada en forma rápida en mortero con ayuda de arena de cuarzo.

3) Como extractante se utilizó acetona al 85%.

4) Se filtró al vacío, volviendo el residuo al paso 2 y volviendo a filtrar. Este proceso siguió hasta que el líquido del filtrado resultó incoloro.

5) Se llevó a volumen conocido (en este caso 1 l) y se procedió a leer en fotocolorímetro a 645 y 663 mu de longitud de onda (máxima absorción de clorofila *a* y *b*, respectivamente).

6) Ante la posibilidad de presencia de algún otro compuesto orgánico —extraclorofila— que pudiera estar interfiriendo, se efectuó una lectura a 750 mu, en la cual la clorofila no absorbe. La absorbencia debe ser menor al 5% del valor de absorbencia en el rojo para la clorofila *a*. En este caso el valor leído se resta del de la clorofila *a* y *b*, antes de efectuar el cálculo final. De lo contrario hay que eliminar el contaminante por centrifugación.

c) *Cálculo de clorofila a, b, total y relación a/b:* Se han desarrollado muchas ecuaciones algo diferentes para el cálculo de la cantidad de clorofila por espectrofotometría. Estas diferen-

cias se deben al tipo de extractante usado y a diferentes valores calculados para el coeficiente de absorción específico. Las ecuaciones de Mackinney-Arnon (Arnon, 1949) son, sin embargo, las de uso más frecuente y son las que se utilizarán para el cálculo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos para la concentración de hierro total aparecen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Concentración de hierro en hojas con diferente grado de clorosis férrica¹.

Grado de clorosis férrica	Cont. Fe (ppm.)
Sana	250
Leve	190
Moderada	245
Fuerte	170
Severa	205

¹Cada observación representa el \bar{x} de 2 análisis.

En este cuadro se aprecia que el análisis de Fe total no guarda relación con la sintomatología de carencia de hierro observada.

Los resultados obtenidos para la concentración de distintas fracciones de clorofila aparecen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Valores de absorbencia y concentraciones de clorofila a, b, total y relación a/b, en hojas con distinto grado de clorosis férrica¹.

Grado de clorosis férrica	Absorbencia (A)			Concentración de clorofila (mg·L ⁻¹) (en base a 1 g mat. fresca)			
	663 mu	645 mu	750 mu	Ca	Cb	Ca + b	a/b
Sana	0,195	0,110	0,001	2,17	1,59	3,75	1,36
Leve	0,168	0,128	0,007	1,72	2,02	3,73	0,85
Moderada	0,083	0,072	0,003	0,83	1,21	2,03	0,68
Fuerte	0,044	0,040	0,007	0,45	0,69	1,12	0,65

¹ El cálculo de fracciones de clorofila se efectuó de acuerdo a las fórmulas de Mackinney-Arnon (Arnon, 1949):

$$\begin{aligned}
 C_a &= 12,7 A_{663} - 2,69 A_{645} \\
 C_b &= 22,9 A_{645} - 4,68 A_{663} \\
 C_{a+b} &= 8,02 A_{663} - 20,20 A_{645} \\
 a/b &= \frac{C_a}{C_b}
 \end{aligned}$$

En este cuadro se observa que el contenido de clorofila *a*, descende consistentemente a medida que se acentúa el síntoma de deficiencia. La situación es parecida respecto del total (*a* + *b*), excepto que no discrimina bien en el primer rango (sana-leve). Clorofila *b*, en cambio, señala menos satisfactoriamente la situación.

Por último, el cuadro señala que a medida que se acentúa la sintomatología, la proporción de clorofila *a* respecto de la *b* decrece notablemente, indicando que aquella se ve afectada en mayor grado por la deficiencia de hierro.

RESUMEN

Se procedió a evaluar el análisis de clorofila como indicador indirecto de clorosis férrica de hojas de durazneros en comparación con el análisis de hierro total. La primera de las técnicas (específicamente, al análisis de clorofila *a*) mostró una buena asociación con sintomatología carencial. El análisis de hierro total, por otra parte, no mostró buena relación con el problema estudiado.

SUMMARY

CHLOROPHYLL ANALYSIS AS AN INDIRECT INDEX OF IRON CHLOROSIS IN NECTARINES

Chlorophyll extraction analysis was evaluated as an indicator of lime-induced-chlorosis symptoms in peach leaves in comparison with total iron content analysis. The A.O.A.C. methodology was employed.

Chlorophyll analysis (specifically Chyll *a*) showed a good correlation with iron deficiency symptoms but total iron content did not show a good correlation with them.

LITERATURA CITADA

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST (A. O.A.C.). 1970. *Methods of analysis*. Benjamin Franklin Station, Washington D.C. William Horwitz, Editor, pp. 52-55.
- ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts.
- BAR-ANKIVA, A. 1969. The use of the activity of metallo-enzym systems for the appraisal of nutritional requirements of citrus trees. *Proceedings of the First International Citrus Symposium*, Vol 3, 1969. pp. 1551-57.
- JAKOBSON, O. 1945. Iron in the leaves and chloroplast of some plants in their relation to their chlorophyll content. *Pl. Physiol.* 20:233-245.
- MC CLUNG, A.C. and LOTT, W.L. 1956. A survey of the nutrient composition of leaf samples from North Carolina peach orchards. *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.* 20: 10-14.
- OSSEKOWSKY, A. 1933. Quantitative relations between chlorophyll and scions in green and chlorotic pear leaves. *Pl. Physiol* 8: 449-468.
- SESTAK, Z. 1971. Determination of chlorophylls *a* y *b*. In *Plant Photosintetic Production. Manual of Methods*, Z. Sestak, J. Catzky y P.G. Jarvis, Editors. Dr. W. Junk N.V. Publ., The Hague, Holland. pp. 672-701.
- WALLACE, A. and LUNT, O.R. 1960. Iron Chlorosis in horticultural plants. *Proc. Amer. Soc. Hort Sci.* 75: 819-841.
- WALLIHAN, E.F.; EMBLETON, T.W. and SHARPLES, R.G. 1969. Studies of foliar sprays for correcting iron deficiency of citrus. *Proceedings of the First International Citrus Symposium*, vol. 3, 1969. pp. 1525-1529.