

EFFECTO DEL HIERRO EN EL DESARROLLO DE LAS RAICES DE LAS PLANTAS

por

JAIRO CORREA VELASQUEZ

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.

Turrialba, Costa Rica

Enero de 1964

EFFECTO DEL HIERRO EN EL DESARROLLO DE LAS RAICES DE LAS PLANTAS

Tesis

Presentada al Consejo de la Escuela para Graduados
como requisito parcial para optar al grado

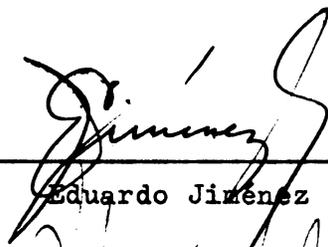
de

Magister Scientiae

en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A.

APROBADA:



Eduardo Jiménez Ph.D.

Consejero



Ludwig Müller Ph.D.

Comité



Manuel Ibáñez Ph.D.

Comité



Gerardo Budowski Ph.D.

Comité

Enero de 1964

A mis Padres

A mis Hermanos

A mi Profesor Consejero

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar sus sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

Dr. Eduardo Jiménez, consejero principal, cuya valiosa ayuda y acertada dirección hicieron posible la realización de esta tesis.

Doctores Manuel Ibañez, Ludwig Müller y Gerardo Budowski, miembros del comité consejero.

Doctores Carl C. Moh y Eddie Echandi, por sus acertadas sugerencias y las facilidades brindadas para realizar parte del trabajo de laboratorio.

Ingeniero Gilberto Páez, por su ayuda en los análisis estadísticos e interpretación de los resultados experimentales.

Al Programa de Energía Nuclear del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. y a la Universidad Nacional de Colombia (Facultad de Agronomía - Medellín), por la oportunidad que dieron al autor para llevar a cabo sus estudios posgraduados.

A los compañeros de estudio y miembros del personal del I.I.C.A. que en una u otra forma le ofrecieron su gentil colaboración.

BIOGRAFIA

El autor nació en San José, Departamento de Antioquia, República de Colombia, en el año de 1928.

Realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional, Medellín, Colombia, graduándose de Ingeniero Agrónomo en 1955.

De 1956 a 1962 fue profesor encargado de cátedra, profesor auxiliar y profesor asociado en la Facultad de Agronomía de Medellín y en la actualidad profesor de dedicación exclusiva de dicha Facultad.

Realizó sus estudios posgraduados en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. desde octubre de 1962 hasta enero de 1964, mediante una beca concedida por el Programa de Energía Nuclear del I.I.C.A.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Lista de Cuadros	viii
Lista de Figuras	ix
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	3
Funciones del Fe en la planta	3
Efecto del Fe en el desarrollo radical	5
Factores que afectan la absorción y utilización del Fe por la planta	7
Cultivo de raíces aisladas	11
MATERIALES Y METODOS	15
RESULTADOS	21
Cacao	21
Respuesta de plantas de cacao deficientes en hierro a la aplicación de este nutrimento al follaje o a la raíz	21
Absorción foliar y traslocación del Fe ⁵⁹	30
Absorción radical y traslocación del Fe ⁵⁹	33
Cultivo de raíces aisladas en diversos medios nutri tivos	34
Café	34
Respuesta de plantas de café deficientes en hierro a la aplicación de este nutrimento al follaje o a la raíz	34
Cultivo de raíces aisladas en diversos medios nutritivos	35
Frijol	35
Cultivo de raíces aisladas en diversos medios nutritivos	35
DISCUSION	38

	Página
CONCLUSIONES	44
RESUMEN	47
SUMMARY	50
LITERATURA CITADA	53

LISTA DE CUADROS

Cuadro N ^o		Página
1	Efecto de la aplicación de hierro (FeEDTA) en el incremento de volumen y longitud radical de plantas cloróticas de cacao	21
2	Efecto de la aplicación de hierro (FeEDTA) en el incremento de la longitud de los tallos, en plantas cloróticas de cacao	27
3	Absorción foliar de Fe ⁵⁹ por plantas cloróticas de cacao. Promedio de radiactividad en c/min/gm	31
4	Absorción radical de Fe ⁵⁹ por plantas cloróticas de cacao. Promedio de radiactividad en c/min/gm	33
5	Efecto de la aplicación de hierro a la solución (quelato) y al follaje (cloruro) sobre el incremento relativo de la longitud de los tallos de plantas cloróticas de café	35

LISTA DE FIGURAS

Figura N ^o		Página
1	Incremento relativo del volumen radical de plantas cloróticas de cacao en 90 días. Fe (quelato) agregado a la solución	22
2	Incremento relativo del volumen radical de plantas cloróticas de cacao en 90 días. Fe (quelato) en aspersión al follaje	23
3	Incremento relativo de la longitud radical de plantas cloróticas de cacao. Fe (quelato) agregado a la solución. Duración del tratamiento: 90 días	25
4	Incremento relativo de la longitud radical de plantas cloróticas de cacao. Fe (quelato) en aspersión al follaje. Duración del tratamiento: 90 días	26
5	Incremento relativo en la longitud de los tallos de plantas cloróticas de cacao. Fe (quelato) agregado a la solución. Duración del tratamiento: 90 días	28
6	Incremento relativo en la longitud de los tallos de plantas cloróticas de cacao. Fe (quelato) en aspersión al follaje. Duración del tratamiento: 90 días	29
7	Distribución de la radiactividad en función de tiempo en hojas, raíces y tallos de plantas cloróticas de cacao. Fe ⁵⁹ absorbido por hojas cortadas	32
8	Incremento relativo de la longitud radical de plantas cloróticas de café. Fe en forma de cloruro aplicado en aspersión al follaje. Duración del tratamiento: 90 días	36

INTRODUCCION

A pesar del gran valor económico que tienen el cacao y el café para la mayoría de los países tropicales, muy poca atención se ha dado al estudio de los problemas fisiológicos relacionados con la absorción foliar y radical de nutrimentos minerales mayores y menores, menos aun del hierro. No sucede lo propio con cultivos como el trigo, el maiz, el frijol, etc. que producen bien en las zonas templadas, con los cuales se han realizado extensos y variados estudios fisiológicos.

En un trabajo con plantas de cacao cultivadas en soluciones nutritivas, llevado a cabo en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de Turrialba (Costa Rica) en 1961^{*}, se observó que el sistema radical de esta planta se desarrolló mejor en presencia de hierro que en ausencia de dicho elemento. El análisis estadístico de los resultados corroboró la observación, pues la diferencia entre los tratamientos con y sin hierro fue significativa.

La observación antes citada, sirvió de estímulo para iniciar un estudio mas detenido de la influencia del hierro en el desarrollo radical, no solo del cacao sino del café y el frijol, teniendo en mente los siguientes objetivos:

1. Determinar en forma cuantitativa la influencia del Fe en el desarrollo radical del cacao, del café y del frijol.
2. Observar el efecto de diversas dosis de Fe sobre el crecimiento de raíces aisladas de cacao, café y frijol, cultivadas en varios medios nutritivos.

* Jiménez, E. Comunicación personal. 1962.

3. Observar y determinar la velocidad de recuperación en el desarrollo radical de plantas con clorosis causada por deficiencia de Fe, en relación con la velocidad de formación de clorofila, cuando se aplica este elemento en aspersión al follaje y a la solución en que crecen las plantas.
4. Determinar el grado de movilización de Fe⁵⁹ hacia las raíces, cuando es absorbido por las hojas de cacao.

REVISION DE LITERATURA

Funciones del Fe en la planta

⊕ Varias son las funciones atribuidas al hierro en la fisiología vegetal. GRANICK (15) cita entre otras las siguientes:

1. Forma parte de las proteínas hem que se combinan reversiblemente con el O_2 , o lo activan para que pueda aceptar electrones del citocromo.
2. Forma parte de las oxígeno-transferasas que adicionan oxígeno directamente a otros compuestos, a través de un enlace doble.
3. Es un constituyente de las oxidasas de funciones mixtas, que oxidan sustratos aromáticos y alifáticos con consumo de oxígeno.
4. Forma parte de los flavoproteídos, que actúan como aceptores de electrones.
5. Actúa como catalizador en cierto tipo de reacciones.

ODDO y POLLACI citados por MALAVOLTA et al (22), afirman que el Fe parece ser indispensable para la síntesis de la clorofila, pues es básico para la formación biosintética del núcleo pirrólico. GRANICK (15), fue el primero en establecer la presencia del hierro en la molécula de una porfirina precursora de la clorofila, por lo que afirma que es probable que en alguna etapa de la formación de ésta, el magnesio reemplace al hierro en la molécula. BONNER (4), por otro lado, cree posible que el requerimiento de hierro en la síntesis de clorofila, pueda estar relacionado principalmente con la producción de proteína cloroplástica y no directamente con la formación del pigmento mismo.

Según GODDARD (14), la función más conocida del Fe en el metabolismo vegetal es su participación en el grupo prostético del sistema citocrómico, que de acuerdo con LUNDEGARDE (21) tiene un papel directo en la absorción de los nutrimentos inorgánicos, además de su función en el proceso respiratorio. ⁽⁷⁾

Por la importancia de su objetivo, es interesante hacer referencia al trabajo de BURSTRÖM (9), quien estudió la acción del manganeso sobre las raíces, a través del efecto de este elemento en la asimilación de nitratos por las raíces de trigo. Sus conclusiones fueron que el manganeso promueve y probablemente cataliza la reducción de nitratos en las raíces y produce marcados cambios en la morfología, tanto de raíces aisladas como unidas a la planta, cuando las cantidades adicionadas no exceden de 1 p.p.m. Observó además que las raíces aisladas reaccionan más que las unidas a la planta y cita entre los cambios morfológicos producidos los siguientes:

1. Acortamiento del punto de crecimiento.
2. Separación nítida entre la zona meristemática y la de alargamiento.
3. Mayor longitud de las células maduras de la epidermis, o sea que el alargamiento de la raíz es mayor en presencia de Mn.
4. El proceso de alargamiento se inicia primero en las raíces tratadas con Mn, que en las no tratadas.

Según el mismo autor, el hierro puede reemplazar, hasta cierto punto, al manganeso en su acción estimulante sobre las raíces en la absorción de nitratos y por consiguiente en el crecimiento radical.

Efecto del Fe en el desarrollo radical

Muy poco se conoce sobre la influencia específica del hierro en el desarrollo radical. En la literatura consultada fue posible hallar sólo unas pocas referencias directas a este aspecto fisiológico, de las cuales sólo tres tienen relación con cacao. A continuación se citan las más importantes.

En un estudio con plantas de cacao cultivadas en soluciones nutritivas, llevado a cabo en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de Turrialba (Costa Rica) en 1962^{*}, se observó que el sistema radical de esta planta se desarrolló mejor en presencia de hierro que en ausencia de dicho elemento. El análisis estadístico de los resultados corroboró la observación, pues la diferencia entre los tratamientos con y sin hierro fue significativa.

Al tratar estacas de cacao de los clones UF 613, SRL5, SR7 y Colombia 267 con ácido índol butírico en combinación con el fungicida Fermate (que contiene hierro), ZAVALA y BULLARD (36) observaron una mayor cantidad de raíces en éstas que en las tratadas con otros fungicidas como Phygon - XL y Zerlate, y que en las no tratadas.

Mediante un interesante estudio GLASSTONE (13) encontró que una solución nutritiva de macrosales purificadas, vitaminas, sacarosa y 0.01 p.p.m. de cobre y 0.35 p.p.m. de hierro como los únicos micronutrientes agregados, proporciona un crecimiento uniforme y adecuado a raíces aisladas de tomate.

* Jiménez, E. Comunicación personal. 1962.

El problema de la absorción del Fe por las plantas y su disponibilidad para las raíces ha sido extensamente investigado, usando varias formas de este elemento, entre ellas las orgánicas. Así, en un experimento con girasol cultivado en soluciones nutritivas, WEINSTEIN y ROBBINS (32) comprobaron que al adicionar 0.5 p.p.m. de Fe en forma de FeEDTA a una solución con 10 p.p.m. de manganeso (en forma de MnO_4) la planta se desarrolla en excelentes condiciones, especialmente el sistema radical. Sin embargo, cuando el hierro agregado a la solución estaba en forma de $FeSO_4$, se presentaron síntomas severos de deficiencia del nutrimento.

SIMONS et al (27) afirman que el crecimiento radical de la soya es particularmente sensible al suministro de hierro y que al aumentar la aprovechabilidad de este nutrimento, ya sea aumentando la cantidad de Fe en la solución o mediante la acción de quelantes débiles, el sistema radical aumenta su crecimiento en forma proporcional. La explicación que de dicho efecto dan GRANICK y GILDER, citados por BROWN (6), es la de que el FeEDTA posee la propiedad de actuar como una oxidasa según el pH del medio y transportar electrones dentro de la célula vegetal. Además, BURSTRÖM (11) ha comprobado que el Fe^{+++} y el Fe^{++} aceleran la división celular en raíces aisladas de trigo, bajo condiciones de completa oscuridad. También SMITH y SPRECHT citados por WEINSTEIN et al (31), obtuvieron respuesta favorable de plantas cítricas a la aplicación de Fe en forma de quelato, al incluirlo en una solución nutritiva que contenía altas concentraciones de manganeso, cobre y zinc.

Factores que afectan la absorción y utilización del Fe por la planta

Varios investigadores han estudiado en diferentes especies de plantas los efectos de la aplicación de hierro a plantas cultivadas en soluciones nutritivas (6, 7, 24, 27) o en aspersiones al follaje de diferentes cultivos (5, 8, 20, 22, 28, 29, 34), pero sin la finalidad específica de determinar cómo influye el hierro en el desarrollo del sistema radical. Dichos estudios han tenido entre otras finalidades la de determinar los factores que regulan la absorción y movilización del hierro, su incorporación a los tejidos o precipitación en ellos, su reutilización, la corrección de su deficiencia etc., usando varias formas de hierro (cloruro, sulfato, citrato, etc.) y también hierro radiactivo. Naturalmente, todos estos problemas están relacionados directamente o indirectamente con el normal desarrollo radical y su solución ha contribuido a esclarecer la influencia del hierro en la fisiología y morfología del sistema radical. A continuación se citan varios de los trabajos más recientes, relacionados con los objetivos de esta Tesis.

REDISKE (23) estudió la absorción y movilización del Fe^{59} en plantas de frijol y los factores que influyen en su distribución. Según él, el Fe^{59} se inmoviliza en los tejidos o puede permanecer libre para ser movilizado, de acuerdo con las condiciones del medio. Así, un alto contenido de fósforo y un pH de 7.0 en la solución, lo inmovilizan. En cambio, permanece libre cuando el contenido de Fe y P en los tejidos es bajo y las raíces de las plantas están sumergidas en un medio ácido de pH aproximado a 4.0. Halló además que cuando se inyectó

hierro en las hojas primarias de frijol, éste no se movió hacia las hojas más jóvenes, cuando el pH y el contenido de fósforo de la solución eran altos.

La absorción de Fe^{59} , incorporación y movilización del mismo en plantas de frijol negro (Phaseolus vulgaris L.) en distintas etapas del crecimiento de la planta y con relación a la velocidad de incremento en peso vivo de la misma, fue estudiada por VILLEGAS (35). Los valores de incremento y absorción se hicieron mayores durante la maduración y desarrollo de flores y frutos. Fueron constantes, sin embargo, durante el desarrollo vegetativo, lo que sugiere que hubo un nivel constante de acumulación de Fe en este período. El estudio antes citado se hizo agregando el Fe^{59} a la solución nutritiva en que crecieron las plantas, o inyectándolo a los pecíolos de las hojas primarias. Además, TEUBNER, et al (28) hicieron un estudio de algunos factores que afectan la absorción y transporte de nutrimentos aplicados al follaje, mediante el uso de isótopos radiactivos. Hallaron que las hojas de frijol retuvieron más los nutrimentos asperjados, y los absorbieron más rápidamente que las hojas de tomate. Tanto la superficie superior de las hojas como la inferior funcionan en el proceso de la absorción mediante mecanismos aún no claramente definidos. Los factores estudiados fueron pH, luz, temperatura, características de la superficie foliar, posibles lugares de entrada de los nutrimentos en la superficie foliar, agentes humectantes y relaciones entre el contenido de nutrimentos del medio en que crecen las raíces y la absorción foliar. Los isótopos usados fueron P^{32} , K^{42} , y Rb^{86} .

SUDIA y LYNCK (26) estudiaron el efecto del pH sobre la absorción de Fe^{59} , Sr^{89} y P^{32} por hojas de maíz de 10 días de edad y comprobaron que el pH de la solución en la que los iones son suministrados a las plantas, tiene un efecto significativo sobre la absorción. La mayor absorción ocurrió a pH de 2.5 a 4.5 y las menores absorciones fueron a pH de 7.0 y 8.2. Los tres iones minerales son perfectamente absorbidos por las hojas de maíz, pero la cantidad movilizada de éstas hacia otras partes de la planta fue muy variable. Un 45 a 47% del hierro activo en la planta se halló en los tallos y en las hojas, después de efectuado el transporte a partir de los lugares de aplicación.

Se ha comprobado que el Fe^{59} es interferido por el manganeso durante el proceso de la absorción y el transporte en plantas de piña. El Fe removido de la solución se deposita en las raíces en presencia de manganeso y la cantidad movilizada de ellas hacia las hojas es menor en solución con manganeso que sin él (28).

BUKOVAC y WITTWER (8) después de hacer un extenso estudio sobre la movilidad de los nutrimentos minerales, clasifican el hierro, el zinc, el cobre, el manganeso y el molibdeno como elementos parcialmente móviles, clasificación que está de acuerdo con la de BIDDULPH y WOODBRIDGE (3). Según BIDDULPH (1) hay poca duda de que el transporte de nutrimentos hacia otros órganos de la planta se hace inicialmente a través del floema y él lo considera como un proceso "activo". Las partes aéreas de la planta diferentes de las hojas, también absorben nutrimentos como la urea y otros que contienen C^{14} , P^{32} , K^{42} , S^{35} y Fe^{55} . Además, plantas de frijol tratadas con Fe en forma de aspersion, absorben 8% de la cantidad aplicada en 24 horas.

Se ha podido determinar que el Fe se precipita como fosfato en las venas de hojas de frijol tratadas con Fe^{55} cuando el pH del medio es de 7.0 y el contenido de fósforo alto. Pero cuando el pH es de 4.0 y el contenido de fósforo bajo, el hierro radiactivo agregado a la solución externa se distribuye uniformemente en la planta y no se presenta clorosis (2).

IGUE (18) estudió la reutilización del Fe^{59} en café y cacao, y comprobó que la concentración de fósforo en el medio, al igual que el pH del mismo, tienen un efecto marcado en la reutilización de dicho elemento. Observó además que la desaparición de la clorosis inducida por deficiencia de Fe en café está relacionada con el aumento del contenido de hierro en las hojas nuevas y que en cacao ocurrió una acumulación de hierro en las raíces con una parcial recuperación de la clorosis en las hojas nuevas cuando el contenido de fósforo en el medio era alto. En café y cacao, la absorción total de Fe^{59} EDTA fue mayor a pH 4.0 que a pH 6.0 u 8.0 y la distribución de hierro a los brotes apicales fue mayor a pH 4.0 para café y a pH 6.0 para cacao. Fue notoria la tendencia de las raíces nuevas de cacao a acumular y retener el hierro, lo mismo que las del café.

Según BOYNTON (5), la tolerancia de las hojas puede ser mayor a las soluciones orgánicas de Fe, que a concentraciones comparables de sales inorgánicas como el sulfato ferroso, pero el grado de recuperación de la clorosis puede ser menor. Las pequeñas cantidades de Fe que se aplican en fungicidas tales como Dimetil ditiocarbamato férrico, no causan apreciable recuperación de las clorosis producidas por deficiencia de este nutrimento.

Es interesante citar el trabajo de TUKEY et al (30), quienes comprobaron que el Fe⁵⁵⁻⁵⁹, el Zn⁶⁵, P³² y Cl³⁶ son lavados del follaje de plantas jóvenes y herbáceas con gran dificultad y que el lavado de estos elementos en hojas viejas y superiores es mayor que en hojas jóvenes y bajas. ³⁾

Mucho se ha discutido sobre la efectividad de la aplicación foliar de elementos nutritivos para corregir la deficiencia de nutrimentos en las plantas. De acuerdo con STEWART y LEONARD (25), el uso de compuestos inorgánicos de hierro aplicados en forma de aspersión al follaje, nunca ha sido satisfactorio para la corrección de la deficiencia del hierro en plantas cítricas. En un experimento en que se marcaron varios compuestos de hierro (quelatos) con Fe⁵⁵ y Fe⁵⁹, y se los aplicó en aspersión a hojas verdes y cloróticas de árboles cítricos para estudiar absorción y movimiento de zinc, hallaron meses después de la aplicación, mediante radioautografías, que no hubo movilización del hierro a partir del punto de aplicación.

Cultivo de raíces aisladas

El cultivo de raíces aisladas constituyen un excelente medio para determinar las funciones fisiológicas de los micronutrientes inorgánicos, por lo que ha sido usado intensamente en los últimos años. Para hacer la anterior afirmación, GLASSTONE (13) aduce las siguientes razones:

1. Los tejidos de las raíces aisladas no tienen estructuras especiales para el almacenaje de nutrimentos y por lo tanto,

agotan rápidamente los que tienen en sus células. Por esto puede asumirse que después de un breve tiempo, el medio de cultivo constituye la única fuente de donde pueden tomarlos.

2. Si se hacen otros cultivos a partir de materiales tomados de los iniciales, sin renovar la solución, la deficiencia de uno o varios elementos se acentúa rápidamente.

GLASSTONE (13) estudió también el efecto del hierro en el desarrollo de raíces aisladas de tomate, usando sulfato ferroso en las siguientes dosis: 0, 0.35, 0.70, y 1.40 p.p.m. Pudo determinar así que el hierro es absolutamente indispensable para el metabolismo de las raíces del tomate, pues éstas no crecen en su ausencia. Halló además que la dosis de 0.35 p.p.m. fue la más adecuada, pues niveles superiores a éste no produjeron aumentos significativos en el desarrollo radical.

WHITE (33) usó con éxito 1.75 p.p.m. de sulfato ferroso en el cultivo de raíces aisladas de trigo, pero no obtuvo los mismos resultados con cloruro y con citrato férrico en igual proporción que la del sulfato. También DAWSON y STREET (12) observaron el comportamiento de clones de raíz de trébol rojo en una solución de WHITE modificada agregándole 0.0017 mg/l de ácido molíbdico, 0.013 mg/l de sulfato de cobre, y hierro en la forma de FeEDTA en la proporción de 1 p.p.m., con diferentes concentraciones de sacarosa. El desarrollo radical fue excelente, tanto de la raíz principal de cada clon, como de las laterales.

De acuerdo con BURSTRÖM (10, 11), la luz inhibe el crecimiento de las raíces aisladas de trigo, y el alargamiento de las células radiculares de esta planta depende del suministro de hierro y ácido giberélico. Según él, a medida que aumenta la proporción de clorofila en las raíces, se produce deficiencia de Fe que causa una inhibición en la rata de alargamiento celular. Existe una estrecha correlación entre la inhibición del desarrollo radical por efecto de la luz y la formación de clorofila.

GUDJONSDOTTIR y BURSTRÖM (16), comprobaron que los alcoholes primarios de bajo peso molecular y en bajas concentraciones ejercen una acción estimulante sobre el crecimiento de raíces aisladas de trigo, en presencia de hierro y de luz. El alcohol metílico y los alcoholes secundarios y terciarios, no tienen efecto sobre el desarrollo radical, tanto en presencia de luz como en la oscuridad.

Entre la numerosa literatura revisada, sólo se halló un trabajo efectuado con raíces aisladas de cacao. Dicho trabajo fue hecho en Trinidad por JONES, HAVORD y MALIPHANT (19), quienes estudiaron la absorción de nutrimentos (N, P, K, y Ca) por raíces aisladas de árboles de cacao, sumergiendo muestras de 200 mg en 4 cc de solución Hoagland completa diluída 5 veces, durante 24 horas, en una atmósfera saturada de humedad. Al analizar las soluciones después del período de absorción, comprobaron que las raíces toman los nutrimentos en algunos casos y en otros los exudan, y que en general, las raíces provenientes de plantas carentes de N, P, K, o Ca muestran tendencia a absorber preferentemente estos nutrimentos, aunque las raíces deficientes en K

absorbieron Ca en cantidades apreciables. En todos los casos en que la provisión de potasio fue adecuada, las raíces exudaron este elemento. No estudiaron el efecto de los nutrimentos en el desarrollo radical, sino la absorción de éstos por las raíces, en un período de tiempo muy limitado.

MATERIALES Y METODOS

Antes de entrar en los detalles correspondientes a este capítulo, se enumeran los experimentos realizados.

1. Efecto de dosis variables de Fe en forma de quelato (agregado a la solución) sobre el desarrollo radical del cacao.
2. Efecto de dosis variables de Fe en forma de quelato (aplicado en aspersión al follaje) sobre el desarrollo radical del cacao.
3. Movilización del Fe⁵⁹ en plantas de cacao.
4. Absorción del Fe⁵⁹ por hojas cortadas de cacao.
5. Efecto de dosis variables de Fe en forma de quelato (agregado a la solución) sobre el desarrollo radical del café.
6. Efecto de dosis variables de Fe en forma de cloruro (aplicado en aspersión al follaje) sobre el desarrollo radical del café.

En los experimentos 1 y 2 se usaron 24 plantas de cacao provenientes de semilla (clon UF 667), de 3 meses de edad y en los experimentos 5 y 6, 30 plantas de café (variedad Caturra) de 3 meses de edad, todas las cuales fueron cultivadas en el invernadero, en solución nutritiva Hoagland Nº 2 sin hierro (17). La solución fue puesta en frascos de vidrio de 3 litros de capacidad, protegidos contra la acción de la luz con bolsas negras de polietileno.

En todos los experimentos se dejaron crecer las plantas en la solución nutritiva hasta que los síntomas de deficiencia de hierro eran claramente visibles, estando así listas para aplicarles los tratamientos.

Las soluciones fueron renovadas periódicamente y estuvieron provistas de aereación permanente. En cada recipiente de vidrio se cultivaron 5 plantas de café para los experimentos Nos. 5 y 6, y 4 de cacao para los experimentos Nos. 1 a 4.

En el estudio de movilización radical del Fe^{59} en cacao se usaron 4 plantas del clon UF 667 de 4 meses de edad. Se agregaron 150 lambdas de Fe^{59} (con 3.711 cuentas por minuto) diluídas en 10 cc de agua destilada a la solución nutritiva. Después de 4 días se sacaron las plantas de la solución radiactiva, se lavaron cuidadosamente las raíces con agua destilada y se secaron en una estufa a 70°C hasta obtener peso constante. Luego se tomaron muestras de hojas, tallos y raíces para determinar con un contador G.M. automático la radiactividad, que se expresa en cuentas por minuto por gramo de material vegetal (c/min/gm).

En el experimento de absorción foliar del Fe^{59} por hojas de cacao cortadas, se emplearon 16 plantas con las mismas características de las usadas en el experimento antes citado. La absorción del Fe^{59} se determinó mediante el siguiente procedimiento: se hicieron 4 grupos de 4 plantas y tanto las hojas como el sistema radical se envolvieron cuidadosamente en toallas de papel humedecidas con agua, dejando por fuera una hoja de la parte superior de cada planta. Estas hojas se unieron con "clips" después de colocarlas una sobre otra y se cortó aproximadamente una cuarta parte de ellas (del ápice hacia el tallo). Los bordes cortados se sumergieron en la solución radiactiva. Fue necesario para ello colocar las plantas en posición casi horizontal, procurando que las raíces estuviesen dentro de un recipiente con

solución nutritiva. En un plato de Petri se pusieron 48 microcurios de Fe^{59} (50 lambdas con 11.130 cuentas por minuto) disueltos en 10 cc de agua destilada y en éste se sumergieron las superficies cortadas de las hojas (aproximadamente 0.5 cm) durante una hora exactamente, al cabo de la cual se sacaron, se dejó escurrir el hierro no absorbido, se desataron las hojas y raíces y se colocaron las plantas en posición normal en frascos con solución fresca en el invernadero. Después de 24, 72, 110 y 158 horas de aplicado el hierro, se lavaron con agua destilada las hojas tratadas de cada grupo, se separaron las distintas partes de la planta, se eliminó en las hojas tratadas una faja de 2.5 cms. (aproximadamente) de ancho y se secó el material en estufa de circulación forzada a 70°C hasta obtener peso constante. Luego se tomaron muestras de hojas, tallos y raíces para determinar la radiactividad en un contador G.M. automático, dejando una planta de cada grupo para hacer autoradiografías.

En el experimento N° 2 se usó como humectante el Tween 80 y "Peps" en el N° 6. Varias precauciones se tomaron en estos dos experimentos para impedir que las soluciones de Fe aplicadas en aspersion al follaje, llegaran hasta las raíces.

Las plantas de cacao y de café tratadas con hierro no radiactivo (en forma de quelato para las primeras y de cloruro para las segundas) recibieron este elemento disuelto en agua destilada y agregando a la solución (2, 4 y 6 p.p.m.) en unos casos y en otros asperjado al follaje (10 y 20 p.p.m.). Las aspersiones se repitieron dos veces por semana, hasta que los síntomas de deficiencia desaparecieron casi por completo.

Antes de aplicar los tratamientos y después que desaparecieron los síntomas de deficiencia de Fe, o sea al cosechar las plantas, se tomaron los siguientes datos: volumen y longitud de las raíces, y longitud de los tallos. Además, antes de secar en estufa las plantas de los experimentos Nos. 1, 2, 5 y 6 se anotaron otras características tales como color de las hojas (presencia o ausencia de clorosis), grado de ramificación de las raíces, síntomas de enfermedades causadas por agentes patógenos, etc.

En los experimentos Nos. 1, 2, 5 y 6 se usó un diseño factorial de 2 x 4 (2 plantas y 4 tratamientos), siendo las plantas café y cacao y los tratamientos 0, 2, 4 y 6 p.p.m. de Fe. En los experimentos Nos. 1 y 2 se usaron 4 repeticiones, y 5 en los Nos. 5 y 6, todos distribuidos al azar dentro de cada repetición en el invernadero. El cálculo de los incrementos relativos se hizo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Incremento final} - \text{Incremento inicial}}{\text{Incremento inicial}} \times 100$$

Se usó la fórmula anterior en los análisis estadísticos debido a la gran variación obtenida en los datos experimentales (principalmente de cacao) y porque se facilita mucho el análisis estadístico de los experimentos y su correcta interpretación.

Como complemento de los experimentos con plantas cultivadas en soluciones nutritivas, se llevaron a cabo algunos estudios con raíces aisladas de café, cacao y frijol. Después de una serie de observaciones preliminares, se seleccionó el método de WHITE (33), muy usado en

Norte América y Europa, pero introduciéndole varias modificaciones con sistentes en reemplazar la sacarosa por dextrosa, sin cambiar la proporción recomendada que es de 20 gramos por litro. Además, se usaron tres dosis de hierro (en lugar de una) y se filtraron las vitaminas y aminoácidos en un filtro bacteriológico de tipo UF, con el fin de evitar su desnaturalización al someterlos a las altas temperaturas y presiones de la autoclave.

El cambio de dextrosa por sacarosa en la solución de WHITE se hizo debido a que las experiencias previas en trabajos con embriones de cacao efectuados por IBÁÑEZ^{*}, indicaron que las raíces de esta planta no tienen las enzimas adecuadas para atacar la molécula de sacarosa y convertirla en fructosa y dextrosa.

El medio líquido de WHITE (reforzado además con Cu y Mo) usado inicialmente, fue modificado posteriormente debido a su ineffectividad, para convertirlo en semi-líquido o sólido al agregarle agar en la proporción de 5 y 10 gramos respectivamente por cada 1000 cc de solución.

Otro de los medios usados para cultivar las raíces fue papa-dextrosa-agar, que combina estos tres materiales en las proporciones siguientes: papa 100 gramos, dextrosa 10 gramos, agar 15 gramos.

Las raíces se obtuvieron en unos casos (café y cacao) de plantas cultivadas en soluciones nutritivas en el invernadero y en otros (cacao y frijol) de semillas germinadas por espacio de una semana a

* Comunicación personal. 1963.

temperatura ambiente en el laboratorio. Para el cacao y frijol se usaron semillas del clon UF 668 y de la variedad JAMAPA, respectivamente. Dichas semillas fueron esterilizadas superficialmente con una solución de "Clorox" (hipoclorito de sodio) al 5%, durante 5 minutos. El desinfectante se removió lavando con agua destilada y esterilizada.

La germinación de las semillas se llevó a cabo en cajas de Petri esterilizadas, sobre una capa de papel de filtro Watman Nº 1, humedecida con agua destilada y esterilizada, o en cámaras húmedas de plástico y sobre toallas de papel esterilizadas.

Después de que las raíces primarias de las plántulas alcanzaron una longitud aproximada de 5 cm., se cortaron ápices de 10 mm. de largo, se desinfectaron por un minuto en bicloruro de mercurio al 1% y se transfirieron asépticamente en una cámara de inoculación a frascos Erlenmeyer de 120 ml., a tubos cilíndricos de vidrio de 30 ml. o a platos de Petri de 7 cm. de diámetro, que contenían el medio o solución nutritiva más hierro, en la proporción de 0, 2, 4 y 6 p.p.m. Los recipientes con las raíces se conservaron en una incubadora a temperatura constante de 25°C, en la oscuridad.

El uso de bicloruro de mercurio para desinfectar las raíces de cacao se suprimió posteriormente y además se empleó un antioxidante (cisteína 0.00005 M), que redujo la acción oxidante y prolongó la vida de las raíces durante 8 días, aunque el desarrollo no fue por esto superior a 3 mm. semanales.

RESULTADOS

Cacao

Respuesta de plantas de cacao deficientes en hierro a la aplicación de este nutrimento al follaje o a la raíz

Los resultados de los experimentos se resumen a continuación:

1. Incremento relativo del volumen radical

Efectuado el análisis estadístico de los datos obtenidos, se determinó que no hay significancia estadística en la respuesta a los niveles de hierro agregados a la solución nutritiva. Tampoco la hay cuando se comparan presencia y ausencia de hierro o los diversos niveles de este elemento entre sí (2, 4, y 6 p.p.m.) (Cuadro 1). Se observó una tendencia creciente en la curva de aumento de volumen

CUADRO 1. Efecto de la aplicación de hierro (FeEDTA) en el incremento de volumen y longitud radical de plantas cloróticas de cacao^{*}.

Incremento relativo promedio (%) en:	p.p.m. de Fe					
	0	A La Solución			Al Follaje	
		2	4	6	10	20
a) Volumen	86.67	153.02	173.27	270.47	161.65	76.52
b) Longitud	280.80	760.32	451.85	522.00	550.20	429.95

* Los datos son promedios de 4 repeticiones.

radical al aumentar la dosis de Fe agregada a la solución (Figuras 1 y 2), aunque no se detectó significancia estadística. Esto puede

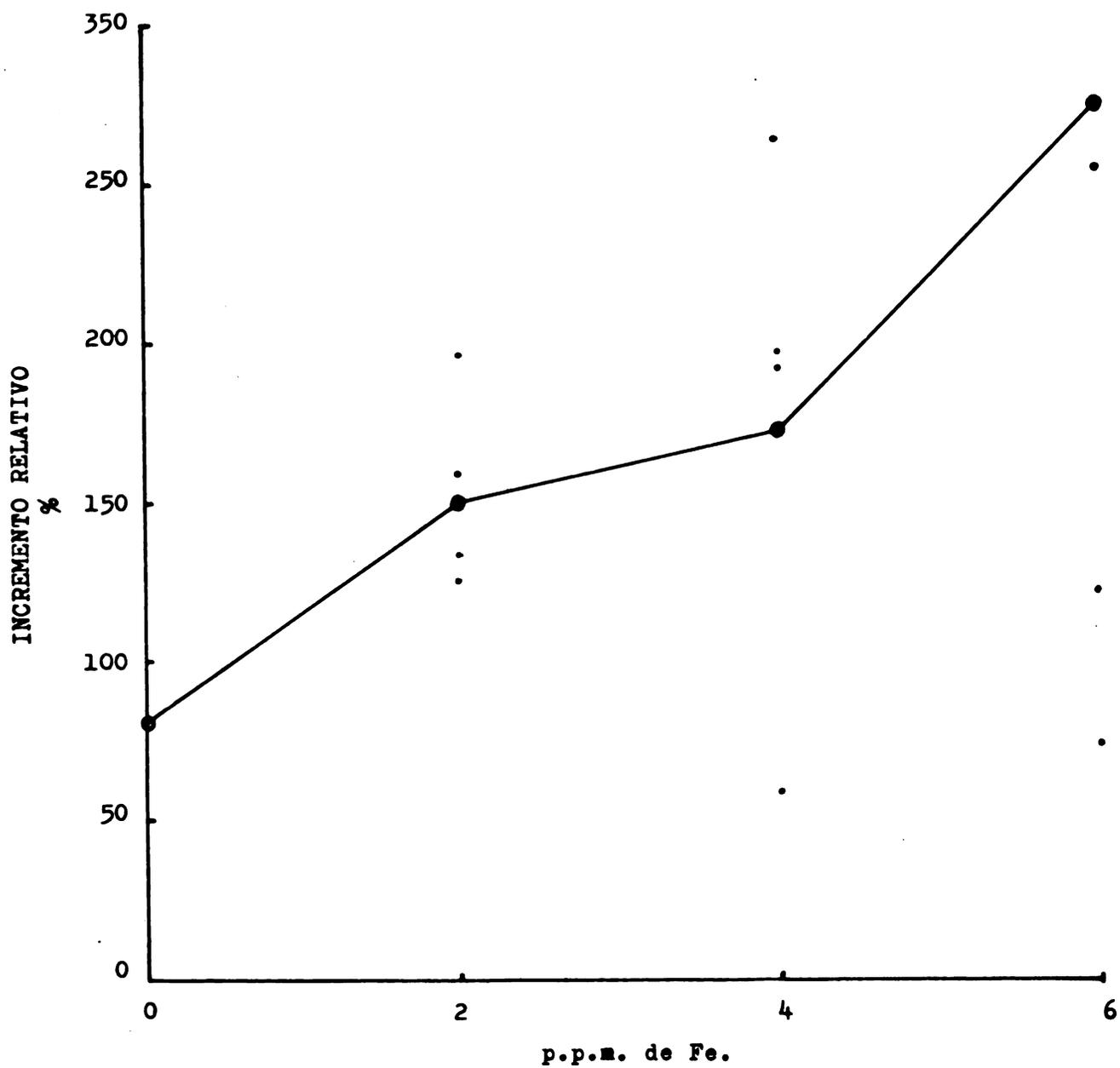


Fig. 1. Incremento relativo del volumen radical de plantas cloróticas de cacao en 90 días. Fe (quelato) agregado a la solución.

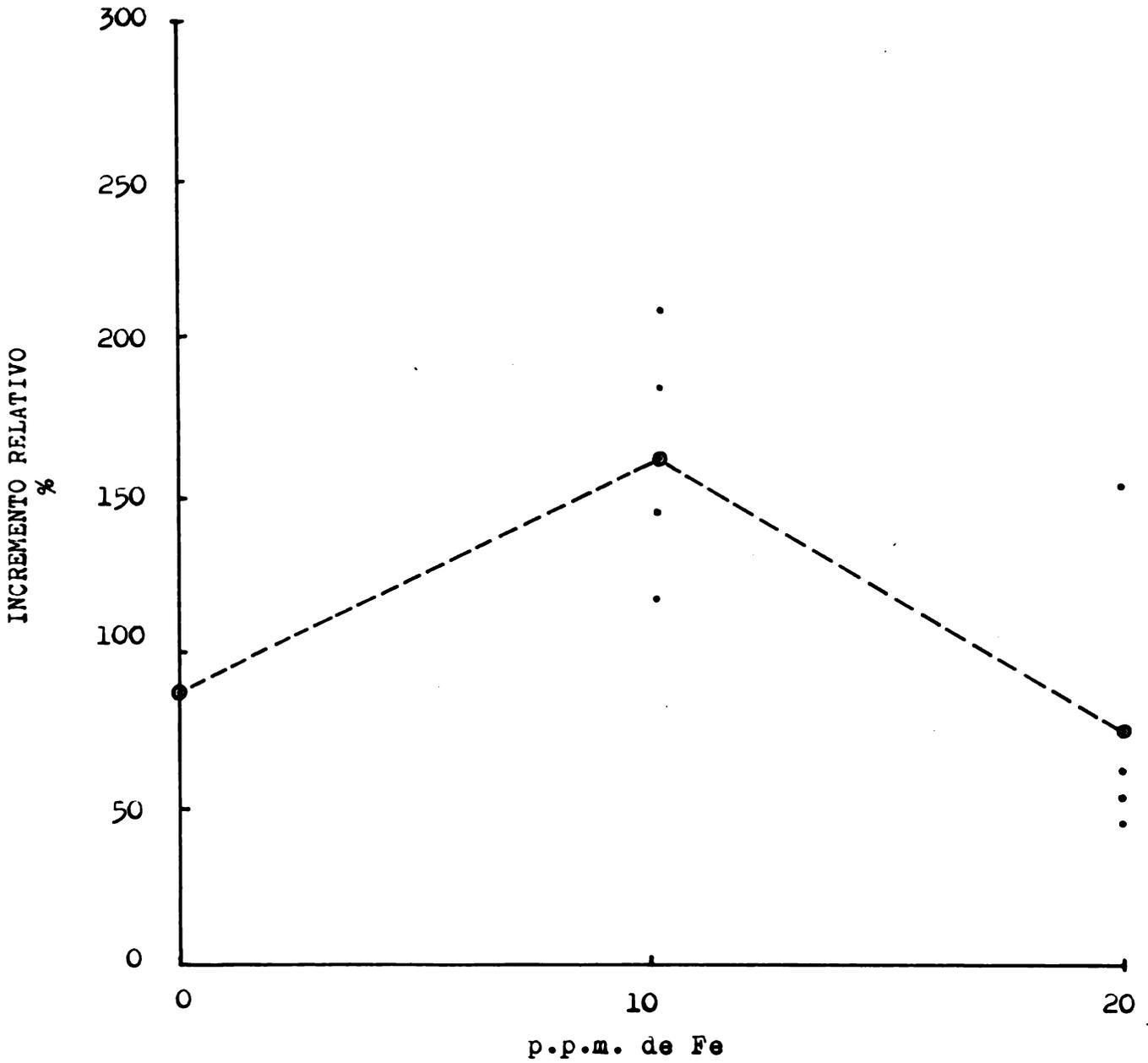


FIGURA 2. Incremento relativo del volumen radical de plantas cloróticas de cacao en 90 días. Fe (quelato) en aspersion al follaje.

atribuirse a la gran variación del material estudiado y al reducido número de repeticiones, que solo fue de cuatro, lo que produjo en el análisis un error experimental muy alto. Igual cosa sucedió con el efecto del hierro aplicado en aspersión al follaje, pues no fue estadísticamente significativo para la comparación entre dosis. En este último caso, la tendencia del incremento relativo se manifestó en forma de un brusco ascenso para 10 p.p.m. de Fe y un rápido descenso del mismo para 20 p.p.m., lo que indica un efecto depresivo de este último nivel sobre el incremento de volumen radical.

2. Incremento relativo en la longitud de las raíces

A pesar de que hubo una tendencia general ascendente en la curva de incremento de la longitud radical al aumentar la dosis de Fe en la solución, ésta fue muy variable y tuvo algunos altibajos (Figuras 3 y 4). Sin embargo, hubo significancias estadísticas para las comparaciones entre ausencia y presencia de hierro, y entre el nivel de 2 p.p.m. con relación a los de 4 y 6 p.p.m., pero no entre los dos últimos. En este caso también el error experimental fue alto, pero sus efectos no se hicieron sentir tanto en los resultados del análisis, como en el experimento anterior.

Cuando el Fe se aplicó en aspersión al follaje, hubo una clara tendencia ascendente en el incremento de la longitud radical a medida que se hicieron aumentos crecientes en la dosis de hierro hasta 10 p.p.m., aunque no hubo significancia estadística para la comparación entre presencia y ausencia de Fe, ni entre los dos niveles mayores de este nutrimento. La dosis de 20 p.p.m. disminuye un poco el

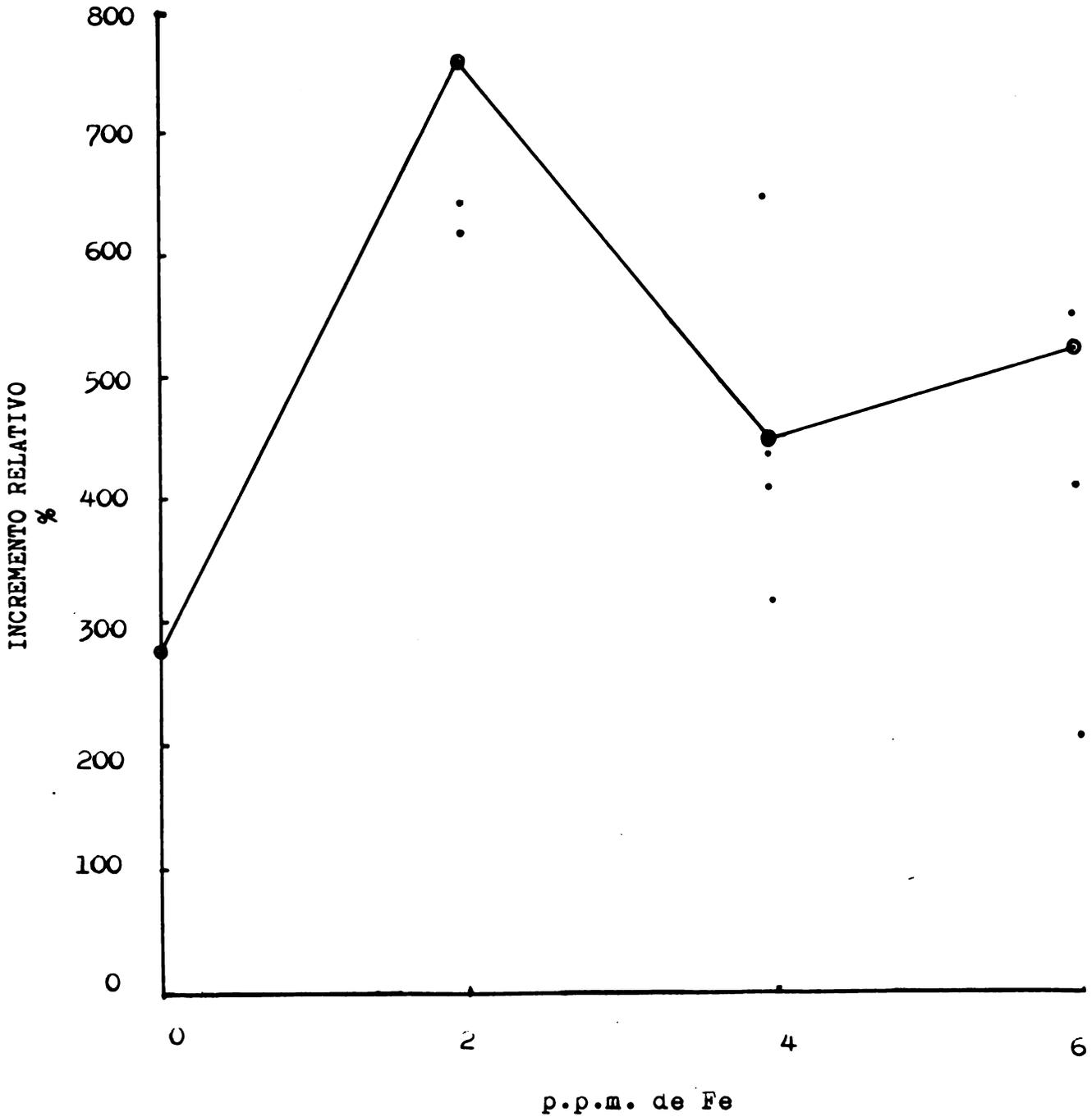


FIGURA 3. Incremento relativo en la longitud radical de plantas cloróticas de cacao. Fe (quelato) agregado a la solución. Duración del tratamiento: 90 días.

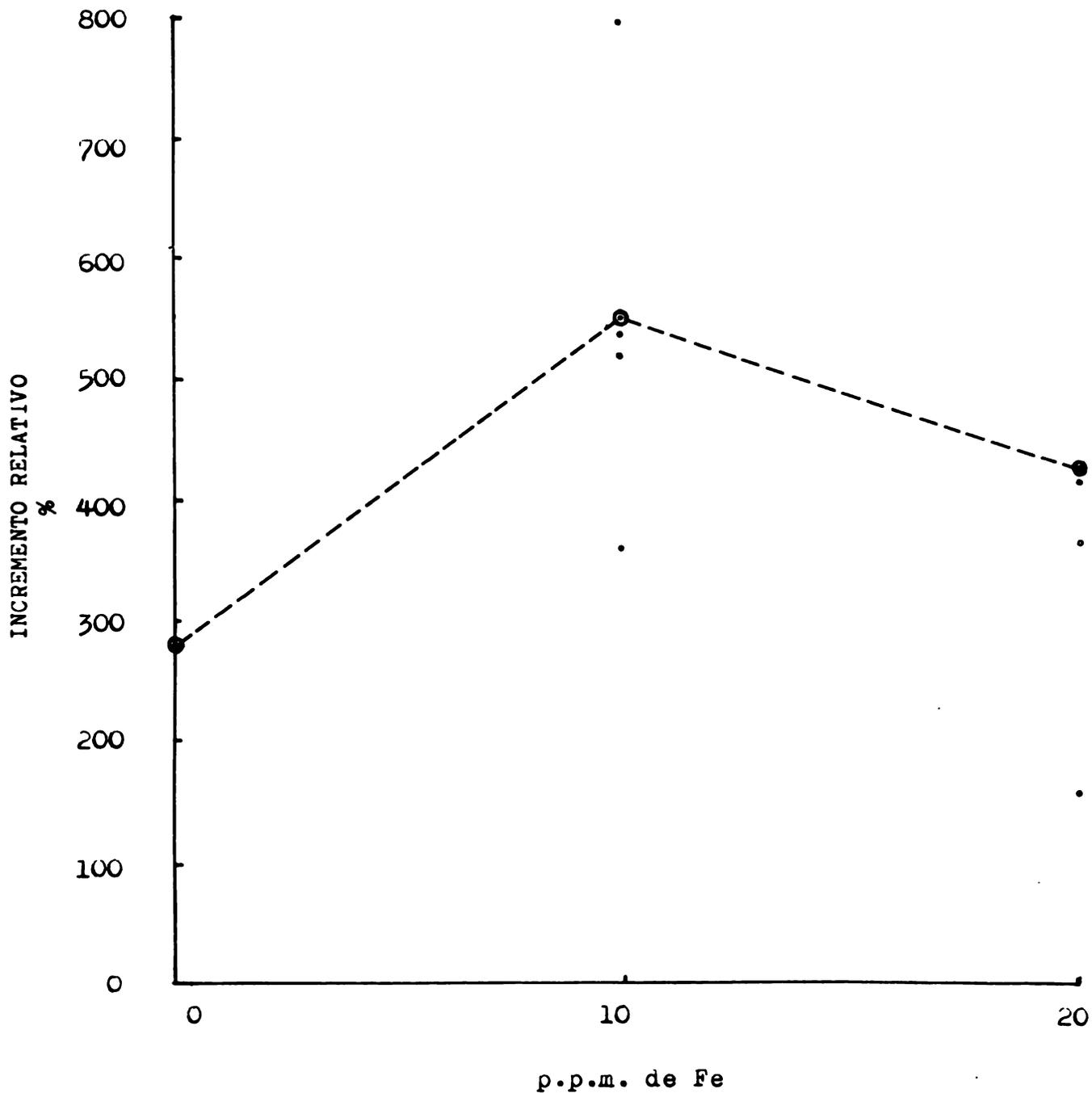


FIGURA 4. Incremento relativo en la longitud radical de plantas cloróticas de cacao. Fe (quelato) en aspersión al follaje. Duración del tratamiento: 90 días.

incremento relativo de la longitud radical, pero no tanto como en el caso de volumen relativo.

3. Incremento relativo en la longitud de los tallos

En este caso se tuvo una mayor variabilidad del material que en los dos anteriores, por lo que no hubo significancia estadística para presencia y ausencia de hierro, ni para la comparación entre las diversas dosis de Fe aplicadas. La tendencia de la curva de respuesta fue de un suave descenso al aumentar la concentración de Fe en la solución hasta 4 p.p.m. y de brusca caída para 6 p.p.m. Cuando se aplicó el hierro en aspersión al follaje (Cuadro 2), el descenso fue muy pronunciado, llegando a menos del 2% del incremento relativo con la dosis de 20 p.p.m. (Figuras 5 y 6).

CUADRO 2. Efecto de la aplicación de hierro (Fe EDTA) en el incremento de la longitud de los tallos, en plantas cloróticas de cacao.

p.p.m. de Fe	A la Solución			Al Follaje		
	0	2	4	6	10	20
Incremento relativo* promedio (%) en la longitud de los ta- llos	13.47	12.92	12.57	7.52	9.92	1.62

* Promedios de cuatro repeticiones.



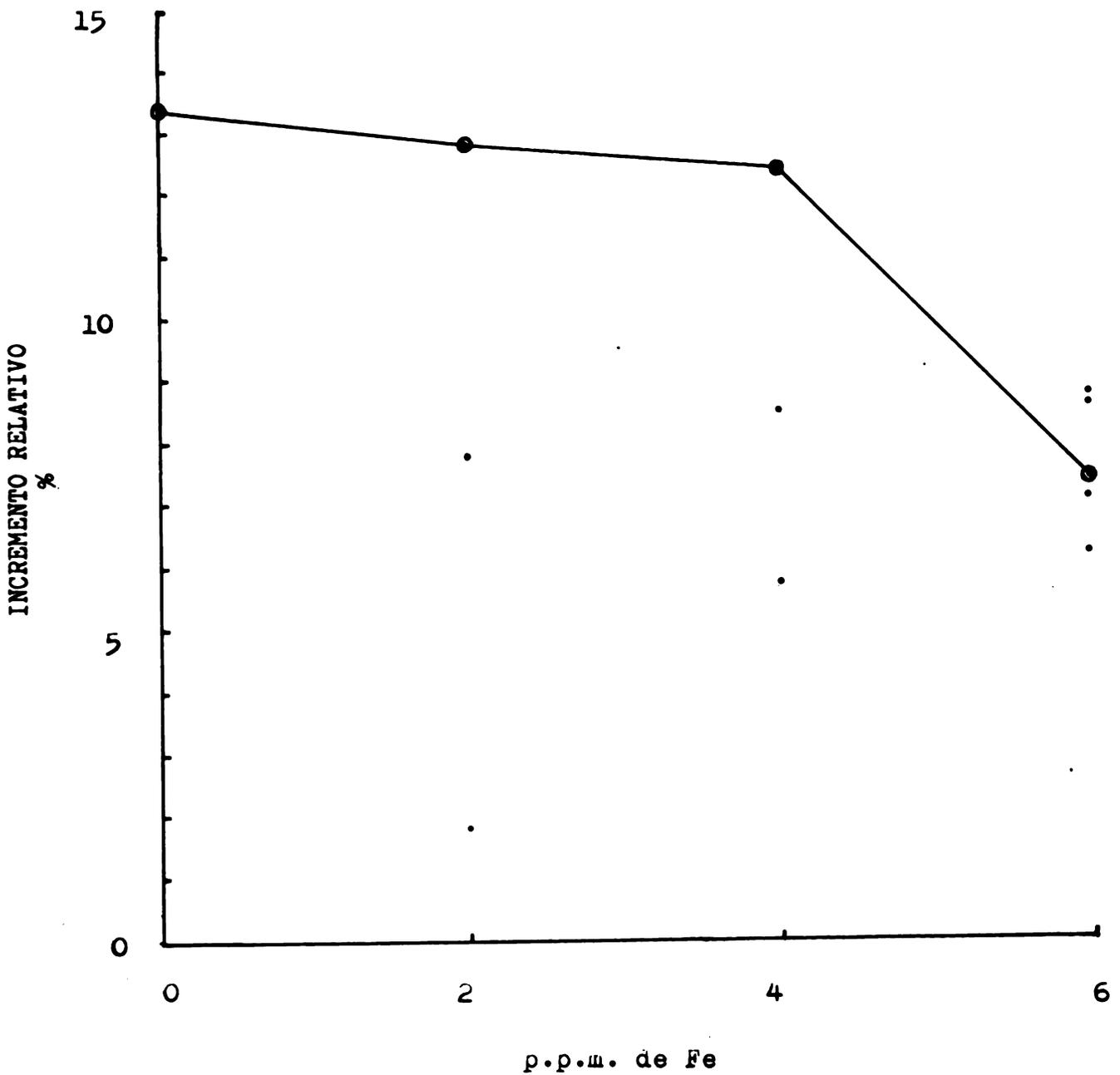


FIGURA 5. Incremento relativo en la longitud de los tallos de plantas cloróticas de cacao. Fe (quelato) agregado a la solución. Duración del tratamiento: 90 días.

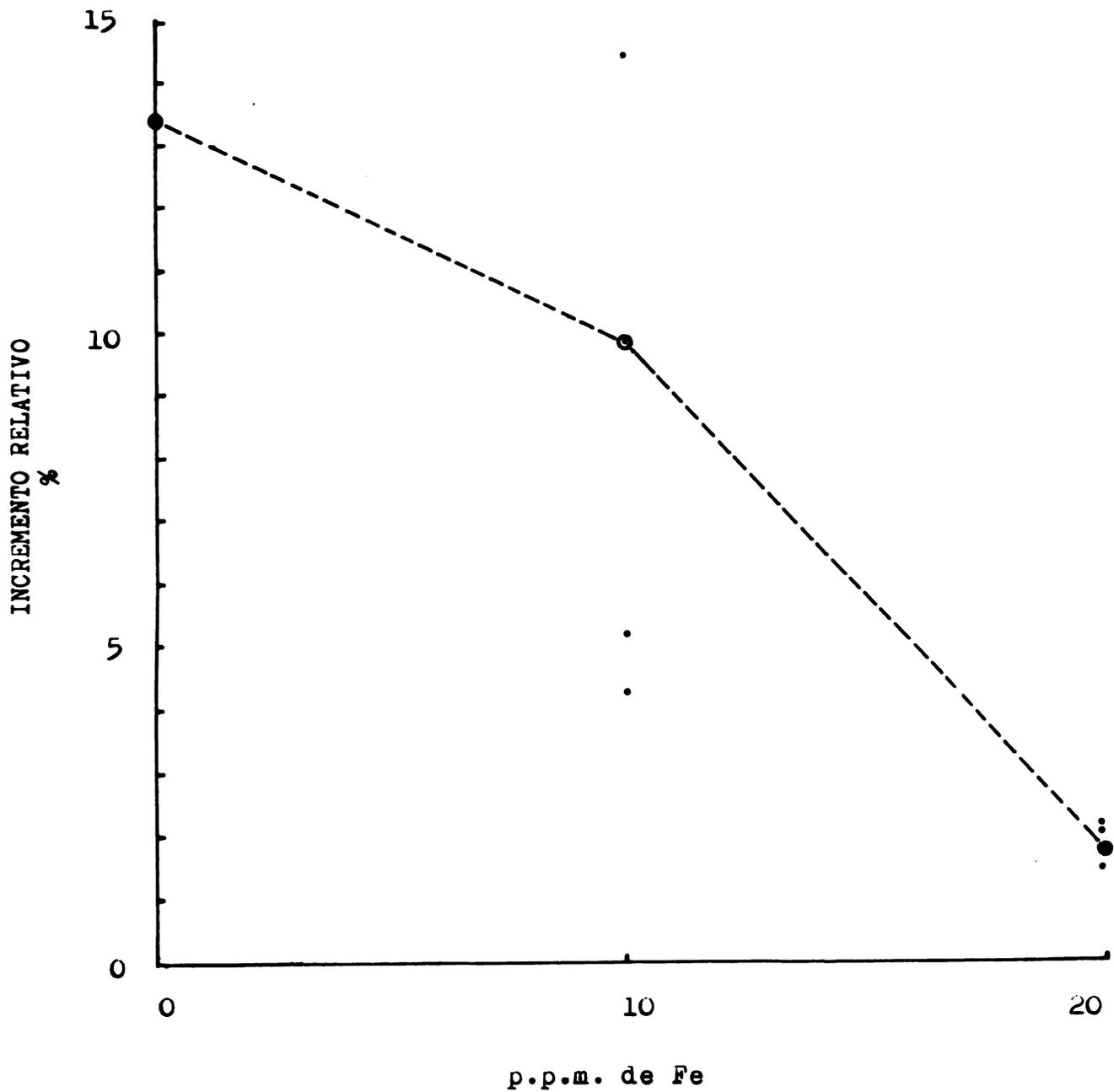


FIGURA 6. Incremento relativo en la longitud de los tallos de plantas cloróticas de cacao. Fe (quelato) en aspersion al follaje. Duración del tratamiento: 90 días.

4. Incremento relativo en peso seco de:

a. Raíces

La comparación entre presencia y ausencia de Fe fue significativa cuando las plantas tomaron este nutrimento de la solución, pero no lo fue para sus distintos niveles. Cuando las plantas absorbieron el hierro aplicado al follaje, la comparación entre presencia y ausencia no fue significativa, ni la de los niveles con 10 y 20 p.p.m.

b. Tallos

Hubo significancia estadística para la comparación entre presencia y ausencia de hierro cuando se aplicó este elemento a la solución, pero no entre los niveles. Cuando el Fe se aplicó en aspersión al follaje ocurrió lo contrario, pues hubo significancia entre 10 y 20 p.p.m. y no entre presencia y ausencia.

c. Hojas

No hubo significancia estadística para la comparación entre presencia y ausencia de Fe, ni entre los niveles aplicados al follaje o agregados a la solución.

Absorción foliar y traslación del Fe⁵⁹

En este experimento, el análisis estadístico indicó que hubo significancia para la comparación entre el número de c/min/gm de tejido en hojas vs. tallos y raíces en los períodos de 1, 3, 5 y 7 días de observación. Las diferencias fueron significativas al 1% de probabilidad estadística a favor de hojas en la comparación de 1, 5 y 7 días y

al 5% para las de 3 días (Cuadro 3). En ninguno de los períodos citados hubo significancia estadística para la comparación de radiactividad entre tallos y raíces.

CUADRO 3. Absorción foliar de Fe^{59} por plantas cloróticas de cacao.
Promedio de radiactividad en c/min/gm^{*}.

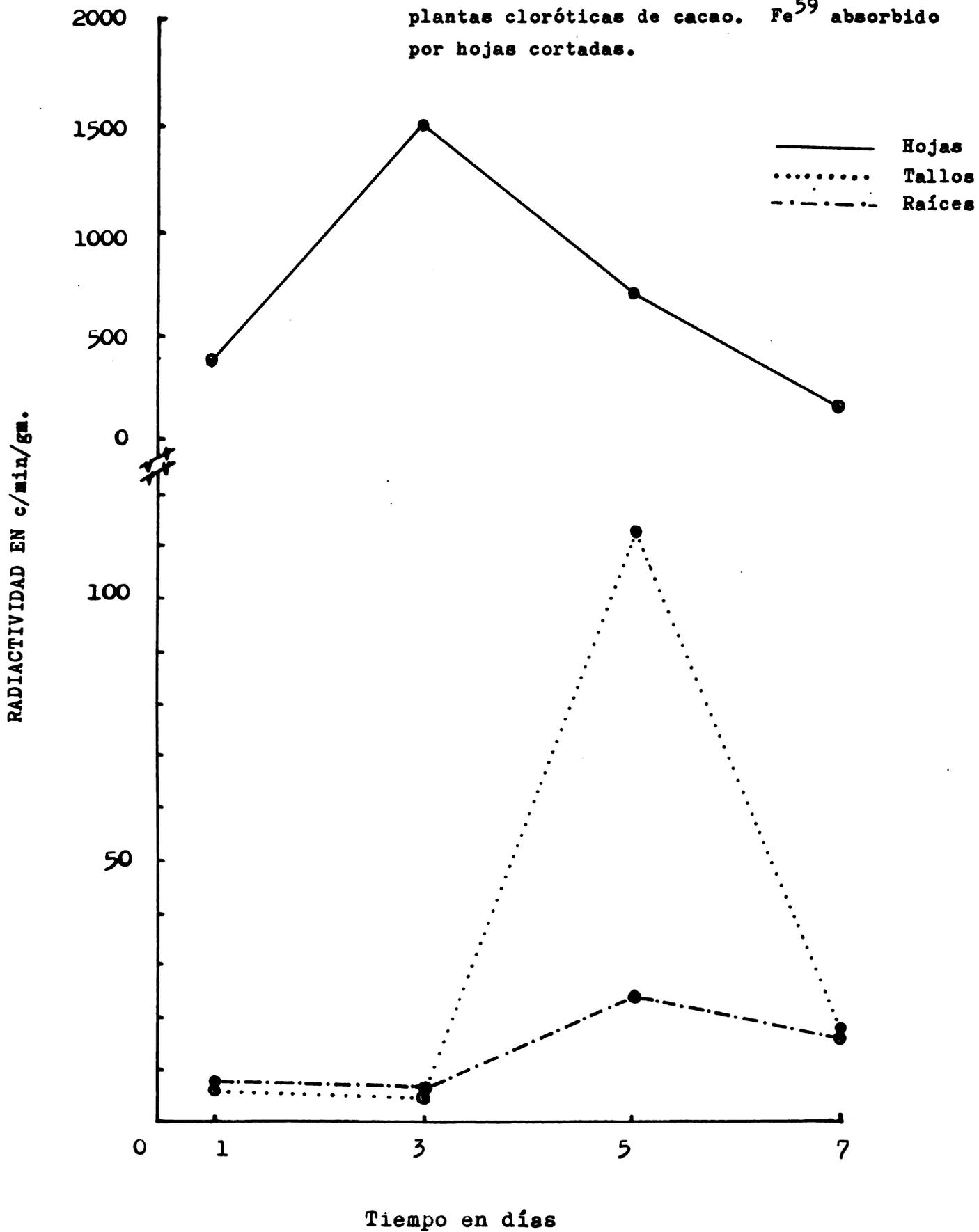
ORGANO	Primer Día	Tercer Día	Quinto Día	Séptimo Día
Hojas	279.51	1534.09	730.12	214.07
Tallos	7.97	7.32	24.24	17.99
Raíces	6.31	5.16	111.95	16.13

* Los datos son promedios de 4 repeticiones.

La curva de la distribución de la radiactividad (Figura 7) en hojas registró un brusco ascenso hasta el tercer día, pero de éste en adelante se inició un descenso que la llevó al término del séptimo día un poco más abajo del límite alcanzado en el primer día. Para las raíces, el aumento fue brusco entre el tercero y el quinto día y descendió luego entre el quinto y séptimo día. En los tallos se registró un brusco aumento entre el tercero y quinto día, pero un rápido descenso entre el quinto y séptimo.

También en este experimento hubo variabilidad considerable en el material experimental, excepto en el correspondiente al séptimo día.

Fig. 7. Distribución de la radiactividad en función del tiempo en hojas, raíces y tallos de plantas cloróticas de cacao. Fe^{59} absorbido por hojas cortadas.



Absorción radical y traslación del Fe⁵⁹

En este experimento se observó que la mayor parte del hierro (97.3%) permaneció en las raíces en 96 horas que fue el período de absorción. Los tallos contenían sólo un 0.5% y las hojas un 2.2% de la radiactividad total asociada con la planta. Los datos anteriores confirman los obtenidos por IGUE (18), en plantas de cacao. Aunque la radiactividad en las raíces fue muy alta en comparación con la de tallos y hojas (Cuadro 4), se registró un mayor número de c/min/gm en las hojas que en los tallos. La "actividad específica" varió considerablemente en los tallos y en las hojas de las plantas tratadas, aunque en menor grado en estas últimas.

CUADRO 4. Absorción radical de Fe⁵⁹ por plantas cloróticas de cacao.
Promedio de radiactividad en c/min/gm^{*}.

Planta N ^o	Raíces	Tallos	Hojas
1	23.130	145	466
2	27.110	157	474
3	22.530	96	539
4	20.620	116	604
\bar{x}	23.350	130	520
%	97.3	0.5	2.2

* Los datos son promedios de 4 repeticiones.

Cultivo de raíces aisladas en diversos medios nutritivos

No fue posible obtener crecimiento adecuado de las raíces de cacao en diversos medios nutritivos, a pesar de los esfuerzos realizados para lograrlo. La rápida oxidación y muerte de los tejidos al separar la raíz del hipocotilo impidió apreciar el efecto de las diversas dosis de hierro aplicadas sobre el desarrollo radical. Cuando las raíces de cacao imbibieron una solución de cisteína (0.0005M) antes de ser cortadas, se logró prolongar su vida y obtener un escaso crecimiento.

Es importante anotar que el medio sólido (Agar-H₂O) y el semilíquido (soluciones de WHITE y GLASSTONE mas Agar al 5%) fueron los que más favorecieron el crecimiento de las raíces aisladas de cacao.

Café

Respuesta de plantas de café deficientes en hierro a la aplicación de este nutrimento al follaje o a la raíz

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, Tampoco la hubo para la comparación entre presencia y ausencia de hierro, pero sí se obtuvo una respuesta de tipo lineal (Cuadro 5) para el incremento relativo de la longitud radical (Figura 8) con las dosis de 0, 10 y 20 p.p.m. de Fe.

CUADRO 5. Efecto de la aplicación de hierro a la solución (quelato) y al follaje (cloruro) sobre el incremento relativo de la longitud de los tallos de plantas cloróticas de café^{*}.

p.p.m. de Fe	A La Solución			Al Follaje		
	0	2	4	6	10	20
Incremento relativo promedio (%) en la longitud de los tallos	7.81	15.94	6.74	15.59	14.89	20.91

* Los datos son promedios de cinco repeticiones.

Cultivo de raíces aisladas en diversos medios nutritivos

No se logró un crecimiento satisfactorio de las raíces aisladas del café, que permitiera apreciar el efecto de los tratamientos aplicados (0, 2, 4 y 6 p.p.m. de Fe en forma de quelato). Tanto en el medio líquido como en los semilíquidos y sólidos, las raíces se mantuvieron vivas durante tres semanas, sin que crecieran siquiera uno o dos milímetros.

Frijol

Cultivo de raíces aisladas en diversos medios nutritivos

A pesar de que crecieron un poco mejor que las de cacao y café, las respuestas a los niveles de Fe (0, 2, 4 y 6 p.p.m.) aplicados, no fueron significativas. Después de una semana de cultivo, los promedios

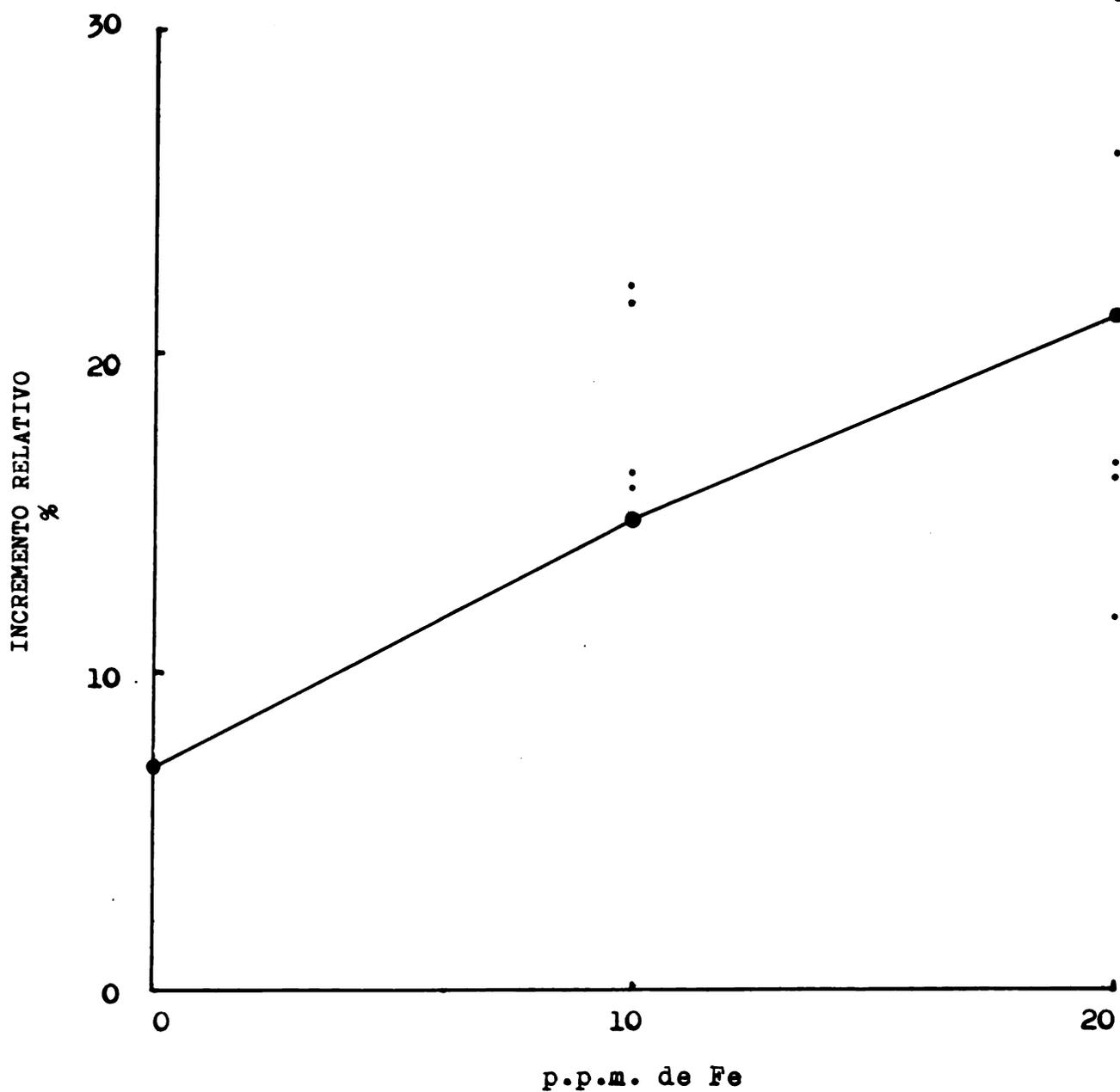


FIGURA 8. Incremento relativo de la longitud radical de plantas cloróticas de café. Fe en forma de cloruro aplicado en aspersión al follaje. Duración del tratamiento: 90 días.

de ocho repeticiones para los tratamientos con 2 y 6 p.p.m. de Fe (en forma de quelato) fueron 1.66 y 1.65 cms. respectivamente, en tanto que los de 0 y 4 p.p.m. fueron 1.49 y 1.50 cms. La longitud inicial de las raíces fue de 1.00 cms.

DISCUSION

En la revisión de literatura se citaron trabajos en los que se estableció claramente que la adición de Fe en varias formas y dosis, a plantas cultivadas en soluciones nutritivas, tuvo efectos marcados en el desarrollo del sistema radical (7, 18, 23, 27). Las condiciones que favorecen este desarrollo son específicas, ya sea que el hierro se aplique en forma de aspersión al follaje o se agregue a la solución.

El estudio del efecto del hierro sobre el desarrollo radical del cacao, del café y del frijol se llevó a cabo en tres etapas, a saber: una de tipo general, en la que se aplicó el Fe a la raíz y al follaje de las plantas, y que sirvió para obtener información preliminar (medidas índices denominadas incremento relativo de volumen y longitud radical, incremento relativo de la longitud de los tallos, etc.). Con base en esta etapa, se efectuó la segunda, que consistió en determinar la absorción y movilización del Fe⁵⁹ aplicado al follaje o a la raíz de plantas de cacao que mostraban clorosis por deficiencia de este nutrimento. La etapa final tuvo por objeto determinar el efecto del hierro en el crecimiento de raíces aisladas de cacao, café y frijol cultivadas en diversos medios nutritivos, para evitar la influencia que en ellas pudiera tener el suministro de nutrientes orgánicos e inorgánicos provenientes del follaje.

Es preciso anotar que en las plantas de cacao se observó una recuperación progresiva y casi total de la clorosis causada por deficiencia de Fe al agregar este nutrimento a la solución o al aplicarlo al follaje en forma de aspersión. Es lógico asumir que la formación

de nueva clorofila capacita a las plantas para producir en las hojas una mayor cantidad de compuestos orgánicos utilizables para los procesos metabólicos.

Los resultados generales para cacao indican que los diversos niveles de hierro aplicados a la solución y al follaje, produjeron aumentos, no sólo en el volumen radical sino en la longitud de ellas, aunque la dosis necesaria para alcanzar la máxima expresión, fue mayor en el primer caso (Fe en la solución) que en el segundo. De estos hechos se deduce que el desarrollo de las raíces de cacao fue beneficiado por la presencia del hierro en la solución nutritiva y que las plantas estuvieron en capacidad de extraer una mayor cantidad de nutrientes y por consiguiente, mejor nutridas al final de los experimentos. Las plantas de cacao, y en especial sus raíces, demostraron ser muy sensibles a las dosis de Fe aplicadas en forma de quelato, tanto a las hojas como a las raíces. La formación de clorofila en plantas cloróticas que recibieron Fe en aspersion al follaje y la implicación que esto pueda tener sobre la alimentación de las raíces, hace difícil separar el efecto directo del hierro en el metabolismo radical, del indirecto, o sea el relacionado con el restablecimiento del normal funcionamiento de las hojas.

El incremento en la longitud relativa de los tallos fue negativo (decreciente) al aumentar la dosis de Fe. No se conocen las causas por las cuales se produjo dicho efecto, tanto al aplicar el Fe en aspersion al follaje como al agregarlo a la solución. Definir claramente el por qué de este hecho sería motivo de un estudio especial que

está fuera de los objetivos de esta tesis.

Igual que en cacao, la aplicación de Fe a las raíces o en aspersión al follaje de las plantas de café, produjo recuperación de la clorosis causada por deficiencia de este elemento. En esta planta no se obtuvieron respuestas significativas para volumen y longitud radical en los niveles de Fe (quelato) aplicados, tanto en forma de aspersión al follaje como al agregarlo a la solución. Sin embargo, al aplicar el hierro al follaje en forma de cloruro, se obtuvo un efecto lineal significativo para incremento relativo de la longitud de las raíces, que indica que esta forma de suministro del nutrimento a las hojas de la planta fue más efectiva que la adición de Fe en forma de quelato a la solución. Quizás la falta de significancia estadística para los tratamientos aplicados a las plantas de café, se debió a que el tiempo de observación fue corto para esta planta (pues las demás condiciones experimentales fueron iguales a las del cacao, excepto el número de repeticiones) o que el Fe agregado a la solución no pudo ser aprovechado.

En relación con la absorción foliar y movimiento del Fe⁵⁹ en plantas de cacao es preciso destacar el hecho de que el promedio de la radiactividad en las hojas fue muy superior al promedio de los tallos y raíces, durante todo el tiempo de observación. Esto indica que hubo poca movilización del Fe⁵⁹ hacia los órganos inferiores de la planta, hecho que fue comprobado mediante autoradiografías de plantas correspondientes a cada uno de los períodos de observación. Se puede asumir, por lo tanto, que el efecto beneficioso del Fe aplicado al follaje

está relacionado principalmente con la recuperación de la actividad fotosintética de las plantas cloróticas, y que el crecimiento de las raíces se debe a un mejor suministro de carbohidratos y otros compuestos orgánicos a éstas, y no directamente al abastecimiento de Fe a las raíces deficientes en este elemento.

En el experimento sobre absorción radical y movilización del Fe^{59} hacia los tallos y hojas se observó que un alto porcentaje del hierro se localizó en las raíces y sólo un 2.7% del total absorbido se movilizó hacia los demás órganos vegetales. Sin embargo, la intensidad de la traslación del Fe^{59} fue mayor en plantas que absorbieron este nucleido por las raíces que en el experimento de absorción foliar, a pesar de que el tiempo de observación fue menor en un 43%. La velocidad de traslación de las sustancias inorgánicas de las raíces hacia las hojas, está grandemente influenciada por la corriente transpiratoria (1, 23). De acuerdo con TEUBNER et al (28) el Fe^{59} puede inmovilizarse en las células radicales al ser absorbido, o permanecer libre y ser movilizado según las condiciones del medio (pH, contenido de P, presencia de Mn, etc.), o del estado de desarrollo de la planta (33). Es probable que el breve tiempo de observación no haya sido suficiente para un mayor desplazamiento del Fe^{59} hacia los tallos y hojas, y que, según BIDDULPH y WOODBRIDGE (3), parte de este elemento retenido por las raíces haya formado compuestos insolubles con el fósforo de la raíz.

Hasta este punto es poco lo que todavía se sabe sobre la influencia directa del hierro en el normal funcionamiento de las raíces del

cacao y del café^{*}, menos aún si éstas se aislan del resto de la planta y se les cultiva en un medio nutritivo. El cultivo de raíces aisladas ha sido uno de los sistemas más usados últimamente para determinar las funciones directas de los micronutrientes inorgánicos (13); fue por esto por lo que este método se consideró adecuado para verificar cómo influye el hierro en el desarrollo radical del cacao, aislando sus efectos de las numerosas complicaciones metabólicas que surgen al ser absorbido este elemento por la planta, movilizado e incorporado al organismo vegetal. Desafortunadamente, dicho método de trabajo requiere el uso de técnicas especiales con las cuales no estaba familiarizado el autor y a cuyo aprendizaje debió dedicar buena parte de su tiempo, pues los cultivos requieren para su éxito una asepsia casi total. No obstante, se obtuvieron algunos resultados en frijol que indican que las raíces responden a la aplicación de dosis crecientes de hierro en forma de quelato, aunque no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Estos resultados confirman en parte los obtenidos por otros investigadores como GLASSTONE (13) con raíces aisladas de tomate, WHITE (33) con raíces aisladas de trigo y DAWSON y STREET (12), que estudiaron el comportamiento de raíces aisladas de trébol rojo. En el caso de las raíces de cacao no fue posible obtener un crecimiento satisfactorio, pues no sólo se desconocían sus requerimientos nutricionales específicos, sino que la rápida oxidación de sus tejidos al separarlos de la planta redujo la viabilidad de las raíces a unos pocos días y el crecimiento a 2 ó 3 mm. El uso de cisteína como antioxidante disminuyó el efecto letal de la oxidación en los tejidos, pero no

* Jiménez, E. Comunicación personal. 1953.

fue suficiente para conseguir un crecimiento satisfactorio que permitiera estimar cuantitativamente el efecto de las varias dosis de hierro utilizadas. Las raíces de café, a pesar de no tener el problema de la oxidación de sus tejidos y de haber permanecido con vida durante varias semanas en distintos medios nutritivos, no mostraron ningún desarrollo, ignorándose las causas que motivaron la falta de respuesta a los tratamientos.

El control que se ejerce hasta cierto punto sobre algunos factores del medio ambiente (temperatura, humedad, contenido de nutrimentos, etc.) en el laboratorio y en el invernadero puede hacer pensar al investigador que es suficiente para conseguir un alto grado de uniformidad en las condiciones experimentales. Sin embargo, es frecuente observar mucha variación en el material a causa de la influencia ambiental, y de su constitución genética. Esto explica por qué hubo errores experimentales muy altos en el análisis estadístico de casi todos los experimentos con cacao y falta de significancia estadística entre diferencias que obviamente eran grandes entre varios de los tratamientos, a pesar de haberse escogido plantas de igual edad, cultivándolas en un mismo medio y de haberseles sometido al mismo tratamiento antes de aplicar las diferentes dosis de hierro.

CONCLUSIONES

1. A pesar de que no se detectó significancia estadística en la respuesta de plantas cloróticas de cacao a los niveles de Fe agregados a la solución, se observó una tendencia creciente en las curvas de incremento relativo de volumen y longitud radical al aumentar la dosis de hierro.
2. Hasta 10 p.p.m. hubo una clara tendencia ascendente en el incremento relativo de la longitud y el volumen de las raíces en plantas cloróticas de cacao, al aplicar el Fe en aspersión al follaje, pero se produjo un efecto depresivo sobre el mismo, cuando la dosis fue de 20 p.p.m.
3. Cuando el Fe se aplicó en aspersión al follaje de plantas cloróticas de cacao, no sólo no hubo significancia estadística para tratamientos, sino que el incremento relativo en la longitud de los tallos fue negativo (disminución).
4. La comparación entre ausencia y presencia de Fe fue significativa para el incremento de peso seco en raíces de cacao, cuando el hierro se agregó a la solución, pero no cuando se lo aplicó al follaje.
5. En las plantas de café no se obtuvieron incrementos en la longitud relativa de las raíces, ni en el volumen relativo de las mismas cuando se hicieron aplicaciones foliares de hierro, o cuando se agregó este elemento a la solución. Sin embargo, hubo un efecto lineal significativo para el incremento relativo de la longitud radical.

6. Se observó una acumulación en el follaje del Fe^{59} absorbido por las hojas de cacao, por lo cual hubo diferencia estadística significativa para la comparación de radiactividad entre hojas con relación a la de tallos y raíces, pero no entre la de estos dos últimos órganos de la planta. En el caso de la absorción radical del Fe^{59} , se comprobó que la mayor parte del hierro permaneció en las raíces, y solo una pequeña parte del absorbido por éstas se desplazó hacia las hojas.
7. Tanto en café como en cacao se observó una recuperación progresiva y casi completa de la clorosis causada por deficiencia de hierro, al aplicar este nutrimento en aspersión al follaje o a la solución nutritiva, aunque en menor grado en café que en cacao.
8. No fue posible separar el efecto directo del Fe en el metabolismo radical, cuando se aplicó este elemento al follaje de plantas cloróticas, del indirecto o sea el restablecimiento del funcionamiento normal de las hojas.
9. El efecto benéfico de la formación de nueva clorofila en plantas cloróticas al aplicarles el Fe al follaje, sobre el crecimiento radical, se debe a un mayor suministro de carbohidratos y otros compuestos orgánicos a éstas y no directamente al abastecimiento de Fe a raíces deficientes en dicho elemento.
10. No se consiguieron respuestas estadísticamente significativas de raíces aisladas de frijol a dosis de 0, 2, 4 y 6 p.p.m. de Fe, aunque el crecimiento de éstas fue adecuado para las condiciones del medio utilizado. Tampoco fue posible obtener crecimiento

satisfactorio en raíces aisladas de cacao y de café, que permitiera apreciar los efectos del Fe.

11. Hubo mucha variabilidad en el material vegetal, por lo cual el error experimental fue muy alto en los análisis estadísticos y no se obtuvo significancia entre diferencias que obviamente eran muy grandes.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal, investigar el efecto del hierro en el desarrollo de las raíces del cacao y además determinar la influencia que este elemento puede tener en el desarrollo radical del café y del frijol. También se observó la velocidad de recuperación de la clorofila en plantas cloróticas de cacao y café, al agregarles cantidades crecientes de hierro y el efecto de dicha recuperación sobre el desarrollo del sistema radical. Además, se estudió el grado de absorción y movilización de Fe^{59} en plantas de cacao y el efecto de distintas dosis de hierro en el crecimiento de raíces aisladas de cacao, café y frijol.

Las plantas fueron cultivadas en el invernadero en una solución Hoagland Nº 2 sin Fe, hasta que mostraron claramente los síntomas de deficiencia de este elemento y luego se les aplicaron los diversos tratamientos.

Para hacer los cultivos de raíces aisladas, el material se obtuvo en unos casos de plantas cultivadas en el invernadero, o de semillas germinadas en el laboratorio durante una semana.

Para los experimentos de absorción foliar y radical de Fe^{59} y traslado del mismo, se usó hierro en forma de cloruro ($\text{Fe}^{59}\text{Cl}_3$), en tanto que el agregado a las soluciones nutritivas o aplicado en aspersión al follaje fue en forma de quelato (FeEDTA) para cacao. En café se usó quelato para las soluciones y cloruro en las aspersiones.

En el estudio sobre el efecto del hierro en el desarrollo de las raíces del cacao y del café se usaron plantas del clon UF 668 y de la variedad Caturra, respectivamente, de 3 meses de edad. Los

tratamientos con hierro se hicieron cuando la clorosis por deficiencia de este elemento era bien visible (a los 3 meses aproximadamente), ya fuera agregándolo a la solución nutritiva o mediante aspersiones semanales, en el último caso mezclado con un humectante. Se pudo observar que se produjo una recuperación casi total de la clorosis (excepto en el tratamiento con 4 p.p.m. de café) y que tanto el volumen como la longitud radical, fueron favorecidos ampliamente por las aplicaciones de hierro. Sin embargo, el incremento relativo de la longitud de los tallos tuvo una tendencia decreciente, ignorándose las causas de tal efecto depresivo.

Para observar la absorción foliar de Fe^{59} se sumergieron hojas cortadas de cacao en la solución radiactiva durante una hora y luego se tomaron muestras en períodos de 1, 3, 5 y 7 días, para determinar la radiactividad.

En las hojas de cacao se presentó una acumulación del Fe^{59} y su movilización hacia los demás órganos de la planta fue lenta y en proporción reducida en relación con el total absorbido. Igual cosa sucedió con el Fe^{59} suministrado a las raíces, pues una buena parte se acumuló en ellas y sólo una proporción reducida se movió hacia tallos y hojas. Al parecer, en ambos casos los períodos de absorción fueron cortos, pero hubo mayor movilidad de las raíces hacia los tallos y hojas, probablemente favorecida por la corriente transpiratoria.

No se pudieron observar los efectos de diferentes dosis de hierro sobre el crecimiento de raíces aisladas de cacao, café y frijol. En los dos primeros casos el crecimiento fue muy reducido y en el segundo,

no hubo significancia en la respuesta obtenida. Las causas de estos resultados se pueden atribuir al hecho de que se desconocía cuáles son los medios nutritivos más adecuados para cada tipo de raíz y además, porque al separar las raíces de cacao del resto de la planta, la rápida oxidación de los tejidos redujo la viabilidad radical a unos pocos días.

SUMMARY

The main purpose of this study was to study the effect of iron in the development of cacao roots, and also to determine quantitatively the influence this element might have on the root development of coffee and beans. The speed with which chlorotic cacao and coffee plants recovered chlorophyll by adding increasing amounts of iron, and the effect of this recovery on the development of the root system, were also observed. Also, the degree of absorption and mobilization of Fe^{59} in cacao plants and the effect of different doses of iron on the growth of isolated cacao, coffee and bean roots were studied.

The plants were cultivated in the greenhouse in a Hoagland No 2 solution without Fe, until they clearly showed the symptoms of iron deficiency. After this the treatments were applied.

For the cultures of isolated roots, the material was obtained in some cases from plants grown in the greenhouse, or from seeds germinated in the laboratory for a week.

For the experiments on foliar and root absorption of Fe^{59} and the movement of same, iron in the form of chloride was used ($\text{Fe}^{59} \text{Cl}_3$), while chelate (FeEDTA) was used as the aggregate to nutritional solutions or for spray application on the leaves of cacao. With the coffee, chelate was used for the solutions and chloride for the spray treatments.

Three month plants were used to study the effect of iron on the development of cacao and coffee roots; clone UF 668 and Caturra variety were the plants used. The iron treatments were made when the chlorosis due to deficiency of this element was quite visible (at approximately

3 months). The treatments were made either by adding it to the nutritive solution or by weekly spraying, in the latter case mixed with an adherent. An almost total recovery from the chlorosis (except in the treatment with 4 p.p.m. of coffee) was observed, and both the volume and the length of the roots were considerably favored with the iron applications. However, the relative increase in the length of the stems showed a decreasing tendency. The reason for this depressive effect is unknown.

In order to observe the foliar absorption of Fe^{59} , cut cacao leaves were submerged in the radioactive solution for an hour. Samples were then taken at periods of 1, 3, 5 and 7 days, to determine radioactivity.

The cacao leaves showed an accumulation of Fe^{59} . Its movement toward the other organs of the plant was slow and was low in proportion, in relation with the total absorbed. The same thing happened with the Fe^{59} fed to the roots. A great deal accumulated in the roots and only a small proportion moved toward the stems and leaves. It seems that in both cases the absorption periods were short, but there was greater movement from the roots to the stems and leaves, probably because of the current of transpiration.

It was not possible to observe the effects of different doses of iron on the growth of isolated cacao, coffee and bean roots. In the first two cases, there was very little growth, and in the second, the response obtained was not significant. The causes for such results

may be due to the fact that the best nutritive means were unknown for each type of root; and also because once the cacao roots were separated from the rest of the plant, the rapid oxidation of the tissues reduced root viability to a few days.

LITERATURA CITADA

1. BIDDULPH, O. Studies of mineral nutrition by use of tracers. *Botanical Review* 21(5):251-295. 1955.
2. _____. Plant analysis and fertilizers problem. In International Botanical Congress. 8th, Paris - Nice. 1954. 8th International Botanical Congress, Paris, 1954. pp. 1-17.
3. _____ y WOODBRIDGE, C. G. The uptake of phosphorus by bean plants with particular reference to the effects of iron. *Plant Physiology* 27:431-444. 1952.
4. BONNER, J. Plant biochemistry. New York, Academic Press, 1950. p. 477.
5. BOYNTON, D. Nutrition by foliar application. *Annual Review of Plant Physiology* 5:31-54. 1954.
6. BROWN, J. C. Iron chlorosis. *Annual Review of Plant Physiology* 7:171-190. 1956.
7. _____ y TIFFIN, L. O. Iron chlorosis in soy bean as related to genotype of root-stock. *Soil Science* 89:8. 1960.
8. BUKOVAC, M. J. y WITTWER, S. H. Absorption and movility of foliar applied nutrients. *Plant Physiology* 32(5):428-435. 1957.
9. BURSTRÖM, H. The action of manganese on roots. In International Union of Biological Science. Trace elements in plant physiology. Waltham, Mass. *Chronica Botánica*, 1950. p. 77-84.
10. _____. Growth action of EDTA in light and darkness. *Physiologia Plantarum* 14:354-377. 1961.
11. _____. Influence of iron and gibberellic acid on the light sensivity of roots. *Physiologia Plantarum* 13:597-615. 1960.
12. DAWSON, J. R. y STREET, H. E. Growth responses of excised roots of red clover. *Botanical Gazette* 120(4):227-234. 1959.
13. GLASSTONE, V. F. Inorganic micronutrients in tomato root tissue culture. *American Journal of Botany* 34:218-224. 1947.
14. GODDARD, D. Cytochrome C and cytochrome oxidase from wheat germ. *American Journal of Botany* 31:270-276. 1944.

15. GRANICK, S. Iron metabolism in animals and plants. In Lamb, C. A., Bentley, O. A. y Beattie, J. M., Eds. Trace elements. New York, Academic Press, 1958. p. 365-382.
16. GUDJONSDOTTIR, S. y BURSTRÖM, H. Growth-promoting effects of alcohols on excised wheat roots. *Physiologia Plantarum* 15:498-505. 1962.
17. HOAGLAND, D. R. y ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular no. 347. 32 p. 1950.
18. IGUE, K. Reutilización del Fe⁵⁹ en café y cacao. Tesis Mag.Sci. Turrialba, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1963. 44 p. (mimeografiada).
19. JONES, T. A., HAVORD, G. y MALIPHANT, G. H. Nutrient uptake by excised roots; a macro-technique. s.n.t. Reimpreso de A Report on Cacao Research, 1955-56, I.C.T.A., Trinidad.
20. KESSLER, B. y MOSCICKI, Z. W. Effect of triiodobenzoic acid and maleic hydrazide upon the transport of foliar applied calcium and iron. *Plant Physiology* 33:70-72. 1958.
21. LUNDEGARDH, H. Mechanisms of absorption, transport, accumulation and secretion of ions. *Annual Review of Plant Physiology* 6:1-24. 1955.
22. MALAVOLTA, E. et al. The essential nutrients. In On the mineral nutrition of some tropical crops. Berne, International Potash Institute, 1962. p. 11-23.
23. REDISKE, J. H. The absorption and translocation of iron. *Plant Physiology* 28(4):576-593. 1933.
24. _____ y BIDDULPH, O. Preliminary note on the absorption of radiozinc by young coffee plants (Coffea arabica L.) grown in nutrient solution. *Phyton* 6(1):1-6. 1956.
25. STEWART, I. y LEONARD, C. D. Studies of chelated plant nutrients with radioactive isotopes. In Conference on radioactive isotopes in agriculture. East Lansing. Michigan. January 12-14, 1956. A conference on radioactive isotopes in Agriculture. Washington, D.C., U.S. Atomic Energy Commission. 1956? pp. 245-251.

26. SUDIA, T. W. y LYNCK, A. J. The effect of pH on the absorption of Sr⁸⁰, P³² and Fe⁵⁹ ions by leaves of Zea maiz L. Ohio, Journal of Science 61:107-112. 1961. (Original no consultado; compendiado en Nuclear Science Abstracts 16(21):28720. 1962).
27. SIMONS, J. et al. Absorption of chelated iron by soy bean roots in nutrient solutions. Plant Physiology 37(4):460-466. 1962.
28. TEUBNER, F. G. et al. Some factors affecting absorption and transport of foliar applied nutrients as revealed by radioactive isotopes. Michigan Agricultural Experiment Station. Quarterly Bulletin 39(3):398-415. 1957.
29. THORNE, G. N. The effect of applying a nutrient in leaf sprays on the absorption of the same nutrient by roots. Journal of Experimental Botany 8(24):401-412. 1957.
30. TUKEY, H. B. et al. Utilización de los isótopos radiactivos en el estudio del grado de efectividad de la absorción foliar de los elementos nutritivos por las plantas. In Conferencia Internacional sobre la utilización de la Energía Atómica con fines pacíficos, Ginebra 8 - 20 Agosto 1955. Actas. Ginebra, Naciones Unidas, 1956. v. 12. pp. 154-160.
31. WEINSTEIN, L. H. y ROBBINS, W. R. The effect of different iron and manganese nutrient levels on the catalase and cytochrome oxidase activities of green and albino sunflower leaf tissues. Plant Physiology 30(1):27-31. 1951.
32. _____ et al. Chelating agents and plant nutrition. Science 120(3106):41-42. 1954.
33. WHITE, P. R. The cultivation of animal and plant cells. New York, Ronald Press, 1954. pp. 71-76.
34. WITWER, S. H. y TEUBNER, F. G. Foliar absorption of mineral nutrients. Annual Review of Plant Physiology 10:13-32. 1959.
35. VILLEGAS, L. Incorporación y translocación de Fe⁵⁹ en Phaseolus vulgaris L. In Simposio Interamericano sobre la aplicación de la energía nuclear para fines pacíficos, 2º, Buenos Aires, 1959. Los radioisótopos y la radiación en las ciencias biológicas. Washington, D. C., Unión Panamericana, 1960. p. 169-172.

36. ZAVALA M., C. y BULLARD, E. T. Rooting cacao clones using various concentrations of indole butiric acid and fungicides. In Conferencia Interamericana de Cacao, VII. Palmira, Colombia, 13-19 de Julio. 1958. Séptima Conferencia Interamericana de Cacao. Bogotá, Minagricultura, 1958? pp. 546-552.