

REUTILIZACION DEL Fe⁵⁹ EN CAFE Y CACAO

Por

KOZEN IGUE

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

Turrialba, Costa Rica

Diciembre, 1963

REUTILIZACION DEL Fe⁵⁹ EN CAFE Y CACAO

Tesis

Sometida al Consejo de Estudios Graduados
como requisito parcial para optar al grado

de

Magister Scientiae

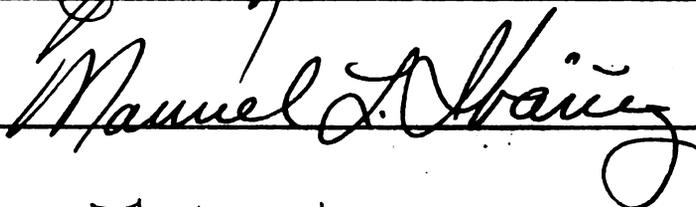
en el

Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas

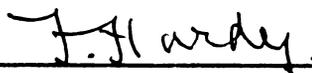
APROBADA:



Consejero



Comité



Comité



Comité

Diciembre, 1963

A mis padres

A mi esposa

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar sus agradecimientos al Consejero Principal Dr. Eduardo Jiménez quien posibilitó la ejecución de este trabajo, y a quien pertenecen muchas de las ideas originales de este trabajo. A los miembros del Comité Consejero Drs. Manuel Ibañez, Carl C. Moh y Frederick Hardy por sus asesoramientos y difusión de muchos conocimientos básicos. Al Ing. Gilberto Páez por las sugerencias estadísticas.

Al Programa de Energía Nuclear a través de su Jefe que otorgó la beca y ayuda financiera para la ejecución de este trabajo.

A los miembros del Instituto Agronómico de Campinas de la Secretaría de Agricultura del Estado de Sao Paulo, Brasil, por haberle brindado la oportunidad de realizar estudios posgraduados.

A los miembros del personal del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas que en una u otra forma le prestaron gentil colaboración durante su permanencia.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Promissao, Estado de Sao Paulo, Brasil en el año de 1935.

Realizó sus estudios universitarios en la "Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz" de la Universidad de Sao Paulo, Piracicaba, graduándose de Ingeniero Agrónomo en el año de 1958.

De 1958 a 1960 trabajó junto a IBEC Research Institute-AIA, en Matao, Estado de Sao Paulo.

En el año de 1960 fue contratado por el Servicio del Valle del Paraiba-DAEE-SVOP, a fin de prestar servicios junto al Instituto Agronómico de Campinas. Está actualmente incorporado al personal técnico del referido Instituto.

Realizó sus estudios posgraduados en el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas desde octubre de 1962 a diciembre de 1963, mediante una beca del Programa de Energía Nuclear del IICA.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
Lista de Cuadros	vii
Lista de Figuras	viii
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	2
Factores que afectan la disponibilidad del hierro	2
El problema del hierro en café y cacao	5
MATERIALES Y METODOS	7
Distribución del hierro aplicado a la semilla	8
Reutilización del hierro por plántulas en distintos estados de crecimientos	9
Efecto del pH sobre la absorción de Fe ⁵⁹ -EDTA	11
RESULTADOS	12
Distribución del Fe ⁵⁹ aplicado a la semilla	12
Reutilización del hierro por plántulas (copita) de café	13
Efecto de la concentración de sales	15
Efecto de la concentración de fósforo en el medio radi cal sobre la recuperación de clorosis de hierro en café y cacao	16
Efecto del pH sobre la absorción de Fe ⁵⁹ -EDTA durante el período de recuperación de la clorosis	24
DISCUSION	28
CONCLUSIONES	33
RESUMEN	36
SUMMARY	39
LITERATURA CITADA	42

LISTA DE CUADROS

Cuadro N ^o		Página
1	Distribución relativa del Fe ⁵⁹ en plantitas de café provenientes de semillas marcadas	12
2	Efecto del nivel de fósforo en la solución nutritiva sobre la reutilización de Fe ⁵⁹ absorbido por las raíces de plántulas de café (copita)	13
3	Efecto del nivel de fósforo en la solución nutritiva sobre la reutilización de Fe ⁵⁹ aplicado a las hojas cotiledonales de café (copita)	14
4	Efecto de las concentraciones de sales sobre la reutilización de hierro en plántulas de café ..	16
5	Efecto de la concentración de fósforo sobre la recuperación de la clorosis de hierro en café de 6 a 8 hojas	17
6	Efecto de la concentración de fósforo en el medio radical sobre la recuperación de la clorosis de hierro en cacao joven	21
7	Efecto del pH sobre la absorción y distribución de Fe ⁵⁹ por plantas cloróticas de café y cacao	25

LISTA DE FIGURAS

Figura N ^o		Página
1	Efecto del nivel de fósforo sobre la distribución relativa de Fe ⁵⁹ en raíces de café, antes (A) y (B) después de la recuperación de clorosis	19
2	Efecto del nivel de fósforo sobre la distribución de Fe ⁵⁹ en los tallos (nuevos y viejos), hojas (nuevas y viejas) de café	20
3	Efecto del nivel de fósforo sobre la distribución de Fe ⁵⁹ en plantas de cacao; A) cloróticas y B) recuperación parcial	23
4	Efecto del pH sobre la absorción total de Fe ⁵⁹ por plantas cloróticas de café y cacao	26

INTRODUCCION

La descripción de síntomas temporales de deficiencias minerales en tejidos vegetales es común en la literatura fisiológica.

En el caso del hierro, los síntomas por lo general se presentan después de una sequía, de un abonamiento pesado, ó cuando la capacidad de aereación del suelo es reducida por regamiento prolongado. Sin embargo, los factores específicos que se citan con mayor frecuencia son el fósforo y la reacción del medio, lo cual indica que el problema está relacionado más bien con la disponibilidad del elemento para las plantas que son variaciones de un contenido en el suelo.

El presente trabajo tuvo por principal objetivo ahondar la investigación del problema de la nutrición del hierro en café y cacao, utilizando para tal fin el quelato hierro-etilenodiaminotetraacetato marcado con Fe^{59} (Fe^{59} -EDTA). Se evaluó en el curso del estudio, el efecto de algunos factores como pH y la concentración de fósforo en el medio nutritivo radical. Además se investigó la traslación del radioisótopo durante el proceso germinativo de la semilla, así como desde hojas cotiledonares hacia otros órganos de plántulas de café.

REVISION DE LITERATURA

Factores que afectan la disponibilidad del hierro

Ya se dijo que la aparición de clorosis debido a la falta de hierro depende del contenido del suelo, pero sobre todo de su disponibilidad para las plantas.

El contenido de hierro disponible es alterado marcadamente por las condiciones ambientales. En general, las condiciones que conducen a la deficiencia de hierro se caracterizan por el mantenimiento de este elemento en la forma férrica. KLIMAN (19), cree que las plantas absorben y utilizan el hierro solamente como ion ferroso, Fe^{2+} . No obstante el ion férrico, Fe^{3+} , puede ser suplido a las plantas, se cree que se reduce antes de ser absorbido por la acción de la materia orgánica, y de los microorganismos del suelo, o por sustancias reductoras presentes en las raíces. Al respecto THORNE & WALLACE (34), observaron que la forma ferrosa es la predominante en suelos donde se producen plantas normales. Sin embargo aún así cabe dudar acerca del estado de oxidación del hierro del suelo, ya que éste no puede determinarse fácilmente (34) en vista de que algunos agentes extractores pueden reducir la forma férrica a la ferrosa.

Los síntomas de deficiencia pueden deberse también a factores internos; así por ejemplo, se admite que la deficiencia de hierro puede resultar por la inactivación del hierro dentro de los tejidos vasculares. El desconocimiento del mecanismo de tal "fijación" en las plantas, hizo que se generalizara la idea de la inmovilidad del hierro.

Recientemente se han efectuado muchas investigaciones con el objeto de determinar los factores que regulan el metabolismo del

hierro (3, 5, 16, 26). La idea de la redistribución dentro de la planta fue sugerida por la observación de que las hojas verdes pierden este elemento antes que la clorofila, al final de la estación de crecimiento (16). Investigaciones posteriores comprobaron esta observación y hoy día muchos autores admiten la idea de la movilidad del hierro.

El problema del traslado del hierro es regulado por muchos factores fisiológicos. Al presente no se conoce mucho respecto de la forma como el hierro es trasladado, pero se admite que es en forma de compuestos orgánicos, malatos ó malonatos de hierro (35). SCHMIDT & GERLOFF (30) estudiaron el exudado del xilema y demostraron que en realidad el hierro existe en forma de un complejo que se comporta de un modo diferente al hierro libre. SIDERIS (29), por otro lado, encontró una correlación positiva entre el contenido del hierro y con parte de la fracción proteica, y sugirió que el hierro puede hallarse combinado en relación estequiométrica. Sugirió también que el hierro puede ocurrir en combinación con alguna enzima que activa la formación de ciertas proteínas ligadas a la síntesis de clorofila. Al respecto cabe añadir que SMITH et al (31) encontraron una reducción del 25% en el contenido de proteína soluble en hojas cloróticas.

La disponibilidad y la movilidad del hierro también dependen en gran parte de la presencia de otros iones en el medio. En suelos ácidos, por ejemplo, se forman compuestos fosfatados de baja solubilidad. Según SWENSON (33), el complejo formado es $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})2\text{H}_2\text{PO}_4$, ya que los hidróxidos de hierro hidratados son bastante efectivos en combinar se químicamente con el H_2PO_4^- a valores bajos de pH. La precipitación máxima de fosfato dibásico de hierro ocurre a pH 2, 5-3, 5. El

equilibrio que existe entre el complejo formado insoluble y los iones fosfato (H_2PO_4^-) y hierro (Fe^{3+}), parece regular la disponibilidad de estos nutrimentos para las plantas.

La importancia que tiene la solubilización del fosfato de hierro ha sido contemplada por CHANG & JACKSON (8), quienes determinaron que el valor de pK_s para $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ estaba entre 33,6 - 34,6 en diferentes valores de pH. Los datos indican que la mayor solubilidad está relacionado con la formación de cristales finos que ofrecen mayor superficie específica.

El traslado de hierro dentro de la planta también parece ser regulado por mismos factores, que afectan la formación de compuestos solubles en los suelos. ROGERS & SHIVE (27), al estudiar la distribución del hierro en plantas notaron que usualmente éste se acumula en forma insoluble en tejidos con un pH elevado, como el floema. Estos autores admiten que el hierro en este estado puede funcionar como reserva, pues una vez que la reacción de la savia se torna ácida por la presencia de ácidos orgánicos, el contenido de hierro soluble en los tejidos aumenta (18). Es muy probable que la susceptibilidad de las plantas a la clorosis inducida está relacionada con la variación del pH de los tejidos vasculares. Que la inmovilidad es debida a la formación de fosfato de hierro insoluble ha sido demostrado por BRANTON & JACOBSON (3). BIDDULPH & WOODBRIDGE (2), entre otros (5, 10), detectaron la presencia de un precipitado de fosfato de hierro en la superficie de las raíces de plantas que se desarrollaron en un medio con alto contenido de fósforo, y según ellos, el mismo fenómeno puede ocurrir en los tejidos conductores. BRANTON & JACOBSON (3),

también encontraron que el hierro primero debe ser acumulado en las raíces antes de ser transferido al xilema; además, verificaron que el acumulo es mayor en raíces de plantas deficientes que en plantas normales.

BROWN et al (5) encontraron que la concentración de fósforo era más elevada en la savia de plantas de soya cloróticas que en las normales. De KOCK (10) demostró que la relación P/Fe soluble ó total es alta, alrededor de 60-70, en plantas cloróticas, mientras que en plantas normales es de sólo 40 a 30. Otra investigación efectuada por BROWN et al (7) indica que tanto el fósforo como el calcio se encuentran en concentraciones elevadas en los tejidos de ciertas plantas. Como estos elementos compiten grandemente con el hierro, pueden inducir la clorosis en plantas susceptibles.

REDISKE & BIDDULPH (26), al investigar recientemente el efecto del fósforo y el pH sobre la distribución del hierro en plantas de frijol encontraron que la mínima traslación ocurrió cuando la concentración de fósforo era alta (1×10^{-3} M), el pH 7,0, el medio contenía 1 ppm. de Fe. Por otro lado, la traslación fue mayor con baja concentración de fósforo (5×10^{-6} M), pH 4,0 y sin Fe en el medio. Como se ve, estos datos parecen corroborar la idea de que la clorosis es inducida por la inmovilización del hierro en las venas. ⊕

El problema del hierro en café y cacao

La ocurrencia de clorosis por deficiencia de hierro ha sido descrita en la mayoría de los cultivos y bajo diferentes condiciones ecológicas (4, 36). En lo que concierne al café la distribución

geográfica de esta anomalía es muy amplia, habiéndose reportado desde casi todos los países productores (9, 12, 21, 22, 24, 25, 28, 32).

SYLVAIN (32) y ROBINSON (28), relatan respectivamente la incidencia de granos ambar, también conocidos como "amber", "marly" ó "wax beans", en Jamaica y Kenya. Esta característica de los granos está relacionada con la falta de hierro; en casos de deficiencia crónica, hasta un 15-30% de los granos pueden ser afectados. Más aún, análisis de granos amber (32) mostraron un contenido de hierro significativamente más bajo que lo normal, en comparación con otros elementos. Al respecto, la carencia de hierro parece afectar especialmente la calidad y no tanto la cantidad del producto.

Con relación a la nutrición de hierro en cacao, se puede decir que el problema es bastante parecido al del café, y que la ocurrencia de la deficiencia de dicho elemento también es bastante común tanto en condiciones de campo como de invernadero (14, 15, 20, 23).

En la Costa de Oro se ha demostrado que la carencia de hierro es más frecuente en áreas nuevas, cuando se instalan plantaciones de cacao en terrenos recién quemados. Esto es así porque la solubilización de la ceniza causa un aumento drástico del pH del suelo, lo cual afecta la solubilidad del hierro (14). Finalmente MACDONALD (26), sostiene que la baja producción de cacao en ciertos suelos en el Caribe está asociada con el alto contenido de yeso y fósforo.

MATERIALES Y METODOS

El material vegetativo usado en este trabajo varió de acuerdo con el objetivo de cada experimento. Así, para estudiar la movilidad del hierro en plantas recién nacidas se utilizó semilla. Cuando se estudió el efecto de la concentración de fósforo en el medio o el de la reacción, se usaron plantas más desarrolladas de café y cacao. En todo caso, el café era de la variedad caturra rojo y el cacao de los clones UF 667 o 668.

Como medio de crecimiento se empleó arena para las plántulas recién nacidas, y la solución nutritiva # 2 de Hoagland (18), la cual fue modificada según los requerimientos experimentales. Dicha modificación consistió en suprimir la fuente de hierro y en ajustar la concentración de fósforo a distintos niveles, pero sin cambiar el contenido de N y K; para conseguir esto, se usó KH_2PO_4 , NH_4NO_3 y KOH en vez de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

El Fe^{59} fue suplido en forma de quelato. Este compuesto fue preparado de la siguiente manera: a 0,435 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 4 ml de agua destilada se le agregó aproximadamente 0,5 mc de Fe^{59} (1 ml de $\text{N Fe}^{59}\text{Cl}_3$). A esta solución luego se le añadió 3,1 g de Na_4EDTA^* previamente disueltos en 4 ml. de agua y se llevó hasta 10 ml. Se aplicó un exceso de EDTA para garantizar la combinación total del hierro. La radioactividad de esta solución era de $5,12 \times 10^6$ c/min /ml. El Fe-EDTA marcado de esta manera fue preparado varias veces según se necesitó. Con el fin de facilitar la corrección por pérdida

* Etilenodiaminotetraacetato de sodio.

de radioactividad (descomposición), en determinadas muestras experimentales se procedió a alistar un patrón, por duplicado, de la solución de Fe⁵⁹ EDTA aplicado originalmente.

Las muestras vegetales fueron preparadas de la siguiente manera: el material fue prensado en papel cartulina y secado con luz infrarroja durante 24 horas. Luego se tomaron muestras representativas de los distintos órganos de la planta con un sacabocados y se colocaron en planchetas de acero inoxidable para ser contadas. Cuando hubo necesidad, el material fue digerido con ácido nítrico concentrado hirviendo, completando luego el volumen con agua destilada. La radioactividad en los tejidos digeridos con ácido, así como en las soluciones residuales y lavados de raíces, fue determinada en alicuotas colocadas en planchetas de acero inoxidable, a las cuales se les añadió unas gotas de detergente con el objeto de lograr una distribución uniforme, antes de ser secadas bajo luz infrarroja. La radioactividad fue medida con un contador G.M. automático, hasta acumular un número de cuentas no menor de 2.500.

Distribución del hierro aplicado a la semilla

A doscientas semillas de café caturra se les removió el pergamino (endosperma) y se les subdividió en dos grupos. Uno fue puesto en una caja Petri y se le añadió 1 ml. de la solución de Fe⁵⁹ EDTA conteniendo aproximadamente 50 microcurios; también se puso suficiente agua para remojar completamente las semillas. Al segundo grupo se le añadió Fe-EDTA no radioactivo y sirvió para estimar el fondo ó "background". Las semillas permanecieron en remojo durante 5 días, y luego

fueron sembradas en arena en el invernadero.

Para determinar la distribución del Fe^{59} en las plántulas recién nacidas, se tomaron muestras en tres períodos: Primero, soldadito; segundo, en estado de copita, o sea cuando las hojas cotiledonales están completamente expandidas, y tercero, cuando apareció el primer par de hojas verdaderas. Las muestras fueron contadas y la radioactividad corregida por la descomposición natural del nucleido.

Reutilización del hierro por plántulas en distintos estados de crecimientos.

En el caso de las plántulas en estado de copita, éstas fueron subdivididas en dos grupos: a uno se le hizo absorber Fe^{59} directamente por las raíces durante dos semanas y luego se le sembró en arena. Al otro se le dejó en arena y se le dio el Fe^{59} directamente en las hojas cotiledonales. Posteriormente al tratamiento con hierro radioactivo, todas las plántulas recibieron los siguientes tres tratamientos de fósforo; P_0 , testigo sin fósforo; P_1 , $2 \times 10^{-3} \text{M}$ y P_2 , $4 \times 10^{-3} \text{M}$ KH_2PO_4 . Excepto por la concentración variable de fósforo, y la exclusión del hierro, los demás nutrimentos se hallaban en las concentraciones correspondientes a la fórmula Hoagland # 2. El pH de las soluciones fue ajustado previamente a 6,0. Los vasos con arena fueron regados diariamente con 15 ml. de las respectivas soluciones. Los tratamientos fueron repetidos cuatro veces en el primer caso, y cinco veces en el segundo.

Las plantas crecieron en arena hasta que tuvieron dos pares de hojas verdaderas. Luego fueron cosechadas y secadas para la

determinación de la radioactividad tanto en tejidos viejos como en aquellos formados posteriormente.

La reutilización de hierro también fue estudiada en plántulas de café y cacao con seis a ocho hojas, previamente adaptadas al cultivo en solución, y las cuales fueron marcadas con Fe^{59} por un período de una semana. En el caso de café, la solución marcadora contenía un total de 14 ppm de hierro y la radioactividad era de $4,25 \times 10^6$ cpm/frasco; para el cacao, la cantidad de hierro se redujo a cinco ppm y la radioactividad a $9,6 \times 10^5$ cpm/frasco. Una vez finalizado el período de absorción de Fe^{59} , las plantas quedaron listas para ser utilizadas en los experimentos que se relatarán a continuación.

Para estudiar el efecto de la concentración de sales y de la alimentación posterior con hierro sobre la reutilización del Fe^{59} , se escogió únicamente plantas de café, a las cuales se les lavó las raíces y se les sometió a los siguientes tratamientos: 1) Hoagland # 2 completa (concentración normal); 2) $\frac{1}{2}$ Hoagland # 2 completa y 3) Hoagland # 2 sin Fe.

El estudio del efecto del fósforo sobre la recuperación de la clorosis de hierro fue hecho en plantas de café y cacao. Estas plantas fueron transferidas a una solución nutritiva sin hierro (Hoagland modificada), cuyo contenido de fósforo fue ajustado a las siguientes concentraciones molares con respecto a KH_2PO_4 : P_0 ; P_1 , 5×10^{-4} ; P_2 , 1×10^{-3} ; P_3 , 2×10^{-3} , y P_4 , 4×10^{-3} . A las plantas de cacao se les puso en soluciones similares excepto que se redujo la concentración total de sales a la mitad; además se excluyó el nivel más alto de fósforo ($4 \times 10^{-3} \text{M}$) por considerársele innecesario. El pH de todas

las soluciones fue ajustado a 6,0 con NaOH ó HCl. Dicho ajuste fue hecho al comienzo del experimento y después de 45 días (café), ó 20 días (cacao), cuando se renovaron las respectivas soluciones nutritivas.

La cosecha de las plantas se efectuó en dos épocas diferentes:

1) después de que se manifestó la clorosis en aquellas hojas nuevas que se formaron posteriormente a la aplicación del radioisótopo (Grupo A), y 2) después de que hubo desaparecido la clorosis en las hojas nuevas (Grupo B). La radioactividad fue medida directamente usando muestras secas de los diferentes órganos de las plantas en cada grupo.

Efecto del pH sobre la absorción de Fe⁵⁹-EDTA

En este experimento se utilizaron plantas cloróticas de café y cacao. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) pH 4,0; 2) pH 6,0 y 3) pH 8,0. Todas las soluciones contenían 4×10^{-3} M de KH₂PO₄ y 5 ppm de hierro en forma de Fe⁵⁹-EDTA. El pH de las respectivas soluciones fue ajustada únicamente al comienzo del experimento. Las plantas fueron cosechadas: 1) 48 horas después de ser sometidas a los diferentes tratamientos, y 2) cuando las plantas se habían recuperado de la clorosis. Esta última fecha varió para el café y el cacao.

La radioactividad fue medida tanto en las plantas, como en los residuos de las soluciones nutritivas y el agua usada para lavar las raíces.

RESULTADOS

Distribución del Fe⁵⁹ aplicado a la semilla

Los resultados de este experimento indican que la reserva seminal de hierro puede ser aumentada por medio de la inmersión de la semilla en una solución de dicho elemento. Es más, la distribución del Fe⁵⁹ en plantas recién germinadas (cuadro 1) muestra que el hierro agregado a la semilla en forma de quelato es utilizable en alto grado.

Cuadro 1. Distribución relativa del Fe⁵⁹ en plantitas de café provenientes de semillas marcadas.

Organo	Estado de crecimiento					
	Soldadito		Copita		Hojas	
	cpm/planta	%	cpm/planta	%	cpm/planta	%
Cotiledones + Endosperma	328	79	-	-	-	-
Hoja Cotiledonal	-	-	40	37	29	29
Hojas Verdaderas	-	-	-	-	18	18
Tallo Superior	-	-	-	-	16	16
Tallo Inferior	45	11	36	33	19	19
Raíz	43	10	32	30	18	18
Total	416	100	108	100	100	100

Quando las plantas se encontraban en el estado de "soldadito", el 79% de la radioactividad estaba asociada con los cotiledones y el residuo del tejido endospermico; el tallo y la raíz por otro lado, compartieron el resto de la radioactividad por partes iguales, o sea

aproximadamente 10% cada uno. Un poco más tarde, cuando los cotiledones se habían expandido, la radioactividad total de la plántula disminuyó a una cuarta parte debido a la pérdida de Fe^{59} asociada con el residuo endospermico. En este estado de crecimiento se observó que el nucleído se hallaba casi uniformemente distribuido en la planta. Con la formación de nuevos tejidos se produjo una distribución de la radioactividad, lo cual viene a reafirmar el concepto de la movilidad del hierro dentro de la planta.

Reutilización del hierro por plántulas (copita) de café

El análisis estadístico de los resultados de este experimento indica que el nivel de fósforo en el medio radical no afectó significativamente la reutilización del Fe^{59} , cuando éste fue absorbido por las raíces (cuadro 2). Esto quiere decir que el Fe^{59} se trasladó libremente hacia el tallo superior y hojas nuevas de todas las plantas.

Cuadro 2. Efecto del nivel de fósforo en la solución nutritiva sobre la reutilización de Fe^{59} absorbido por las raíces de plántulas de café (copita).

Nivel	Hoja nueva	Cotiledón	Tallo superior	Tallo inferior	Raíz	I.T. % A
cuentas por minuto por gramo, materia seca						
P ₀	330	240	450	780	1.160	26
P ₁	280	250	220	1010	1.050	18
P ₂	350	200	60	840	2.210	11

I.T.(A) = $\frac{\text{Radioactividad Hoja nueva} + \text{Tallo superior} \times 100}{\text{Total}}$

Total

Sin embargo, si se usa el índice de traslación^{*} como un mejor criterio para juzgar la movilización del hierro, se nota que hubo un marcado efecto represor de las altas concentraciones de fósforo sobre la distribución del nucleido en las plantas. Esto quizás se debe a una mayor precipitación del hierro en las raíces.

Para el segundo grupo de plantas, ó sea las que recibieron el Fe⁵⁹ directamente en las hojas cotiledonales (cuadro 3) el efecto del fósforo fue altamente significativo en lo que concierne a la traslación del Fe⁵⁹ hacia la región superior del follaje. Se notó además

Cuadro 3. Efecto del nivel de fósforo en la solución nutritiva sobre la reutilización de Fe⁵⁹ aplicado a las hojas cotiledonales de café (copita).

Nivel	Hoja nueva	Cotiledón	Tallo superior	Tallo inferior	Raíz	I.T.	
						A%	B%
cuentas por minuto por gramo, materia seca							
P ₀	750	81.410	11.900	3.090	1.170	13	4,3
P ₁	1.630	68.090	20.290	3.370	1.370	23	5,0
P ₂	540	66.090	8.110	2.400	1.340	11	4,8

$$\text{I.T. (A)} = \frac{\text{Radioactividad Hoja nueva} + \text{Tallo superior}}{\text{Total}} \times 100$$

$$\text{I.T. (B)} = \frac{\text{Radioactividad Raíz} + \text{Tallo inferior}}{\text{Total}} \times 100$$

* Índice de traslación (I.T.) = Radioactividad en las hojas nuevas + tallo superior, expresado en porcentaje del total, según FOSTER y RUSSEL (11).

que la concentración de Fe^{59} fue mucho mayor en el tallo superior que en las hojas nuevas. El efecto del fósforo tuvo una tendencia cuadrática, ó sea que la traslación a P_1 fue significativamente mayor que a P_0 ó P_2 . Esta observación parece reflejar una mejor distribución del hierro absorbido por las hojas cotiledonales cuando la planta crece en una solución balanceada. En lo que se refiere a la traslación del hierro hacia la raíz, el efecto del fósforo no fue significativo, cuando se tomó los datos de la radioactividad en los órganos de la planta. Sin embargo, de acuerdo con los correspondientes índices de traslación, se notó una tendencia cuadrática similar a la descrita en el caso de movilización hacia el follaje.

Efecto de la concentración de sales

Las plantas previamente marcadas con Fe^{59} , y que más tarde recibieron Fe-EDTA (no marcado) y fósforo en las soluciones nutritivas, desarrollaron normalmente. Aquellas que no recibieron hierro después de haber sido marcadas, tenían sus hojas nuevas completamente cloróticas. Los resultados (cuadro 4) indican que la concentración de sales en el medio radical no ejerce mayor influencia sobre la reutilización del hierro fijado. La supresión posterior del hierro, por otro lado, pareciera estimular ligeramente la traslación hacia las hojas nuevas. No obstante esta diferencia en el contenido del Fe^{59} entre hojas nuevas y cloróticas bien puede estar afectado por un efecto de dilución del radioisótopo.

Cuadro 4. Efecto de las concentraciones de sales sobre la reutilización de hierro en plántulas de café.

Tratamiento	Hoja nueva	Hoja vieja	Tallos	Raíz	I.T. A %
	Distribución relativa de la radioactividad (en porcentaje)				
Hoagland completa	3	9	19	69	17
1/2 Hoagland completa	2	4	12	81	11
Hoagland sin Fe	7	8	13	72	9

Las autoradiografías (no se muestran aquí) concuerdan con los datos presentados en el cuadro anterior en el sentido de que la radioactividad en las hojas nuevas era muy baja.

Efecto de la concentración de fósforo en el medio radical sobre la recuperación de clorosis de hierro en café y cacao.

Observaciones hechas durante el transcurso del experimento sobre la aparición de clorosis en hojas nuevas de café y cacao indicaron claramente que el fósforo es capaz de interferir con la disponibilidad de hierro en la planta, siendo el efecto mucho más pronunciado en café que en cacao.

Síntomas típicos de clorosis aparecieron en las plantas de café en todos los tratamientos con fósforo; en las plantas testigos, por otra parte, las hojas nuevas tenían un color verde normal a pesar de que el hierro había sido excluido del medio. Más tarde, sin embargo, la clorosis desapareció "espontáneamente" en todas las plantas que

recibieron fósforo. Esta observación es de mucha importancia puesto que viene a confirmar la hipótesis de que la desaparición de la clorosis en plantas que no hayan recibido una fertilización con hierro se debe a la reutilización del elemento "fijado" en los tejidos de la planta.

Los datos obtenidos de los análisis de las muestras tomadas cuando las plantas estaban cloróticas y después de la recuperación de su color verde normal, muestran que gran parte de la radioactividad se concentró en las raíces (cuadro 5). En general, la concentración de

Cuadro 5. Efecto de la concentración de fósforo sobre la recuperación de la clorosis de hierro en café de 6 a 8 hojas[★].

Muestra	Grupo ^{★★}	Concentración de fósforo				
		P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
Distribución relativa de la radioactividad (en porcentaje)						
Raíz	A	25	84	79	83	76
	B	53	80	69	73	78
Tallo inferior	A	16	2	3	3	3
	B	5	3	7	3	2
Tallo superior	A	17	4	5	4	12
	B	5	4	4	5	4
Hoja vieja	A	19	6	9	6	6
	B	21	7	10	10	7
Hoja nueva	A	23	3	3	4	4
	B	16	7	11	8	8

★ Los datos son promedios de tres observaciones

★★ Grupo A: Plantas cloróticas

B: Después de la recuperación total.

Fe^{59} en las raíces eran más elevadas en los tratamientos con fósforo que en el testigo, sin fósforo. Comparando los dos grupos de plantas, se observó que las plantas cloróticas (Grupo A) presentaban una concentración más elevada de Fe^{59} que las recuperadas (Grupo B) en todos los tratamientos excepto en el testigo (P_0), en el que más bien hubo un acumulo en el segundo período. Estos datos están representados en la figura 1. La tendencia observada, parece indicar que las raíces de plantas cloróticas que crecieron en medio con fósforo, cedieron parte de su hierro durante la recuperación de la clorosis, mientras que en el testigo (P_0) hubo un fenómeno inverso. Esto es cierto, visto que los resultados indican que todos los órganos (excepto hojas viejas) de la parte aérea de las plantas testigo habían perdido gran parte del hierro durante el segundo período de muestreo, indicando que parte del elemento se trasladó hacia las raíces, elevando la concentración de radioactividad de 25 a 53%. Por otro lado, se observó una tendencia de acumular hierro en las hojas de plantas que crecieron en un medio con fósforo, durante el segundo período. No se observó cambios muy pronunciados en los tallos. En la figura 2 está representada la tendencia general de los tallos y hojas respectivamente en los dos períodos de muestreo. Se puede observar que en presencia de fósforo hay una tendencia de acumular hierro en las hojas y tallos, mientras que en ausencia de fósforo la tendencia es de bajar cuando desaparece la clorosis.

Los resultados del mismo experimento para cacao (cuadro 6) muestran que el fósforo actuó de manera muy distinta. La concentración de Fe^{59} en las raíces era bastante elevada en todos los tratamientos,

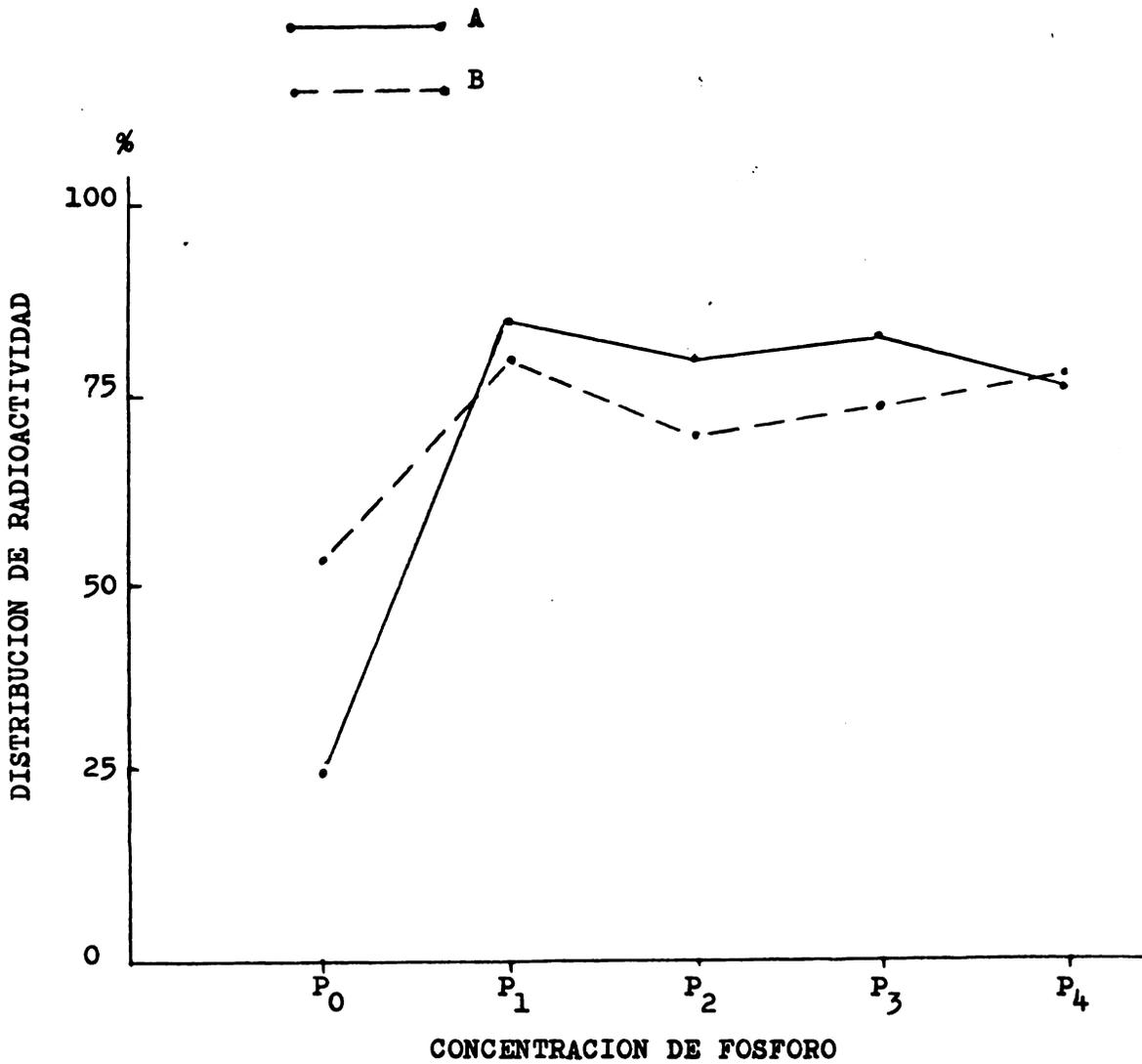


Figura 1. Efecto del nivel de fósforo sobre la distribución relativa de Fe⁵⁹ en raíces de café, antes (A) y (B) después de la recuperación de clorosis.

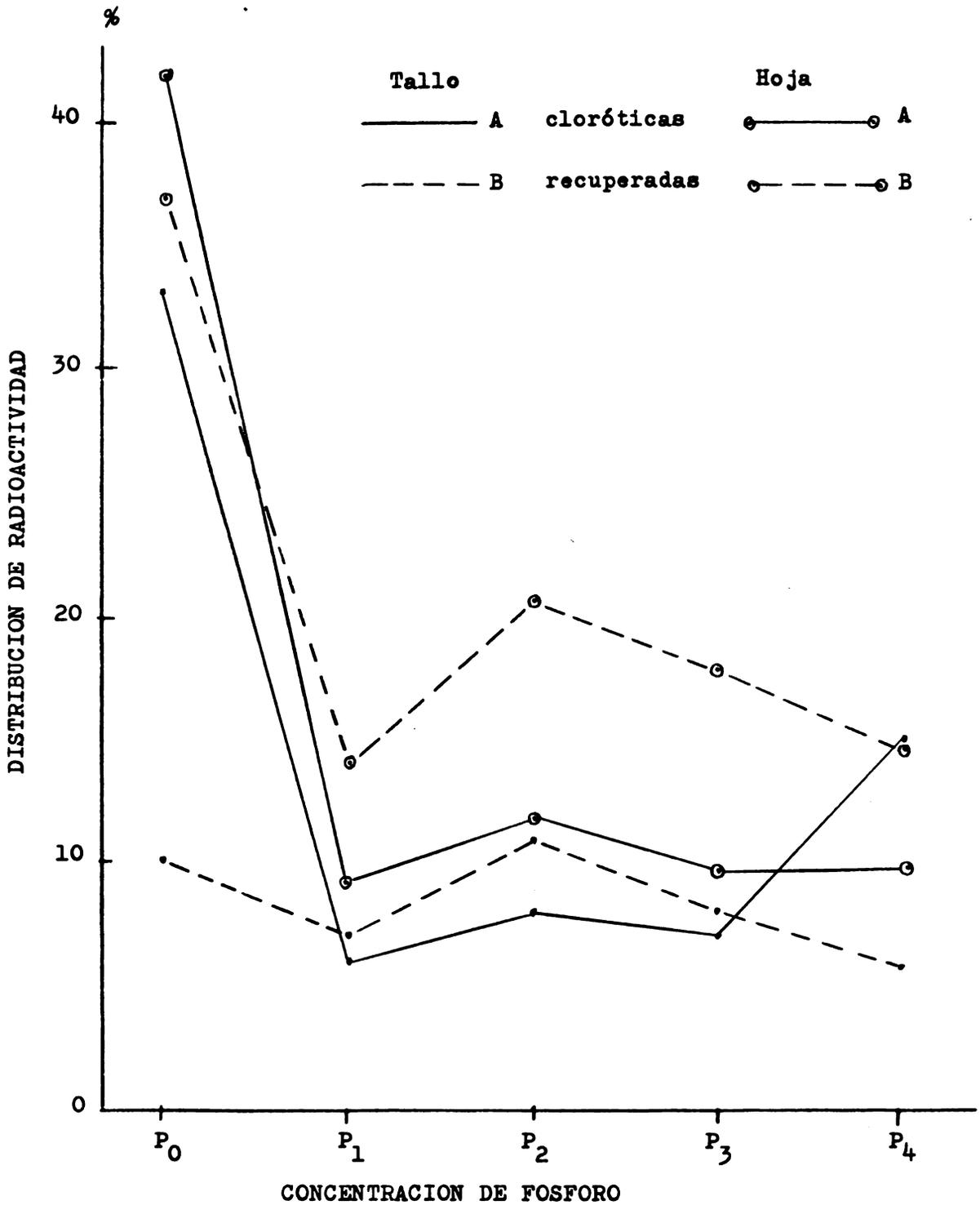


Figura 2. Efecto del nivel de fósforo sobre la distribución de Fe⁵⁹ en los tallos (nuevos y viejos), hojas (nuevas y viejas) de café.

Cuadro 6. Efecto de la concentración de fósforo en el medio radical sobre la recuperación de la clorosis de hierro en cacao joven^{*}.

Muestra	Grupo ^{**}	Concentración de fósforo			
		P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
Distribución relativa de la radioactividad (en porcentaje)					
Raíz vieja	A	78	76	63	67
	B	73	53	74	47
Raíz Nueva	A	11	13	9	22
	B	17	41	19	51
Tallo inferior	A	2	3	2	3
	B	1	2	2	1
Tallo superior	A	2	2	6	2
	B	1	1	1	tr.
Hoja vieja	A	3	2	8	2
	B	5	2	3	tr.
Hoja nueva	A	3	3	12	4
	B	2	2	2	tr.

* Los datos representan promedios de tres observaciones.

** Grupo A: Después de 35 días de marcadas con Fe⁵⁹ y puestas en soluciones de fósforo. Las plantas mostraban síntomas de clorosis.

Grupo B: Diez días más tarde, cuando la clorosis apenas había comenzado a desaparecer.



incluyendo el testigo (P_0). En este caso se observó una tendencia general hacia la acumulación de hierro en las raíces durante la recuperación de la clorosis. Esta tendencia fue determinada posiblemente por el desarrollo radical, pues se observó un gran aumento de radioactividad en las raíces formadas durante el período comprendido entre los dos muestreos. El acumulo observado en las raíces parece ser seguido por pérdidas de las partes aéreas, mayormente en los tratamientos con altas dosis de fósforo (P_3 y P_4). Además, se notó (figura 3), que el acumulo en las raíces tienden a aumentar con el aumento en la dosis de fósforo. Al inverso del café, se observó que en general la parte aérea de cacao perdió radioactividad durante el período de recuperación de la clorosis, en todos los tratamientos. En la figura 3, están representados también las tendencias generales de los resultados observados en los tallos y hojas, en los dos períodos de muestreo. Debemos señalar que en este experimento de cacao, las plantas del grupo A fueron cosechadas 35 días después de haber sido tratadas con Fe^{59} y puestas en soluciones con fósforo. Las plantas que recibieron fósforo mostraban síntomas de clorosis, mientras que las testigos (sin fósforo) desarrollaron un color normal y el tamaño de las hojas era mucho mayor que en los demás tratamientos. El Grupo B fue cosechado 10 días más tarde, cuando la clorosis había comenzado a desaparecer.

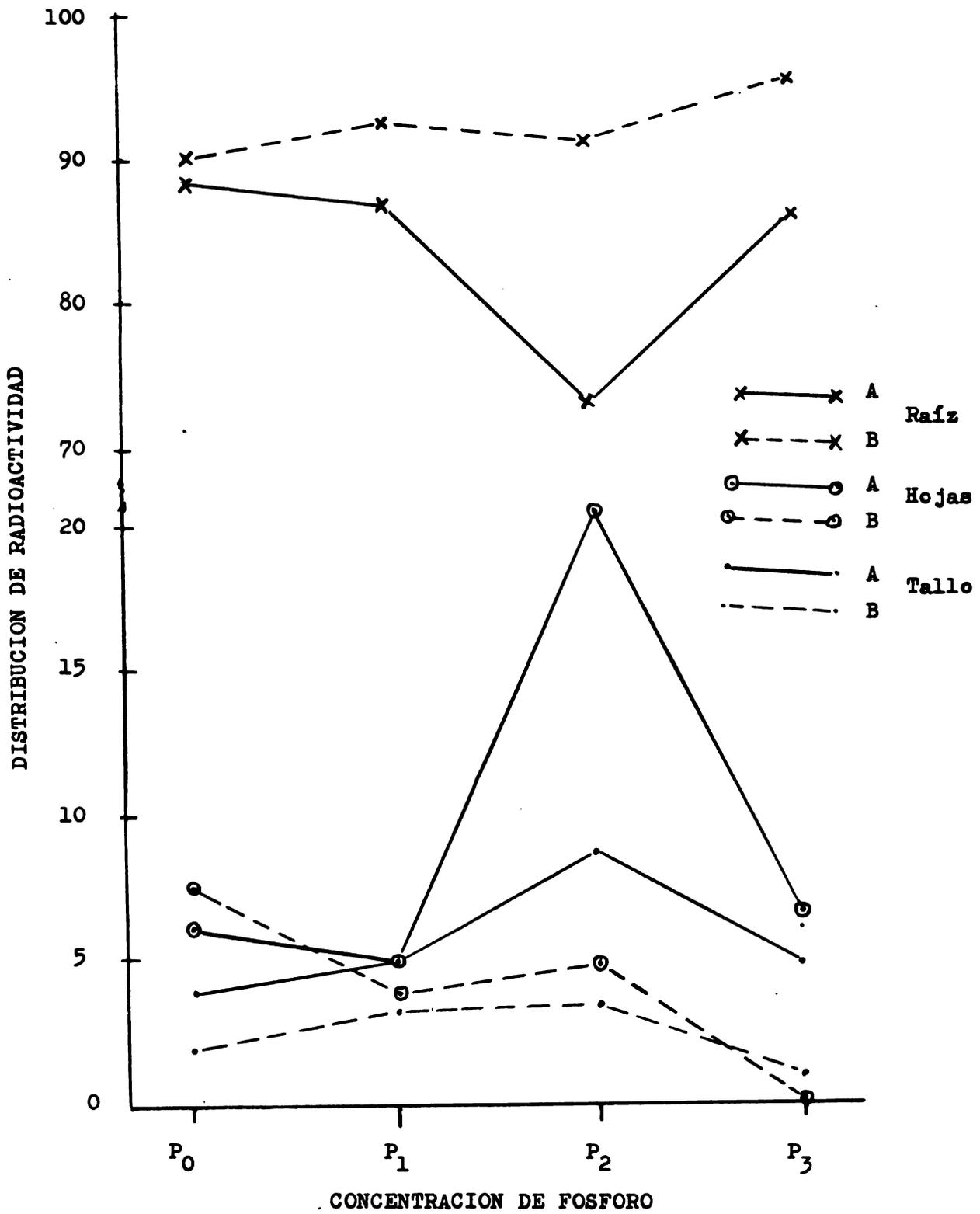


Figura 3. Efecto del nivel de fósforo sobre la distribución de Fe⁵⁹ en plantas de cacao; A) cloróticas y B) recuperación parcial.

Efecto del pH sobre la absorción de Fe⁵⁹-EDTA durante el período de recuperación de la clorosis.

La absorción de Fe⁵⁹ en forma de quelato por plantas cloróticas de café y cacao fue bastante afectada por la variación en la reacción del medio. La absorción total de Fe⁵⁹ (cuadro 7), tanto en café como en cacao, fue siempre mayor a pH 4,0 que a 6,0 u 8,0. Entre estos dos últimos valores de pH sin embargo, la diferencia no fue muy marcada. La absorción de hierro aumentó con el tiempo, esto es durante la recuperación de la clorosis, en todos los tratamientos y las dos plantas. Este aumento fue mucho mayor para café que para cacao, excepto a pH 6,0, en cuyo caso la absorción aumentó marcadamente al final de la recuperación. La figura 4, muestran claramente como las plantas de cacao habían absorbido la casi totalidad del hierro a las 48 horas, excepto a pH 6,0. El café, por otro lado, fue menos eficiente que el cacao en todos los valores de pH investigados. Estos datos ilustran la mayor afinidad de las raíces de cacao por el hierro.

Con respecto a la distribución del Fe⁵⁹ (cuadro 7) en los órganos aéreos, el efecto de pH fue diferente en los dos cultivos. En general se notó un mayor traslado de hierro hacia la parte superior en plantas de café que en cacao, y a pH 4,0 que a pH 6,0 u 8,0. Esto tal vez podría explicar por qué la recuperación de clorosis fue mucho más rápida (23 días) en café cuando las plantas se hallaban en el medio más ácido (pH 4,0). En cacao, por otra parte, la recuperación tomó más de 60 días y fue favorecida por el pH 6,0. Esto parece indicar que los valores de pH 4,0 y 6,0 son más adecuados respectivamente para café y cacao, al menos en lo se refiere a la nutrición del

Cuadro 7. Efecto del pH sobre la absorción y distribución de Fe^{59} por plantas cloróticas de café y cacao. *

Organo	2 días			23 y 60 días		
	4,0	6,0	8,0	4,0	6,0	8,0
	cpm/g	%	cpm/g	%	cpm/g	%
CAFE						
Raíz	19.810	<u>53</u>	4.620	<u>23</u>	3.070	<u>69</u>
Follaje	17.520	<u>47</u>	330	<u>1</u>	1.390	<u>31</u>
Total	37.330		4.750		4.460	
					74.570	
					33.410	
					29.890	<u>82</u>
					26.310	<u>71</u>
					10.790	<u>29</u>
					37.100	
CACAO						
Raíz	97.500	<u>22,5</u>	28.530	<u>98,8</u>	59.970	<u>99,6</u>
Follaje	450	<u>0,5</u>	350	<u>1,2</u>	270	<u>0,4</u>
Total	97.950		28.880		60.240	
					98.400	
					63.920	
					680	<u>1,1</u>
					390	<u>0,6</u>
					64.810	<u>99,4</u>
					65.200	

* La solución nutritiva contenía $4 \times 10^{-3} M$, KH_2PO_4 y 5 ppm. de Fe-EDTA marcado con Fe^{59} .

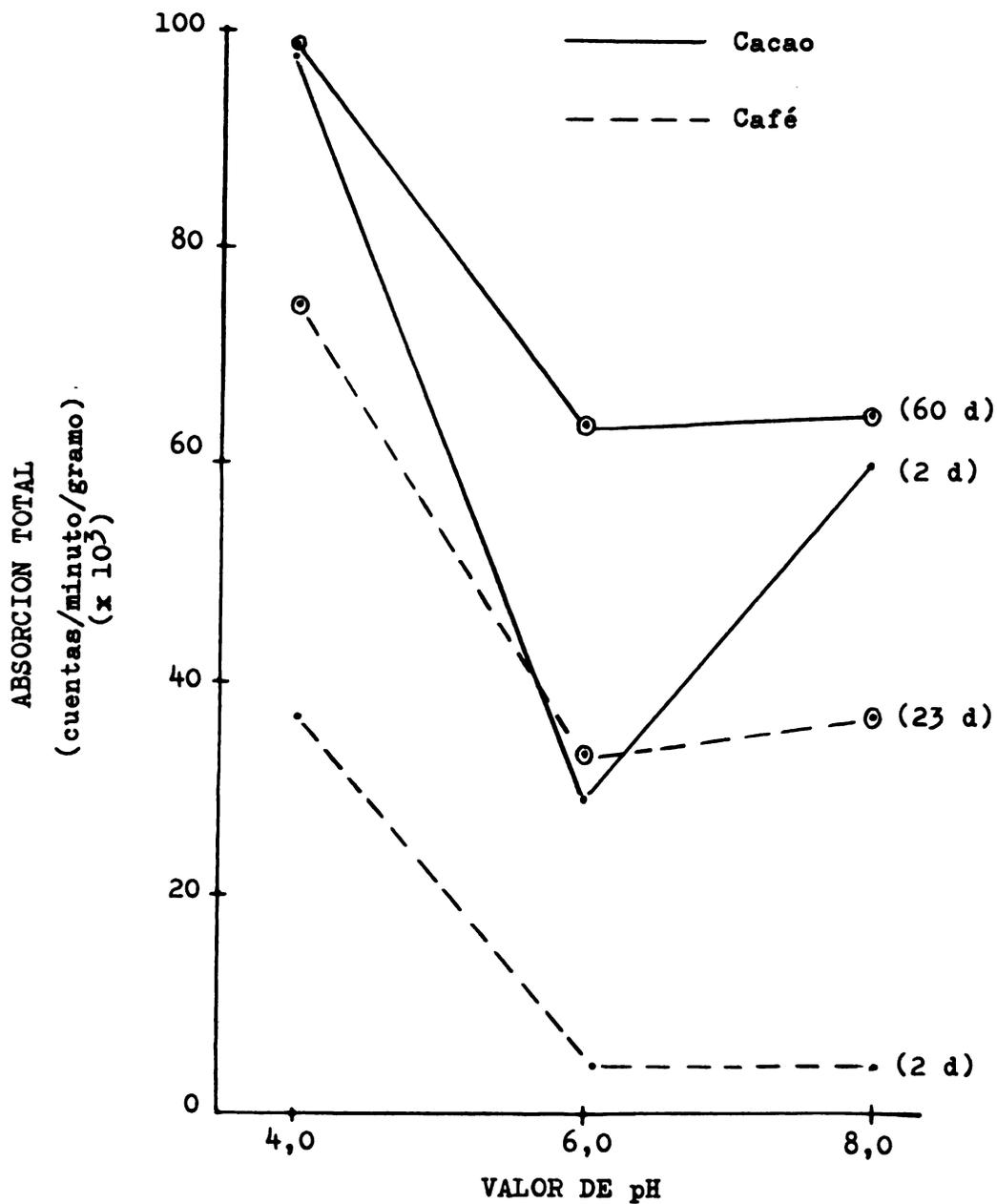


Figura 4. Efecto del pH sobre la absorción total de Fe^{59} por plantas cloróticas de café y cacao.

hierro cuando el nivel de fósforo es alto (4×10^{-3} M KH_2PO_4) en el medio radical.

DISCUSION

Las semillas normalmente contienen hierro almacenado en los cotiledones para suplir la necesidad de la planta joven. Es pues evidente que el hierro en este estado puede ser fácilmente utilizado por otros órganos de la planta, es decir: las hojas, el tallo y las raíces.

Los presentes resultados experimentales muestran que el Fe^{59} quelado también puede ser utilizado normalmente por las plantas durante la germinación si se aplica a la semilla. Durante las etapas iniciales de desarrollo, el Fe^{59} es utilizado por las raíces y el follaje en una forma bastante uniforme, lo cual concuerda con el concepto de que en plantas muy jóvenes, el hierro seminal es altamente movable y puede ser cedido por los tejidos más maduros a aquellos que se encuentran en activo crecimiento. Al respecto, se ha observado que en plántulas de soya gran parte del hierro del follaje es suplido por los cotiledones, y que cuando estos son eliminados, el contenido de ese elemento en las hojas disminuye considerablemente (3). Con relación al efecto del pH sobre la disponibilidad del hierro de la semilla, se ha verificado que a pH 4,0 hay una mayor utilización por las plantas (26). La forma en que se encuentra el hierro en los órganos de reserva y la manera como es utilizado no son todavía conocidas.

La reutilización de Fe^{59} "fijado" por plantas de café y cacao previamente marcada, es bastante influenciada por cambios de los factores ambientales. Por ejemplo, la ~~constitución~~ química de la solución, la concentración de fósforo y las variaciones del pH. La intensidad con que actúan esos factores determina el grado de reutilización del

hierro y consecuentemente el grado de desarrollo de los correspondientes síntomas de clorosis en los cultivos.

El efecto de la constitución química de la solución sobre la reutilización del hierro no quedó claramente establecido en este estudio, pues si bien es cierto que en ausencia de hierro en el medio, el contenido de Fe^{59} en las hojas nuevas era mayor, esta diferencia puede ser ficticia y quizás refleje un efecto de dilución isotópica en el caso de las plantas cultivadas posteriormente en Hoagland completa (con hierro). De otro modo no se podría explicar el hecho de que las hojas verdes tuvieran menos Fe^{59} que las cloróticas.

Ya fue mencionado que la concentración de fósforo puede constituir uno de los factores más importantes en controlar la absorción y traslado de hierro en las plantas. En el presente caso, se observó también que el fósforo puede afectar el traslado de hierro, sea absorbido por las raíces ó aplicados directamente sobre las hojas cotiledonales. Debemos señalar que su efecto es bastante complejo y de difícil interpretación. En general se observó que a bajas concentraciones de fósforo el acumulo de hierro en los tejidos jóvenes del follaje fue mayor, indicando por lo tanto una mejor distribución. Aunque los resultados sean bastante específicos para plantas de café muy jóvenes (estado de copita), el fósforo parece actuar diferentemente según la manera de aplicación. Por ejemplo, en plántulas de café a las que se le hizo absorber el hierro por las raíces, el hierro del follaje disminuyó según aumentó la dosis de fósforo, y el índice de traslado presenta una tendencia lineal decreciente. En cambio, cuando se aplicó a las hojas cotiledonales, se observó una tendencia curvilínea,

aumentando de P_0 a P_1 y disminuyendo subsecuentemente. Es probable que esta diferencia esté relacionada en algún modo con el sistema de traslado del hierro dentro de la planta. Se sabe por ejemplo, que los elementos absorbidos por las hojas se mueven por el floema (1) mientras que los absorbidos por las raíces lo hacen principalmente vía xilema. Es curioso observar que relativamente gran cantidad de hierro se trasladó hacia las raíces, cuando se aplicó en las hojas cotiledonales. En este caso el efecto del fósforo no fue tan marcado como en el caso del traslado hacia arriba. Esto parece indicar que el fenómeno de traslado hacia las raíces ocurre a través del floema, de ahí el efecto del fósforo no es muy marcado. En cambio, el traslado hacia el ápice debe ocurrir de otra forma, quizás a través del xilema, y es influenciada grandemente por la corriente transpiratoria, lo cual explica el mayor acumulo de Fe^{59} en el ápice que en las raíces.

La concentración de fósforo fue decisiva en el apareamiento de clorosis en plantas de café y cacao previamente alimentadas con Fe^{59} . El hecho de que las hojas nuevas de plantas sin fósforo desarrollaron un color normal evidencia el efecto marcado del fósforo sobre la reutilización de hierro. El gran acumulo de hierro observado en las raíces de plantas tratadas con fósforo hace creer que aquel es retenido en las raíces formando compuestos fosfatados de baja solubilidad. Por otro lado, se supone también que un desarrollo mayor del sistema radical estimulado por la presencia de fósforo haya contribuido a tal acumulo, puesto que ellas requieren hierro para su desarrollo. Esto parece ser cierto particularmente para cacao, por lo menos en los primeros estados de crecimiento, pues las raíces nuevas en cacao

aumentaron su contenido en el segundo período de muestreo. Observaciones efectuadas por BRANTON y JACOBSON (3), indican que plantas cloróticas de soya acumulan más hierro en las raíces que las plantas normales. Según ellos, aparentemente las raíces de plantas cloróticas necesitan hierro para satisfacer sus necesidades en el comienzo. En el presente caso debemos recordar que las plantas crecieron en un medio sin hierro y que la clorosis apareció y desapareció sin ser alimentadas con hierro, por tanto, haciendo uso de lo que ya existía en los tejidos. Además se observó que la recuperación del color normal coincidió con la transferencia de hierro acumulado en las raíces al follaje, principalmente en plantas de café. Esto parece corroborar la idea de que el hierro está "fijado" en los tejidos formando compuestos de solubilidad lenta, pero que son sensibles principalmente a las variaciones de pH. En lo que respecta a los compuestos de fósforo y hierro en las plantas, se sabe, según REDISKE Y BIDDULPH (26), que a altas concentraciones de fósforo, el precipitado es probablemente una suspensión fina de fosfato férrico, el cual no es absorbido aparentemente. A bajas concentraciones por otro lado, se forma óxido férrico hidratado, que se acumularía sobre las raíces y que sería incorporado posteriormente. En el presente caso es más probable que el hierro sea inactivado dentro del tejido radical, visto que durante el período de absorción de Fe^{59} , las plantas tenían la misma concentración de fósforo. Además la reutilización posterior con el desaparecimiento de clorosis parece concordar con las observaciones de SHIVE & ROGERS (27), sobre la utilización de hierro precipitado en los tejidos vasculares.

En plantas de cacao se notó una tendencia diferente a la del café. El hecho de que las raíces de cacao hayan aumentado la concentración de hierro en el segundo período, parece concordar con la teoría de que el acumulo es debido al desarrollo radical estimulado por las concentraciones de fósforo. En forma general, se notó que la pérdida de Fe^{59} observadas en las partes aéreas, correspondía a un acumulo en las raíces. Es posible que la discrepancia entre café y cacao se deba a la concentración de la solución utilizada (1/2 Hoagland para cacao solamente), y a que el período experimental que fue más corto para cacao y por lo consiguiente la recuperación de clorosis fue sólo parcial.

Otro factor de mucha importancia además del fósforo es el pH del medio. El cambio de pH de la solución constituyó un factor de suma importancia en la desaparición de la clorosis. Esto se deduce de la observación de que cuando se utilizó KH_2PO_4 en vez de $NH_4H_2PO_4$ como fuente de fósforo, la desaparición fue mucho más rápida. Esto concuerda con las observaciones de FRANCO & LOOMIS (13) en que el exceso de KH_2PO_4 (alta dosis de fósforo) al mantener el pH alrededor de 4,5 y 5,5 resulta en una clorosis moderada. Además, el uso de NH_4NO_3 para suplir el N del medio, parece ser responsable por la disminución en el valor de pH, debido a la absorción preferencial del NH_4^+ . Cabe señalar que en el presente estudio de concentración de fósforo, el pH fue controlado solamente en el inicio del experimento. El pH observado al final era muy bajo, alrededor de 3,5.

En lo que respecta al efecto del pH sobre la absorción del Fe-EDTA, ya se dijo que la absorción total fue mayor a pH 4,0

bajando a pH 6,0 y 8,0 en los dos cultivos estudiados. Sin embargo a la distribución relativa del hierro fue muy diferente en ambos casos, siendo mayor en café que en cacao. La baja traslación observada en cacao de 6 a 8 hojas parece concordar con los resultados obtenidos anteriormente, que se refiere al acumulo de hierro en las raíces, que es mucho mayor que en café. Según parece las plantas de cacao necesitan mucho hierro en las raíces al comienzo de su crecimiento, mayormente cuando hay mucho fósforo. Dentro de las condiciones experimentales estudiadas el mejor traslado se verificó a pH 4,0 en café y a pH 6,0 en cacao.

CONCLUSIONES

1. La reserva seminal de hierro puede ser aumentada eficientemente mediante la inmersión de la semilla en una solución de dicho elemento en forma de quelato (Fe-EDTA).
2. El hierro aplicado a plántulas jóvenes de café directamente sobre las hojas cotiledonales es utilizado en el desarrollo de nuevos tejidos tanto del follaje como de las raíces. El traslado del hierro es afectado por la concentración de fósforo, siendo el efecto mucho mayor sobre la traslación ascendente que sobre la descendente.
3. El nivel de fósforo tiene un efecto bastante marcado sobre la reutilización de Fe^{59} fijado por las plantas de café y cacao.
4. La desaparición de clorosis está relacionada con un aumento de hierro en las hojas; dicho incremento puede ocurrir a expensas del hierro de las raíces.
5. En cacao, el acumulo de hierro en las raíces nuevas se debe al traslado de hierro desde la parte aérea.
6. El traslado de hierro de la raíz hacia el follaje es mucho más alto en café que en cacao.
7. Aparentemente las raíces de café tienden a acumular menos hierro que las de cacao.
8. Además del fósforo, el pH constituye otro factor importante en la redistribución del hierro de la planta. Es posible que su efecto sea indirecto, favoreciendo la solubilización de los compuestos de hierro formado en presencia de fósforo.

9. La absorción de hierro por plántulas de café y cacao es mayor a pH 4,0 que a 6,0 u 8,0, sin embargo, la distribución es mejor a pH 4,0 para café y pH 6,0 para cacao.
10. La desaparición de clorosis es mucho más rápida en café que en cacao. Esto puede reflejar una insuficiencia de la distribución de hierro en plantas de cacao.

RESUMEN

En el presente trabajo se procuró investigar el problema de la nutrición de hierro en plantas de café y cacao, teniendo como objetivo principal estudiar el efecto de algunos factores como concentración de fósforo y la reacción del medio sobre la reutilización del hierro. Además se investigó la movilidad de hierro aplicado a la semilla de café, así como desde las hojas cotiledonales hacia otros órganos de plántulas de café.

Como medio de crecimiento se utilizó arena para las plántulas recién nacidas, y la solución nutritiva # 2 de Hoagland, la cual fue modificada según los presentes requerimientos experimentales. El Fe^{59} fue aplicado en forma de Fe^{59} -EDTA.

Para estudiar la movilidad del hierro en plántulas jóvenes se utilizó semillas que fueron remojadas en solución de Fe^{59} -EDTA en cajas de Petri y después germinadas en arena. Se hicieron muestreos en los diferentes períodos de crecimiento. También se aplicó Fe^{59} en hojas cotiledonales para observar la traslación.

En el estudio del efecto de la concentración de fósforo o de la reacción del medio sobre la recuperación de clorosis, se usaron plantas más desarrolladas de café (caturra) y cacao (clones UF 667 o 668). Las plantas de café y cacao (con 6 a 8 hojas) fueron marcadas previamente con Fe^{59} -EDTA por un período de una semana, siendo después cuidadosamente lavadas y transferidas a los tratamientos respectivos. Las plantas crecieron en soluciones conteniendo dosis crecientes de fósforo o diferentes concentraciones de sales. Las plantas fueron cosechadas y analizadas en dos períodos: a) cuando se manifestó la clorosis y

b) cuando desapareció la clorosis. Para estudiar el efecto del pH sobre la absorción de Fe^{59} -EDTA, se utilizó plantas cloróticas de café y cacao. El hierro fue aplicado en solución nutritiva en presencia de fósforo.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el hierro aplicado a la semilla aumenta la reserva de este elemento y es utilizado posteriormente. La distribución del Fe^{59} en la planta es bastante uniforme a través de los diferentes estados iniciales de crecimiento.

El hierro aplicado directamente sobre las hojas cotiledonales de café es movilizado hacia los tejidos nuevos del follaje o de las raíces. Se observó que el traslado hacia las raíces es relativamente grande.

El nivel de fósforo tuvo un efecto bastante marcado sobre la reutilización de Fe^{59} fijado por las plantas de café y cacao. Los resultados fueron diferentes para café y cacao. Clorosis típica apareció en todos los tratamientos que contenían fósforo en el medio, mientras que tratamiento sin fósforo desarrolló un color normal verde. Fue observado que el desaparecimiento de clorosis en café está relacionado con el aumento de hierro en las hojas nuevas; este hierro fue suplido principalmente por las raíces. Inversamente, en cacao, encontró que hubo acumulo de hierro en las raíces lo cual ocurrió a expensas de la parte aérea. La recuperación de clorosis fue parcial en este caso. Es posible que este acumulo esté relacionado con un desarrollo del sistema radicular del cacao estimulado por el fósforo,

durante el período experimental. Esto refleja también un traslado más lento de hierro hacia el follaje en cacao que en café.

El efecto indirecto de pH constituye otro factor importante en el desaparecimiento de clorosis. Se notó que el tiempo de desaparecimiento de clorosis está relacionado con la disminución en el valor de pH de las soluciones. El uso de KH_2PO_4 en vez de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, para suplir fósforo produjo un rápido desaparecimiento de la clorosis en café.

La absorción total de Fe^{59} fue siempre mayor a pH 4,0 que a 6,0 u 8,0, tanto en café como en cacao. Sin embargo la traslación hacia el ápice, fue mayor a pH 4,0 y 6,0 para café y cacao respectivamente.

SUMMARY

It was recently observed that coffee plants suffering from induced iron deficiency were able to recover their normal color of the young leaves in the absence of iron in the nutrient culture solution. This happened after the solution became 'old' and hence depleted of some of the nutrient elements. Therefore, the idea arose that recovery could be associated with 'reutilization' of iron fixed by the plant.

This series of experiments was set up to test the above hypothesis.

Factors such as phosphorus concentration, salt concentration and pH of the medium were studied in the reutilisation of iron in coffee and cacao plants. Mobility of iron applied to the seed and the cotyledonary leaves was also investigated.

Plants were grown in sand medium and Hoagland no. 2 nutrient solution, which was modified according to the experimental needs. Iron-59 was supplied as Fe-EDTA, labelled with Fe⁵⁹.

To study the mobility of iron, coffee seeds and seedling were used. Seeds were soaked in a solution containing labelled Fe-EDTA and later planted in sand. The seeds were harvested during three different growth stages. The mobility was also studied by applying iron directly to the cotyledonary leaves.

The reutilization of iron was studied by feeding coffee and cacao plants (6 to 8 leaves) with Fe⁵⁹-EDTA during a period of one week. These plants were carefully washed and later transferred to fresh nutrient solutions containing different concentrations of phosphorus,

without iron. The effect of salt concentration and iron supply on the reutilization of 'fixed' iron was also studied. Plants were harvested in two different periods: a) when chlorosis appeared, and b) when chlorosis had disappeared.

To study the effect of pH on the absorption of Fe^{59} -EDTA applied to the nutrient solution, chlorotic coffee and cacao plants were used. Again the plants were harvested in two periods: a) 48 hours after the beginning of treatment, and b) when chlorosis had disappeared.

Results reported in the present paper show that iron supplied to the seed may increase the original stock of iron, and it may be utilized later. The distribution of applied iron is quite uniform in different stages of growth. Iron applied directly to the cotyledonary leaves is transported to the root in considerable quantity, but not comparable to the quantity translocated to the shoot.

Phosphorus concentration had a marked effect on the reutilization of iron in coffee and cacao. Typical chlorosis appeared in all treatment containing phosphorus in the medium, while treatment without phosphorus developed normal green color. It was observed that the disappearance of chlorosis in coffee is related to the increase of iron in new leaves, which was supplied mostly by the roots. Inversely, from chlorosis in the new leaves, in a high phosphorus medium. It is possible that this accumulation in cacao roots may result from the root development which was stimulated by the phosphorus, during the experimental period. The slow growth of cacao plants probably reflects the low content of labelled iron in the shoots.

The indirect effect of pH may constitute important factors in the disappearance of chlorosis. It was observed that the time of disappearance was related to decreasing of pH value of the solutions. The use of KH_2PO_4 instead of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, to supply phosphorus produced a rapid disappearance of chlorosis in coffee plants.

In coffee and cacao, the total absorption of Fe^{59} -EDTA was higher at pH 4,0 than at pH 6,0 or 8,0. However, the distribution of iron to the shoots, was higher at pH 4,0 for coffee and at pH 6,0 for cacao.

LITERATURA CITADA

1. BIDDULPH, S. Visual indications of S³⁵ and P³² translocation in the phloem. *American Journal of Botany* 43:143-148. 1956.
2. BIDDULPH, O. y WOODBRIDGE, C. G. The uptake of phosphorus by beans with particular reference to the effects of iron. *Plant Physiology* 27(3):431-444. 1952.
3. BRANTON, D. y JACOBSON, L. Iron transport in pea plant. *Plant Physiology* 34(4):539-545. 1962.
4. BROWN, J. C. Iron chlorosis in plants. *Advances in Agronomy* 13:329-366. 1961.
5. _____ et al. Internal inactivation of iron in soybeans as affected by root growth medium. *Soil Science* 87(2):89-94. 1959.
6. _____ y HOLMES, R. S. Iron the limiting element in a chlorosis: Part I. Availability and utilization of iron depend upon nutrition and plant species. *Plant Physiology* 30(5):451-457. 1955.
7. _____, HOLMES, R. S. y SPECHT, A. W. Iron the limiting element in a chlorosis. Part II. Copper-phosphorus induced chlorosis depend upon plant species and varieties. *Plant Physiology* 30(5):457-462. 1955.
8. CHANG, S. C. y JACKSON, M. L. Solubility product of iron phosphate. *Soil Science Society of America. Proceedings* 21(3):265-269. 1957.
9. CULOT, J. P. et al. Contribution a l'etude des deficiences minerales du cafeier d'Arabic au Kivu. *Institut National pour l'etude Agronomique du Congo Belge. Serie Scientifique* no. 73. 1958. 105 p.
10. DE KOCK, P. C. Iron nutrition of plants at high pH. *Soil Science* 79(3):167-175. 1955.
11. FOSTER, N. M. y RUSSEL, R. S. Factor affecting the ability of plants to absorb phosphate from soils. III. Plant Physiological effect of iron. *The Journal of Soil Science* 9(2):280-288. 1958.
12. FRANCO, C. M. y MENDES, H. C. Síntomas de deficiencias mine-rais no cafeeiro. *Bragantia* 9(9-12):165-173. 1949.

13. FRANCO, C. M. y LOOMIS, W. E. The absorption of phosphorus and iron from nutrient solutions. *Plant Physiology* 22(4): 627-634. 1947.
14. GREENWOOD, M. y HAYFON, R. J. Iron and Zinc deficiency in cacao in the Goald Coast. *Empire Journal of Experimental Agriculture* 19(14):73-76. 1951.
15. HAVORD, G. Lime induced chlorosis of cacao seedlings. In Imperial College of Tropical Agriculture. St. Augustine, Trinidad, 1955. pp. 72-76.
16. HILL, R. y LEHMANN, H. Iron absorption and translocation in land plants. In Lamb, C. A., Bentley, O. G. & Beatie, J. M. Trace elements. New York, 1958. pp. 377-379.
17. HOAGLAND, D. R. y ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular no. 347. 1950. 32 p.
18. INGALLS, R. A. y SHIVE, J. W. Relation of H-ion concentrations of tissue fluids to the distribution of iron in plants. *Plant Physiology* 6(1):103-125. 1931.
19. KLIMAN, S. The importance of ferrous iron in plants and soils. Soil Science Society of America. Proceedings 2:385-392. 1937.
20. LOUE, A. Estudio de las carencias y de las deficiencias minerales en el cacao. *Fertilité* no. 14. 1955? 63 p.
21. LOTT, W. L. et al. Estudio de cafetales de San Pablo y Parana mediante el análisis foliar. IBEC Research Institute. Boletín no. 26. 1961. 72 p.
22. MEDCALF, J. C. y LOTT, W. L. Metal chelates in coffee. IBEC Research Institute. Bulletin no. 11. 1956. 19 p.
23. MCDONALD, J. A. Phosphate fixation in soils in relation to iron availability and its possible connection with the gypsum phosphate problem in cacao soils. Imperial College of Tropical Agriculture. Annual Report on Cacao Research 4:86-87. 1935.
24. MULLER, L. E. Algunas deficiencias minerales comunes en el cafeto (Coffea arabica L.). Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Boletín Técnico no. 4. 1959. 41 p.
25. PEREZ, S. V. M. Algunas deficiencias minerales del cafeto en Costa Rica. Costa Rica, Ministerio de Agricultura e Industrias. Informe Técnico no. 2. 1957. 27 p.

26. REDISKE, J. H. y BIDDULPH, O. The absorption and translocation of iron. *Plant Physiology* 28(4):576-593. 1953.
27. ROGERS, C. H. y SHIVE, J. W. Factors affecting the distribution of iron in plants. *Plant Physiology* 7(2):227-252. 1932.
28. ROBINSON, J. B. D. Amber Beans. *Kenya Coffee* 25(291):91-93. 1960.
29. SIDERIS, C. P. Manganese interference in the absorption and translocation of radioactive iron (Fe^{59}) in ananas comosus (L) Merr. *Plant Physiology* 25(2):307-321. 1930.
30. SCHMIDT, W. E. y GERLOFF, G. C. A naturally occurring chelate of iron in xylem exudate. *Plant Physiology* 36(2):226-231. 1961.
31. SMITH, R. L. et al. Some uses of radioisotopes in micronutrient plant studies at Utah State University. In International Atomic Energy Agency. Radioisotopes in soil plant nutrition. Vienna, 1962. pp. 249-258.
32. SYLVAIN, P. G. Report on the "marly" beans condition of market coffee in Jamaica due to the iron deficiency. Inter-American Institute of Agricultural Sciences. Report no. 49. 1961. 17 p.
33. SWENSON, R. M. et al. Fixation of phosphate by iron and aluminum and replacement by organic and inorganic ions. *Soil Science* 67:3-22. 1949.
34. THORNE, D. y WALLACE, A. Some factors affecting chlorosis on high lime soils. I. Ferrous and ferric iron. *Soil Science* 57(4):299-312. 1944.
35. TIFFIN, L. O. y BROWN, J. C. Iron chelates in soybeans exudate. *Science* 135:311-313. 1962.
36. WALLACE, A. y LUNT, O. R. Iron chlorosis in horticultural plants, a review. American Society of Horticultural Sciences. Proceedings 75:819-841. 1960.