

SOBRE LA APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA PARA EL ANALISIS FOLIAR

por el Dr. W FEUTCH

Del Depto. de Enología y Fruticultura de la Escuela de Agronomía,
Universidad de Chile

El análisis foliar nos permite apreciar el estado de nutrición de las hojas en el momento de arrancarlas del árbol. El resultado refleja todos los factores del suelo, del clima, como también el estado de desarrollo de la planta. Hay que tomar en cuenta, no obstante, que el árbol frutal reacciona apreciablemente a la cantidad de frutas, tanto del año de la investigación como de los años anteriores. Por esta razón es difícil concluir resultados exactos del análisis. A larga vista convendría más crear un huerto experimental, con el fin de realizar ahí numerosos ensayos de abonos, para establecer así un standard representativo para la zona frutícola circundante. Una comparación entre los resultados obtenidos por los huertos de fruticultores con aquellos del huerto experimental, que se controla severamente y durante todo el año, permite mayor seguridad en las conclusiones prácticas de los análisis.

Existen en las hojas del árbol, sin embargo, algunos síntomas muy visibles de nutrición disarmónica y perjudicial. Si estos síntomas son claramente visibles, podemos comparar las hojas enfermas con las hojas sanas del mismo huerto y, por lo general, encontrar la causa del mal (GRUPPE, 1960). Para Chile, estamos obligados a seguir, por ahora, este método.

Métodos

Hay varios métodos para establecer el contenido de minerales en las hojas. La elección del método conveniente depende, ante todo, de las posibilidades del laboratorio. En muchos casos, la cromatografía puede servir para el análisis, y no exige aparatos caros ni complicados. La cromatografía se usa mucho para la separación de sustancias orgánicas. Sin embargo, se sabe menos sobre su valor para identificar sustancias anorgánicas. Además, la cromatografía permite a menudo sólo determinaciones cuantitativas semixactas. Por este motivo hicimos previamente experiencias para cerciorarnos si con este método se podrían resolver problemas prácticos de la fruticultura.

Para la cromatografía se dispuso del medio del papel y del de capas delgadas. El primer procedimiento se efectúa en probetas de 30 cm. de alto y de un litro

de capacidad. Ellos sirven de cámaras separadoras. La separación se realizó mediante los papeles Whatman (1) en forma ascendente. Por lo general, se necesitan 10-14 horas para lograrla, por lo que conviene colocar la cinta en la noche y retirarla a la mañana siguiente. El ancho de la cinta es suficiente para marcar en su base dos puntos de partida con los extractos que se comparan. Esto es importante para la identidad de las condiciones separadoras y excluye ciertas fuentes de error. Si se usa papel, es también importante cerciorarse de la dirección de las fibras, pues éstas influyen en la separación y en el movimiento de las sustancias. Las experiencias siguientes fueron realizadas de manera que las soluciones corrian con las fibras del papel.

La cromatografía de capa delgada se realizó siempre con silicagela H. Este tipo de silicagela se presta mejor para disolventes usados en este caso. Las capas se aplicaron en planchas de vidrio de 6,7 cm. de ancho y 18,0 cm. de largo, secandóselas según indicación. La separación se realizó en cámaras separadoras de correspondiente tamaño y en forma ascendente con un tiempo de recorrido entre 60 y 120 minutos. Estas planchas de vidrio también se prestan para marcar dos puntos de partida con las ventajitas ya mencionadas. La producción de los extractos se realizó mediante la incineración seca de 2 gr. de peso seco. Según POLLARD (1953) es posible disolver, mediante algunas cromatografías, toda la ceniza en sus componentes y sin más procedimiento. Sin embargo, la identificación de las sustancias buscadas se facilita más si la ceniza es separada, según SEILER (1960) de 3 a 4 grupos.

Como la cromatografía es solamente semicuantitativa, es conveniente compararla con otro método que fuera cuantitativamente exacto. Para esto, la complexometría es apropiada. Se obtiene buenos resultados si previamente se eliminan o enmascaran los metales perturbadores (SCHWARZENBACH, 1960).

Resultados

Se analizaron primeramente hojas de durazno del jardín experimental de la Estación Experimental Agronómica Maipú. Las hojas enfermas mostraron los sín-

tomas visuales de la deficiencia ferrosa producida por el exceso de calcio, es decir, láminas amarillentas con nervios verdes. Si se examina en el cromatograma las manchas ocasionadas por el hierro, se aprecia claramente su menor cantidad en las hojas enfermas.



Fig. 1. Cromatograma de papel mostrando la menor cantidad del hierro en las hojas enfermas (derecha) en comparación con las hojas sanas (izquierda).

Solvente: Metanol/HCl/H₂O = 8/1/1 (MERCK).

Reactivo de coloración: Potasioferricianuro (MERCK).

Ubicación de hierro: R_f 0,8 (la fig. muestra sólo una parte del cromatograma).

Fig. 2. Cromatograma de papel mostrando las manchas cruzadas del Mn y Fe de las hojas enfermas (derecha) y sanas (izquierda).

Solvente: Acetona/HCl/H₂O = 8/1/1 (MERCK).

Reactivo de coloración: difenilcarbazona y amoníaco.

Ubicación de Fe: R_f 0,7 y 0,78.

Ubicación de Mn: R_f 0,67 y 0,74.

(La fig. muestra sólo una parte del cromatograma).

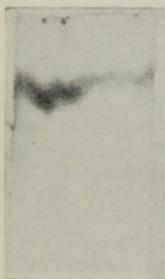


Fig. 3: Cromatograma del papel mostrando las manchas del Fe de las hojas enfermas (derecha) y sanas (izquierda).

Solvente: Metanol/HCl/H₂O = 8/1/1.

Reactivo de coloración: Potasioferricianuro.

Ubicación de Fe: R_f 0,85.

(La figura muestra sólo una parte del cromatograma).

La diferencia visible en el cromatograma no es tan grande como se supone observando las hojas amarillentas. Algunas veces el Fe se presenta en cantidades convenientes, pero no fisiológicamente activo. Por ejemplo un contenido alto en fósforo puede precipitar el Fe de las hojas e inactivarlo. También se sabe, que el hierro soluble en ácido puede reflejar mejor la relación con la deficiencia que el contenido absoluto.

Para comprobar el resultado obtenido por el cromatograma con otro método cuantitativo, conviene aplicar la complexometría. La titulación se efectúa con ácido salicílico como indicador y con tiritreplex III (Merck). El hierro en total tiene los valores siguientes:

Hojas sanas : 106 ppm/peso seco

Hojas enfermas: 77 ppm/peso seco

La relación de los valores titulados es aproximadamente 3 a 4, es decir que corresponden estos valores a la impresión visual del cromatograma (fig. 1).

Hojas del manzano

Síntomas visuales de las hojas enfermas: manchas amarillentas despiertas sobre la lámina.

Un elemento menor, con importancia en los procesos fisiológicos, es el manganeso. Separado de la ceniza con precipitación de thioacetamida junto con el hierro, surge el problema de separarlos. En la figura 2 se ven las manchas pulverizadas con difenilcarbazona. Las partes superiores aparecen de color rojomoreno y corresponden al hierro, las partes inferiores son rojoazul y corresponden al manganeso. Sin embargo sería lo mejor separar las manchas cruzadas e identificarlas por sí solas, o tomar un reactivo de coloración especial para un metal. La próxima figura 3 muestra los mismos extractos pulverizados con potasioferricianuro para hacer visible solamente el hierro.

En la figura 2 se ve que la mancha menor sube más que la otra. En general la cantidad de la substancia influye en el valor R_f. También puede intervenir la textura del papel.

La diferencia de Fe entre las hojas sanas y enfermas es bien visible y también es evidente al observar las manchas amarillentas de las hojas dañadas. La falta de la clorofila se relaciona muchas veces con un nivel bajo del hierro.

Para separar el Mn definitivamente del Fe e identificarlo, conviene aplicar la cromatografía de capa fina (fig. 4).

La figura 4 muestra que el Fe se separa del Mn mediante un mayor valor R_f. El contenido del manganeso en las hojas sanas y enfermas es más o menos igual. Cuando hay interés para fijar no sólo los valores relativos sino también los valores absolutos se aplica a

Fig. 4. Cromatograma de capa fina (silicagela H) mostrando las manchas de Fe y de Mn de las hojas enfermas (izquierda) y sanas (derecha).

Solvente: Etanol/ácido acético = 100/1 (SEILER, 1962).
 Reactivo de coloración: Difenilcarbazida y amoniaco.
 Ubicación de Fe: 0,95.
 Ubicación de Mn: 0,6.
 (La fig. 4 muestra sólo una parte del cromatograma).

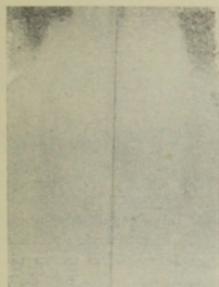


Fig. 5. (Negativo de una UV-fotocopia). Cromatograma del papel mostrando las manchas de calcio (R_f 0,8) cruzando las de magnesio (R_f 0,63).

Solvente: Metanol/HCl/H₂O = 8/1/1.

Reactivo de coloración: 8-hidroxiquinolina y amoniaco, UV-fotocopia.

(La figura muestra sólo la parte superior del cromatograma).



Fig. 6. Cromatograma de papel mostrando manchas de magnesio (R_f 0,14) y más arriba de sodio (R_f 0,57) de las hojas sanas (derecha) y enfermas (izquierda).

Solvente: Acetona/HCl/H₂O = 8/1/1 (MERCK).

Reactivo de coloración: difenilcarbazida y amoniaco.

(La figura 6 muestra sólo una parte del cromatograma).



la capa fina en forma de test varias cantidades de las sustancias correspondientes para efectuar una comparación visual de la cantidad del extracto natural. La exactitud es más o menos 20%. (La silicagela misma contiene Fe y hay que lavarlo para determinar el hierro de la muestra).

Los síntomas visuales de estas hojas investigadas no son bien claros sino parecidos a las deficiencias del magnesio o calcio. Se encontraron las hojas enfermas en las partes inferiores y superiores de las ramillas, lo que indica que existen por lo menos las dos posibilidades. Por este motivo se hizo un análisis para varios elementos (tab. 1).

Tab. 1: Valores de varios elementos de las hojas del manzano (% de peso seco). Valores obtenidos de 4 repeticiones; determ. de K. con fotospectrómetro de llama, 2 veces.

Elemento	Ca	Mg	Fe	K ₂ O	N
H. enferma	0,54	0,19	0,008	1,6	2,4
H. sana	0,55	0,17	0,017	1,8	3,3

En comparación con resultados de otros países el nivel de calcio y también de magnesio es bajo en las hojas sanas y enfermas. Es posible que en las hojas "sanas" el alto nivel de nitrógeno oculte la falta de cationes.

Hojas del limonero

Hojas enfermas de los limoneros con síntomas visuales de la enfermedad: borde amarillo de la hoja.

En el cromatograma (fig. 5) se aprecian las manchas de calcio y magnesio. Se alcanzó en este caso la separación sin partir la ceniza en varios grupos. La identificación de calcio y magnesio se realizó con 8-hidroxiquinolina y amoniaco. Las manchas aparecen con luz ultravioleta en color amarillo y amarilloverde. Las hojas sanas tienen más calcio y magnesio (derecho) en comparación a las hojas enfermas (izquierda).

La complexometría sirve para los valores absolutos. Antes de la titulación se debe separar el calcio y también el magnesio de los otros cationes según SEILER (1962), y la titulación misma se efectúa con Titrplex III e incluso con tabletas tampón indicadoras.

Tab. 2: Valores de los cationes y N de las hojas de los limoneros en % de peso seco (medidas de 4 repeticiones).

Cation/N	Ca	Mg	N
H. sanas	3,2	0,74	2,6
H. enfermas	2,3	0,42	2,2

Comparando estos valores con resultados de CHAPMAN (1960) de California, se puede concluir, que el contenido de calcio de las hojas enfermas (2,3%) sig-

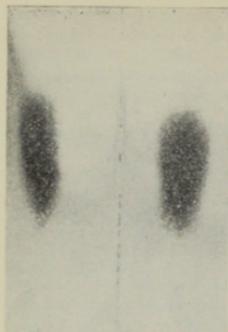


Fig. 7. Cromatograma de capa fina mostrando manchas de calcio de las hojas sanas (derecha) y enfermas (izquierda).
Solvente: Etanol/ácido acético = 100/1.
Reactivo de coloración: 8-hidroquinolina y amoníaco, UV-fotocopia.
Ubicación del calcio: R_f 0,6.
(La figura muestra sólo una parte del cromatograma).

nifica un nivel bajo. El magnesio indica un nivel medio para las hojas enfermas y alto para las sanas. Los valores de nitrógeno son normales.

Otras hojas enfermas del limonero con manchas amarillas en la lámina como síntomas visuales, muestran, comparándolas con hojas sanas, también un contenido menor de magnesio (fig. 6).

En suelos con poca materia orgánica, hay pérdidas de magnesio por las lluvias y el agua de riego. También tiene influencia al magnesio aprovechable la cantidad de calcio en el suelo. Por eso conviene determinar el calcio de las hojas.

Se ve que la cantidad del calcio también es menor en las hojas enfermas. Por eso no existe una competencia entre los dos cationes. Hay que examinar el valor pH del suelo para revelar si los iones H actúan como competidores del Mg y Ca. En este caso también es necesario determinar los valores absolutos y además compararlos con las manchas del cromatograma.

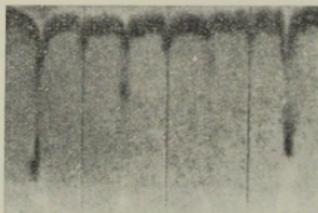


Fig. 8. Cromatograma de capa delgada con manchas de K; de izquierda a derecha: de hojas de las figuras 6 y 5, tests para niveles deficientes y bajos, según Chapman (1960).
Solvente: Etanol/ácido acético = 100/1.
Reactivo de coloración: Ácido viológico.
Ubicación de K: El valor R_f sube con menor cantidad de la substancia de 0,2 hasta 0,8.
(La figura 8 muestra todo el cromatograma desde los puntos de la salida hasta la negra fachada del solvente)

Tab. 3: Valores de cationes y nitrógeno de las hojas del limonero. (% de peso seco, medida realizada para los cationes 4 veces, para N, 2 veces).

Cation/N	Ca	Mg	N
H. sanas	3,2	0,74	2,6
H. enfermas	1,9	0,17	2,0

Los valores de la tabla 3 corresponden aproximadamente a los cromatogramas. En comparación a los valores que da CHAPMAN (1960) el contenido de calcio es en un nivel deficiente y el de magnesio en un nivel bajo. Podría ser en este caso, que exista una deficiencia real de Ca y Mg. Además el potasio, cuando será presente en cantidades altas, podría desplazar los otros cationes.

Una plancha de silicagela H (tomado 20 x 20 cm) sirve para comparar los contenidos de K de las hojas limoneras con substancias de test.

El cromatograma revela, que las hojas de la figura 6 tienen un nivel bajo de potasio y las de la figura 5 un nivel entre deficiente y bajo. Lo último corresponde con los síntomas visuales, a saber, borde oscuro de las hojas.

El potasio juega un papel importante en la regulación de la transpiración como en el metabolismo de ácidos orgánicos y azúcares. Bajo este aspecto valdría la pena que los fruticultores se preocupen sobre el abono de K, ante todo respecto a la calidad de las frutas.

Resumen

Estos ejemplos ya bastan para demostrar, que con los métodos enseñados se pueden investigar las deficiencias en árboles frutales. Con la cromatografía se puede identificar un cation de nivel deficiente cuando en comparación con hojas sanas existe una diferencia por lo menos de 30%.

Como ya se ha dicho, los ejemplos dados significan sólo un paso en el camino para descubrir las causas de una enfermedad y deducir conclusiones convenientes para los fruticultores.

Bibliografía

- CHAPMAN, H. D.: Agr. Publ. 207, Univ. Hall. Berkeley 4, 1960.
GRUPPE, W.: Erwerbsobstbau, 10/11, 2. Jg., 1960.
MERK: Chromatographie, Darmstadt, E. Merck; Komplexeomet. Best. methoden m. Titriplex, E. Merck.
POLLARD, F. H.: u. a.: Nature 163, 292, 1949.
SEILER, H.: Dunnschichtchromatographie, E. STAHL, Springer Verlag, 1962.
SCHWARZENBACH, G.: Die komplexometrische Titration, Verl. F. Enke, Stuttgart, 1960.