

El Manganeso como nutriente del limonero Verna

POR EL
DR. FRANCISCO COSTA YAGÜE

O B J E T O

La extraordinaria importancia económica del cultivo de los citrus en la provincia de Murcia, particularmente del limonero, merece que sean intensificados los estudios conducentes a su mejora. El principal factor limitante de la producción citrícola murciana es el desequilibrio nutritivo en que se desenvuelven estas especies, motivado por algunas características de sus suelos y por la falta de fertilización adecuada.

El manganeso es uno de los micronutrientes escasos en los huertos de la zona. Al estudio de su deficiencia en el limonero Verna, así como de la importancia que dicho elemento tiene en el desarrollo conveniente de esta planta, hemos dedicado varios años de labor, cuyos resultados más interesantes constituyen la presente Memoria.



ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Entre los primeros investigadores que estudiaron el efecto del manganeso sobre el desarrollo vegetal, figuran LOEW (1), BERTRAND (2) y en especial MAZÉ (3), que realizó experiencias con maíz en cultivos hidropónicos.

Posteriormente, SJOLLEMA y HUDIG (4), apreciaron en el Norte de Holanda que las plantas de avena, desarrolladas en suelos turbosos, neutralizados o alcalinizados por aplicaciones de cal, padecían una enfermedad hasta entonces desconocida, que podía curarse con la adición de sulfato de manganeso.

HILTER (5), demostró que el moteado gris de la avena, llamado así por CLAUSEN (6), no era privativo de dicha especie, ni de los suelos alcalinos, sino que también podía manifestarse en condiciones ácidas de éstos y en otras plantas, comprobando además que, en ambos casos, la adición de compuestos de manganeso curaba la enfermedad.

Sin embargo, hasta SAMUEL y PIPER (7), no se estableció de modo riguroso la esenciabilidad del manganeso como micronutriente del Reino Vegetal. Sus trabajos pusieron claramente de manifiesto que el moteado gris se debe a una deficiencia de aquel elemento, si bien no pudo explicar el hecho de que plantas desarrolladas en suelos con grandes contenidos de manganeso total fueran incapaces de absorber las pequeñas dosis necesarias para su normal crecimiento.

Con respecto a los Citrus, se debe a HAAS (8), probablemente, la primera descripción de la deficiencia de manganeso en limonero y naranjo. Posteriormente se ha señalado en Argelia (9), Sicilia (10, 11), California (12, 13, 14), Florida (15), Australia (16, 17), y España (18).

Todos los investigadores están de acuerdo en que las necesidades de este elemento para la vida vegetal y en particular para los Citrus, son muy limitadas; pero que si no se cubren suficientemente, quedan afectados decisivamente el desarrollo y la producción.

PARTE PRIMERA

ESTUDIO DE LA DEFICIENCIA DE MANGANESO

I

SINTOMATOLOGIA Y DIAGNOSTICO

Las propiedades físico-químicas de los suelos de la Región Citrícola Murciana (19), y, además, la considerable actividad vegetativa del limonero Verna, explican su gran tendencia a manifestar alteraciones carenciales.

La deficiencia predominante en dicha variedad, es la clorosis férrica (20). Sin embargo, cuando mejoran las condiciones del suelo, cultivo y fertilización o, bien, cuando se corrige aquélla, aparecen manifestaciones foliares muy generalizadas y descensos en la producción, que presuponen la existencia de perturbaciones en la absorción y metabolismo del manganeso.

Los síntomas observados por nosotros en las hojas son: *presencia de bandas o zonas de color verde claro en el tejido mesofilico, conservando el color verde normal todas las nerviaciones y zonas foliares adyacentes. Las estrechas zonas internerviales llegan a tomar color verde amarillento.*

Si el estado carencial es agudo, la palidez se extiende por casi toda la hoja, pero sin llegar en ningún caso a la ausencia total de clorofila, como ocurre en estados similares de la deficiencia de hierro.

La sintomatología observada y que se muestra en la fotografía n.º 1, coincide con la descrita en la bibliografía.

En los estados iniciales, la deficiencia afecta parcialmente al árbol (fotografía n.º 2), generalizándose cuando el proceso se agrava (fotografía n.º 3).

En nuestras repetidas observaciones sobre árboles afectados, hemos comprobado sistemáticamente que el progreso de la enfermedad trae consigo la disminución de los brotes florales y en consecuencia del fruto, hasta el punto de que, en estados graves, la planta no produce.

También se aprecia defoliación que, si bien no es tan intensa como en otras deficiencias minerales comunica al árbol el aspecto triste característico de las plantas con insuficiente follaje.

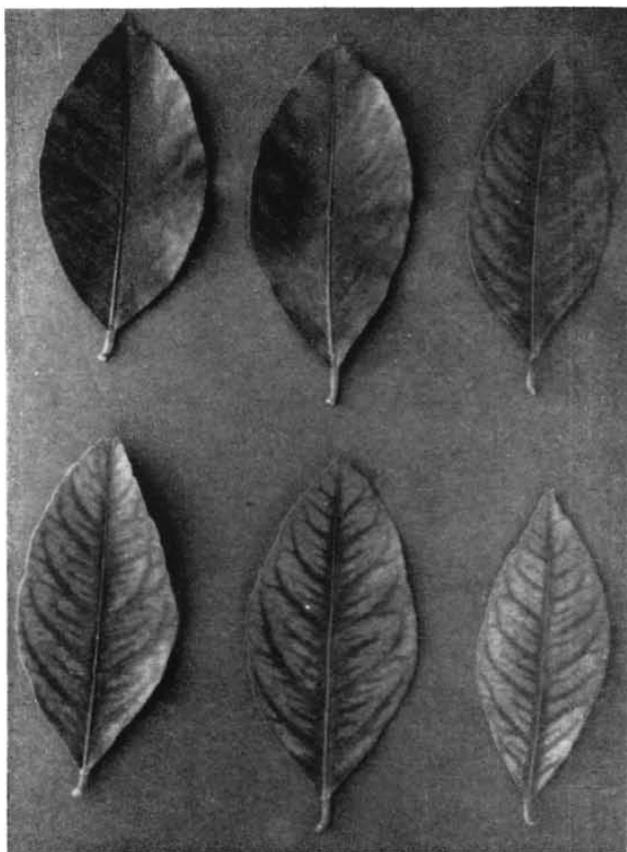
Aunque los caracteres indicados corresponden con toda probabilidad a la deficiencia de manganeso, no hemos dejado de considerar la posibilidad de confusión con las de hierro y cinc, sobre todo en los primeros estados, aunque se ha comprobado frecuentemente que cuando la clorosis férrica se manifiesta no hay indicios de la de manganeso, y a la inversa. Respecto de la de cinc, se confirma que su localización preferente es la zona sur del árbol, al contrario que en el manganeso (18); además, el color amarillo manifiesto de las zonas internerviales y su tendencia a dar hoja pequeña, en el caso de la de cinc, ayudan suficientemente por lo general a establecer de modo inequívoco el tipo de deficiencia.

Independientemente de los reconocimientos visuales ya citados, hemos utilizado para el diagnóstico los procedimientos siguientes:

MÉTODOS DIRECTOS

Incisión foliar (21). Con una cuchilla de afeitar u otro instrumento similar, se practica un corte en la zona intervenal de la hoja, introduciéndose en él un trozo de papel de filtro sumergido por el otro extremo en un pequeño tubo de plástico que contiene la disolución del nutriente a ensayar (fig. 1). Esta fluye por capilaridad hasta la incisión, donde, si la respuesta es positiva, se observa al poco tiempo un reverdecimiento de las zonas cercanas.

Inyección en peciolo (20) y (21). Consiste en adaptar al peciolo de una hoja, a la que previamente se ha quitado el limbo, un tubito de goma unido a un pequeño frasco con la disolución a inyectar, el cual se sujeta verticalmente para que fluya por gravedad (fig. 2). La respuesta es observada en hojas de la misma rama, situadas en posición inferior a la que se ha practicado la inyección. Cuando es afirmativa, se aprecia reverdecimiento en un plazo no superior a diez días.



Fotografía n.º 1



Fotografía n.º 2



Fotografía n.º 3

Inmersión (11) y (20). Se sumerge el extremo de una rama, sin dañarla, en la disolución durante veinticuatro horas (fig. 3). La respuesta suele darse al cabo de ocho días. Aunque en algunos casos pueda aparecer necrosis grave de las hojas sumergidas, no queda por esto anulado el ensayo, pues, si es positivo, se produce rápidamente un brote abundante de hojas normales.

Para la aplicación de estos métodos, se han utilizado disoluciones de los sulfatos manganeso, ferroso y de cinc al 0,025 %, con acidez sulfúrica libre suficiente para evitar la hidrólisis.

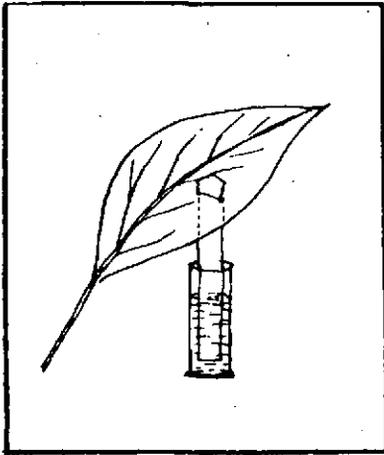


Fig. 1

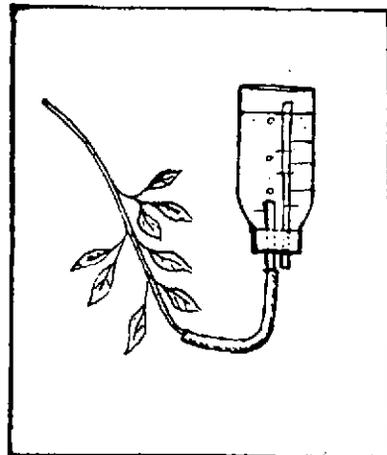


Fig. 2



Fig. 3

MÉTODOS COMPARATIVOS

Examen citológico (22). Partiendo del supuesto de que toda variación química del protoplasma celular de los parenquimas foliares, implica una correlativa modificación morfológica de la arquitectura micro y submicroscópica de los cloroplastidios, es factible comparar el número y volumen de éstos en hojas normales y deficientes. Una vez establecidas las características típicas en cada caso y para cada especie, la determinación de dichos valores en la hoja puede suministrar información sobre el probable estado deficitario.

Análisis químico (23). Por lo general, en el caso de la deficiencia de un determinado nutriente, su contenido en la hoja es inferior al existente en plantaciones normales de la misma especie. Por tanto, el análisis comparativo, puede confirmar la existencia de una alteración carencial.

TABLA I

Número de muestra	Tejido en empalizada					
	N.º de Cloroplastos			Volm. de cloroplastos		
	H.N.	H.D.	Dif.	H.N.	H.D.	Dif.
1	12	6	6	17,10	10,72	6,38
2	7	7	0	16,70	16,10	0,60
3	11	6	5	23,20	12,42	10,78
4	13	8	5	25,33	15,45	9,88
5	13	7	6	20,42	14,83	5,59
6	10	5	5	24,32	17,21	7,11
7	12	7	5	18,47	11,45	7,02
8	11	6	5	19,31	13,34	5,97
9	8	8	0	19,65	21,77	-2,12
10	10	7	3	18,63	14,87	3,76
11	13	8	5	19,42	13,31	6,11
12	9	8	1	21,73	19,43	2,30
13	11	6	5	28,62	12,85	15,77
14	13	5	8	20,31	11,56	8,75
15	12	6	6	17,12	9,67	7,45
16	13	4	9	23,36	15,32	8,04
17	7	8	-1	19,56	20,52	-0,96
18	12	8	4	21,62	14,26	7,36
19	14	6	8	27,36	13,52	13,84
20	12	4	8	19,52	9,86	9,66

TABLA II

Número de muestra	Hojas normales p. p. m. de Mn	Hojas deficientes p. p. m. de Mn	Diferencia
1	15,9	7,8	8,1
2	20,9	9,2	11,7
3	20,2	5,9	14,3
4	22,5	8,4	14,1
5	15,3	3,9	11,4
6	15,8	7,3	8,5
7	14,9	9,4	5,5
8	17,3	7,2	10,1
9	19,3	9,7	9,6
10	14,2	5,8	8,4
11	15,6	4,9	10,7
12	14,3	4,5	9,8
13	16,9	8,6	8,3
14	20,2	7,8	12,4
15	17,6	6,0	11,6
16	15,6	9,3	6,3
17	16,9	8,6	8,3
18	18,6	7,4	11,2
19	17,7	5,4	12,3
20	20,3	6,3	14,0
21	19,4	5,9	13,5
22	17,2	4,7	12,5
23	16,1	6,8	9,3
24	21,3	7,3	14,0
25	23,6	3,4	20,2
26	17,6	6,2	11,4
27	21,4	7,3	14,1
28	15,8	9,3	6,5
29	24,0	4,1	19,9
30	16,4	5,6	10,8
31	19,2	6,5	12,7
32	25,1	6,3	18,8
33	17,7	3,9	13,8
34	16,2	6,3	9,9
35	15,9	5,7	10,2
36	18,4	7,2	11,2
37	20,1	4,3	15,8
38	19,5	5,1	14,4
39	22,7	6,4	16,3
40	14,9	4,8	10,1

TABLA III

Métodos	N.º de ensayos	N.º de respuestas positivas	%
<i>Directos</i>			
Incisión foliar	10	1	10
Inyección en peciolo	10	3	30
Inmersión	40	40	100
<i>Comparativos</i>			
Examen citológico	20	16	80
Examen químico	40	40	100

Los procedimientos de incisión e inyección requieren un manejo muy cuidadoso y, a pesar de ello, fallan numerosos ensayos. Por el contrario, según nuestras experiencias, resulta extraordinariamente útil y aplicable sobre todo el de inmersión para numerosas determinaciones simultáneas, por cuyo motivo es el que más hemos generalizado.

Durante la aplicación de este método, se observa rápida mejoría, siendo frecuente que la zona verde clara de la hoja adquiriera un color normal antes de 15 días. Al mes aproximadamente, aparecen hojas completamente normales y brotes sanos; en numerosos casos se producen brotes florales, aunque no se haya realizado la experiencia en el tiempo más apropiado para tal evolución.

En cuanto a los métodos comparativos, se ha podido apreciar una marcada diferencia en el número y volumen de los cloroplastidios existentes en los parénquimas foliares de hojas de árboles normales y carentes (tabla I). Lo mismo ocurre en el análisis químico, donde, además, hemos encontrado sistemáticamente los valores menores de manganeso en las hojas con síntomas de su deficiencia (tabla II).

Los resultados de los ensayos de diagnóstico, ampliamente extendidos en toda la zona limonera murciana, y que se indican en la tabla III prueban la existencia de una deficiencia de manganeso en las plantaciones de limonero verna de Murcia, particularmente en las establecidas en los términos de Guadalupe y Cabezo de Torres.

II

CAUSAS

Los diversos estados de oxidación en que se encuentra el manganeso del suelo, dotados a su vez de solubilidad diferente, pueden agruparse así:

a) Manganeso divalente: al estado iónico en la disolución del suelo, como compuestos de cambio o en combinaciones complejas no cambiables.

b) Oxidos de manganeso trivalente, muy activos ($Mn_2O_3 \cdot x H_2O$), que son fácilmente reducibles por la hidroquinona a pH 7.

c) Oxidos de pequeña actividad, en los que el manganeso presenta las valencias 2 y 3 (Mn_3O_4).

d) Oxidos de Mn tetraivalentes (MnO_2), relativamente inertes.

El equilibrio entre estas formas vendrá determinado por el estado redox del suelo.

Resulta conveniente, de acuerdo con LEEPER (24, 25), hacer una distinción entre el manganeso «total» y el «asimilable o activo», que es el que tiene auténtico interés desde el punto de vista edafológico. Este comprende al manganeso soluble en agua, al de cambio y al fácilmente reducible.

Los procesos que transfieren el manganeso del suelo a la planta no son suficientemente conocidos; sin embargo, se acepta que lo importante en la práctica consiste en mantener una concentración adecuada de manganeso divalente en el suelo.

Esta varía según las condiciones fisicoquímicas y biológicas del mismo, que vienen influenciadas, principalmente, como es sabido, por la tempe-

ratura, humedad, pH, potencial de oxidación-reducción y contenido de materia orgánica:

La temperatura y humedad del suelo ejercen un efecto considerable sobre el manganeso activo, habiéndose comprobado (26) cómo los descensos de aquélla, acompañados de gran humedad, determinan deficiencias agudas, que disminuyen al modificar ambos factores. La explicación tal vez se encuentre en la sugerencia de FUGIMOTO y SHERMANN (27), según la cual parte del manganeso existe bajo la forma del complejo $(\text{MnO})_x \cdot (\text{MnO}_2)_y \cdot (\text{H}_2\text{O})_z$, que se desdobra cuando es eliminada su agua de hidratación por elevación de la temperatura y desecación simultánea.

En la actualidad, se considera el pH como uno de los factores primarios que regulan la accesibilidad del manganeso a las plantas. En efecto, a pH bajos suele haber mayor proporción de manganeso divalente que en los suelos alcalinos, calizos o encalados con exceso, donde aquel pasa a estados de valencia superior, menos asimilables. Esta oxidación, influida de modo más o menos directo por los microorganismos, se efectúa muy rápidamente en los suelos alcalinos.

El Mn^{2+} se oxida con facilidad al ponerse en contacto con el oxígeno del aire o bien con el disuelto en el agua; los productos de oxidación pueden quedar en disolución protegidos por coloides orgánicos, precipitando posteriormente en forma de $\text{Mn}(\text{OH})_2$ y MnO_2 , insoluble. Se comprende el papel importante del potencial redox del suelo en estos procesos oxidativos.

La reducción de los óxidos mangánicos a Mn^{2+} por la materia orgánica es más fácil a pH bajos. No obstante y de modo general, aquélla contribuye a elevar la asimilabilidad del manganeso, aun en condiciones no tan beneficiosas de pH. Así, HURWITZ (28), observó un incremento en el manganeso de cambio después de aportar materiales orgánicos. Y CHRISTENSEN (29) ha demostrado que la adición de éstos a suelos calizos eleva de 6 a 13 veces la concentración de Mn^{2+} en la disolución del suelo, si bien el efecto se limita al período de descomposición de dichos materiales, pues transcurridos éste se restablece el bajo nivel primitivo.

ESTUDIO FÍSICO - QUÍMICO DEL SUELO

El análisis de las causas posibles de la deficiencia de manganeso observada se ha realizado con particular intensidad en los suelos de la zona experimental del término de Guadalupe.

CARACTERES Y TIPOLOGIA.

Los suelos ocupados por las plantaciones cítricas estudiadas son coluviales, pedregosos, con gran abundancia, en general, de grava constituida por silicato del período pérmico, depositados como detritus en terrenos clasificados como miocénicos. Abundan en ellos, asimismo, las fracciones de arenas gruesa y fina; de menor contenido en limo y arcilla, siendo de textura general «arenosa» y excelente permeabilidad, con un primer nivel freático inferior a los 10 metros. Desde este punto de vista son, pues, excelentes para el desarrollo de los citrus en especial del limonero.

Antes de la roturación y cultivo, estos suelos eran de tipo de estepa parda (Burosem, con vegetación xerofítica abundando las labiadas y compuestas, encontrándose especies de halófilas en algunas áreas, como se comprueba en terrenos vírgenes colindantes.

De acuerdo con el material geológico originario, constituido por lajas permianas silíceas violáceas y cantos cuarzosos, cuya riqueza en carbonatos es muy baja, el contenido medio en caliza en estos suelos, no es demasiado elevado, oscilando entre 25 y 30 %, si bien en algunos puntos alcanza valores más altos llegando hasta un 50 %, debido al lavado de los silicatos de calcio, que origina capas cementadas calcáreas.

En el análisis de los perfiles efectuados se observa que el contenido en carbonato cálcico, disminuye progresivamente, al descender, desde el horizonte superior.

Como perfil más representativo de la zona en estudio, podemos considerar el siguiente:

P E R F I L

Situación.—Guadalupe.

Geología.—Pleistoceno.

Topografía.—Ligeramente inclinado (2 %).

Altitud.—50 metros.

Drenaje.—Externo e interno, muy bueno.

Tipo de suelo.—En su modo original, estepa parda (Burosem).

DESCRIPCIÓN

Profundidad en cm.	Horizontes	Observaciones
0-30	(A)	Color, pardo claro 7,5 YR 6/4 Munsell. Textura arenosa. Estructura granular. Buena permeabilidad y penetración de raíces. Pequeño contenido de materia orgánica.
30-80	(B ₁)	Color rosa, 5 YR 7/4 M. Textura areno-limosa. Estructura en bloques sub-angulares. Buena permeabilidad.
80-110	(B ₂)	Color rosa, 5 YR 7/4 M., Textura arenosa. Estructura granular y muy buena permeabilidad.

ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO DEL PERFIL

TABLA IV

Profundidad de la muestra	Grava %	Tierra %	A. gruesa %	A. fina %	Limo %	Arcilla %	Textura
0 - 30 cm	28,7	71,5	22,3	22,6	21,9	3,4	Arenosa
30 - 80 »	32,1	67,9	23,9	17,9	16,9	8,5	»
80 - 110 »	84,6	15,4	9,1	2,2	2,5	1,4	»

TABLA IV (a)

Profundidad de la muestra	Salinidad m/mhos/cm.	C. cambio meq/100	CO ₂ Ca %		pH H ₂ O	KCl
			Total	Activo		
0 - 30 cm.	0,301	12,51	16,6	8,9	7,80	7,45
30 - 80 »	0,284	15,30	11,8	8,1	7,75	7,50
80 - 110 »	0,295	3,85	1,8	1,7	7,60	7,35

TABLA IV (b)

Profundidad de la muestra	Carbono %	M. Orgánica %	Nitrógeno %	C/N	Fósforo p.p.m.	Potasio p.p.m.
0 - 30 cm.	0,74	1,27	0,084	8,7	4,3	218
30 - 80 »	0,30	0,53	0,044	6,9	2,7	132
80 - 110 »	0,06	0,11	0,006	10,5	0,6	26

TABLA IV (c)

Profundidad de la muestra	Calcio p.p.m.	Magnesio p.p.m.	Sodio p.p.m.	Cloruros p.p.m.	Sulfatos p.p.m.
0 - 30 cm.	5.043	321	82	121	indicios
30 - 80 »	4.571	264	68	115	»
80 - 110 »	879	30	14	20	»

TABLA IV (d)

Profundidad de la muestra	M A N G A N E S O p.p.m.			Total
	Cambio	F. reducible	Inactivo	
0 - 30 cm.	1	16	257	274
30 - 80 »	0	13	191	204
80 - 110 »	0	3	64	67

FERTILIDAD

En la tabla V se indican los datos obtenidos para un grupo de muestras de la zona.



TABLA V

Número Muestra	Grava %	Tierra %	A gruesa %	A. fina %	Limo %	Arcilla %	Textura
1	33,34	66,66	15,73	27,60	14,66	7,17	Arenosa
2	26,67	73,33	23,03	30,10	13,05	5,01	»
3	14,29	85,71	18,00	44,10	16,45	4,97	»
4	21,48	78,52	14,84	26,89	17,93	16,86	Are./Arcell.
5	9,84	90,16	11,45	47,63	18,08	19,73	»
6	0,00	100,00	24,90	45,91	13,09	15,05	»
7	34,43	65,57	18,29	19,44	11,86	14,53	Arenosa
8	54,60	45,40	23,24	7,85	6,22	7,01	»
9	55,77	44,23	21,67	8,49	6,17	6,97	»
10	34,15	65,85	17,31	19,94	12,99	14,29	»
11	29,63	70,37	15,76	21,75	15,24	15,72	Are./Arc.
12	19,30	80,70	17,51	23,35	19,43	18,02	»
13	41,60	58,40	24,60	17,03	11,19	10,95	Arenosa
14	27,90	72,10	16,50	32,70	14,80	6,80	»
15	22,50	77,50	18,30	25,70	15,60	15,60	Are./Arcell.
16	25,00	75,00	21,60	27,30	16,30	7,60	Arenosa

TABLA V (a)

Muestra número	Salinidad mlmhos, cm	C. cambio meq/100	CO ₂ Ca %		H ₂ O	pH	KCl
			Total	Activo			
1	0,300	5,90	20,0	9,9	8,00	7,40	7,40
2	0,310	6,00	16,1	5,0	7,90	7,40	7,40
3	0,691	9,70	21,0	6,7	7,7z	7,40	7,40
4	0,601	11,00	23,9	12,4	7,80	7,50	7,50
5	0,921	12,00	26,6	9,6	7,80	7,50	7,50
6	0,628	12,70	23,3	7,5	7,90	7,50	7,50
7	0,354	8,30	24,3	11,1	7,95	7,55	7,55
8	0,364	4,60	19,7	5,7	8,00	7,30	7,30
9	0,406	4,80	16,6	8,6	8,00	7,30	7,30
10	0,300	9,20	18,1	7,1	8,10	7,40	7,40
11	0,513	9,80	23,9	11,1	7,70	7,45	7,45
12	0,602	12,30	22,2	10,3	7,75	7,35	7,35
13	0,539	13,41	20,4	7,6	7,75	7,50	7,50
14	0,199	12,61	37,8	13,6	7,80	7,40	7,40
15	0,611	11,62	30,2	10,8	7,60	7,45	7,45
16	0,567	13,12	21,7	8,5	7,55	7,35	7,35

TABLA V (b)

Muestra número	Carbono %	M. Orgánica %	Nitrógeno %	C/N	Fósforo p. p. m.	Potasio p. p. m.
1	0,88	1,49	0,084	10,3	3	266
2	1,26	1,17	0,085	14,8	5	211
3	1,29	2,22	0,124	10,4	10	414
4	1,15	1,98	0,131	8,7	9	282
5	1,32	2,27	0,124	10,6	11	328
6	0,73	1,25	0,039	18,7	11	344
7	0,84	1,43	0,076	10,9	3	242
8	0,61	1,05	0,064	9,5	3	230
9	0,54	0,91	0,055	9,6	5	211
10	0,75	1,29	0,068	11,0	2	321
11	1,10	1,89	0,113	9,7	5	297
12	1,39	2,37	0,163	8,4	5	297
13	0,90	1,43	0,009	10,0	2	195
14	0,64	1,11	0,054	11,8	3	85
15	1,25	2,16	0,108	11,6	9	339
16	1,21	2,09	0,106	11,4	3	205

TABLA V (c)

Muestra Número	Calcio p.p.m.	Magnesio p.p.m.	Sodio p.p.m.	Cloruros p.p.m.	Sulfatos p.p.m.
1	4.859	426	75	65	indicios
2	4.927	469	73	53	»
3	6.531	505	118	116	»
4	5.983	384	106	113	»
5	6.798	622	532	308	»
6	6.720	790	200	252	»
7	4.511	321	85	53	»
8	3.123	290	52	53	»
9	3.007	238	44	44	»
10	4.569	454	72	53	»
11	5.419	555	81	120	»
12	5.229	556	121	161	»
13	4.043	301	168	166	»
14	4.334	175	53	61	»
15	5.590	377	139	164	»
16	5.110	438	145	191	»

TABLA V (d)

Muestra Número	M A N G A N E S O p. p. m.			Total
	Cambio	F. reducible	Inactivo	
1	1	23	165	189
2	0	24	157	181
3	1	36	216	253
4	1	25	150	176
5	1	36	197	234
6	1	33	190	324
7	0	12	158	178
8	0	1	79	80
9	0	1	82	83
10	1	27	166	194
11	0	10	173	183
12	1	36	172	209
13	0	14	154	168
14	0	11	200	211
15	1	33	180	214
16	1	30	214	245

Los hechos más importantes, relacionados con la deficiencia que nos ocupa, y que se aprecia en el estudio físico-químico descrito son:

Contenido de caliza relativamente elevado.

pH alto.

Valores prácticamente nulos para el manganeso de cambio y pequeños, respecto del total, para el manganeso fácilmente reducible.

El estudio de las correlaciones entre los diversos datos analíticos obtenidos conduce a los resultados siguientes:

Manganeso total y fácilmente reducible. Los valores obtenidos para la F de SNEDECOR y los coeficientes de regresión (b) y de correlación (r), se indican en la tabla VI y la ecuación de regresión en la figura 4. Puede apreciarse una correlación particularmente significativa, muy superior incluso para niveles del 0,1 %. Estos hechos subrayan los criterios ya mencionados de la influencia positiva de los aportes de manganeso al suelo y confirman la posibilidad, en el caso estudiado, de utilizar este sistema como método curativo de las deficiencias en este nutriente.

Manganeso fácilmente reducible y materia orgánica. Encontramos también correlación, si bien la significación no llega al 0,1 %. Esto pone de manifiesto que los aportes de materia orgánica aumentan la fracción activa de manganeso en el suelo pero no en tal magnitud que pueda considerarse como absoluta tal influencia.

Manganeso inactivo con carbonato cálcico total. Los valores para F y r demuestran la existencia de correlación sólo significativa para niveles del 10 %. Es evidente, pues, que la caliza perturba la asimilabilidad del manganeso; pero no en intensidad extraordinaria, por lo menos en las condiciones de estos suelos y con los contenidos no excesivamente altos que hemos apreciado.

Manganeso inactivo con arena fina y limo. En ambos casos, encontramos una correlación notable superior al 0,1 %. Ello demuestra que la mayor parte del manganeso inactivo se encuentra en estos suelos en agregados relativamente gruesos.

TABLA VI

<i>Regresión y correlación</i>	<i>F</i>	<i>b</i>	<i>r</i>
Del Mn. f. reducible con M. Orgánica . . .	16,5	18,22	0,7362
» » » » Mn. total . . .	34,0	0,21	0,8416
» Mn. inactivo con CO ₂ Ca total . . .	3,8	3,36	0,4624
» » » » arena fina . . .	23,5	2,64	0,7920
» » » » limo . . .	24,4	8,29	0,7970

VALORES TABULADOS PARA 14 GRADOS DE LIBERTAD

	N I V E L E S			
	10 %	5 %	1 %	0,1 %
F	3,10	4,60	8,86	17,14
r	0,4259	0,4973	0,6226	0,7420

REGRESION Y CORRELACION ENTRE MANGANESO TOTAL
Y MANGANESO FACILMENTE REDUCIBLE

	<i>Mn total</i>	<i>Mn. f. reducible</i>		
	189 p.p.m.	23 p.p.m.		
	181 »	24 »		
	253 »	36 »		
	176 »	25 »		
	234 »	36 »		
	224 »	33 »		
	170 »	12 »		
	80 »	1 »		
	83 »	1 Q		
	194 »	27 »		
	183 »	10 »		
	209 »	36 »		
	168 »	14 »		
	211 »	11 »		
	213 »	33 »		
	244 »	30 »		
	S.S.	G.L.	V.	F.
REGRESION	1589	1	1589	34
ERROR	655	14	46,7	
TOTAL	2244	15		

b = 0,21 r = 0,8416

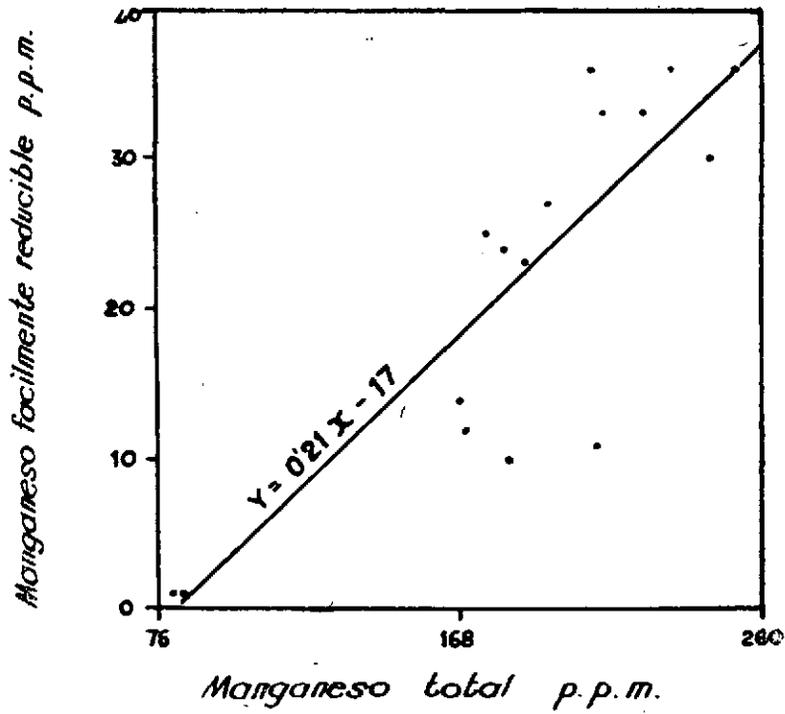


Fig. 4

REGRESION Y CORRELACION ENTRE MATERIA ORGANICA
Y MANGANESO FACILMENTE REDUCIBLE

	<i>M. orgánica</i>	<i>Mn. f. reducible</i>		
	1,49 %	23 p.p.m.		
	2,17 »	24 »		
	2,22 »	36 »		
	1,98 »	25 »		
	2,27 »	36 »		
	1,25 »	33 »		
	1,43 »	12 »		
	1,05 »	1 »		
	0,91 »	1 »		
	1,29 »	27 »		
	1,89 »	10 »		
	2,37 »	36 »		
	1,43 »	14 »		
	1,11 »	11 »		
	2,16 »	33 »		
	2,09 »	30 »		
			S.S.	G.L.
REGRESION			1215,5	1
ERROR			1028,5	14
TOTAL			2244,0	15
			V.	F.
			1215,5	16,5
			73,4	

$$b = 18,22$$

$$r = 0,7362$$

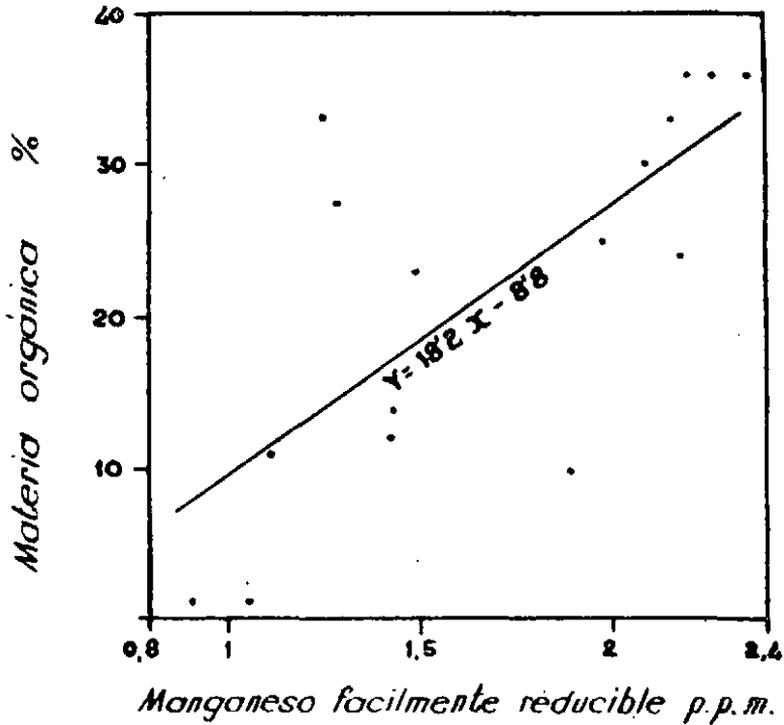


Fig. 5

REGRESION Y CORRELACION ENTRE CARBONATO CALCICO
TOTAL Y MANGANESO INACTIVO

	<i>CO₃Ca total</i>	<i>Mn inactivo</i>		
	20,0 %	165 p.p.m.		
	16,1 »	157 »		
	21,0 »	216 »		
	23,9 »	150 »		
	26,6 »	197 »		
	23,3 »	190 »		
	24,3 »	158 »		
	19,7 »	79 »		
	16,6 »	82 »		
	18,1 »	166 »		
	23,9 »	173 »		
	22,2 »	172 »		
	20,4 »	154 »		
	37,8 »	200 »		
	30,3 »	180 »		
	21,7 »	214 »		
	S.S.	G.L.	V.	F.
REGRESION	4907,36	1	4907,36	3,80
ERROR	18041,64	14	1288,64	
TOTAL	22949	15		

$$b = 3,36$$

$$r = 0,4624$$

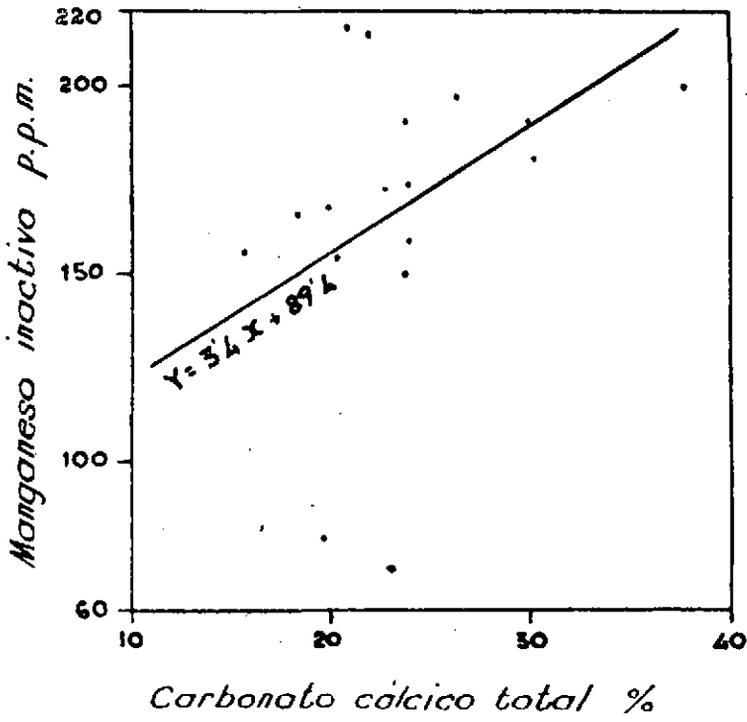


Fig. 6

REGRESION Y CORRELACION ENTRE ARENA FINA
Y MANGANESO INACTIVO

	<i>Arena fina</i>	<i>Mn. inactivo</i>		
	27,60 %	165 p.p.m.		
	30,10 »	157 »		
	44,10 »	216 »		
	26,89 »	150 »		
	47,63 »	197 »		
	45,91 »	190 »		
	19,44 »	158 »		
	7,85 »	79 »		
	8,49 »	82 »		
	19,94 »	166 »		
	21,75 »	173 »		
	23,35 »	172 »		
	17,30 »	154 »		
	32,70 »	200 »		
	25,70 »	180 »		
	27,30 »	214 »		
	S.S.	G.L.	V.	F.
REGRESION	14394,9	1	14394,9	23,5
ERROR	8554,1	14	611	
TOTAL	22949,0	15		
$b = 2,64$ $r = 0,7920$				

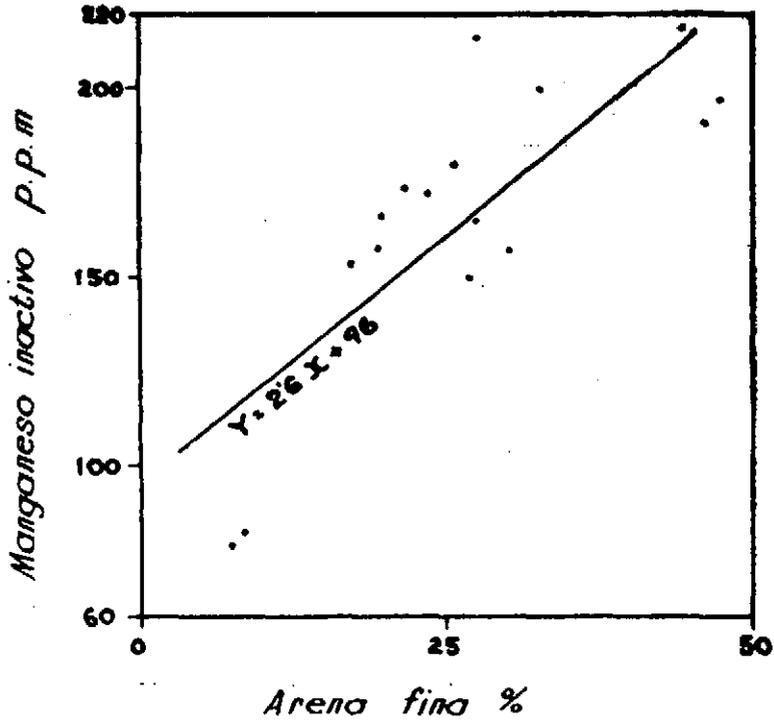


Fig. 7

REGRESION Y CORRELACION ENTRE LIMO Y MANGANESO
INACTIVO

	<i>Limo</i>	<i>Mn. inactivo</i>		
	14,66 %	165 p.p.m.		
	13,05 »	157 »		
	16,45 »	216 »		
	17,93 »	150 »		
	18,08 »	197 »		
	13,09 »	190 »		
	11,86 »	158 »		
	6,22 »	79 »		
	6,17 »	82 »		
	12,99 »	166 »		
	15,24 »	173 »		
	19,43 »	172 »		
	11,19 »	154 »		
	14,80 »	200 »		
	15,60 »	180 »		
	16,30 »	214 »		
			S.S.	G.L.
REGRESION			14595,9	1
ERROR			8353,1	14
TOTAL			22949,0	15
b = 8,29				r = 0,7970
			V.	F
			14595,9	24,4
			596,6	

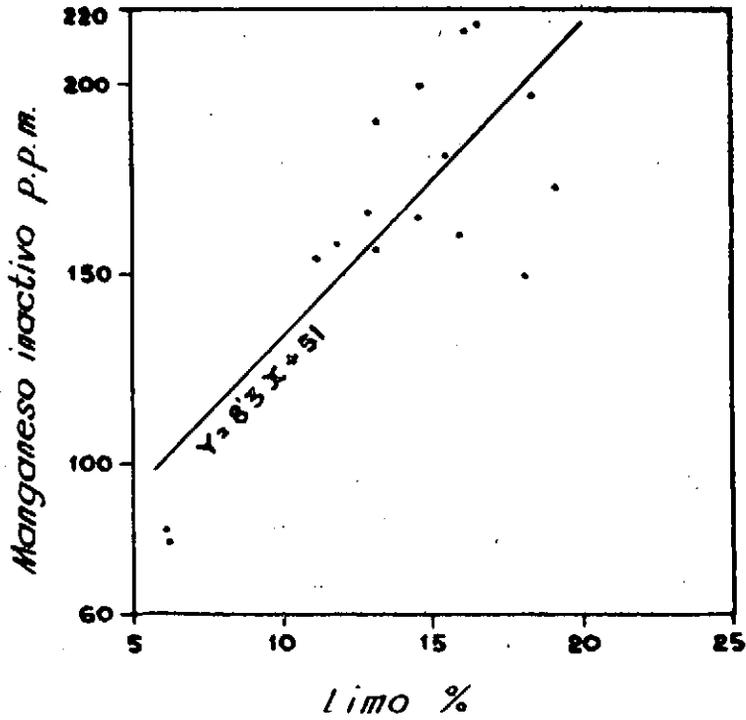


Fig. 8



El examen comparativo de nuestros resultados y de las observaciones de otros investigadores, consignadas en los antecedentes de este estudio, permite deducir las consecuencias siguientes:

La deficiencia observada no es achacable a carencia total de manganeso en los suelos estudiados, pues los valores del manganeso total son suficientes.

El contenido de materia orgánica de los suelos estudiados no es capaz de influir positivamente sobre el manganeso de cambio.

Los valores altos de pH, originados por los contenidos elevados de caliza, disminuyen la asimilabilidad del manganeso.

ESTUDIO BIOLÓGICO DEL SUELO

Aunque como ya hemos dicho, se considera el pH como uno de los factores fundamentales que gobiernan la accesibilidad del manganeso en las plantas, es también cierto que las condiciones de pH y caliza de los suelos estudiados por nosotros no son tan excesivamente desfavorables como para hacerlas responsables exclusivamente de la deficiencia de manganeso observada; y lo prueba, además la correlación no muy alta apreciada entre manganeso inactivo y carbonato cálcico.

En nuestro deseo de encontrar todas las causas posibles de la alteración carencial descrita, hemos tenido en cuenta las observaciones realizadas por otros investigadores referentes al importante papel que los microorganismos ejercen en el proceso oxidativo, que inmoviliza el manganeso de los suelos. Por ello, nos dispusimos a iniciar, en la medida de nuestras posibilidades, el estudio de las características microbianas de los suelos donde habíamos reconocido dicha deficiencia de manganeso.

La mayor parte de la investigación sobre la influencia microbiana en el manganeso del suelo, se ha orientado principalmente al estudio de los procesos de oxidación y reducción biológicas de dicho nutriente. En efecto, las primeras experiencias de laboratorio en este sentido se deben a BEIJERINCK (30), quien demostró que el *Bacillus manganica* y el hongo *Papulospora manganica*, son capaces de oxidar compuestos manganosos tales como el lactato y el carbonato.

Posteriormente, SÖHNGEN (31), ha realizado una aportación muy estimable a este problema, demostrando que una gran variedad de microorganismo, entre los que figuran *Pseudomonas fluorescens*, *Azotobacter choroococcum*, *Escherichia coli*, *Oidium lactis* y diferentes especies de *Saccharomyces*, son capaces de transformar compuestos manganosos solubles en óxidos mangánicos de color pardo.

Por último, TIMONIN (32), ha aislado cuatro especies de hongos que

oxidan al manganeso, siendo identificadas como *Curvularia brachyspora*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inoequalis* y *Periconia circinata*.

Análisis microbiológicos. Ha sido practicado en dos suelos de contenido nulo en manganeso divalente, cuyas plantaciones de limoneros verna manifestaban en su totalidad la deficiencia. Se dispusieron parcelas bien delimitadas, de tal manera que el estado carencial de los árboles correspondiese precisamente al carácter medio del conjunto de toda la plantación, así como a las características físico-químicas del suelo (tabla VII).

Para dichos análisis se han utilizado muestras medias recientes, procedentes de las tomadas en los distintos puntos de las parcelas, mediante sonda metálica provista de bordes cortantes, y a la misma profundidad (20 centímetros).

TABLA VII
ANÁLISIS DEL SUELO

	M U E S T R A	
	I	II
Grava	26,13 %	19,76 %
A. gruesa	16,80 %	17,40 %
A. fina	21,75 %	24,00 %
Limo	17,30 %	18,70 %
Arcilla	16,12	17,90 %
Ca. cambio. meq/100	10,20	11,90
pH (H ₂ O)	7,45	7,75
pH (ClK)	7,40	7,35
CO ₂ Ca total	24,00 %	21,90 %
CO ₂ Ca activo	11,10 %	10,20 %
Mat. Org.	1,90 %	2,15 %
C/N	10,00	8,30
N	0,110%	0,150%
P. p.p.m.	5	5
K, p.p.m.	300	297
Ca, p.p.m	5,378	5,194
Mg, p.p.m	546	558
Mn de camb., p.p.m.	0	1
Mn f. rede, p.p.m.	11	30
Mn inct. ^o , p.p.m.	169	169
Mn total, p.p.m.	180	200

Previamente, efectuamos con una espátula la limpieza de los restos vegetales sin descomponer que cubrían la superficie en donde se iba a realizar la toma. Los instrumentos y el material de vidrio fueron esterilizados.

Se ensayaron los medios de cultivo de FISCHER (33), FEHÉR (34), WAKSMAN (35) y CZAPEK (36), eligiendo estos dos últimos, específicos para bacterias y hongos respectivamente, porque —aplicando el método en la placa de PETRI—, permitieron desarrollar el mayor número de especies y proporcionaron valores más concordantes en los recuentos.

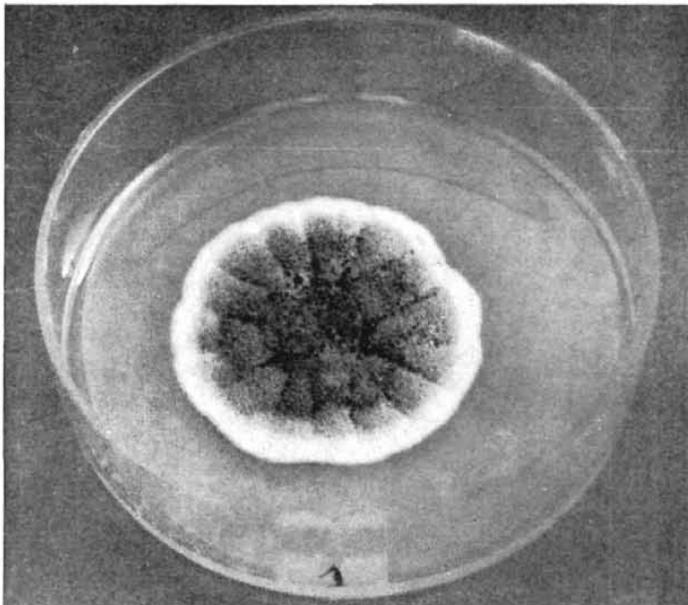
Las pesadas de las muestras medias de suelo se hicieron en condiciones asépticas y fueron mezcladas con el volumen preciso de agua esterilizada para conseguir de cada una seis diluciones, de tal manera que cada centímetro cúbico correspondiese respectivamente a 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000, 1/1000.000 gramos de suelo, agitando al principio durante cinco minutos, para provocar la dispersión uniforme en el seno del agua de las partículas de suelo y la separación de los microorganismos de las mismas. Para cada dilución, empleamos, después de suficiente agitación, una pipeta esterilizada distinta.

En cada placa de PETRI colocamos un mililitro de la dilución correspondiente y diez del medio de cultivo elegido, fundiendo previamente y enfriando hasta 42° C. Las placas una vez sembradas, se incubaron en estufa de cultivo a 30° C. Para la determinación del número de hongos, se contaron las colonias a las 48 y 72 horas y para las bacterias se continuaron los recuentos hasta los doce días. El número de colonias por placa nos dio el de microorganismos en un mililitro de dilución, de cuyo valor se obtiene fácilmente el de microorganismos por gramo de suelo. Los resultados se consignan en la tabla n.º VIII.

TABLA VIII

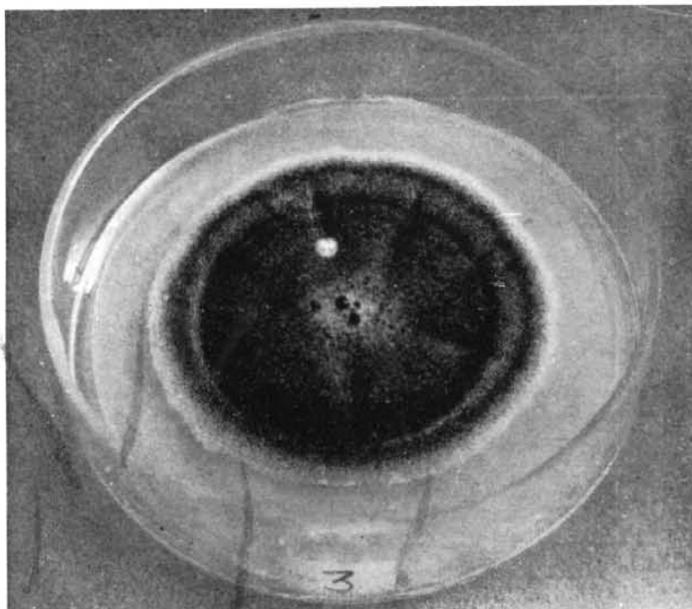
Suelo	Núm. de hongos por gramo de suelo	Núm. de bacterias por gramos de suelo
Muestras medias I	9,600	94,1 × 10 ⁶
Muestras medias II	8,300	77 × 10 ⁶

Identificación de especies. Dada la gran complejidad que encierra todo estudio microbiológico de suelos, en particular por la enorme y diversa población microbiana, decidimos trabajar en primer lugar sobre un grupo de hongos del género *Aspergillus*, predominantes en los cultivos



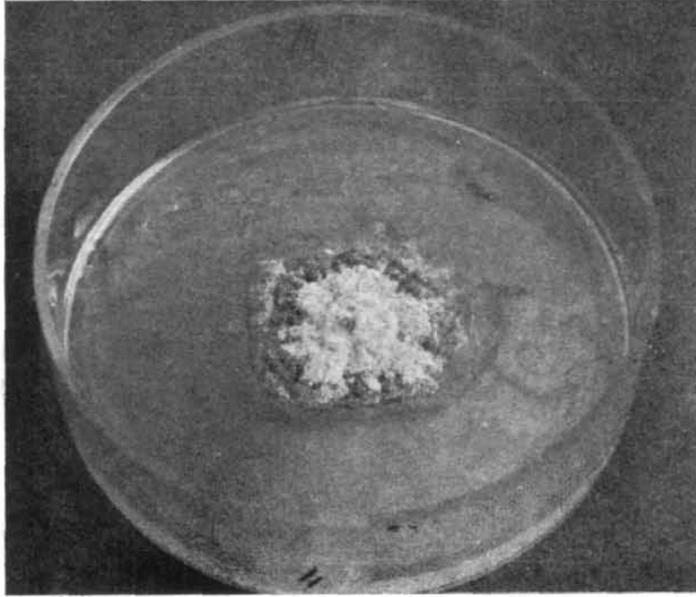
Fotografía n.º 4

Aspergillus versicolor a los 20 días de sembrado en medio Czapek, temperatura de 30° C



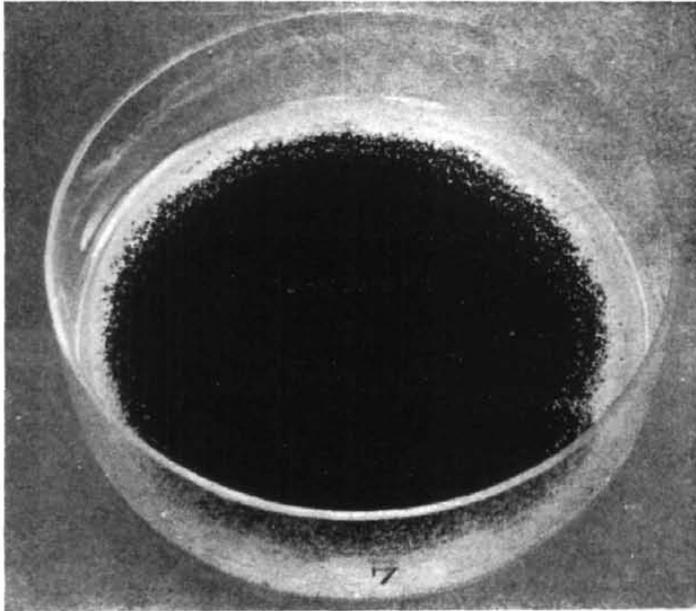
Fotografía n.º 5

Aspergillus awamori a los 20 días de sembrado en medio Czapek, temperatura de 30° C



Fotografía n.º 6

Aspergillus amstelodami a los 20 días de sembrado en medio Czapek, temperatura de 30° C



Fotografía n.º 7

Aspergillus niger a los 10 días de sembrado en medio Czapek, temperatura de 30° C

efectuados. Pudimos aislar e identificar cuatro especies: *A. versicolor*, *A. awamori*, *A. amstelodami* y *A. niger*, cuyas características se indican en la tabla IX.

TABLA IX

Características	<i>A. versicolor</i> μ	<i>A. awamori</i> μ	<i>A. amstelodami</i> μ	<i>A. niger</i> μ
Conidióforo	600 x 5	900 x 10	300 x 7	1.000 x 15
Vesícula	15	35	20	60
Cabezuela	100	160	135	500
Esterigma 1.º	9 x 3	10 x 4	6 x 3	15 x 7
Esterigma 2.º	7 x 2	6 x 2	—	8 x 2,5
Conidio	3	4	4,5	3,5
Aspecto de la colonia	Aterciopelada de color verde claro	Flocosa de color marrón oscuro	Zonada de color verde claro y peritocios amarillos	Uniforme de color negro

Con independencia del criterio general que acabamos de resumir, al principio de este capítulo, juzgamos de marcado interés profundizar más en el conocimiento del metabolismo del manganeso divalente por los microorganismos. Pensamos que aparte de la influencia que los microorganismos del suelo puedan tener en la transformación del manganeso activo en no asimilable, merced a procesos oxidativos, cabe la posibilidad del establecimiento de una competencia entre algunos de aquellos y la planta respecto del manganeso de cambio, competencia que en determinadas circunstancias puede ser desfavorable a ésta, constituyendo otro factor coadyuvante, junto a los ya indicados, en la provocación del estado carencial que estudiamos.

De acuerdo con esta hipótesis, hemos estudiado la influencia de varios niveles de Mn^{2+} sobre el crecimiento y metabolismo del *Aspergillus versicolor*. La elección de este hongo, aislado del suelo que estimamos deficiente en manganeso divalente, fue motivada por su preponderancia sobre los demás.

No pretendemos establecer conclusiones definitivas, pues de sobra sabemos que este tipo de estudios requieren una experiencia larga y continuada. No obstante, creemos que los resultados, que más adelante se exponen, abren posibilidades interesantes para una investigación más completa sobre la competencia planta-microorganismo en la absorción de este nutriente.

En primer lugar tratamos de establecer el medio de cultivo más adecuado para mantener el estado divalente del manganeso. Los resultados más satisfactorios se obtuvieron incorporando glucosa como donador de hidrógeno (37) y ácido cítrico como agente complejante (38). La composición del medio utilizado es la siguiente:

Nitrato sódico	3	grs. por mil
Fosfato bipotásico	1	» » »
Sulfato magnésico	0,5	» » »
Cloruro potásico	0,5	» » »
Sulfato ferroso	0,05	» » »
Peptona	5	» » »
Glucosa	30	» » »
Acido cítrico	2	» » »
<i>Sulfato de manganeso: 0, 10, 25, 40, 55, 70 p.p.m. expresadas en Mn²⁺.</i>		

Se prepararon seis series del medio nutritivo o sustrato, cuyo intervalo en los niveles de manganeso era del orden de 15 p.p.m. con excepción de la segunda (tabla X). Se empleó disolución de sulfato manganeso equivalente a 1.000 mg por litro de Mn²⁺.

TABLA X

Serie	Mls. de disolución de SO ₄ Mn en 200 mls sustrato	p.p.m. de Mn ⁺⁺ encontrado en el sustrato
1. ^a	0,0	0,0
2. ^a	1,4	7,0
3. ^a	5,0	24,5
4. ^a	8,0	39,0
5. ^a	11,0	56,0
6. ^a	14,0	72,0

En cada frasco de Roux, se colocaron 195 mls del medio correspondiente a cada serie, adicionándose como inóculo 5 mls de una suspensión de conidios, procedentes de cepas de diez días de *Aspergillus versicolor*, preparada previamente para que la siembra fuese idéntica en todas las series. Estas fueron colocadas en estufa de cultivo a una temperatura de 23 ± 2° C, observándose a los tres días manifiesta germinación, y a los cuatro formación miceliar con conidióforos. Se efectuaron las recogidas

miceliales para su análisis a los 6,9 y 16 días. Los micelios, después de lavados con agua destilada hasta que ésta no acusó presencia de manganeso, se desecaron a 105° C y pesaron.

Estas series experimentales fueron realizadas por triplicado en condiciones idénticas.

Los valores de la tabla XI corresponde a la media aritmética de los datos obtenidos.

TABLA XI

Substrato: ppm. de Mn	grs. micelio a los 6 días	grs. micelio a los 9 días	grs. micelio a los 16 días
0 (testigos)	1,3088	1,7412	1,5992
7	1,3293	1,8115	1,6549
24	1,3464	1,8240	1,6928
39	1,3586	1,8693	1,7076
56	1,3383	1,8222	1,7364
72	1,2381	1,8056	1,7461

Se pone de manifiesto en ella la influencia de los niveles crecientes del nutriente ensayado, así el peso del micelio del *Aspergillus versicolor* aumenta de forma gradual con la concentración de manganeso en el substrato hasta un nivel de 39 p.p.m., a partir del cual decrece. Un efecto similar se ha podido observar en la fase de pleno desarrollo del hongo, a los 9 días. Por el contrario, en el período de envejecimiento, el peso miceliar aumenta progresivamente con la concentración de manganeso en el substrato. La evolución de este proceso se observa claramente en la figura 9.

Para las determinaciones analítica (tabla XII), se procedió a la digestión por vía húmeda de los respectivos micelios, utilizando peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico (39). Se comprueba que el manganeso divalente es metabolizado por este hongo con tendencia a acumularse intracelularmente, a niveles tales que interfieren fisiológicamente en su propio metabolismo. La escasa variación de los valores para los nutrientes nitrógeno, fósforo y hierro, prueba que el manganeso no obstaculiza el metabolismo de los mismos.

Se han calculado las regresiones entre el manganeso del substrato y el manganeso del micelio a los 6,9 y 16 días. Los valores obtenidos para la F de Snedecor y los coeficientes de regresión (b) y de correlación (r), se indican en la tabla XIII, así como las ecuaciones de regresión respecti-

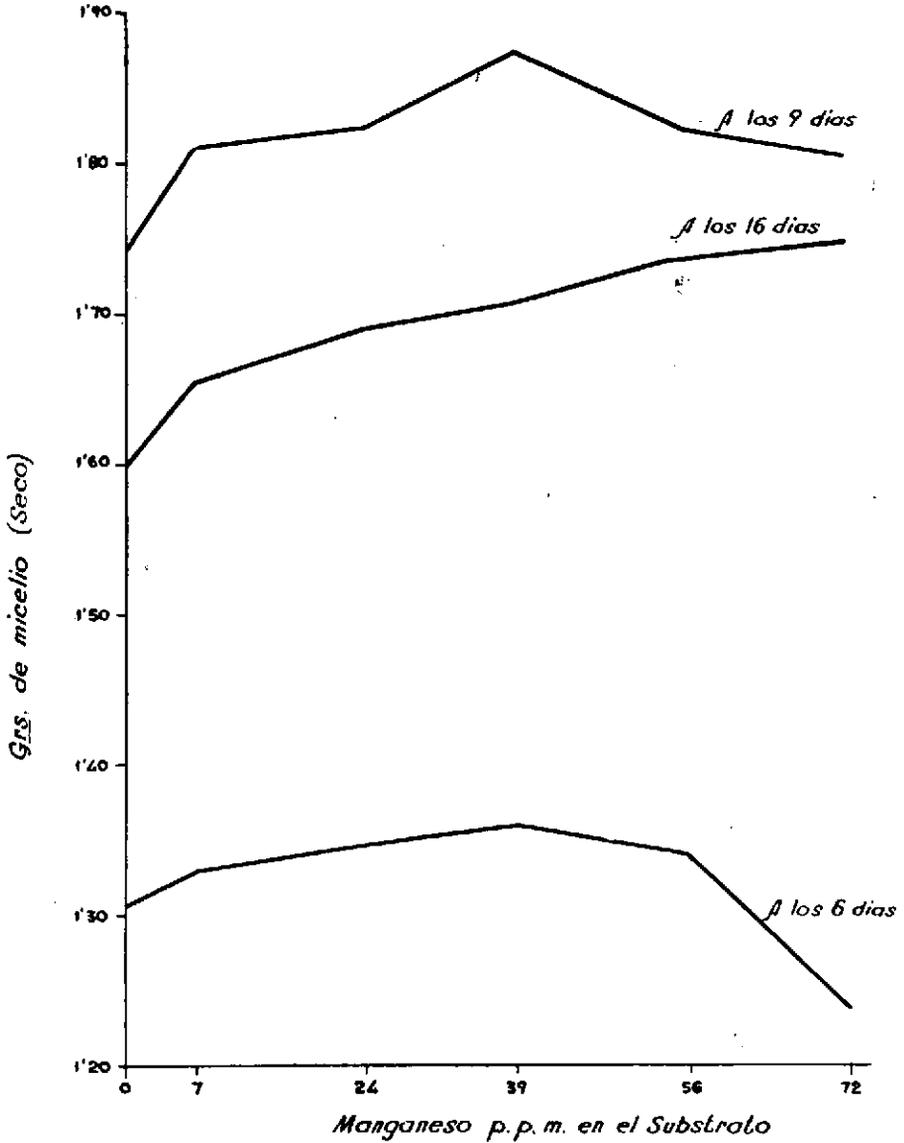


Fig. 9

vas en las figuras 10, 11, 12. Del análisis de las mismas se deduce la existencia de correlación entre los valores considerados, particularmente significativos para el micelio de 6 días.

TABLA XII

Días	Substrato		Micelio			
	Mn. ppm.	pH	Mn. ppm.	Fe. ppm.	% P	% N
6	0	8,21	0	999	0,73	5,87
»	7	8,47	58	990	0,70	6,06
»	24	8,53	132	872	0,70	5,53
»	39	8,26	212	887	0,74	5,58
»	56	8,16	303	886	0,74	5,67
»	72	8,04	403	870	0,77	5,69
9	0	8,31	0	982	0,49	4,62
»	7	8,31	217	925	0,52	4,99
»	24	8,29	588	978	0,57	4,84
»	39	8,30	837	974	0,58	4,55
»	56	8,30	915	973	0,52	5,00
»	72	8,38	1037	956	0,51	4,83
16	0	9,07	0	1021	0,66	4,70
»	7	9,06	416	993	0,65	4,94
»	24	8,91	1206	963	0,69	4,72
»	39	8,96	2025	1038	0,69	4,76
»	56	8,94	2261	1137	0,73	4,85
»	72	8,95	3306	1209	0,71	4,65



REGRESION Y CORRELACION ENTRE EL Mn EN EL SUBSTRATO
EN EL MICELIO A LOS 6 DIAS

	<i>Substrato</i>		<i>Micelio</i>	
	0 p.p.m.		0 p.p.m.	
	7 »		58 »	
	24 »		132 »	
	39 »		212 »	
	56 »		303 »	
	72 »		403 »	
	S.S.	G.L.	V.	F.
REGRESION	114.972	1	114.972	1249
ERROR	368	4	92	
TOTAL	115.340	5		

b = 5,4 r = 0,9984

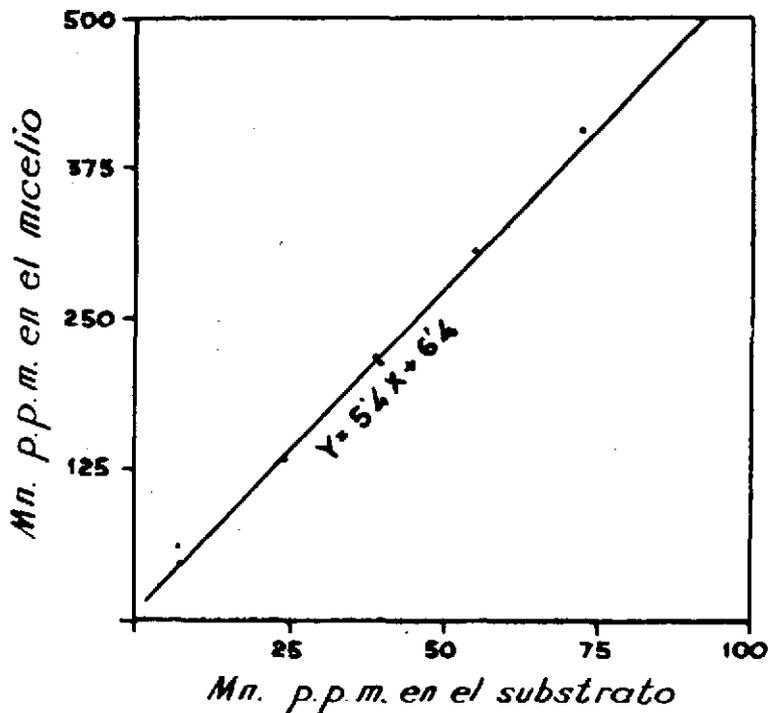


Fig. 10



REGRESION Y CORRELACION ENTRE EL Mn EN EL SUBSTRATO
Y EN EL MICELIO A LOS 9 DIAS

	<i>Substrato</i>	<i>Micelio</i>			
	0 p.p.m.	0 p.p.m.			
	7 »	217	»		
	24 »	588	»		
	39 »	838	»		
	56 »	915	»		
	72 »	1037	»		
		S.S.	G.L.	V.	F.
REGRESION		785.696	1	785.696	42.2
ERROR		67.971	4	16.992	
TOTAL		853.667	5		

b = 14,1 r = 0,9593

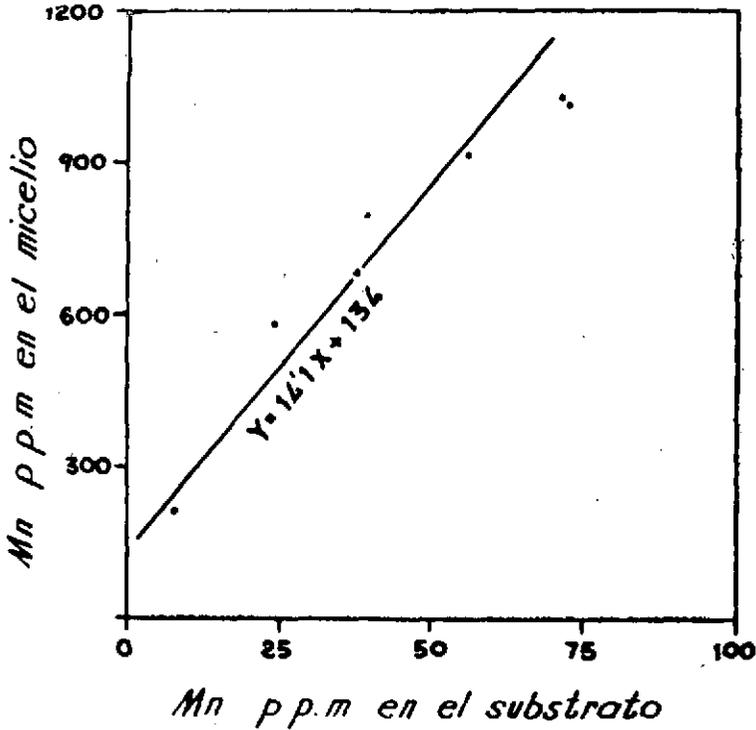


Fig. 11

REGRESION Y CORRELACION ENTRE EI. Mn EN EL SUBSTRATO
Y EN EL MICELIO A LOS 16 DIAS

	<i>Substrato</i>		<i>Micelio</i>	
	0 p.p.m.		0 p.p.m.	
	7 »		417 »	
	24 »		1206 »	
	39 »		2025 »	
	56 »		2261 »	
	72 »		3306 »	
		S.S.		G.L.
REGRESION		7.470.720		1
ERROR		147.287		4
TOTAL		7.618.007		5
			V.	F.
			7.470.720	202
			36.821	

$$b = 43,5 \quad r = 0,9902$$

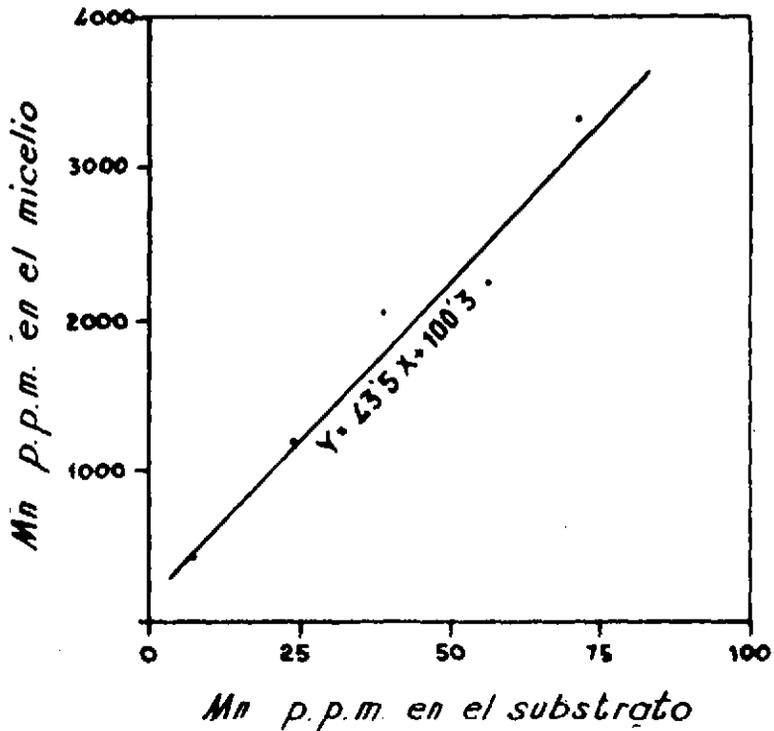


Fig. 12

TABLA XIII

<i>Regresión y correlación</i>	<i>F</i>	<i>b</i>	<i>r</i>
Entre el Mn en el substrato y Mn en el micelio:			
a los 6 días	1249	5,4	0,9984
» » 9 »	42,2	14,1	0,9593
» » 16 »	202	43,5	0,9902

VALORES TABULADOS PARA CUATRO GRADOS DE LIBERTAD

	<i>N i v e l e s</i>	
	1 %	0,1 %
<i>F</i>	21,20	74,14
<i>r</i>	0,9172	0,97406

Con el estudio descrito, se demuestra a escala de laboratorio que el manganeso divalente es metabolizado notablemente por el hongo *Aspergillus versicolor*. Puesto que tal especie ha sido aislada y en proporción notable de suelos deficitarios en dicho elemento, no es exagerado, a nuestro juicio, admitir en principio la posibilidad de que exista un caso de competencia como el supuesto en nuestra hipótesis de trabajo. Esperamos que los estudios de campo ya iniciados permitan confirmar totalmente tal presunción. No obstante, en el momento actual de nuestra investigación, creemos justificado afirmar *que es un factor coadyuvante a la deficiencia de manganeso en los citrus de las zonas estudiados, el desarrollo en sus suelos de microorganismos que metabolizan el manganeso divalente.*

III

TRATAMIENTO

Los métodos preconizados para el restablecimiento de las condiciones normales de plantas deficitarias en manganeso, siguen tres directrices diferentes:

1.^a Agregar al suelo sustancias que disminuyan el pH del medio, de forma tal que resulte asimilable el manganeso existente. En este sentido, se manifiestan eficaces los tratamientos acidificantes con azufre (40), y el empleo de fertilizantes de hidrólisis ácida, como el sulfato amónico, debido a la formación de espacios de acidez relativamente elevada, en la que los compuestos de manganeso son mucho más solubles (41).

2.^a Adición al suelo de manganeso, preferentemente como sulfato, en la proporción de 50 a 100 kgs. hectárea (42) y mejor aún mezclando con azufre o superfosfato (43).

3.^a Suministro directo del nutriente a la planta por inyección en el tronco de sales sólidas o disoluciones a alta presión (44), o por vía foliar mediante fumigaciones con disoluciones muy diluídas de sulfato manganeso. En este último caso, el más difundido, se han empleado concentraciones comprendidas entre 0,15 y 0,5 %, neutralizando convenientemente la disolución con hidróxidos cálcico o sódico (11, 13, 14, 15, 17).

El primer procedimiento descrito, puede considerarse como meramente preventivo y sólo capaz de dar resultados a largo plazo, siempre que la deficiencia no sea debida a carencia total de manganeso en el suelo.

El segundo completa este último aspecto con la adición de sal manganesa. Adolece también de lentitud y su viabilidad es solamente posible en suelos de pH adecuados, pues en los alcalinos se produce una inmovilización de gran parte del nutriente aportado.

Queda, pues, como método más eficaz y de acción más rápida el que actúa de modo directo sobre la planta afectada. Sin embargo, las aplicaciones de sales sólidas o inyecciones a presión son sólo aconsejables «in extremis», ya que pueden determinar lesiones en los órganos, trastornando el normal funcionamiento fisiológico, o ser puertas de entrada para infecciones de naturaleza varia. Por otra parte, dadas las necesidades escasas de este elemento en la mayoría de las especies vegetales, suelen resolverse tales alteraciones con tratamientos menos drásticos, como son los realizados por vía foliar en condiciones adecuadas.

Por todas las razones expuestas en este breve examen crítico de los métodos tradicionales, hemos elegido el procedimiento de rociado o fumigación de la hoja para la corrección de la deficiencia observada. Las experiencias fueron dispuestas del modo siguiente:

Se eligieron parcelas de limoneros verna, de edad y desarrollo diferentes con fertilizaciones diversas.

A vía de ensayo, fueron utilizadas treinta disoluciones cuya composición y resultados previos se indican en la tabla XIV.

Los resultados obtenidos con las siete primeras disoluciones fueron prácticamente nulos debido a la escasa concentración de sulfato manganeso; a partir de la disolución n.º 8 apreciamos respuesta positiva, especialmente con las del 0,3 %. Las disoluciones restantes (19-30) produjeron necrosis en razón directa a la cantidad de manganeso.

Para igual proporción de sal manganosa, observamos, mayor actividad al incorporar carbonato sódico, que aumenta la persistencia.

La adición de tensioactivos de naturaleza no iónica, mejoró aún más las condiciones pues se facilitó el mojado e impregnación de las hojas.

El conjunto de observaciones realizadas ha permitido elegir las disoluciones 16, 17 y 18 como de mejores respuestas.

De acuerdo con ello, se trataron con cada una de dichas disoluciones quince árboles escogidos al azar en una misma parcela, conservando otros tantos como testigo. La operación se efectuó en todos los casos a la caída de la tarde. Por término medio se consumieron de diez a doce litros de disolución por árbol, llegando hasta veinte litros en los de gran desarrollo.

En las tablas XV a XVIII se indica la evolución del contenido foliar de manganeso tanto en los árboles testigo como en los tratados.

TABLA XIV

Disol. n.º	Composición		Detergente		Necrosis	Impreg- nación	Respuestas
	MnSO ₄ %	Na ₂ CO ₃ %	Irol	Neutronyx			
1	0,1	—	—	—	—	r	—
2	0,1	—	0,1	—	—	b	—
3	0,1	—	—	0,1	—	b	—
4	0,1	0,05	—	—	—	r	—
5	0,1	0,05	0,1	—	—	b	—
6	0,1	0,05	—	0,1	—	b	—
7	0,2	—	—	—	—	r	—
8	0,2	—	0,1	—	—	b	+
9	0,2	—	—	0,1	—	b	+
10	0,2	0,10	—	—	—	r	+
11	0,2	0,10	0,1	—	—	b	+
12	0,2	0,10	—	0,1	—	b	+
13	0,3	—	—	—	—	r	+
14	0,3	—	0,1	—	—	b	+
15	0,3	—	—	0,1	x	b	+
16	0,3	0,15	—	—	—	r	++
17	0,3	0,15	0,1	—	—	b	+++
18	0,3	0,15	—	0,1	—	b	+++
19	0,4	—	—	—	x	r	+
20	0,4	—	0,1	—	x	b	+
21	0,4	—	—	0,1	x	b	+
22	0,4	0,20	—	—	x	r	+
23	0,4	0,20	0,1	—	x	b	++
24	0,4	0,20	—	0,1	x	b	++
25	0,5	—	—	—	x	r	++
26	0,5	—	0,1	—	x	b	++
27	0,5	—	—	0,1	x	b	++
28	0,5	0,25	—	—	x	r	++
29	0,5	0,25	0,1	—	x	b	++
30	0,5	0,25	—	0,1	x	b	++

— nula.
r regular.
b, + buena
++ óptima.
x producción de necrosis.

TABLA XV

ARBOLES TESTIGO

Número del árbol	Manganeso p p. m.			
	Al iniciar la experiencia	Al mes de la experiencia	Diferencia	Aumento en tanto por uno
32	7,8	7,4	-0,4	-0,05
24	5,6	5,9	0,3	0,05
53	5,9	5,9	0,0	0,00
9	8,4	8,2	-0,2	-0,02
6	3,9	4,2	0,3	0,08
51	7,2	7,7	0,5	0,07
41	4,5	5,5	0,1	0,22
37	6,0	5,7	-0,3	-0,05
59	8,6	9,0	0,4	0,05
27	5,4	5,0	-0,4	-0,09
54	4,7	5,2	0,5	0,10
21	6,2	5,6	-0,6	-0,09
2	3,8	3,7	-0,1	-0,03
44	5,3	5,3	0,0	0,00
38	6,1	6,4	0,3	0,05
<i>Media</i>	5,96	6,04		

TABLA XVI

ARBOLES TRATADOS.—Disolución n.º 16

Número del árbol	Manganeso p p. m.			
	Al iniciar la experiencia	Al mes de la experiencia	Diferencia	Aumento en tanto por uno
57	5,6	28,9	23,3	41
34	9,5	37,3	27,8	2,9
56	4,8	29,8	25,0	5,2
40	5,7	37,4	31,7	5,5
22	6,3	31,6	25,3	4,0
14	2,7	38,3	25,6	13,1
29	1,9	30,7	28,8	15,1
5	3,6	28,6	25,0	6,9
33	3,4	29,3	25,9	7,6
55	2,7	31,4	38,7	10,6
25	7,6	32,6	25,0	3,2
12	6,2	25,3	19,1	3,0
28	6,4	24,6	18,2	2,8
52	4,7	29,6	24,9	5,2
31	3,7	30,4	26,7	7,2
<i>Media</i>	4,98	29,72	24,73	

TABLA XVII

ARBOLES TRATADOS.—Disolución n.º 17

Número del árbol	Manganeso p. p. m.			
	Al iniciar la experiencia	Al mes de la experiencia	Diferencia	Aumento en tanto por uno
50	4,2	33,4	29,2	6,9
17	9,7	36,4	26,7	2,7
46	7,3	35,4	28,1	3,8
11	5,3	31,7	26,4	4,9
23	3,4	31,6	28,2	8,2
4	3,6	31,6	28,0	7,7
26	6,6	40,8	34,2	5,1
7	6,5	29,6	23,1	3,5
16	2,0	22,8	30,8	15,4
3	2,9	31,7	28,8	9,9
47	9,4	43,2	33,8	3,5
13	4,2	37,4	33,2	7,9
30	6,8	37,4	30,6	4,5
36	3,2	30,2	37,0	8,4
42	3,2	37,2	34,0	10,6
<i>Media</i>	5,02	34,69	29,67	

TABLA XVIII

ARBOLES TRATADOS.—Disolución n.º 18

Número del árbol	Manganeso p. p. m.			
	Al iniciar la experiencia	Al mes de la experiencia	Diferencia	Aumento en tanto por uno
45	3,2	32,7	29,5	9,2
48	7,3	43,2	35,9	4,9
1	6,7	51,6	44,9	6,7
60	4,5	39,0	34,5	7,6
18	3,6	48,3	44,7	12,4
8	5,4	40,7	35,3	6,5
35	3,2	47,4	44,2	13,8
20	7,2	52,4	45,2	6,2
58	2,1	39,8	37,7	17,9
15	8,6	45,5	36,9	4,2
19	5,7	42,1	36,4	6,3
49	5,3	32,4	27,1	5,1
39	3,3	39,2	35,9	10,8
43	4,4	34,6	30,2	6,8
10	2,3	33,5	31,2	13,5
<i>Media</i>	4,85	41,49	36,64	

El examen detenido de las tablas anteriores, permite deducir que el contenido de manganeso en los árboles testigo es prácticamente constante; por el contrario las hojas de los árboles tratados experimentan un aumento considerable que va desde el 2,6 hasta el 17,9 por 1. Si se comparan las medias de las diferencias en las tres últimas tablas, aparecen aumentos proporcionales a la impregnación, que es mayor cuando utilizamos tensioactivos, sobre todo con el Neutronyx. A la vista de lo expuesto, escogimos la disolución n.º 18 para todos los tratamientos posteriores.

En la tabla XIX se presenta un resumen de los resultados obtenidos en épocas diversas, para lo que se ha tenido en cuenta la actividad vegetativa de esta variedad y la influencia que pudiese ejercer el tratamiento sobre los brotes jóvenes. De ella se deduce que el intervalo óptimo de aplicación en estas zonas corresponde a los meses de mayo y junio.

Después del éxito de nuestras primeras experiencias, se ha procedido en años siguientes a extender los tratamientos a la mayor parte de las zonas afectadas, un resumen de los cuales figura en la tabla XX. Los resultados han sido igualmente satisfactorios, confirmándose sistemáticamente la desaparición de los síntomas foliares de la deficiencia, respuesta considerable de los brotes florales y, por último, un aumento de la producción.

TABLA XIX

<i>E p o c a</i>	<i>Efectos de la fumigación</i>
Enero-Febrero	+
Marzo-Abril	-
Mayo-Junio	++
Julio-Agosto	-
Septiembre-Octubre	+
Noviembre-Diciembre	+

- + Bueno.
- ++ Muy bueno.
- Nulo o perjudicial.

TABLA XX

Términos	p. p. m. Manganeso en materia seca	
	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
Guadalupe	4,2	28,2
Cabezo de Torres	5,3	36,3
Llano de Brujas	4,6	34,6
Zeneta	6,2	33,5
Beniaján	7,6	31,4

Cada cifra es la media de diez determinaciones.

Como consecuencia de la amplia experimentación resumida en este trabajo, consideramos de interés recomendar para las plantaciones de limonero verna carentes en manganeso, la siguiente:

TECNICA DE TRATAMIENTO

Los árboles afectados se rociarán completa y adecuadamente con la disolución que sigue:

Sulfato manganeso	0,3 kgs.
Carbonato sódico	0,15 »
Neutronyx-600.	0,1 »
Agua, cantidad suficiente para. .	100 litros

La operación deberá efectuarse preferentemente durante los meses de mayo y junio, a la caída de la tarde, y aprovechando días de calma.

PARTE SEGUNDA

ESTUDIOS COMPARATIVOS DE LA HOJA NORMAL Y DEFICIENTE EN MANGANESO DEL LIMONERO VERNA

I

ESTUDIO CITOLOGICO

Fue SCHIMPER, en 1885 (45), de los primeros que estudiaron seriamente los cloroplastos; él ya indicaba que éstos constan de un estroma incoloro en el que están embebidos unos gránulos tan diminutos que alcanzan los límites de la visibilidad microscópica y donde se encuentra el pigmento verde. Estas ideas fueron aceptadas por BINZ (46) y MEYER (47) y refutadas más tarde por SCHÜRHOFF (48), SHARP (49), GUILLIERMOND y otros (50) que apoyándose en las teorías coloidales de la materia viva llegaban a la conclusión de que todos los componentes vivientes de las células eran flúidos y microscópicamente homogéneos (KÜNSTER) (51). Finalmente, ya en el año 1935, HUBERT (52) y HEITZ (53), entre otros, vuelven a los criterios primitivos, indicando que los cloroplastos están dotados de una estructura microscópica finamente granulada.

Más recientemente y basándose en la teoría originaria de SCHIMPER, hemos de destacar los trabajos realizados por los Dres. LOUSTAU, ORTUÑO y CARPENA (54, 22) cuyas ideas nos han servido de directriz para la elaboración del presente capítulo.

De acuerdo con los trabajos últimamente citados, pensamos que debería existir una clara diferencia entre los cloroplastidios de las hojas verdes, fisiológicamente normales, y los correspondientes a las deficientes en



oligoelementos, y que se podrían investigar las variaciones que éstos producen en los orgánulos celulares de los parénquimas foliares. Por otra parte, siempre nos pareció de gran interés estudiar los orgánulos citoplásmicos precisamente en plantas con deficiencias de micronutrientes, ya que ellos han de bloquear necesariamente las distintas fases evolutivas de los condriosomas citoplásmicos, en especial de los cloroplastidios.

Hemos estudiado las células enteras y completas cuidando de que sus cloroplastidios no presenten deterioro alguno, y así se ha conseguido determinar su volumen y número, que, entre ciertos límites, presuponemos específico para una estructura normal. Los detalles más importantes de la técnica seguida se indican a continuación:

Se parte de hojas desprovistas de peciolo, convenientemente lavadas. En las deficientes en manganeso, fueron separadas previamente por corte las zonas verde clara y verde oscura.

El material se divide en pequeñas tiras, fijándolo con ácido sulfosalicílico al 5 % en disolución acuosa de ácido pícrico al 1 %; según el tamaño de los cortes, el tiempo de fijación oscila entre cinco y veinte días. A continuación, se tratan durante 24 horas con sulfato ferroso al 0.5%; la disolución toma color violeta como consecuencia de la reacción del ácido sulfosalicílico con el ión ferroso. Después de repetidos lavados con agua destilada, hasta eliminar el hierro, disociamos las células que forman los parénquimas foliares con oxalato amónico al 1 por 100, que disuelve las sustancias pécticas del cemento de unión situado entre las membranas de las células adjuntas. El grado conveniente de disociación se alcanza al cabo de unas horas, en cuyo momento debe trabajarse con sumo cuidado para evitar la disgregación de las piezas. Seguidamente se tiñe con hematoxilina al 0,1, 0,5 y 1 por 100 (según el grado de tinción que se desee), a la que se añade disolución acuosa de alumbre potásico al 0,1 por 100. Después, diferenciamos con Rodamina B en disolución glicérica durante 24 horas y finalmente se lava con agua destilada. La preparación definitiva, se consigue tomando una pequeña parte de material y colocándola en una gotita de glicerina sobre un porta; se deposita a continuación sobre el objeto una gota de gelatina glicerinada, previamente fundida; por último se coloca el cubre con suave presión, valiéndose de un trocito de médula de saúco e imprimiendo a la vez un ligero movimiento de rotación o de oscilación. Entonces, las células se esparcen sin ninguna dificultad en la gelatina glicerinada, y, en tanto ésta permanece fundida se las puede trasladar a un lado o a otro mediante ligeras presiones sobre la lámina cubreobjetos. Con esta marcha micrográfica, se resaltan fundamentalmente los cloroplastidios.

La primera parte de este estudio fue dedicada por entero a la determinación de las características tipo de los cloroplastidios pertenecientes a hojas fisiológicamente normales, con el objeto de establecer valores de referencia que permitieran la comparación racional con plantas afectadas de estados deficitarios.

Con la ayuda del micrómetro ocular, hemos podido determinar los volúmenes de los cloroplastidios, aplicando la fórmula matemática del volumen del esferoide $4/3\pi r^3$ en unos casos o del ovoide $4/3\pi ab^2$ en otros, según la forma de aquellos.

La tabla n.º XXI indica los resultados obtenidos para el número de cloroplastos. En el tejido de empalizada, se aprecia proporción superior de valores comprendidos entre 10 y 13 con más frecuencia para el n.º 12. En cuanto al tejido esponjoso, estos valores oscilan entre 9 y 21, correspondiendo el mayor porcentaje a 10 cloroplastidios por célula.

TABLA XXI

LIMONERO NORMAL

Clase de tejido	N.º de cloroplastos por célula	%
Empalizada	6	2,00
»	8	6,00
»	9	9,00
»	10	16,00
»	11	21,00
»	12	23,00
»	13	14,00
»	15	7,00
»	16	2,00
	<i>Media</i>	11,27
Esponjoso	6	6,40
»	9	15,50
»	10	24,50
»	13	15,70
»	16	14,30
»	21	12,00
»	29	7,80
»	35	3,80
	<i>Media</i>	14,67



TABLA XXII

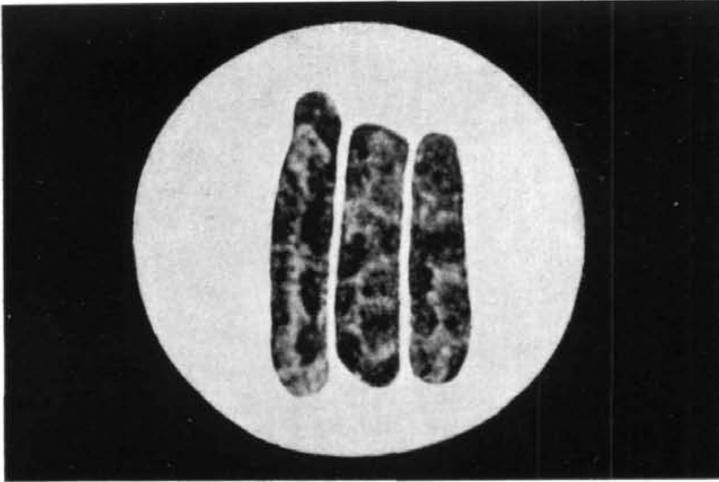
LIMONERO NORMAL

Clase de tejido	Volumenes de los cloroplastidios μ^3	%
Empalizada	8,15	1,70
»	14,10	13,20
»	16,71	17,70
»	25,00	21,70
»	23,25	30,70
»	47,39	12,00
»	66,19	3,00
	<i>Media</i>	
	μ^3	25,20
Esponjoso	8,16	5,70
»	9,40	16,90
»	14,10	21,10
»	25,06	37,10
»	39,25	15,80
»	75,20	3,40
	<i>Media</i>	
		23,08

Los volúmenes de los cloroplastidios (tabla XXII) en células del tejido en empalizadas varían entre $8,15 \mu^3$ y $66,19 \mu^3$, con un tanto por ciento más alto para el $23,25 \mu^3$. En el esponjoso van de $8,16$ a $75,20$ siendo mayor la proporción del $25,06$.

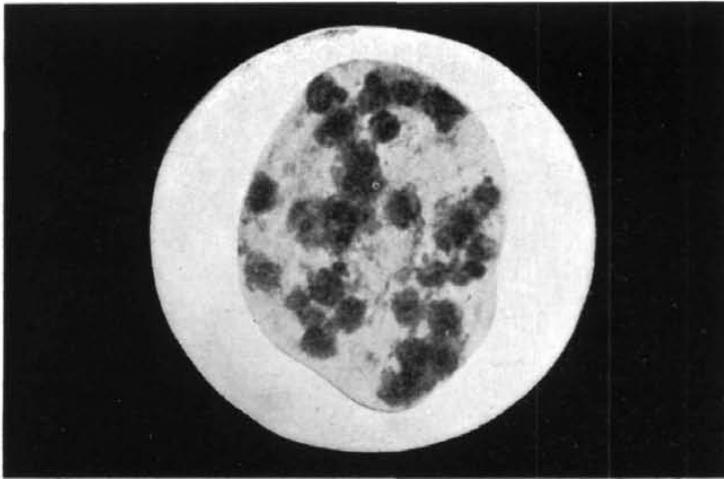
Las fotografías números 8 y 9 muestran, a 1.200 aumentos, preparaciones de células correspondientes a los parénquimas en empalizada y esponjoso de hojas normales de limonero verna, que han sido disociadas, teñidas y diferenciadas con arreglo a la técnica descrita. En ambas, pueden apreciarse fácilmente el número y volumen de los cloroplastos.

Teniendo en cuenta, como ya se ha dicho, que cualquier alteración química del protoplasma de los parénquimas foliares y en particular de los del limonero, debe dar lugar a modificaciones en el número, morfología y desarrollo de los cloroplastidios, ampliamos el estudio micrográfico a hojas de limonero verna deficientes en manganeso, tanto en la zona verde clara como en la verde oscura, características de esta deficiencia.



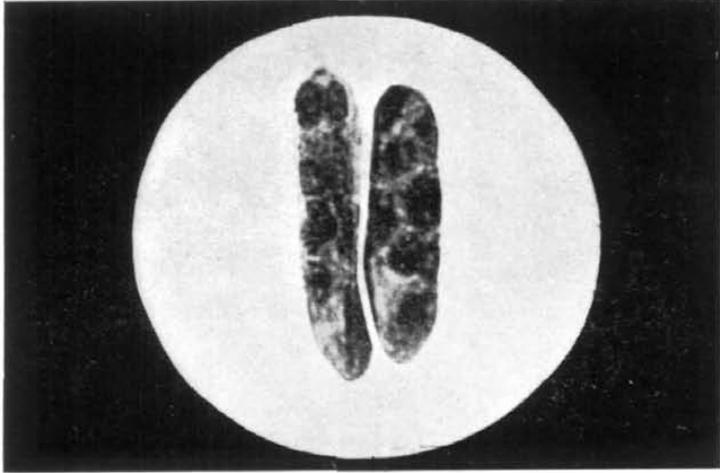
Fotografía n.º 8

Células del tejido de empalizada de hojas de limonero normal (x 1.200)



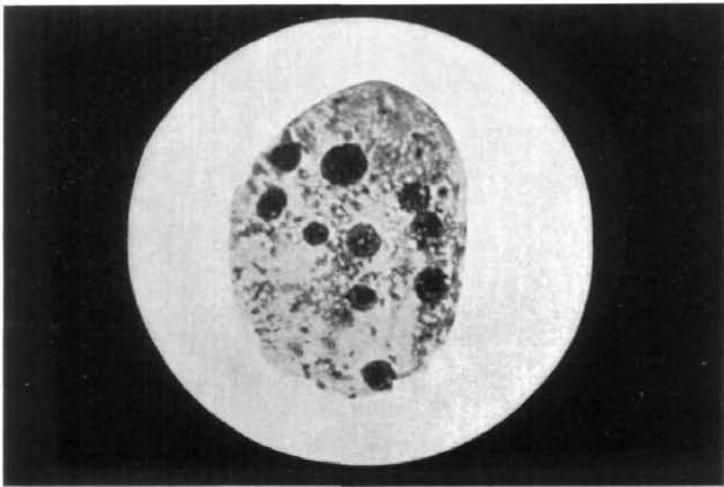
Fotografía n.º 9

Célula del tejido esponjoso de hojas de limonero normal (x. 1.200)



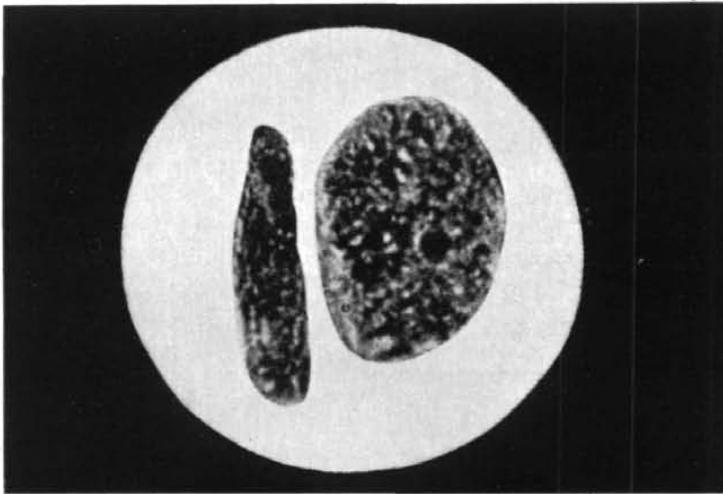
Fotografía n.º 10

Células del parénquima en empalizada de hoja de limonero deficiente en manganeso, zona verde oscura (x. 1.200).



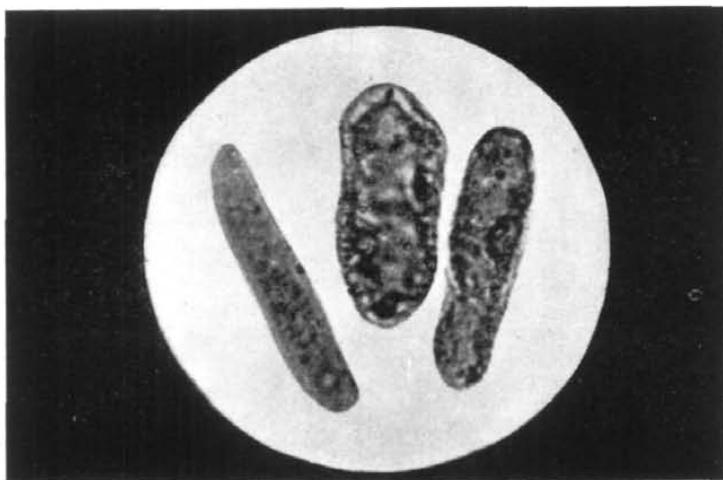
Fotografía n.º 11

Célula del parénquima esponjoso de hoja de limonero deficiente en manganeso, zona verde oscura (x 1.200).



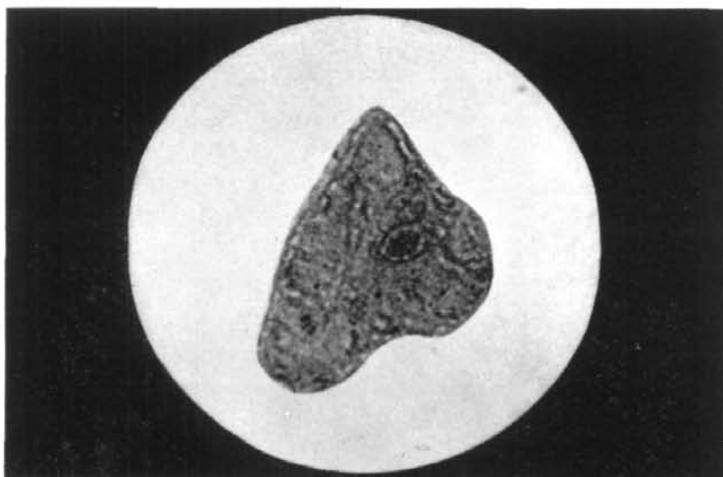
Fotografía n.º 12

Células del parénquima en empalizada y esponjoso de hoja de limonero deficiente en manganeso, zona verde clara (x 1.200)



Fotografía n.º 13

Células del parénquima en empalizada de hoja de limonero deficiente en hierro (x 1.200)



Fotografía n.º 14

Célula del parénquima esponjoso de hoja de limonero deficiente en hierro (x 1.200)

Efectivamente, como habíamos supuesto, los resultados obtenidos y que figuran en las tablas XXIII, XXIV y XXV, revelan diferencias ostensibles en relación con las hojas normales.

Así para el tejido en empalizada el número de cloroplastidios en ambas zonas es inferior al de hojas normales. El desplazamiento resulta todavía más acusado en el tejido esponjoso.

Respecto a los volúmenes cloroplastidiales, tienen lugar también diferencias importantes que dan valores inferiores para la zona clara y superiores para la oscura en ambos tejidos.

Si analizamos comparativamente los datos para las dos zonas aparecen hechos, tal vez de difícil interpretación por el momento, pero de indudable interés. En efecto el número de cloroplastos en el tejido de empalizada oscila de 0 a 10, si bien son mayores para la zona oscura las frecuencias de los valores más altos; en el tejido esponjoso las diferencias son más marcadas pues mientras que en la zona clara los valores están comprendidos entre 0 y 4, con mayor probabilidad para el primero, en la oscura el intervalo es de 0-15 y con el mayor porcentaje para sus cloroplastidios por célula.

En cuanto a los volúmenes de los cloroplastidios, las diferencias se intensifican, pues, para el tejido en empalizada, los valores extremos de la zona clara van de 8,57 a 49,0 con una proporción máxima de 10,72; por el contrario en la oscura, estos datos son de 10,7, 60,30 y 28,70 respectivamente. Algo similar, pero con mayor intensidad, se observa en el tejido esponjoso.

En las fotografías 10, 11 y 12 presentamos células aumentadas 1.200 veces, de tejido en empalizada y esponjoso de las zonas claras y oscura de hojas de limonero deficientes en manganeso; en las que se pueden apreciar las variaciones con respecto a hojas normales ya comentadas.

TABLA XXIII

LIMONERO DEFICIENTE EN MANGANESO

Clase de tejido	Zona clara		Zona oscura	
	N.º de cloro-plastos/célula	%	N.º de cloro-plastos/célula	%
Empalizada	0	14,40	0	16,50
»	2	17,60	3	25,30
»	4	14,20	4	8,30
»	6	22,80	6	8,40
»	8	30,20	9	33,20
»	10	0,80	10	8,30
<i>Media</i>		4,78		5,40
Espojoso	0	60,30	0	1,50
»	1	10,00	1	15,20
»	3	19,80	4	15,40
»	4	9,90	6	22,10
»	—	—	8	15,20
»	—	—	9	15,10
»	—	—	15	15,50
<i>Media</i>		1,09		6,99

TABLA XXIV

LIMONERO DEFICIENTE EN MANGANESO

Clase de tejido	Zona clara		Zona oscura	
	Volumen cloro-plastidial	%	Volumen cloro-plastidial	%
	μ^3		μ^3	
Empalizada	8,57	4,40	10,70	8,00
»	10,72	30,80	13,90	12,90
»	10,84	1,40	16,70	8,00
»	13,93	8,90	17,10	6,40
»	16,75	20,80	21,70	12,90
»	21,77	14,00	22,10	9,60
»	22,15	2,80	26,80	1,60
»	28,31	1,40	28,70	16,10
»	28,77	5,50	33,50	1,60
»	35,44	4,40	35,40	3,20
»	43,80	2,80	36,70	15,50
»	49,00	2,80	45,20	3,20
»	—	—	60,30	1,00
<i>Media</i>		18,35		27,13

TABLA XXV
LIMONERO DEFICIENTE EN MANGANESO

Clase de tejido	Zona clara		Zona oscura	
	Volumen cloro- plastidial	%	Volumen cloro- plastidial	%
	μ^3		μ^3	
Esponjoso	10,72	9,00	13,93	23,00
»	13,93	37,00	16,75	4,10
»	17,15	9,00	17,15	8,40
»	20,10	9,00	21,77	19,00
»	21,77	18,00	26,80	19,00
»	26,80	9,00	28,77	4,10
»	35,44	9,00	35,50	2,10
»	—	—	43,80	4,10
»	—	—	50,92	4,10
»	—	—	65,08	6,20
»	—	—	86,69	2,00
»	—	—	91,21	2,00
»	—	—	104,86	2,00
Media	18,99		30,02	

Las variaciones encontradas por nosotros en el estudio citológico realizado con hojas normales y deficientes en manganeso, nos sugirió la posible utilidad de su comparación con las afectadas de clorosis férrica, estudiadas también en limonero verna (55). En las tablas XXVI y XXVII pueden observarse que el número de cloroplastidios por célula varía de 0 a 6 en el parénquima de empalizada y de 0 a 12 en el esponjoso, con un 0 de máxima frecuencia para ambos tejidos. Respecto del volumen, los valores oscilan entre 6,43 y 38,57 μ^3 , con un máximo de 8,57, para el tejido en empalizada y 6,43, 26,80 y 12,86, respectivamente, para el esponjoso. En las fotografías 13 y 14 se presentan células de tejido en empalizada y esponjoso correspondientes a hojas de limonero deficientes en hierro; como puede verse las diferencias, en relación con las normales, son más acusadas que en la zona clara de hojas deficientes en manganeso.

TABLA XXVI
LIMONERO DEFICIENTE EN HIERRO

Clase de tejido	N.º de cloroplastos	%
Empalizada	0	45,00
»	1	20,00
»	2	10,00
»	3	10,00
»	4	7,00
»	5	5,00
»	6	3,00
	<i>Media</i>	1,21
Esponjoso	0	45,00
»	1	10,00
»	2	6,00
»	4	14,00
»	5	7,00
»	6	5,00
»	10	5,00
»	11	4,50
»	12	3,50
	<i>Media</i>	2,84

FABLA XXVII

LIMONERO DEFICIENTE EN HIERRO

Clase de tejido	Volúmenes de los cloroplastidios μ ³	%
Empalizada	6,43	23,80
»	8,57	33,50
»	9,42	4,70
»	10,85	4,70
»	13,48	9,00
»	16,75	14,90
»	30,99	4,70
»	38,57	4,70
<i>Media</i>	12,35	
Esponjoso	6,43	3,50
»	8,57	10,70
»	10,05	3,50
»	10,22	14,00
»	12,86	22,60
»	16,28	14,00
»	16,75	10,70
»	18,99	3,50
»	21,71	14,00
»	26,80	3,50
<i>Media</i>	14,61	

Para un mejor examen, se ha construído la tabla XXVIII con los valores medios de todos los resultados obtenidos. Los hechos más destacables son :

Número de cloroplastos. Como era de esperar el valor máximo corresponde a la hoja normal, observándose en el tejido de empalizada una gradación que, de mayor a menor, sigue este orden : normal, manganeso zona verde oscura, manganeso zona verde clara y hierro, invirtiéndose los dos últimos términos en el tejido esponjoso.

El estudio detenido de estos valores pone de manifiesto que el número de cloroplastidios aumenta en el parénquima esponjoso, con excepción de la zona clara, sin que tengamos suficiente información capaz de explicar esta anomalía. Por lo demás, puede deducirse que la deficiencia de manganeso determina un descenso del número cloroplastidial con menor intensidad que en el caso del hierro.

Volumen cloroplastidial. Tanto en el tejido de empalizada como en el esponjoso, se aprecian diferencias respecto de la comparación anterior. Así, el orden de mayor a menor es como sigue: zona oscura, normal, zona clara y hierro. Una interpretación posible de este aumento del volumen del cloroplastidio en la zona oscura, tal vez sea el intento de la planta, para restablecer las condiciones normales de la fotosíntesis, su- pliendo con dicho aumento la escasez de cloroplastos y simultáneamente su contenido en clorofila. En consecuencia, resulta lógico suponer que el análisis químico de la zona oscura dará valores de la clorofila y manganeso superiores a la zona clara, pero sin que este último alcance el nivel normal.

TABLA XXVIII

MEDIAS

NÚMERO DE CLOROPLASTOS

	Normales	Deficiente en Mn		Deficiente en Fe
		Z. V. Oscura	Z. V. Clara	
Empalizada	11,27	5,40	4,78	1,21
Esponjoso	14,67	6,99	1,09	2,84
VOLUMENES DE LOS CLOROPLASTOS				
Empalizada	25,20	27,13	18,35	12,13
Esponjoso	23,08	30,02	18,99	14,61

En cuanto al parénquima esponjoso, todavía es mayor el volumen del cloroplastidio respecto del de empalizada, quizás por la mayor dificultad que entraña para la fotosíntesis su localización más interna.

En resumen, nuestros estudios confirman la hipótesis previa de la influencia que los estados deficitarios de manganeso o hierro ejercen sobre los cloroplastidios y demuestra que la llamada por nosotros zona clara en la deficiencia de manganeso, tiene características muy semejantes a las de hierro, si bien de menor intensidad.

Como resumen de lo expuesto, creemos pueden establecerse los criterios siguientes:

a) *Las hojas normales de limonero verna tienen número y volúmenes cloroplastidiales distintos a los de hojas de la misma variedad deficientes en manganeso.*

b) *Las zonas oscura y clara que caracterizan las hojas de limonero verna deficitarias en dicho micronutriente, muestran también diferencias entre sí en el número y tamaño de sus cloroplastidios.*

c) *Las características cloroplastidiales de las hojas deficitarias en manganeso son intermedias entre las tipo y las afectadas de clorosis férrica, acercándose las de la zona verde clara a éstas y las de la oscura a las fisiológicamente normales.*

II

ESTUDIO QUIMICO

EL MANGANESO DE LA HOJA

El establecimiento de las dosis mínimas de un nutriente necesarias para el normal desarrollo de una determinada especie vegetal, se viene deduciendo tradicionalmente a escala de laboratorio mediante el suministro de las disoluciones nutritivas de estudio en vasos de vegetación con o sin soporte inerte. Sin embargo, es necesario aceptar que, en especies perennes, resulta muy difícil prever, con tal tipo de trabajo, todas las condiciones posibles capaces de presentarse posteriormente en el campo. Buena prueba de ello es que la inmensa mayoría de los ensayos se han efectuado con plantas de ciclo corto.

Consideramos, pues, que la experimentación de campo, realizada de modo cuidadoso y teniendo en cuenta las diversas circunstancias de suelo, clima, edad de los árboles, etc., podría dar luz suficiente para determinar con más seguridad el nivel mínimo de un determinado nutriente, por lo menos desde el punto de vista práctico. Con este motivo se emprendió una amplia experiencia sobre limonero verna de las zonas tradicionales de Murcia, que fue planteada de la forma siguiente:

En las zonas de Beniaján, Zeneta, Cabezo de Torres y Guadalupe, tradicionalmente limoneras de la región, fueron señaladas parcelas de árboles deficientes y normales; en cada una de ellas se eligieron 32 árboles clasificándolos al azar en ocho grupos de cuatro. Con arreglo a la técnica

de muestreo que se describe en el capítulo correspondiente, se tomó en cada grupo una muestra por árbol, constituyendo la muestra definitiva con las cuatro muestras parciales de cada grupo. En las tablas XXIX, XXX, XXXI y XXXII figuran los resultados de la experiencia y en la n.º XXXIII se presenta un resumen comparativo que a continuación comentamos: Los valores más altos de manganeso, tanto en hoja normal como en hoja deficiente, corresponden a la zona de Beniaján, lo que está de acuerdo con el hecho de ser ésta más propensa a la deficiencia de hierro. Los contenidos más bajos son los de Guadalupe, donde la deficiencia de hierro es mucho menos frecuente; por esta razón ha sido la zona elegida por nosotros con más asiduidad para el estudio de la deficiencia de manganeso.

Con respecto a Cabezo de Torres y Zeneta se aprecia la misma concordancia de resultados, pues la primera es una continuación de la de Guadalupe y la segunda de Beniaján.

Un examen detenido de los límites calculados al 5 % para las cuatro zonas nos revela que, en una misma planta, el intervalo de normalidad para un determinado nutriente puede diferir según las condiciones externas, bien porque éstas actúen en el sentido de disminuir la absorción del nutriente en cuestión obligando a la planta a adaptarse a esas circunstancias adversas, o porque, realmente sus necesidades puedan variar discretamente en función de dichas condiciones. De ser absolutamente ciertas estas consecuencias, podría llegarse a admitir en el caso estudiado, que el nivel mínimo para el manganeso en el limonero verna es diferente, dentro de límites muy estrechos, en las cuatro zonas estudiadas. Al mismo tiempo se tendría una base experimental más para justificar que las necesidades mínimas de las plantas no dependen exclusivamente de éstas sino también del medio en que se desarrollan.

TABLA XXIX

Término	Manganeso p. p. m.	
	Hoja Normal	Hoja Deficiente
Beniaján	15,9	7,8
»	20,9	9,2
»	20,2	5,9
»	22,5	8,2
»	17,6	6,4
»	21,4	7,3
»	15,8	9,3
»	19,2	6,5
Media	19,2	7,6
C. V.	11,56 %	16,84 %
Límites 5 %	14,0 - 24,4	3,6 - 10,6

TABLA XXX

Término	Manganeso p. p. m.	
	Hoja Normal	Hoja Deficiente
Zeneta	16,9	8,6
»	20,2	7,8
»	17,6	6,0
»	15,6	9,3
»	19,4	5,9
»	17,2	4,7
»	16,1	6,8
»	21,3	7,3
Media	18,0	7,0
C. V.	11,02 %	21,57 %
Límites 5 %	13,3 - 22,7	3,5 - 10,5

TABLA XXXI

Término	Manganeso p p. m.	
	Hoja Normal	Hoja Deficiente
Cabezo de Torres	19,3	9,7
»	14,2	5,8
»	15,6	4,9
»	14,3	4,5
»	16,9	8,6
»	18,6	7,4
»	17,7	5,4
»	20,3	6,3
Media	17,1	6,6
C. V.	13,15%	27,87%
Límites 5 %	11,8 - 22,4	2,3 - 10,9

TABLA XXXII

Término	Manganeso p p. m.	
	Hoja Normal	Hoja Deficiente
Guadalupe	15,3	3,9
»	15,8	7,3
»	14,9	9,4
»	17,3	7,2
»	16,2	6,3
»	15,9	5,7
»	18,4	7,2
»	20,1	4,3
Media	16,7	6,4
C. V.	10,5%	27,81%
Límites 5 %	12,6 - 20,8	3,2 - 9,6

TABLA XXXIII

Término	Media		C V.		Límites 5 %	
	H. Nor.	H. Defe.	H. Nor.	H. Defe.	H. Nor.	H. Defe.
Guadalupe	16,7	6,4	10,53	27,81	12,2	3,2
					20,8	9,6
Cabezo de Tores	17,1	6,6	13,5	27,87	11,8	2,3
					22,4	10,9
Zeneta	18,0	7,0	11,02	21,57	13,3	3,5
					22,7	10,5
Beniaján	19,2	7,6	11,56	16,84	14,0	3,6
					22,4	10,6
<i>Media</i>	17,7	6,9			12,9	3,1
					22,5	10,4

TABLA XXXIV

Término	Manganeso p. p. m.			
	Z. Verde Oscura	Z Verde Clara	Dife.	% de dife.
Guadalupe	8,4	3,1	5,3	63,09
»	6,9	4,0	2,9	42,03
»	7,8	5,1	2,7	34,61
»	12,2	5,5	6,7	54,91
»	7,5	4,2	3,3	44,00
»	9,6	4,1	5,5	57,29
»	11,6	6,5	5,1	43,96
»	10,4	4,9	5,5	52,88
<i>Media</i>	9,3	4,7	4,6	49,09
C. V.	21,07 %	22,12 %		
Límites 5 %	4,7 - 13,9	2,3 - 7,1		

TABLA XXXV

Término	Mgr. de Clorofila por 100 grs de Hoja Fresca			
	Hoja Normal		Hoja Deficiente	
	Completa	Completa	Z V. Oscura	Z. V. Clara
Guadalupe	1.040	810	1.080	750
»	1.100	840	1.040	720
»	1.170	750	970	630
»	1.080	790	1.100	700
»	1.030	840	900	680
»	1.120	850	900	680
»	1.070	770	1.050	650
»	1.010	800	990	710
Medias	1.077	806	1.018	685
C. V.	4,85%	4,44%	6,32%	6,18%
Límites 5 %	953,5-1200,4	723,3-888,6	866,1-1169,9	585-785

Por último, si se consideran en conjunto todas las zonas objeto de este estudio, puede afirmarse que los límites más probables son para la hoja normal de 12,9 - 22,4 y para la hoja deficiente de 3,1 - 10,4. Los valores obtenidos por nosotros amplían el rango de los hallados por varios investigadores sobre otras especies del género *Citrus* (55 y 56).

En correlación con el estudio citológico ya descrito, nos pareció interesante estudiar desde el punto de vista químico dos zonas foliares características de la deficiencia de manganeso.

Las tablas XXXIV y XXXV resumen los resultados de las determinaciones de manganeso y clorofila, respectivamente realizadas en la zona de Guadalupe.

Como era de esperar y de conformidad con los resultados ya obtenidos al estudiar los cloroplastidios, en todos los casos se observa que los valores de manganeso de la zona verde clara son notablemente inferiores a los de la zona oscura, y lo mismo ocurre respecto de la clorofila. También se comprueba que ambos datos para la zona verde oscura son ligeramente inferiores a los de la hoja normal.

RELACIÓN ENTRE LOS CONTENIDOS DE HIERRO Y MANGANESO

Paralelamente con las determinaciones descritas, se han realizado las de hierro con la finalidad de calcular la relación existente entre estos dos nutrientes. Los resultados, tabla XXXVI, confirman en líneas generales que la Fe/Mn aumenta con la deficiencia de este último, como lo prueba que los valores más altos correspondan a la zona verde clara, la cual por suficientes razones demostradas a lo largo de este trabajo, puede considerarse como la representante del estado más agudo. Además dicho aumento se observa aunque la hoja presente simultáneamente deficiencia en ambos micronutrientes, demostrándose así que, lo verdaderamente importante es la relación existente entre ellos y no los valores absolutos.

TABLA XXXVI

RELACION Fe/Mn CALCULADA EN Meq/100 gr DE MATERIA SECA		
<i>Término</i>	<i>Hoja normal</i>	<i>Hoja deficiente</i>
Beniaján	6,00	14,84
Zeneta	6,65	16,84
Cabezo de Torres	7,06	16,96
Guadalupe	7,45	20,65
Hoja deficiente en Mn.		
Zona verde oscura		12,34
Zona verde clara		24,60

Cada dato es la media de ocho determinaciones.

También en este caso se observan diferencias de cierto interés en las zonas estudiadas; así por ejemplo, Beniaján presenta los valores más bajos de la relación en ambos casos y Guadalupe los más altos; estos hechos apoyan las consideraciones expuestas en la primera parte de este capítulo.

Como final del estudio químico de la hoja presentamos los resultados analíticos de hojas normales y deficientes en las que se han determinado los nutrientes fundamentales. Las muestras corresponden a hojas de seis meses pertenecientes a árboles de edad similar y análogamente cultivados, tomadas sin más criterio que el de apreciar visualmente la sintomatología de su estado normal o deficiente.

Los resultados vienen reflejados en las tablas XXXVII, XXXVIII, XXXIX, XL, XLI y XLII, donde las concentraciones se expresan en tanto por ciento sobre materia seca, excepto en la del hierro que lo hacemos en partes por millón.

TABLA XXXVII
NITRÓGENO % EN MATERIA SECA

<i>Término</i>	<i>Hoja normal</i>	<i>Hoja deficiente</i>
Guadalupe	2,71	2,79
»	2,27	2,54
»	2,23	2,57
»	2,55	2,66
»	2,59	2,86
»	2,32	2,81
»	2,47	2,66
»	2,36	2,59
»	2,34	2,82
»	2,58	2,73
»	2,45	2,67
Media	2,44	2,72
C. V.	6,22%	4,33%
Límites 5 %	2,102 - 2,778	2,457 - 2,983
L.S.D. (5 %)		0,12
L.S.D. (1 %)		0,17

TABLA XXXVIII
FÓSFORO % EN MATERIA SECA

<i>Término</i>	<i>Hoja normal</i>	<i>Hoja deficiente</i>
Guadalupe	0,16	0,16
»	0,15	0,14
»	0,13	0,15
»	0,17	0,14
»	0,16	0,17
»	0,18	0,18
»	0,18	0,18
»	0,15	0,15
»	0,14	0,16
»	0,13	0,16
»	0,13	0,15
Media	0,152	0,158
C. V.	12,66%	8,86%
Límites 5 %	0,110 - 0,194	0,127 - 0,189
L.S.D. (5 %)		0,015
L.S.D. (1 %)		0,020

TABLA XXXIX

POTASIO % EN MATERIA SECA

<i>Término</i>	<i>Hoja normal</i>	<i>Hoja deficiente</i>
Guadalupe	1,69	1,66
»	1,48	1,81
»	1,64	1,48
»	1,63	1,95
»	1,45	1,58
»	1,56	1,55
»	1,59	1,50
»	1,31	1,21
»	1,34	1,36
»	1,19	1,30
»	0,93	1,30
Media	1,43	1,52
C. V.	16,01%	14,86%
Límites 5 %	0,92 - 1,94	1,016 - 2,024
L.S.D. (5 %)		0,202
L.S.D. (1 %)		0,275

TABLA XL

CALCIO % EN MATERIA SECA

<i>Término</i>	<i>Hoja normal</i>	<i>Hoja deficiente</i>
Guadalupe	3,96	3,44
»	2,99	3,36
»	3,57	3,10
»	3,37	3,87
»	3,33	3,50
»	3,93	4,12
»	3,51	4,14
»	3,29	3,68
»	2,81	2,88
»	3,16	3,10
»	3,40	3,36
Media	3,39	3,50
C. V.	10,32%	13,20%
Límites 5 %	2,61 - 4,17	2,47 - 4,53
L.S.D. (5 %)		0,365
L.S.D. (1 %)		0,497

TABLA XLI

MAGNESIO % EN MATERIA SECA

<i>Término</i>	<i>Hoja normal</i>	<i>Hoja deficiente</i>
Guadalupe	0,28	0,39
»	0,36	0,34
»	0,37	0,37
»	0,37	0,37
»	0,30	0,34
»	0,32	0,39
»	0,36	0,25
»	0,36	0,34
»	0,33	0,41
»	0,31	0,36
»	0,36	0,30
»	0,30	0,25
Media	0,33	0,34
C. V.	9,39 %	15,82 %
Límites 5 %	0,261 - 0,339	0,22 - 0,46
L.S.D. (5 %)		0,039
L.S.D. (1 %)		0,053

TABLA XLII

HIERRO p.p.m. EN MATERIA SECA

<i>Término</i>	<i>Hoja normal</i>	<i>Hoja deficiente</i>
Guadalupe	99	105
»	105	112
»	102	150
»	91	130
»	91	111
»	106	116
»	103	139
»	104	115
»	95	127
»	98	102
»	89	101
Media	98,9	119,40
C. V.	6,13 %	13,11 %
Límites 5 %	85,4 - 112,4	84,50 - 154,50
L.S.D. (5 %)		10,53
L.S.D. (1 %)		14,36

Del examen de las mismas se deduce la existencia de unas diferencias altamente significativas entre los contenidos de nitrógeno y hierro de hojas normales y deficientes en manganeso, mientras que para los restantes elementos estudiados las diferencias no alcanzan los límites de significación.

La consideración conjunta de los resultados experimentales que figuran en este capítulo, permite, a nuestro juicio, deducir los hechos siguientes:

a) Los contenidos de manganeso en las hojas de limonero verna dependen, entre límites estrechos, de las condiciones ambientales en que la planta se desarrolle.

b) Valores del manganeso por debajo de 13 p.p.m. indican deficiencia en limonero verna cultivados sobre suelos calizos.

c) En esta especie tiene mas interés la relación Fe/Mn que los valores absolutos de ambos nutrientes.

d) El análisis químico confirma de manera indudable las ostensibles diferencias ya observadas visual y citológicamente en las zonas clara y oscura de hojas deficientes en manganeso.

e) El estudio comparativo de hojas normales y deficientes sólo arroja significación para nitrógeno y hierro, cuyos contenidos aumentan en el estado deficitario.

III

EVOLUCION DE NUTRIENTES DESPUES DEL TRATAMIENTO

Los datos conocidos hasta 1948 con respecto a la composición de citrus, figuran en la revisión de CHAPMAN y KELLEY (57), donde se puede apreciar que la información existente sobre los cambios estacionales de los elementos minerales en hojas de citrus es casi nula, excepción hecha del nitrógeno. Posteriormente, SMITH y REUTHER (58) y CAMERÓN y COMPTON (59), estudian la evolución, a lo largo de un ciclo vegetativo, de materia seca y elementos minerales y nitrógeno, respectivamente, en naranjos Valencia.

En 1954, CAMERON, WALLACE y MUELLER (60), indican las variaciones estacionales para fósforo, potasio, calcio y magnesio en hojas de naranjos Valencia, estudiando las diversas interacciones posibles.

Para una interpretación correcta de los datos del análisis foliar, en especial para fines de diagnóstico, es fundamental el conocimiento de los diversos antagonismos o interacciones iónicas. En citrus se han descrito numerosos ejemplos de este tipo. Así, los contenidos foliares elevados de nitrógeno están ligados a valores altos para calcio y bajos para fósforo y potasio (61). Las variaciones de fósforo son paralelas a las de calcio e inversas a las de nitrógeno y potasio (62). Las de potasio guardan una correlación inversa con las de calcio y magnesio, habiéndose apreciado, que la suma $Ca + Mg + K$ en la hoja es prácticamente constante (63).

Las observaciones mencionadas nos han sugerido la conveniencia de estudiar la evolución de los nutrientes fundamentales de limoneros verna en los que se había corregido una deficiencia de manganeso, y que mostraban, por tanto, contenidos de dicho elemento superiores a su nivel normal en citrus.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los árboles utilizados para este estudio se han descrito anteriormente, así como los tratamientos empleados para corregir la deficiencia de manganeso. Las muestras se obtuvieron quincenalmente desde octubre, con excepción del 15 de febrero y 15 de marzo.

La fertilización de los árboles durante la experiencia fue la siguiente:

<i>Epoca</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Kgs. árbol</i>
Febrero	Estiércol de cuadra	40
»	Sulfato potásico	0,75
»	Superfosfato cálcico 16/18	5
Marzo	Sulfato amónico	1
Mayo	» »	1
»	Sulfato ferroso	1

Los datos hallados para los contenidos de nutrientes, referidos a materia seca, figuran en las tablas número XLIII a IL; cuyas fechas exactas de toma de muestra son:

I.	15 de Octubre
II.	30 »
III.	14 de Noviembre
VI.	29 »
V.	14 de Diciembre
VI.	29 »
VII.	14 de Enero
VIII.	29 »
IX.	28 de Febrero
X.	30 de Marzo
XI.	15 de Abril
XII.	30 »
XIII.	15 de Mayo
XIV.	1 de Junio

Los coeficientes de variabilidad elevados, excepto para el calcio, indican las variaciones estacionales normales y las producidas por el restablecimiento del nivel normal de manganeso.

TABLA XLIII

CONTENIDO DE NITRÓGENO - % EN MATERIA SECA

LIMONEROS

Fecha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Medias
I	2,79	2,54	2,57	2,66	2,86	2,81	2,86	2,59	2,82	2,73	2,67	2,71
II	2,84	2,26	2,41	2,34	2,82	2,54	2,27	2,54	2,61	2,60	2,38	2,51
III	2,75	2,27	2,23	2,55	2,59	2,32	2,47	2,36	2,34	2,58	2,45	2,44
IV	2,73	2,02	2,37	2,49	2,55	2,26	2,73	2,49	2,31	2,34	2,59	2,44
V	2,61	2,15	2,43	2,51	2,57	2,58	2,42	2,50	2,31	2,31	2,39	2,43
VI	2,51	2,34	2,36	2,50	2,66	2,50	2,34	2,31	2,41	2,27	2,44	2,42
VII	2,62	2,42	2,40	2,55	2,16	2,43	2,26	2,29	2,27	2,14	2,63	2,37
VIII	2,56	2,49	2,86	2,21	2,44	1,97	2,18	2,25	2,08	2,21	2,12	2,33
IX	2,23	2,16	2,20	2,35	2,34	2,10	2,22	2,21	2,68	2,38	2,06	2,26
X	2,02	1,89	2,06	2,15	1,67	1,80	1,25	2,13	1,89	1,60	1,83	1,84
XI	1,49	1,38	1,16	1,72	1,20	1,62	1,68	1,83	1,28	1,97	1,97	1,57
XII	1,96	2,02	2,10	2,03	2,10	1,95	1,77	1,52	1,72	1,76	1,79	1,88
XIII	2,01	1,98	1,97	2,29	2,05	2,04	1,93	1,86	1,61	1,82	1,85	1,94
XIV	1,97	1,70	1,90	2,16	1,99	1,96	2,02	1,55	2,10	1,68	1,87	1,90
Med.	2,36	2,11	2,21	2,32	2,28	2,20	2,17	2,17	2,17	2,17	2,21	
C. V. %	17,37	15,07	17,78	10,90	19,42	15,40	19,35	16,26	19,81	16,49	14,61	
Límite	3,24	2,79	3,06	2,87	3,23	2,93	3,08	2,93	3,10	2,94	2,91	
5 %	1,48	1,43	1,36	1,77	1,33	1,47	1,26	1,41	1,24	1,40	1,51	



TABLA XLIV

CONTENIDO DE FÓSFORO - % EN MATERIA SECA

LIMONEROS

Fecha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Medias
I	0,16	0,14	0,15	0,14	0,17	0,18	0,18	0,15	0,16	0,16	0,15	0,16
II	0,19	0,16	0,14	0,15	0,19	0,16	0,18	0,16	0,15	0,14	0,14	0,16
III	0,16	0,16	0,13	0,17	0,16	0,18	0,18	0,15	0,14	0,13	0,13	0,15
IV	0,16	0,15	0,14	0,15	0,16	0,14	0,18	0,15	0,14	0,13	0,13	0,15
V	0,17	0,14	0,15	0,14	0,17	0,15	0,17	0,15	0,15	0,13	0,12	0,15
VI	0,16	0,15	0,14	0,15	0,17	0,15	0,17	0,16	0,12	0,13	0,14	0,15
VII	0,14	0,13	0,13	0,15	0,17	0,14	0,18	0,15	0,13	0,13	0,13	0,14
VIII	0,16	0,13	0,14	0,15	0,17	0,16	0,18	0,16	0,14	0,13	0,13	0,15
IX	0,13	0,11	0,11	0,11	0,13	0,13	0,14	0,14	0,12	0,12	0,12	0,12
X	0,11	0,10	0,10	0,10	0,11	0,09	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11
XI	0,11	0,10	0,10	0,09	0,11	0,09	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
XII	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,09	0,10	0,09
XIII	0,11	0,11	0,10	0,11	0,11	0,10	0,13	0,12	0,09	0,10	0,10	0,11
XIV	0,14	0,11	0,12	0,14	0,12	0,11	0,13	0,11	0,12	0,12	0,11	0,12
Med.	0,142	0,127	0,124	0,131	0,145	0,134	0,152	0,136	0,126	0,122	0,122	
C. V. %	19,75	18,81	17,09	19,92	20,96	23,58	20,59	17,72	17,22	15,03	13,44	
Límite	0,201	0,178	0,170	0,187	0,210	0,220	0,211	0,188	0,173	0,162	0,157	
5 %	0,083	0,076	0,078	0,075	0,080	0,084	0,085	0,084	0,079	0,082	0,087	



TABLA XLV

CONTENIDO DE POTASIO - % EN MATERIC SECA

LIMONEROS

Fecha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Medias
I	1,66	1,81	1,48	1,95	1,58	1,55	1,50	1,21	1,36	1,30	1,30	1,52
II	1,68	1,64	1,50	1,83	1,74	1,50	1,67	1,48	0,97	1,34	0,86	1,47
III	1,69	1,48	1,64	1,63	1,45	1,56	1,59	1,31	1,34	1,19	0,93	1,44
IV	1,70	1,35	1,57	1,87	1,51	1,47	1,37	1,51	1,28	1,27	1,16	1,46
V	1,71	1,50	1,53	1,82	1,67	1,50	1,50	1,51	1,49	1,35	1,08	1,51
VI	1,76	1,73	1,75	1,97	1,64	1,60	1,60	1,60	1,46	1,39	1,19	1,61
VII	1,28	1,48	1,27	1,38	1,28	1,24	1,11	1,30	1,05	1,01	0,86	1,21
VIII	1,24	1,30	1,54	1,49	1,16	1,13	1,18	1,29	1,30	1,05	1,01	1,24
IX	1,06	1,14	1,18	1,31	1,24	0,92	0,98	0,17	0,91	0,72	0,80	1,04
X	0,79	0,93	0,90	1,05	0,86	0,80	0,90	0,77	0,90	0,82	0,74	0,86
XI	1,00	1,45	1,25	1,57	1,07	1,00	0,92	0,93	0,90	1,20	0,74	1,09
XII	1,19	1,26	1,20	1,28	0,95	0,86	0,94	0,77	1,06	0,88	0,73	1,01
XIII	1,22	1,42	1,34	1,62	1,20	0,84	0,95	1,13	1,01	1,05	0,84	1,15
XIV	1,48	1,26	1,39	1,67	1,40	1,04	0,98	0,98	1,19	1,13	1,16	1,24
Med.	1,39	1,41	1,40	1,60	1,34	1,22	1,23	1,21	1,16	1,12	0,96	
C. V. %	21,79	16,45	15,85	17,25	19,77	25,08	26,09	20,41	18,27	18,66	19,89	
Límite	2,05	1,91	1,88	2,20	1,91	1,88	1,92	1,84	1,62	1,67	1,37	
5 %	0,74	0,91	0,92	1,00	0,77	0,56	0,54	0,68	0,70	0,67	0,55	



TABLA XLVI

CONTENIDO DE CALCIO - % EN MATERIA SECA

LIMONEROS

Fecha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Medias
I	3,44	3,36	3,10	3,87	3,50	4,12	4,14	3,68	2,88	3,01	3,36	3,41
II	3,45	3,25	3,62	3,45	3,10	4,12	3,56	3,59	2,95	3,22	3,20	3,41
III	3,96	2,99	3,57	2,94	3,33	3,93	3,51	3,29	2,81	3,16	2,89	3,31
IV	3,09	2,94	3,65	3,30	3,36	4,29	3,54	3,84	2,93	3,04	3,62	3,42
V	3,73	2,72	3,31	3,34	3,10	3,76	3,43	3,80	2,49	3,42	3,17	3,30
VI	3,62	3,21	3,41	3,32	3,66	3,56	3,29	3,28	3,39	3,57	3,32	3,33
VII	2,14	2,40	2,06	3,48	3,32	3,74	3,64	3,45	2,38	2,94	3,34	2,99
VIII	3,64	3,28	3,95	3,48	3,26	4,01	3,48	3,87	3,31	3,42	3,44	3,56
IX	3,37	3,29	3,10	3,68	3,29	3,32	3,59	3,30	3,29	2,81	2,73	3,34
X	3,45	3,44	3,54	3,28	3,32	3,25	4,11	3,84	2,59	2,65	2,75	3,29
XI	3,64	3,28	3,74	3,77	4,31	4,23	4,18	3,95	3,24	2,88	2,76	3,63
XII	3,69	3,41	3,92	3,80	3,90	4,42	3,77	3,30	3,03	3,16	3,09	3,59
XIII	3,93	3,50	4,05	4,10	3,97	4,67	4,24	3,74	3,38	3,30	3,10	2,91
XIV	3,80	3,15	3,42	3,56	3,61	4,59	3,80	3,61	2,88	2,46	2,52	3,40
Med.	3,50	3,16	3,46	3,52	3,50	4,00	3,73	3,61	2,97	3,00	3,09	
C. V. %	7,77	9,58	9,47	8,35	10,02	10,92	8,36	6,75	11,04	10,10	10,32	
Límite	4,08	3,80	4,15	4,14	4,25	4,92	4,40	4,13	3,66	3,64	3,09	
5 %	2,92	2,52	2,77	2,90	2,75	3,08	3,06	3,09	2,28	2,36	2,40	



TABLA XLVII

CONTENIDO DE MAGNESIO - % EN MATERIA SECA

LIMONEROS

Fecha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Medias
I	0,39	0,34	0,37	0,34	0,39	0,25	0,34	0,41	0,36	0,30	0,25	0,34
II	0,25	0,31	0,38	0,32	0,31	0,22	0,37	0,29	0,30	0,34	0,29	0,31
III	0,28	0,36	0,29	0,30	0,32	0,36	0,36	0,33	0,28	0,27	0,30	0,31
IV	0,33	0,28	0,36	0,25	0,28	0,41	0,43	0,37	0,32	0,38	0,31	0,34
V	0,35	0,23	0,41	0,31	0,38	0,38	0,35	0,42	0,29	0,25	0,32	0,34
VI	0,35	0,40	0,46	0,34	0,32	0,42	0,42	0,39	0,36	0,33	0,34	0,38
VII	0,39	0,39	0,37	0,28	0,45	0,40	0,33	0,37	0,39	0,38	0,45	0,38
VIII	0,34	0,28	0,41	0,36	0,42	0,50	0,42	0,43	0,37	0,42	0,40	0,40
IX	0,36	0,30	0,51	0,38	0,38	0,41	0,38	0,40	0,35	0,24	0,33	0,37
X	0,30	0,39	0,40	0,28	0,34	0,26	0,43	0,40	0,37	0,28	0,37	0,35
XI	0,30	0,43	0,28	0,38	0,32	0,36	0,37	0,34	0,29	0,27	0,29	0,33
XII	0,30	0,33	0,39	0,35	0,35	0,36	0,34	0,29	0,34	0,31	0,32	0,33
XIII	0,36	0,38	0,36	0,40	0,38	0,41	0,34	0,32	0,30	0,33	0,34	0,36
XIV	0,35	0,40	0,49	0,42	0,34	0,44	0,38	0,30	0,28	0,30	0,22	0,36
Med.	0,33	0,34	0,39	0,34	0,36	0,37	0,38	0,36	0,33	0,31	0,32	
C. V. %	12,42	17,05	16,41	14,70	13,05	21,08	9,47	14,16	11,51	17,09	18,12	
Límite	0,41	0,46	0,53	0,45	0,46	0,54	0,46	0,47	0,41	0,42	0,44	
5 %	0,25	0,22	0,25	0,23	0,26	0,20	0,30	0,25	0,25	0,20	0,20	



TABLA XLVIII

CONTENIDO DE HIERRO p.p.m. EN MATERIA SECA

LIMONEROS

Fecha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Medias
I	105,9	112,6	150,2	130,9	111,9	116,0	139,5	115,5	127,7	102,8	101,1	119,4
II	71,2	87,8	78,8	85,2	78,7	99,8	85,4	75,1	65,2	71,5	57,5	77,8
III	90,9	75,6	78,0	83,6	84,4	107,0	81,3	86,0	64,5	69,5	56,2	79,7
IV	66,6	73,2	76,8	67,6	68,1	72,3	70,3	67,3	64,1	65,7	70,0	69,2
V	67,9	66,9	67,1	71,2	65,7	88,2	67,5	74,2	54,7	51,7	80,9	68,7
VI	100,8	76,7	75,8	80,7	65,2	63,7	68,9	61,4	69,4	57,4	52,8	70,2
VII	67,5	72,9	62,3	73,8	74,6	67,0	76,8	66,6	70,3	68,9	62,5	69,3
VIII	65,1	120,8	90,3	100,3	89,4	91,2	89,0	115,5	85,6	79,1	72,8	90,8
IX	72,8	85,2	75,5	69,1	57,2	69,9	69,4	68,1	64,9	62,0	54,9	68,0
X	64,6	77,6	81,5	97,4	97,7	60,9	83,6	76,7	71,5	61,5	62,2	75,9
XI	72,3	104,0	83,5	87,5	79,6	97,8	94,9	80,5	120,3	86,8	122,5	94,4
XII	125,4	114,5	87,4	130,5	117,7	119,8	169,1	71,7	72,6	59,8	64,4	102,9
XIII	81,3	64,9	91,9	104,8	80,0	85,6	79,0	68,7	62,6	59,9	63,9	76,6
XVI	46,2	56,4	42,1	41,3	45,2	80,1	92,8	80,4	95,2	87,2	88,2	68,6
Med.	78,2	85,0	81,5	87,4	79,6	87,8	90,5	79,1	78,4	70,2	72,1	
C. V. %	26,78	23,88	28,71	27,80	25,00	21,86	32,04	21,11	29,89	20,08	27,73	



TABLA XLIX

CONTENIDO DE MANGANESO p.p.m. EN MATERIA SECA

LIMONEROS

Fecha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Medias
I	2,9	9,4	9,5	2,9	7,2	7,2	7,3	7,2	7,4	7,3	7,2	6,8
II	37,1	51,1	30,0	24,3	43,2	53,3	51,1	47,0	20,7	29,6	25,3	37,5
III	57,7	37,1	43,5	39,7	60,2	90,1	59,4	62,7	18,3	20,8	24,7	46,7
IV	61,2	45,6	31,4	29,6	39,7	42,3	44,9	39,2	18,2	28,0	19,8	35,6
V	21,3	31,4	23,7	23,6	33,9	38,1	31,9	38,3	16,1	16,5	19,5	26,8
VI	21,2	37,6	39,2	34,3	38,8	36,5	42,5	44,3	19,7	23,7	20,6	32,5
VII	24,0	35,9	33,6	32,2	45,4	50,3	56,7	54,8	25,6	27,3	23,5	37,2
VIII	32,7	33,1	39,0	32,2	52,4	44,2	42,9	52,5	19,8	30,3	22,9	36,5
IX	32,2	55,3	34,6	29,2	41,0	47,8	48,3	46,5	32,9	23,9	27,1	38,0
X	26,4	27,2	31,8	34,1	40,4	46,7	48,6	56,8	17,6	22,2	21,9	34,8
XI	20,5	64,2	32,9	35,5	44,5	49,7	54,5	50,6	17,9	30,9	24,9	38,7
XII	37,0	47,2	42,8	31,9	49,3	56,5	50,7	55,6	19,5	31,4	22,9	40,4
XIII	29,4	29,4	38,4	42,4	47,8	61,6	69,9	57,9	34,4	17,3	20,7	40,7
XIV	12,4	14,3	22,0	11,7	24,1	50,1	29,0	32,9	13,4	18,6	19,9	22,5
Med.	29,7	38,4	33,0	29,5	40,5	47,4	45,5	46,1	20,1	23,4	21,4	
C. V. %	49,49	32,81	27,87	35,93	31,60	36,91	33,18	40,56	35,32	29,91	21,96	

De las diversas correlaciones estudiadas, sólo resultaron significativas, las N-P, N-K y P-K. Los valores de F, b y r se indican en la tabla n.º L y las ecuaciones de regresión correspondientes en las figuras números 13, 14 y 15.

TABLA L

Regresión y correlación	F	b	r
Del nitrógeno con fósforo	78,5 +	17,7	0,9314 +
Del nitrógeno con potasio	17,9 ×	0,94	0,7739
Del potasio con fósforo	16,5 ×	13,1	0,7607

+ Significativa al nivel 0,1 %.

× Significativa al nivel 1 %.

CORRELACION Y REGRESION ENTRE NITROGENO Y FOSFORO

	N <i>Meq./100 grs.</i>	P <i>Meq./100 grs.</i>		
	580	26		
	538	26		
	523	24		
	523	24		
	520	24		
	518	24		
	508	23		
	499	24		
	484	19		
	394	18		
	336	16		
	403	15		
	401	18		
	407	19		
	S.S.	G.L.	V.	F.
REGRESION	57.612	1	57.612	78,5
ERROR	8.810	12	734	
TOTAL	66.422	13		

b = 17,7

r = 0,9314

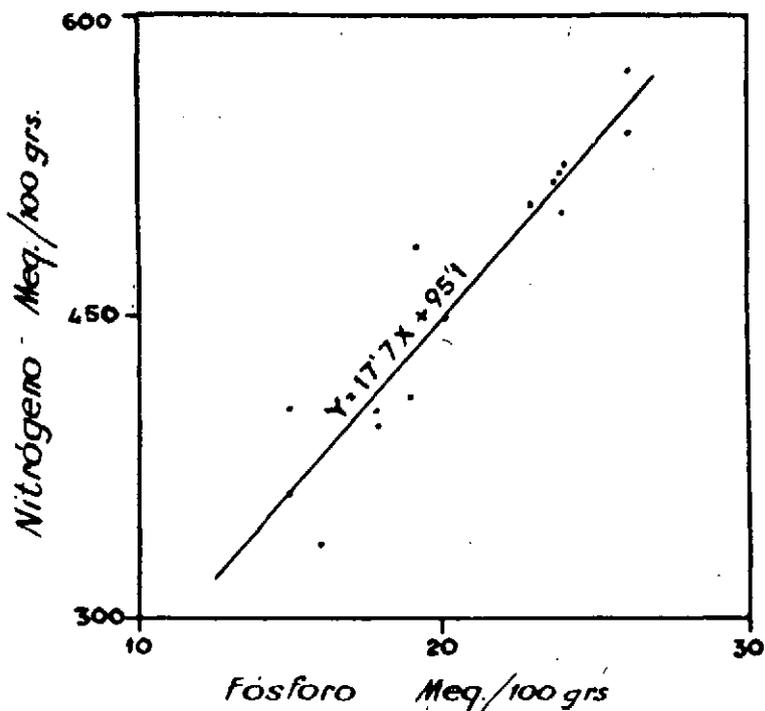


Fig. 13

REGRESION Y CORRELACION ENTRE POTASIO Y FOSFORO

	K Meq./100 grs.	P Meq./100 grs.		
	389	26		
	376	26		
	368	24		
	373	24		
	386	24		
	412	24		
	309	23		
	317	24		
	266	19		
	220	18		
	279	16		
	258	15		
	294	18		
	317	19		
	S.S.	G.L.	V.	F.
REGRESION	31.580	1	31.580	16,5
ERROR	23.003	12	1.917	
TOTAL	54.583	13		

$b = 13,1$ $r = 0,7607$



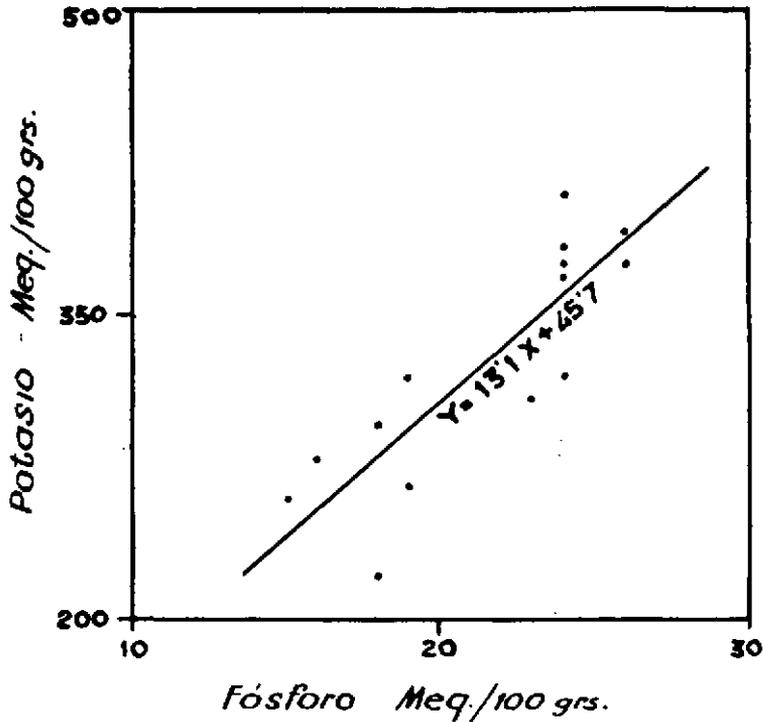


Fig. 14

REGRESION Y CORRELACION ENTRE NITROGENO Y POTASIO

	N Meq./100 grs.	K Meq./100 grs.		
	580	389		
	538	376		
	523	368		
	523	373		
	520	386		
	518	412		
	508	309		
	499	317		
	484	266		
	394	220		
	336	279		
	403	258		
	401	294		
	407	317		
	S.S.	G.L.	V.	F.
REGRESION	39.782	1	39.782	17,9
ERROR	26.640	12	2.220	
TOTAL	66.422	13		
b = 0,94	r = 0,7739			



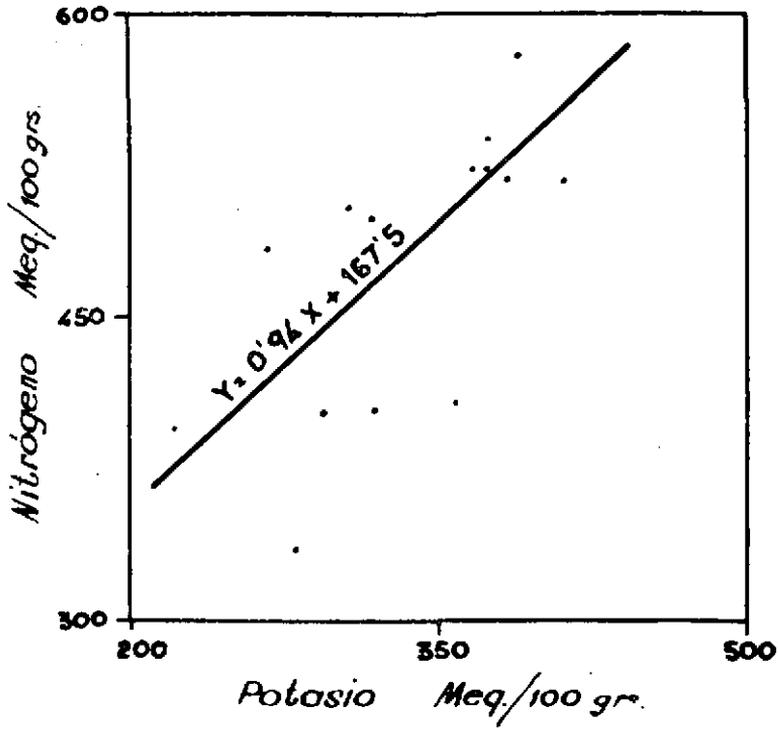


Fig. 15

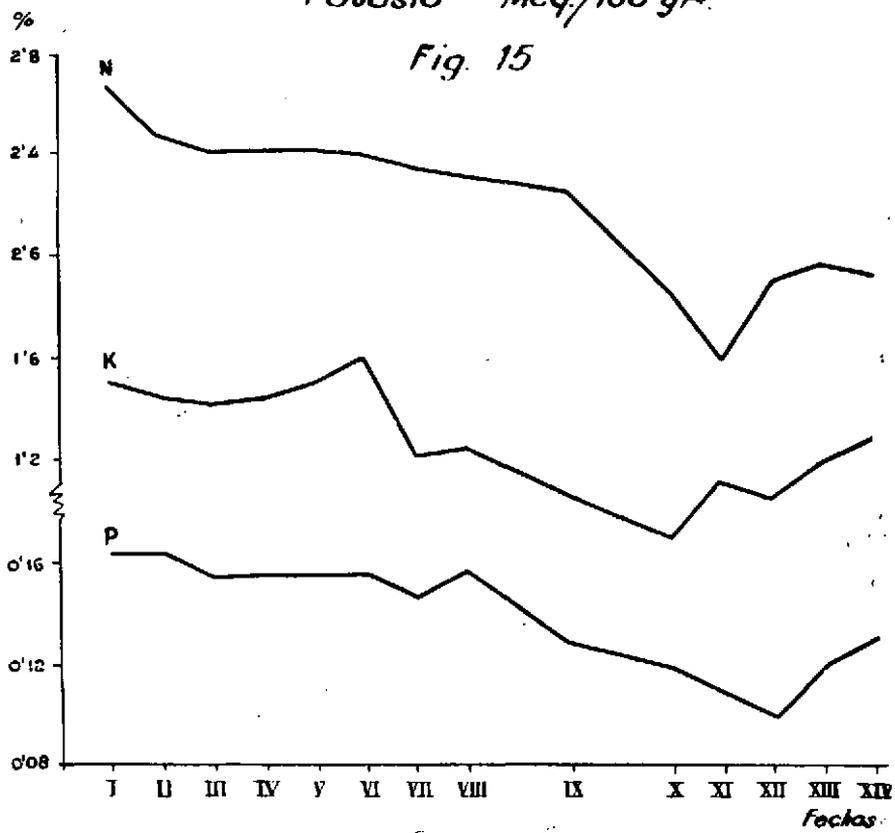


Fig. 16



En las figuras 16 a 20 se ha representado la evolución estacional de los diversos elementos a partir de los valores medios para cada fecha.

Las fluctuaciones en los porcentajes de nitrógeno, fósforo y potasio, figura 16, no muestran diferencias sensibles con las obtenidas por otros investigadores para citrus (64, 65, 66). Se observa que el análisis de la hoja no revela de forma inmediata las fertilizaciones de estos nutrientes realizadas a lo largo de la experiencia.

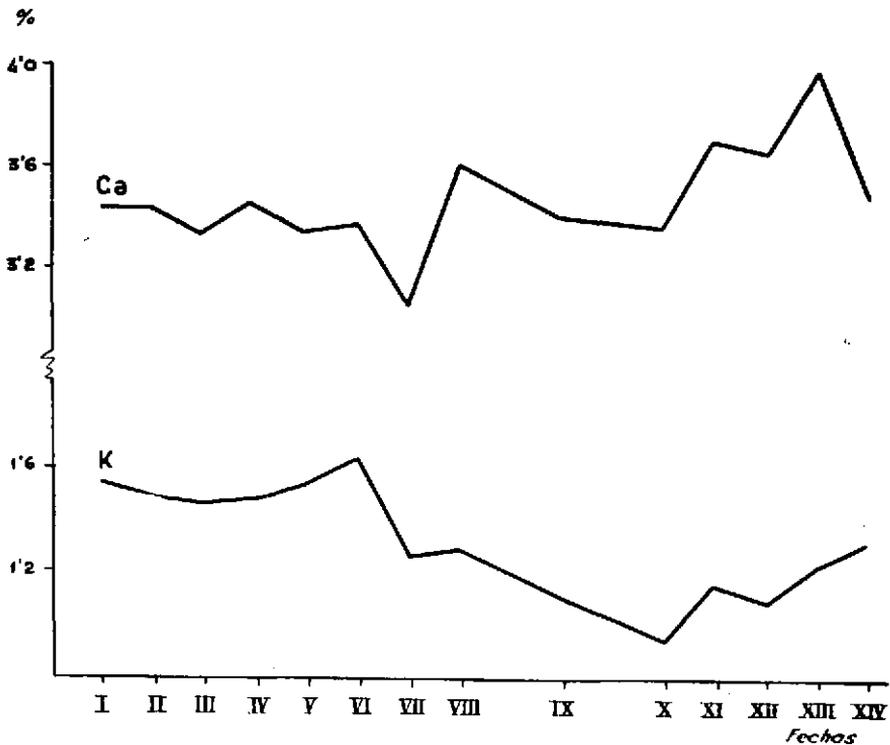


Fig. 17

Al comparar las curvas correspondientes a potasio y calcio, figura 17, vemos que el aumento del primero en los meses de noviembre y diciembre va acompañado de una disminución del contenido de calcio; los valores más bajos de potasio en los meses de marzo y abril corresponden a los más altos de calcio. Se aprecia, pues, el antagonismo ya mencionado de ambos nutrientes, aunque en este caso particular no resulte significativa su correlación.

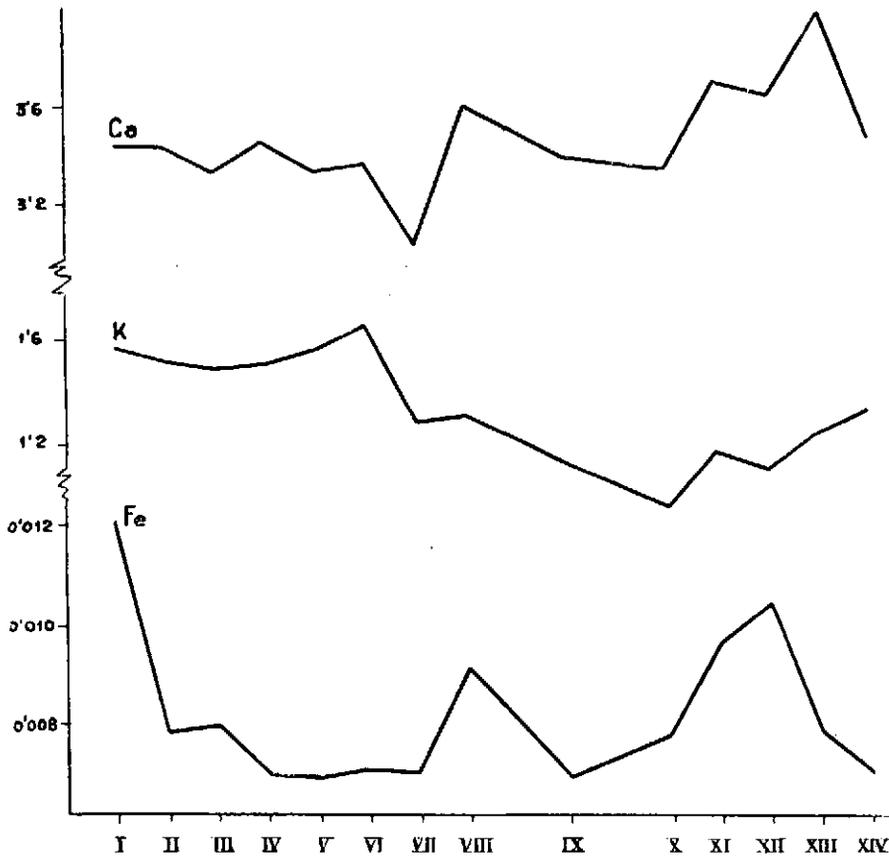


Fig. 18

El examen simultáneo de las evoluciones de potasio, calcio y hierro, revela los hechos siguientes: El aumento de potasio en noviembre y diciembre está unido a una elevación del porcentaje de hierro en el mes de enero, lo que parece probar los efectos sinérgicos de ambos y está ligado al descenso de calcio. Al disminuir los valores de potasio durante febrero y marzo, aumentan los de calcio; el descenso que cabría esperar del hierro, se ha compensado con el aporte de sulfato ferroso al suelo en esta fecha. Ello parece probar la influencia, del potasio sobre los otros nutrientes, así como, que a pesar de las características alcalinas del suelo, la absorción del hierro no está impedida totalmente.

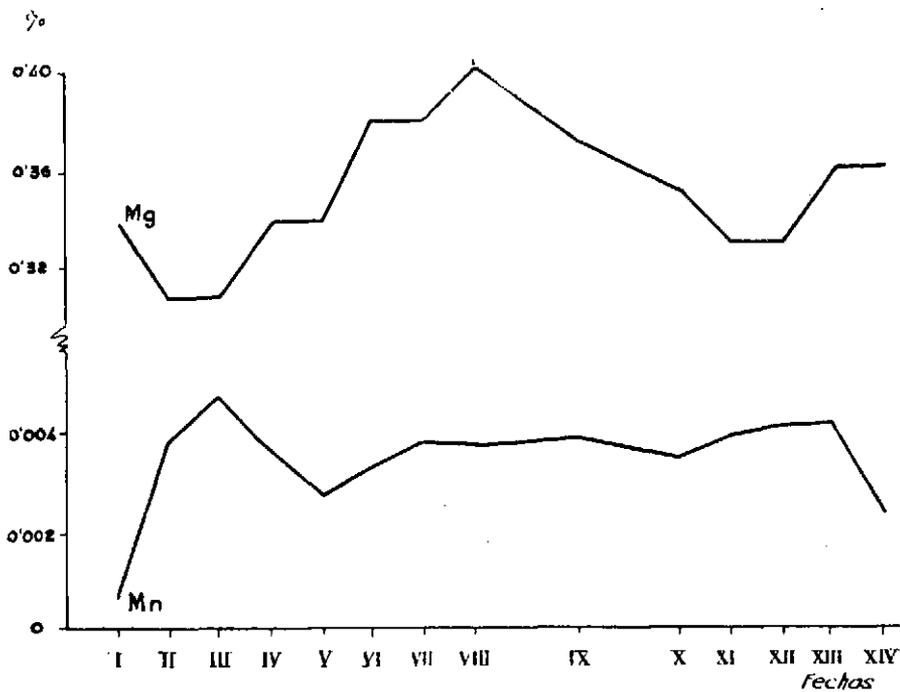


Fig. 19

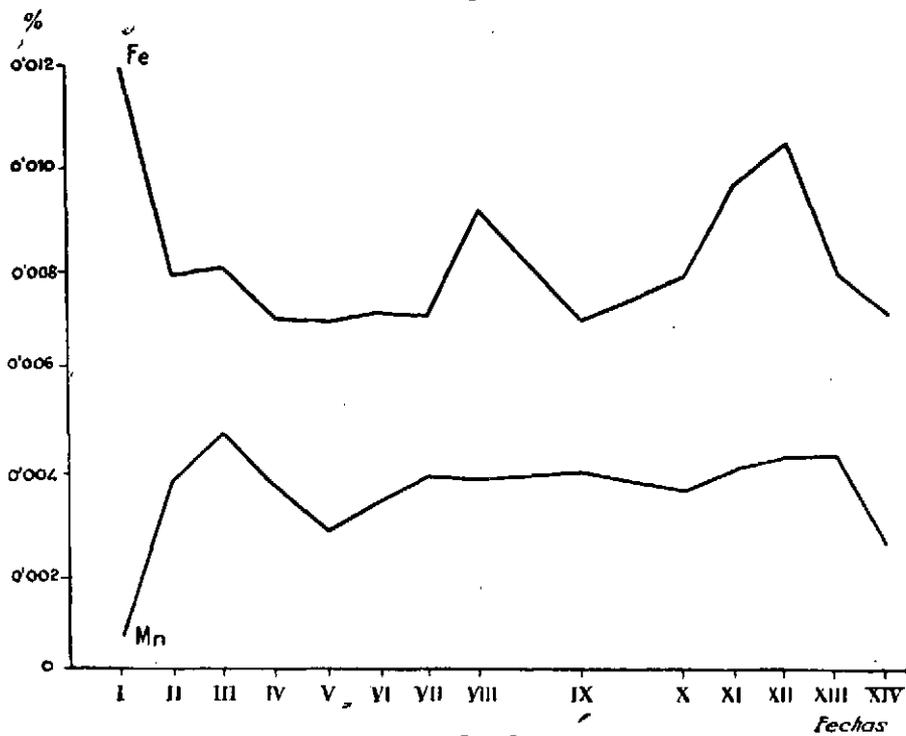


Fig. 20



Para el magnesio, el tramo de la curva correspondiente a octubre y noviembre sugiere una posible interacción Mn/Mg, ya que su descenso coincide con el aumento brusco de manganeso. En este sentido hay pues un cierto paralelismo entre magnesio y hierro, perturbado a partir de finales de marzo por el suministro ya indicado de sulfato ferroso.

Finalmente, la comparación entre las variaciones de hierro y manganeso, confirma claramente el antagonismo ya conocido, sobre todo en los meses de octubre y noviembre. Posteriormente, la adición de sulfato de hierro y el efecto debido al potasio, sin aparente significación para el manganeso, modifican el resto de la curva correspondiente al hierro.

En la tabla n.º LI expresamos las diversas relaciones entre nutrientes, calculadas según CAIN (67) en miliequivalentes por cien gramos de material seco, para diversas estaciones y al comienzo y fin de la experiencia.

En la mayoría de estas relaciones se observan grandes variaciones estacionales mientras que las de N/P, N/K, Ca/Mn, Ca/Fe, Fe/Mn, Mg/Ca y Mg/Mn permanecen dentro de unos límites mucho más estrechos.

TABLA LI

Relación	E P O C A				
	Otoño	Invierno	Primavera	Com. exp.	Final exp.
N/P	21,30	22,30	23,40	22,50	21,00
N/K	1,40	1,56	1,48	1,49	1,28
N/Mg	19,70	15,90	13,70	20,70	13,70
N/Ca	3,13	3,05	2,14	3,41	2,39
N/Fe*	1,33	1,27	0,84	0,90	1,11
N/Mn*	4,10	3,87	2,75	23,20	5,00
P/Fe*	62,20	56,80	36,00	40,20	52,70
P/Mn*	0,19	0,17	0,11	1,04	0,24
K/Mg	14,00	10,30	9,30	13,90	10,70
K/Ca	2,24	2,05	1,46	2,29	1,86
K/Fe*	0,95	0,83	0,57	0,61	0,86
K/Mn*	2,93	2,51	1,86	15,68	3,87
Ca/Fe*	0,43	0,41	0,39	0,26	0,46
Ca/Mn*	1,30	1,30	1,30	6,85	2,09
Mg/Ca	0,16	0,19	0,16	0,16	0,17
Mg/Mn*	0,21	0,24	0,20	1,12	0,36
Fe/Mn	3,10	3,10	3,30	25,60	4,50

* Valores divididos por 1.000.

La experiencia descrita informa sobre algunos aspectos que merecen ser comentados.

En primer lugar, debe subrayarse la escasa influencia que el manganeso parece ejercer sobre la evolución de los macronutrientes principales. Por otra parte el posible antagonismo Mn/Mg y la confirmación del Fe/Mn abre un campo interesante de trabajo sobre estos tres elementos tan ligados en procesos importantes de la vida vegetal.

Finalmente las notables variaciones de las relaciones nutritivas calculadas explican las grandes divergencias existentes en la bibliografía y demuestran que estas magnitudes sólo tienen interés cuando se mencionan comparativamente.

TECNICAS

SUELO

TOMA DE MUESTRA

La muestra representativa de cada uno de los campos estudiados, siempre menor de 2,5 Has., está formada por la reunión de 20 a 30 submuestras distribuídas en zig-zag sobre la superficie total del campo, y obtenidas a una profundidad de 0-20 cm. Para ello utilizamos una sonda cuya parte inferior, de 20 cm. de longitud, está abierta en media caña y termina en una punta afilada. Los taladros los realizamos dentro de la zona de goteo del árbol con orientaciones distintas respecto al tronco (68).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Después de seco el material al aire, a la temperatura ambiente, se desmenuza y tamiza a través de malla de 2 mm., quedando así separada la grava de la tierra. De esta última y siguiendo el sistema de cuarteo, mediante un aparato adecuado, obtenemos la muestra media, sobre la cual se realizarán las distintas determinaciones analíticas.

ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO

Fundamento.—El método adoptado, sigue en líneas generales la técnico de ROBINSON, de separación mecánica de las distintas fracciones, con ligeras modificaciones que le hacen más rápido y sencillo (69).

Reactivos.—Agua oxigenada de 20 volúmenes.

Dispersante: Metafosfato sódico 35,70 grs.
 Carbonato sódico 7,94 »
 Agua hasta 1 litro

Método.—Se destruyen los coloides orgánicos de 5 grs. de muestra con 10 ml de agua oxigenada, calentando a 40° C hasta que cese el desprendimiento de gas. Después se transfiere a un tubo de ensayo de dimensiones determinadas, añadiendo unas gotas de agentes dispersante y enrasando con agua hasta una altura de 20 cm. Se agita un par de veces por inversión; después de 9 minutos 36 segundos se decanta en una cápsula de dimensiones también normalizadas, repitiendo de nuevo todo el proceso.

El depósito del tubo de ensayo corresponde a las arenas gruesa y fina, que se separan aún húmedas por tamizado, pesándolas una vez secas.

La cápsula en que se recogieron los decantados, contiene las fracciones de limo y arcilla, llevando el nivel de aquella a 4 cm, el limo se deposita en 3 horas 12 minutos, decantamos y repetimos la operación. El residuo que queda en la cápsula se seca y pesa. La fracción arcillosa se determina por diferencia.

CAPACIDAD DE CAMBIO DE CATIONES

Fundamento.—Desplazamiento de los cationes de cambio por una fuerte concentración de ión bario y sustitución de éste por el ión magnesio (70).

Reactivos.—Acetato bórico N. a pH 7.
 Sulfato magnésico 0,1 N.
 Complexona III 0,05 M.

Método.—A un gramo de suelo se añaden 25 ml de acetato bórico agitando vigorosamente durante un minuto. Se centrifuga y decanta, y el residuo lo tratamos con 25 ml, exactamente medidos, de sulfato magnésico, agitando y centrifugando como antes. En el líquido claro sobrenadante se determina, con complexona, el magnesio que no ha intervenido en el desplazamiento. El magnesio consumido es equivalente a la capacidad de cambio.

CARBONATOS TOTALES

Fundamento.—Medida del volumen de CO_2 desprendido por la acción del ácido clorhídrico sobre los carbonatos de la muestra.

Reactivos.—Acido clorhídrico 1 : 1.

Carbonato cálcico.

Método.—Se calibra el calcímetro BERNARD con carbonato cálcico puro, deduciéndose de este ensayo el peso de muestra de suelo a tomar, para que las lecturas obtenidas representen directamente porcentajes de carbonato cálcico.

CARBONATO CÁLCICO ACTIVO

Fundamento.—Esta técnica está basada en la determinación de la fracción de carbonato cálcico que reacciona con el oxalato amónico a pH 7.

Reactivos.—Oxalato amónico N/5 a pH 7.

Permanganato potásico N/10.

Acido sulfúrico al 10 %.

Método.—10 grs. de suelo se agitan durante dos horas con 250 mls de oxalato amónico. Se valora, en medio sulfúrico, una porción alícuota del filtrado con permanganato potásico. Obteniéndose por diferencia con un ensayo en blanco el oxalato que ha reaccionado (71).

MEDIDAS DE pH

Las medidas de pH en agua y en cloruro potásico N, se realizaron sobre pasta saturada, con electrodo de vidrio en potenciómetro BECKMAN.

MATERIA ORGÁNICA

Fundamento.—Medida fotocolorimétrica de la concentración de Cr^{3+} procedente de la reducción del dicromato potásico, por la materia orgánica presente en la muestra (72).

Reactivos.—Dicromato potásico N.

Acido sulfúrico concentrado.

Método.—A 1 gr. de suelo se le añaden 10 mls de la disolución de dicromato potásico y 20 ml de ácido sulfúrico. Se agita y deja reposar una hora, al cabo de la cual, se agregan 100 ml de agua destilada y se agita nuevamente, dejando en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se decanta y filtra cuidadosamente y en el filtrado se determina la absorción a $580 \text{ m}\mu$ frente a un ensayo en blanco.

NITRÓGENO TOTAL

Fundamento.—El método consiste en la valoración del amoníaco desplazado del sulfato amónico resultante en la reducción de las diversas formas de nitrógeno procedentes de la muestra.

Reactivos.—Acido sulfúrico diluído 3 : 2,5.

Mezcla catalizadora:

Selenio metálico (polvo)	10 %
Sulfato de cobre	25 %
Sulfato potásico	65 %

Disolución de hidróxido sódico 35 %.

Acido clorhídrico N/14.

Disolución de ácido bórico al 2 % + 1 % de indicador.

Indicador:

Rojo de metilo al 0,066 % en alcohol.	50 %
Verde de bromocresol al 0,033 % »	50 %

Método.—1 gr de suelo y 1,5 de mezcla catalizadora, se atacan con 15 ml de ácido sulfúrico, en un matraz KJELDHAL, hasta alcanzar una coloración verde manzana. Una vez frío se destila con arrastre de vapor, el amoníaco desplazado por adición de 45 ml de la disolución de hidróxido sódico, recogiendo el destilado sobre ácido bórico. El amoníaco se valora con clorhídrico N/14 hasta restablecer la coloración inicial (73).

FÓSFORO ASIMILABLE

Fundamento.—Determinación fotocolorimétrica según (74) de la fracción de fósforo extraída por el reactivo de BRAY y KURTZ (75).

EXTRACCIÓN

Reactivos.—Fluoruro amónico 1,11 g.
Clorhídrico 0,025 N hasta 1 litro

Método.—Se agitan durante 40 segundos 5 gr de suelo con 50 ml de disolución extractora, filtrando seguidamente.

DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA

Reactivos.—A)	Molibdato amónico	100 gr
	Amoníaco	10 ml
	Agua	hasta 1 litro
B)	Metavanadato amónico	2,35 gr
	Acido nítrico d. 1,33	7 ml
	Agua	hasta 1 litro
C)	Disolución A	100 ml
	» B	100 ml
	Acido nítrico d. 1,33	97 ml
	Agua	203 ml

Método.—Se mezclan partes iguales del extracto de suelo y del reactivo C. Después de 10 minutos se lee la absorción en longitud de onda 420 m μ .

CATIONES ASIMILABLES

PERCOLACIÓN

Fundamento.—Está basado el método en el desplazamiento, por el ión amonio, de los cationes de cambio, a pH 7 (76).

Reactivo.—Acetato amónico 1 N. a pH 7.

Método.—5 gr de suelo se colocan en un tubo de percolación y se les añaden 100 ml del reactivo. La operación debe durar de dos a tres horas. Finalmente se completa a 100 ml el volumen del percolado.

SODIO Y POTASIO ASIMILABLES

Los contenidos de estos elementos se determinan por fotometría de llama en el extracto anterior, convenientemente diluido.

CALCIO ASIMILABLE

Reactivos.—Complexona III 0,1 M.

Disolución de hidróxido sódico al 10 %.

Disolución saturada de murexida.

Disolución patrón de calcio (1 ml = 1 mg. Ca)

Método.—10 ml. del percolado se llevan a pH 12 por adición de hidróxido sódico. Se añaden unas gotas del indicador hasta intenso color rojo burdeos y se valora con complexona hasta un color púrpura estable (74).

MAGNESIO ASIMILABLE

Reactivos.—Complexona III 0,1 M.

Disolución tampón de PH 10:

Cloruro amónico 54 gr

Hidróxido amónico al 25 % 350 ml

Agua hasta 1 litro

Indicador:

Disolución alcohólica de negro de eriocromo T al 10 %.

Disolución patrón de magnesio (1 ml = 1 mgr de Mg)

Método.—A 10 ml del percolado se le agregan 10 ml de la disolución tampón y varias gotas del indicador. Se valora con complexona III hasta viraje a azul brillante. El consumo de reactivo corresponde a la suma de los contenidos de calcio y magnesio presentes en la muestra (77).

DETERMINACIÓN DE SALINIDAD, CLORUROS Y SULFATOS

Fundamento.—Extracción de los iones con agua destilada.

Método.—50 grs. de suelo se agitan durante una hora con 250 ml de agua destilada. En el filtrado determinamos (81):

Salinidad.—Por conductimetría.

Cloruros.—Por volumetría.

Sulfatos.—Por gravimetría.

MANGANESO

Fundamento.—Extracción de las diversas fracciones de manganeso existente en el suelo, mediante diferentes reactivos y posterior valoración colorimétrica del mismo en cada una de ellas

MANGANESO DE CAMBIO

Reactivo.—Disolución de nitrato magnésico M a pH 7. —

Método.—10 grs de suelo se agitan durante una hora con 40 mls del reactivo, después de filtrado se determina el Mn extraído (78).

MANGANESO FÁCILMENTE REDUCIBLE

Reactivos.—Disolución de nitrato magnésico M a pH 7, conteniendo 0,012 % de hidroquinona.

Método.—10 grs de suelo se agitan con 40 mls de reactivo durante una hora, se filtra e inmediatamente determinamos el Mn extraído (78).

MANGANESO TOTAL

Reactivos.—Acido perclórico 60 %.

Acido nítrico 1 : 1.

Método.—1 gr de suelo finamente pulverizado, se ataca durante dos horas con HClO_4 , evaporando hasta sequedad. Después se agrega 5 mls de NO_3H y se calienta de nuevo hasta que desaparece la tonalidad marrón. Se filtra y el residuo se lava con agua destilada, repetidas veces, hasta alcanzar un volumen de 50 mls (79).

DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA

Fundamento.—Medida de la intensidad del color violeta debido a la oxidación del Mn^{2+} a Mn^{7+} , y comparación con una solución patrón.

Reactivos.—Periodato sódico.

Acido fosfórico.

Método.—En un tubo de ensayo se colocan unos 50 mgs de IO_3Na . $3\text{H}_2\text{O}$ y medio centímetro cúbico de ácido fosfórico, después se agrega una cantidad de problema tal que su dilución final no sobrepase las 20 p.p.m., completando con agua destilada, si fuera necesario hasta un volumen total de 5,5 cc. Se calienta en baño maría durante una hora, y una vez frío se lee la absorción, en el fotómetro, empleando una longitud de onda de 525 $\text{m}\mu$ (80).

PLANTA

TOMA DE MUESTRA

Las muestras de hojas las hemos tomado con arreglo a los criterios siguientes (23):

I.—Se eligió hojas de una edad comprendida entre los tres y siete meses.

II.—En árboles individuales la muestra tenía como mínimo sesenta hojas, tomadas describiendo un círculo alrededor del árbol

III.—Cuando se trataba de tomar muestra de una plantación se escogían diez árboles como representativos de la parcela, la cual tenía aproximadamente 1/4 de hectárea, tomando diez hojas por árbol y reuniéndolas para formar una sola muestra.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra recogida en el campo se somete, lo más rápidamente posible, a un primer lavado con agua corriente, separando así la mayor parte de materiales extraños; seguidamente se lava con una disolución al 0,05 % de un detergente no iónico en agua destilada, y por último reciben un tercer y cuarto lavado con agua bidestilada. A continuación se la somete a un desecado previo a 60-70° C durante unas cuatro horas. Se pulverizan en un triturador y el material resultante se conserva en pequeñas bolsas de plástico (23).

EXTRACTO DE HOJAS

Fundamento.—Digestión húmeda del material.

Reactivos.—Ácido nítrico concentrado.

» » 1 : 1.

» » 0,6 N.

» perclórico al 60 %

Método.—1,5 gr del material pulverizado y desecado a 105° C hasta peso constante se le añaden 3 ml de ácido nítrico concentrado y se calienta casi a sequedad. Se repite el tratamiento, y después de agregar 6 ml de ácido perclórico y 6 ml de ácido nítrico 1 : 1 se evapora lentamente hasta cerca de sequedad. El residuo se disuelve en ácido nítrico 0,6 N y se lleva a un volumen de 25 ml (18).

Nitrógeno total.—Se utiliza la misma técnica que en suelo, pero en escala semimicro, partiendo de 50 mg de material pulverizado y seco, al que se adicionan 0,8 gr de mezcla catalizadora y 2 ml de ácido sulfúrico.

Fósforo.—Sobre el extracto de la digestión, diluido 1 : 5, se realiza la determinación fotocolorimétrica como queda descrita para suelos.

Potasio.—Se determina fotométricamente sobre los extractos de hojas a dilución 1 : 250.

Calcio y magnesio.—Se determina complexométricamente sobre 2 ml del extracto de hojas.

Manganeso.—Se valora, como se ha descrito en suelo, utilizando 5 ml de extracto de hojas.

HIERRO

Fundamento.—Medida de la intensidad de color rojizo, debido al complejo formado entre Fe^{2+} y la o-fenantrolina (82).

Reactivos.—Acetato amónico al 20 %.

Hidroquinona.

O-fenantrolina al 0,5 % en alcohol.

Preparación:

Disolución de acetato amónico 60 ml

Hidroquinona 0,3 gr

Disolución de o-fenantrolina 10 ml

Método.—A 1 ml de extracto de hojas se le añaden 7 ml del reactivo, recientemente preparado, y después de media hora se efectúan las lecturas con una longitud de onda de 480 m μ .

CLOROFILA

Fundamento.—Extracción y determinación colorimétrica (83).

Reactivo.—Alcohol etílico de 96°.

Método.—1 gr de hojas frescas se mezcla con 0,5 gr de arena y unas gotas de alcohol, se reducen a pulpa fina en un mortero y se añaden 10 ml de alcohol, filtrándolos a continuación. Los triturados y lavados se repiten hasta que los líquidos pasen sin coloración; se reúnen todos los líquidos de lavado y se llevan a 100 ml en matraz aforado.

La clorofila se determina inmediatamente después de haber sido obtenida la solución, interpolando las lecturas sobre una curva patrón de clorofila pura (84), empleando para ello cubetas de 4 ml y filtro rojo I LFOR 608.

CONSIDERACIONES FINALES

Los primeros ensayos preparatorios del presente trabajo mostraron un grupo de hechos tan interesantes y al mismo tiempo tan dispersos, que planteó a nuestro ánimo un serio problema de sistemática. Nosotros lo hemos resuelto, con menguas de la profundidad, optando por realizar un bosquejo amplio de las numerosas facetas que el manganeso presenta dentro de la complicada fisiología del limonero Verna.

Y en efecto creemos, quizá audazmente, haber acertado, ya que de resultas de esta Memoria surgen varias rutas importantes de trabajo de interés teórico y práctico que vamos a comentar brevemente:

La circunstancia repetidamente observada por nosotros de la ausencia de fruto en las ramas cuyas hojas muestran la deficiencia, indica claramente que el manganeso juega un importante papel en los procesos de fructificación, indicación que se confirma rápidamente sin más que suministrar por vía foliar una disolución manganosa. La rama afectada, al curarse, produce rápidamente brotes florales que originan un número de frutos a veces desproporcionados. En este sentido se aprecia una clara diferencia de funciones respecto del hierro, pues la deficiencia de éste no produce, por lo menos en Citrus, inhibición de la fructificación, hasta el punto de que es corriente ver árboles gravemente cloróticos, con defoliación casi absoluta y cargados de frutos.

Simultáneamente con la anterior observación, aparece el hecho curioso de la migración del manganeso en la hoja, comprobada experimentalmente por nosotros en las determinaciones citológicas y químicas realizadas sobre las zonas clara y oscura, netamente diferenciadas

Respecto del papel de los microorganismos en la absorción y metabolismo de este nutriente, queda justificado en esta memoria que su acción no es meramente oxidativa sino que entra plenamente en un proceso de competencia que con una investigación más profunda tal vez permita explicar muchos fenómenos carenciales adjudicados muy frecuentemente a las condiciones físico-químicas y no a las biológicas de los suelos.

El estudio realizado en los cloroplastidios resulta extraordinariamente revelador, sobre todo, desde dos puntos de vista: la influencia del nutriente en las características de tan importantes orgánulos y las diferencias con relación al Fe, que unidas a las ya indicadas, respecto de la fructificación, justifican una independencia de funciones, alejándose del criterio muy generalizado que considera a estos nutrientes exclusivamente antagonicos.

Los hechos indicados más la posible interacción con el magnesio, puestos de manifiesto con nuestro trabajo, sugieren la conveniencia de un estudio más profundo que, Dios mediante, pretendemos abordar en el futuro con las miras de esclarecer más completamente el papel importante de este nutriente y al mismo tiempo contribuir al mejor conocimiento de los Citrus, que tanto significan económicamente para nuestra Patria.

CONCLUSIONES

1.^a Se diagnostica por vez primera una deficiencia de manganeso en el limonero Verna murciano, que afecta gravemente a la producción.

2.^a Se demuestra la existencia de correlación entre los diversos estados de manganeso en los suelos de las zonas carentes y sus contenidos de materia orgánica, caliza, arena fina y limo.

3.^a El estudio detenido de los suelos de las zonas deficitarias demuestra que la única causa de naturaleza físico-química, determinante de la deficiencia, es el pH alto inducido por el exceso de caliza.

4.^a Se ha efectuado el análisis microbiológico de los suelos de Guadalupe, comprobándose la existencia de una gran actividad microbiana.

5.^a Se han aislado e identificado, en esta misma zona, los Hongos *A. versicolor*, *A. awamori*, *A. amstelodami*, *A. niger*.

6.^a En experiencias de laboratorio se ha demostrado por vez primera que el *A. versicolor* metaboliza cantidades notables de manganeso divalente, lo que permite sugerir la existencia de un proceso de competición hongo-planta favorable al primero. La localización máxima de la deficiencia, observada en estos suelos, permite admitir la posibilidad de que dicho fenómeno de competición coadyuva a la aparición de la deficiencia.

7.^a Después de realizar un estudio a fondo para la curación de la deficiencia, se ha deducido un método por vía foliar extraordinariamente útil, que incluye en la disolución aplicada un tensioactivo no iónico muy eficaz.

8.^a Se ha determinado el número y volumen cloroplastidiales de las zonas claras y oscuras de las hojas deficientes en manganeso, demostrándose a su vez diferencias notables entre sí y respecto de la hoja normal.

9.^a Del estudio comparativo con la clorosis férrica, se deduce la influencia de ambos micronutrientes sobre el número y tamaño de los cloroplastidios, dando lugar al orden siguiente de más a menos: hoja normal, zona verde oscura, zona verde clara y hoja deficiente en hierro.

10.^a Se ha establecido por vez primera el intervalo de normalidad del manganeso en la hoja de limonero Verna. Contenidos inferiores a 13 p.p.m. revelan deficiencia de aquella planta cuando se cultiva en suelos calizos.

11.^a Se demuestra que el contenido de manganeso y de clorofila en la hoja deficiente no es uniforme; los valores mínimos medios que corresponden a la zona clara están por debajo de 5 p.p.m. y 700 mgs por 100 grs (hoja fresca) respectivamente.

12.^a Se demuestra que el medio externo influye de manera directa en los contenidos de manganeso de las hojas de limonero Verna.

13.^a La relación Fe/Mn es notoriamente más alta en las hojas deficientes, alcanzando su valor máximo para la zona clara de acuerdo con la conclusión 11.^a.

14.^a El análisis comparativo entre hojas normales y deficientes, conduce a admitir que los estados deficitarios elevan los contenidos de nitrógeno y hierro.

15.^a Se presentan los datos de la composición mineral de la hoja de limonero Verna, curado de una deficiencia de manganeso, a intervalos de 15 días durante un período de 8 meses.

16.^a Sobre los árboles citados se ha realizado el estudio de las variaciones estacionales de N, P, K, Ca, Mg, Fe y Mn.

17.^a Se calculan los coeficientes de correlación entre varios pares de elementos nutritivos; su valor positivo sugiere que estos elementos varían simultáneamente dentro de las hojas.

18.^a Se confirma el antagonismo hierro-manganeso.

19.^a Se sugiere un posible antagonismo entre magnesio-manganeso.

20.^a Se ha determinado un grupo de relaciones entre los diversos nutrientes, demostrando su variabilidad en el ciclo vegetativo anual.

21.^a Se proponen nuevas rutas de trabajo para el mejor conocimiento del papel del manganeso en Citrus.

BIBLIOGRAFIA

- (1) LOEW.—*Landw. Jahrb.*, 32, 437-448 (1903).
- (2) BERTRAND, G.—*Compt. rend.*, 141, 1255-1257 (1905).
- (3) MAZE, P.—*Ann. Inst. Pasteur*, 28, 21-46 (1914).
- (4) SJOLLEMA, B. y HUDIG, J.—*Verlag. Landbouwk. Onderzoek*, 5, 29-157 (1909).
- (5) HILTNER, E.—*Landw. Jahrb.*, 60, 689-769 (1924).
- (6) CLAUSEN, H.—*Mitt. deut. Landw. Ges.*, 25, 631-639 (1910).
- (7) SAMUEL, G. y PIPER, C. S.—*J. Agr. South Australia*, 31, 696-705 y 789-799 (1928).
- (8) HAAS, A. R. C.—*Hilgardia*, 7 (4); 181-206 (1932).
- (9) BLONDEL, L., y CASSIN, J.—*Rev. Franç. Oranger*, 21, 6-8. Argelia, 1915.
- (10) PASINETTI, L.—*Ann. facoltà sci. agrar. Univ. Palermo*, 1, 13-43. Sicilia (1950).
- (11) RUSSO, F. y RACITI, G.—*Técnica Agrícola*, 3-4, Sicilia (1954).
- (12) CHANDLER, A. L.—*Citrus Leaves*, 26, 28-30. California (1946).
- (13) CHAPMAN, H. D., BROWN, S. M. y BAYNER, D. S.—*Citrus Leaves*, 25, 17-28. California (1945).
- (14) PARKER, E. R. y SOUTHWICK, R. W.—*Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 39, 51-58. California (1941).
- (15) CAMP, A. F. y FUDGE, B. R.—*Florida Agr. Exp. Sta. Bull.*, 335 (1939).
- (16) CONNOR, J.—*Australian J. Agr. Research*, 5, 31-38 (1954).
- (17) LRVITT, E. C. y NICHOLSON, R. I.—*Agr. Gaz. N. S. Wales*, 52, 283-286. Australia (1914).
- (18) CARPENA, O., GUILLÉN, M. G. y COSTA, F.—*Anal. Edaf.* XVIII, 765-782. España (1959).
- (19) CARPENA, O., ABRISQUETA, C., GUILLÉN, M. G. y SÁNCHEZ, J. A.—*Anal. Edaf.*, XVI, 43-58 (1957).
- (20) CARPENA, O., GUILLÉN, M. G., SÁNCHEZ, J. A.—*Anal. Edaf.*, XVI, 259-272 (1957).
- (21) ROACH, W. A.—*Ann. Bot. Lond.*, 3, 155-226 (1939).
- (22) CARPENA, O., ORTUÑO, A. y LOUSTAU, J.—*Anal. Edaf.*, XVIII, 329-45 (1959).
- (23) CARPENA, O., ABRISQUETA, C., SÁNCHEZ, J. A. y GUILLÉN, M. G.—*Anal. Edaf.*, XVI, 59-75 (1957).
- (24) LEEPER, G. W.—*Proc. Roy. Soc. Victoria*, 47, 225-61 (1935).
- (25) LEEPER, G. W.—*Soil. Sci.*, 63, 79-94 (1947).
- (26) MEDRASKI, H. J. y WHISON, J. H.—*Proc. Am. Soc. Soil Sci.*, 19, 461-4 (1955).
- (27) C. K. FUJIMOTO y G. D. SHERMAN.—*Soil. Sci.*, 66, 131 (1948).
- (28) HURWITZ, C.—*Soil. Sci.*, 63, 79-94 (1948).
- (29) CHRISTENSEN, P. D. y TOTB, S. J.—*Proc. An. Soc. Soil. Sci.*, 15, 279-82 (1950).
- (30) BRUJINCK, M. W.—*Proc. Sci. Sect. Koninkl. Akad. Wetenschap. Amsterdam*, 16, 397-401 (1913).
- (31) SÖRNGEN, N. L.—*Zentr. Bakt.*, 40, 545-54 (1914).
- (32) TIMONIN, M. L.—*IV Congr. Inter. Soil. Sci.*, Amsterdam, 3, 97 (1950).



- (33) FISCHER, H.—*Landw. Jshrb.* 38, 355-64 (1909).
- (34) FEHER, D.—*Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldshodens.* Berlin (1933).
- (35) WAKSMAN, S. A.—*Soil. Sci.*, 14, 283-98 (1922).
- (36) VERNA, L. C. y HENNERO, F. J.—*Micología.* El Ateneo. Buenos Aires, 174 (1952).
- (37) SHERMAN, G. D. y HARMER, P. M.—*Proc. Soil. Sci. Soc. Amer.*, 7, 398 (1943).
- (38) MANN, P. J. G. y HEINTZE, S. G.—*J. Agric. Sci.*, 37, 23 (1947).
- (39) DUGET, G., BATS, J. y DUPONY, B.—*Methodes de Dosage Colorimetrique Rapide.*—Station de Recherches viticoles et d'Arboriculture frutiere du Sud-ouest Pont-de-la-Maye (Gironde) (1957).
- (40) WALLACE, T.—*Ann. Rent. Agr. Hort. Research.* Sta. Long Ashton, Bristol, 19-23 (1940).
- (41) GAREY, C. L. y BARRER, S. A.—*Soil. Sci. Soc. Am. Proc.*, 16, 173-5 (1952).
- (42) EVANS, H. J. y PURVIS, E. R.—*J. Am. Soc. Agron.*, 40, 1046-7 (1948).
- (43) STRECKEL, J. E., BERTRAMSON, B. R. y OHLROGGE, A. J.—*Proc. Am. Soc. Soil. Sci.*, 13, 18-111 (1948).
- (44) BRAUCHER, O. L. y SOUTHWICK, R. W.—*Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 39, 133-36 (1941).
- (45) SCHIPER, A. F. W.—*Jahrb. wiss. Bot.* 16, 1. (1885).
- (46) BINZ, A.—*Diss. Univ. Zurich.* Flora, 76. Erg. bd. zu. ig. (1892).
- (47) MEYER, A.—*Die Chlorophyllkorn.*, Leipzig, 1883.
- (48) SCHÜBHOFF, P. N.—*Die Plastiden.* Berlin 1924.
- (49) SHARP, W. L.—*An introduction to cytology*, 3.^a ed., New York, 1934.
- (50) GUILLIERMOND, A., MANGENOT, G. y PLANTEFOL, L.—*Traité de Cytologie Vegetale.* Paris 1933.
- (51) KÜSTER, E.—*Die Pflanzenzelle.* Jena, 1935.
- (52) HUBERT, R.—*Chloroplasts. Molecular. Structure.* Diss. Leiden, 1935.
- (53) HEITZ, E.—*Chloroplasts. Structure.* *Ber. dtsh. bot.*, 54, 362 (1936).
- (54) LOUSTAU, J., ORTUÑO, A. y CARRERA, O.—*Anal. Edaf.* XVII, 473-85 (1958).
- (55) CHAPMAN, H. D.—*Citrus Leaf Analysis.* California Agriculture, 11 (3), 10.
- (56) REUTHER, W. y SMIT, P. F.—*Leaf Analysis as a Guide to the Nutritional Status of Orchard Trees.*—VIII.^o Congrès International de Botanique, Paris, 1954.
- (57) CHAPMAN, H. D. y KELLEY, W. P.—*The Citrus Industry.* I, 1.^a ed.; WEBBER, H. J. y BATHCHELOR, H. D., *U. de California, Press.*, Berkeley y Los Angeles, págs. 719-766 (1948).
- (58) SMITH, P. F. y REUTHER, W.—*Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 55, 61-72 (1950).
- (59) CAMERON, S. H. y COMPTON, O. C.—*Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 46 60-68 (1945).
- (60) CAMERON, S. H. A. WALLACE y R. T. MUELLER.—*Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 63, 59-66 (1954).
- (61) HAAS, A. R. C. y BRUSCA, J. N.—*Calif. Citrograph*, 40, 320-21 (1955).
- (62) CHAPMAN, H. D. y VANSILOW, A. P.—*Calif. Citrograph*, 42, 32-35, 50-54 (1956).
- (63) SMITH, P. F. y otros.—*Plant. Physiol.*, 29, 349-55 (1954).
- (64) JONES, W. W., EMBLETON, T. W. y JOHNSTON, J. C.—*Cit. Leav.*, 35, 6 (1955).
- (65) JONES, W. W. y PARKER, E. R.—*Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 57, 101-3 (1951).
- (66) HERRERO, M. EGAÑA.—*An. Inst. Nac. Inv. Agron.*, 1, 217-24 (1952).
- (67) CAIN, J. C. y otros.—*Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 62, 22-24 (1953).
- (68) FITT, J. W. y NELSON, W. I.—*Advances in Agronomy*, VIII, 241-82 (1956).
- (69) DULAC, J. y BOUAT, A.—*Ann. Agron.* 456-59 (1951). France.
- (70) CECCONI, S. y PONESSELLO, A.—*Ann. Sper. Agr.* X, 127-32 (1956).
- (71) GALEP, P.—*Progrès Agricole et Viticole*, 128 (1947).
- (72) CAROLAN, R. J.—*Soil Sci.*, 66, 341-7 (1948).
- (73) DROUINEAU, G.—*Métodos de Análisis de suelos.* Station d'Agronomie Cap d'Alibes (1958).
- (74) KITSON, R. E. y MELLON, M. G.—*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 16, 379-83 (1944).
- (75) BRAY, R. H. y KURTZ, L. T.—*Soil Sci.*, 59, 39-45 (1945).
- (76) SCHOLLEMBERGER, C. J.—*Science*, 65, 552-3 (1927).
- (77) BIEDRIMAN y SCHWARZENBACH.—*Chimia*, 2, 1 (1948).
- (78) BOKEN, E.—*Plant and Soil*, VII, n.^o 3, 237-52 (1956).
- (79) KUANG LU CHENG, BRAY, R. H. y KURTZ, T.—*Anal. Chem.*, 25, 347-8 (1953).
- (80) SMITH, J. B.—*J. Assoc. Offic. Agr. Chemist.*, 33, 248-87 (1950).
- (81) DURAND, H.—*Les Soils Irrigables.* Direction d'Hydraulique et l'équipement Rural Alger (1958).
- (82) FORTNE, W. B. y MELLON, M. G.—*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 10, 60 (1938).
- (83) SCHENK, W.—*Planta*, 41, 290-310 (1952).
- (84) PETERING, H. G., WOLMAN, W. y HIBBARD, R. P.—*Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 12, 148 (1940).

SECCION BIBLIOGRAFICA

METHODS IN ENZYMOLOGY.—Vol. III.—**Preparación y ensayo de sustratos.**—Ed. Sidney P. Colowick y Nathan C. Kaplan.—Academic Press Inc., Publishers. New York, 1957. 1.154 páginas.

Después de dos volúmenes dedicados a la preparación y ensayo de enzimas la serie *Methods in Enzymology* tenía en preparación tres volúmenes más, dedicados a complementar lo que en el campo experimental necesita un enzimólogo.

El presente volumen tercero está dedicado a la preparación y ensayo de sustratos, problema que va adquiriendo envergadura conforme van apareciendo nuevos enzimas y, sobre todo, al completarse el conocimiento de sistemas multienzima, los cuales implican una serie de metabolitos intermedios que la industria química no siempre puede suministrar.

El libro, en sí, no es original, puesto que supone un extracto de preparaciones y métodos analíticos, la mayoría de ellos aparecidos ya en la bibliografía; esto resulta lógico. El verdadero mérito estriba en haber hecho esta selección encargándola a investigadores de primera fila que, en muchos casos, son autores o coautores de los métodos originales. Por ello interesa, no sólo al investigador, sino también al analista y, especialmente, al clínico.

En cuanto al sistema, se han ordenado las sustancias a estudiar pensando, más que en su naturaleza química, en los procesos metabólicos de que forman parte. Así, las siete secciones en que quedan encuadradas son: carbohidratos; lípidos y esteroides; componentes del ciclo del ácido cítrico; proteínas y derivados; ácidos nucleicos y derivados; coenzimas y fosfatos relacionados; determinación de compuestos inorgánicos.

F. Sabater

