

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE BORO NATURAL EN HOJAS DE CAFE, UTILIZANDO LA TECNICA DE AUTORADIOGRAFIA POR CAPTURA NEUTRONICA¹

Luis Guillermo Loría^{2/}, Ricardo Jiménez**, Michell Thellier****

RESUMEN

Con la Técnica de Autoradiografía por Captura Neutrónica se evaluó el coeficiente de absorción del boro en hojas jóvenes de plantas de café (var. Caturra), en 2 experimentos realizados en abril y noviembre de 1996. Se encontró que dicho coeficiente oscila entre 0.9 y 5.3 nmol/h. También, se estudió la concentración de B natural en hojas de café tomando en cuenta edad, sintomatología y tratamiento recibido, utilizando la misma técnica.

ABSTRACT

Determination of natural boron concentration in coffee leaves, using the autoradiography by neutron capture technique. The boron absorption coefficient in young coffee leaves was measured using autoradiography by neutron capture. In two experiments carried out in April and November, 1996, it was found that the coefficient varies between 0.9 and 5.3 nmol/h. The concentration of natural boron in coffee leaves in regard to age, symptoms and treatment received was also studied, using the same technique.

INTRODUCCION

La importancia del B en la nutrición de las plantas es bien conocida y la deficiencia de este elemento en muchos cultivos alrededor del mundo ha sido observada desde hace muchos años (Agulhon 1910, Shorrocks 1990). El metabolismo de este micronutriente en los cultivos toda-

vía hoy día es materia de discusión (Golbach 1997, comunicación personal) y el café no ha sido la excepción. Deficiencias de B en este tipo de cultivo han sido observadas en Centro y Sur América (De Lima Filho y Malavolta 1992). En este trabajo se estudia la concentración de B y la absorción del mismo en hojas de café. En ambos estudios se utiliza la técnica de radiografía por captura neutrónica, método utilizado en otros cultivos por los autores Thellier et al. 1988, Loría et al. 1992, Martini et al. 1978 y 1993.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Hojas de café de las Fincas San José (SJ) y CoopeAtenas (CA), provincia de Alajuela, fueron recolectadas tomando en cuenta sintomatología, edad y tratamiento recibido. Las plantas de

1/ Recibido para publicación el 8 de agosto de 1997.

2/ Autor para correspondencia.

* Laboratorio de Física Nuclear, Escuela de Física, Universidad de Costa Rica.
E mail: lloria@cariari.ucr.ac.cr

** Laboratorio de Física Nuclear, Escuela de Física, Universidad de Costa Rica. E mail: jdam@cariari.ucr.ac.cr

*** Laboratorio de Procesos Iónicos Celulares, Universidad de Rouen, Francia.
E mail: thellier@coloris-univ.rouen.fr

café de la primera finca en general presentaban síntomas visuales de deficiencia del elemento, aunque recibieron 3 aplicaciones foliares antes de la recolección de las muestras, mientras que en la segunda finca las plantas tenían un aspecto saludable y solamente la mitad de ellas recibieron una aplicación foliar de B.

Los especialistas en café aceptan 40 ppm como una concentración apropiada en hojas adultas y 25 ppm en jóvenes (Bertsch 1997, comunicación personal).

En el Cuadro 1 se presentan los rangos de las concentraciones de B (bajo, suficiente y alto) en hojas jóvenes y adultas de café (Carvajal 1984, Jones et al. 1992)

La cinética del B se estudió utilizando plantas de café (var. Caturra) suministradas por el laboratorio del Instituto del Café (ICAFE) y por el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica. Las plantas en promedio tenían una edad de 6 meses y crecieron a la luz y temperatura natural.

Cuadro 1. Concentraciones de B (ppm) en hojas de café que determinan el estado de las hojas con relación al nutrimento.

Tipo	Bajo	Suficiente	Alto
Hoja joven	20-24	25-75	>75
Hoja adulta	< 40	40-75	>75

Carvajal, 1984.

Protocolo experimental

A las hojas de café provenientes de las fincas se les midió su densidad frescas y secas, para luego incinerarlas, a una temperatura de 380°C, sobre un porta-objeto de cuarzo. La hoja se mantiene plana con un soporte de Cu, el cual a su vez elimina los esfuerzos de origen térmico durante la incineración. La hoja después de incinerada alcanza un grosor de $13 \pm 5 \mu\text{m}$ lo que evita el apantallamiento de las partículas alfa (α) que se emitirán durante las reacciones nucleares. La hoja incinerada se cubre con un detector de estado sólido, en este caso, de nitrato de celulosa (LR-115, Tipo 1.6 μm).

La cinética del B se estudió mediante 2 experimentos (abril y noviembre de 1996). En ambos experimentos se utilizó una solución de 164 mM de ácido bórico 97% (at/at), suplido por Sigma/Aldrich, en ^{10}B .

En el primer experimento de abril, 5 microgotas de 3 μl , 164 mM, fueron colocadas sobre una de las plantas aportadas por ICAFE-MAG, conteniendo 0.477 $\mu\text{mol } ^{10}\text{B}$ cada una. El B remanente en las hojas se lavó, al cabo de 48, 119, 192, 287 y 487 h, utilizando 0.5 ml agua bi-distilada al 0.5% en gelatina. Una gota de 3 μl de cada una de las soluciones de lavado fue colocada sobre un detector de estado sólido (LR-115, tipo 1.6 μm) y se irradiaron por un tiempo de 21 h. Los detectores se revelaron de acuerdo al método descrito arriba y luego se contó el número de trazos al microscopio. El número total de trazos provenientes de la gota se multiplicó por 500/3 con el fin de obtener el número total de trazos provenientes de las soluciones de lavado. Q se evaluó con uso de la ecuación (3).

En el segundo experimento de noviembre, sobre 2 plantas procedentes del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, se colocó en cada una 4 gotas de 5 μl de la solución 0.795 μmol . El B remanente en las gotas fue lavado al cabo de 72, 96, 120 y 144 h, con el método descrito para el experimento de abril del 96.

Las gotas colocadas sobre las hojas se denominarán gotas de fertilización, las cuales se dejan secar a temperatura ambiente, de acuerdo al protocolo establecido (Jiménez et al. 1988). Luego se utilizan las denominadas gotas de lavado.

La concentración de ^{10}B en las gotas de lavado se evaluó mediante curvas de calibración, las cuales se construyen depositando microgotas de soluciones de diferentes concentraciones de ácido bórico al 97% en ^{10}B sobre un detector de estado sólido.

Irradiación neutrónica

Los detectores que contenían las gotas de lavado, de calibración y los espodogramas (cenizas de las hojas) se irradian durante 21 h, a un

flujo térmico (neutrones cuya energía es de 0.025 eV) con un orden de magnitud de $10^4 \text{ n/cm}^2/\text{s}$, utilizando una fuente de ^{252}Cf , la cual tiene un período de semidesintegración de 2.65 años.

Bajo la irradiación con neutrones térmicos, los núcleos de los átomos de ^{10}B se rompen en 2 partículas ionizantes, de acuerdo a la reacción nuclear:



En el Cuadro 2 se presenta las características completas de la reacción nuclear descrita.

Cuadro 2. Características de la reacción nuclear $^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$.

Abundancia isotópica del ^{10}B en B natural %	Sección eficaz (Barns)	Energía de la partícula incidente eV	Energía de los productos de la reacción (MeV)	
18.3	4000	0.025	7%	93 %
			α 1.78	1.47
			Li 1.01	0.84

Cuando finaliza la irradiación, los detectores LR-115 son revelados en una solución de NaOH (2.5 M) a una temperatura controlada de $60 \pm 01^\circ\text{C}$, durante un tiempo de 55 min, con el propósito de incrementar los diámetros de los trazos latentes y de esta forma hacerlos visibles al microscopio óptico. Los trazos se contaron con un microscopio Reichert, One Fifty, y con un microscopio Olympus, BH-2. En ambos microscopios se utilizó un campo de 200 X, las áreas de visión fueron en su orden de 9×10^{-8} y $25 \times 10^{-8} \text{ m}^2$.

RESULTADOS

Curvas de calibración

El Cuadro 3 presenta los resultados de la curva de calibración realizada en abril de 1996, la cual se construyó depositando gotas de 3 y 5 μl de diferentes concentraciones de ^{10}B al 0.5% en gelatina y 2% de manitol para homogenizar el B en las gotas. El número de moles contenido en cada gota se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\eta = c * f * v \quad (2)$$

donde:

η = número de moles en la gota
 c = concentración de ^{10}B en la solución en mM
 f = porcentaje de ^{10}B en el B total
 v = volumen de las gotas

La Figura 1 muestra la curva analítica del número de trazos en función de la concentración, obtenida mediante el método de cuadrados mínimos, donde la ecuación de la curva está dada por:

$$N = 270 + 1.14 \times 10^{12} Q \quad (3)$$

donde:

N = número de trazos contados por gota
 Q = concentración de ^{10}B en cada gota

La curva analítica de noviembre de 1996 se construyó con el método descrito, la forma simbólica de ella se expresa en la siguiente ecuación:

$$N = 0.81 + 1.20 \times 10^{12} Q \quad (4)$$

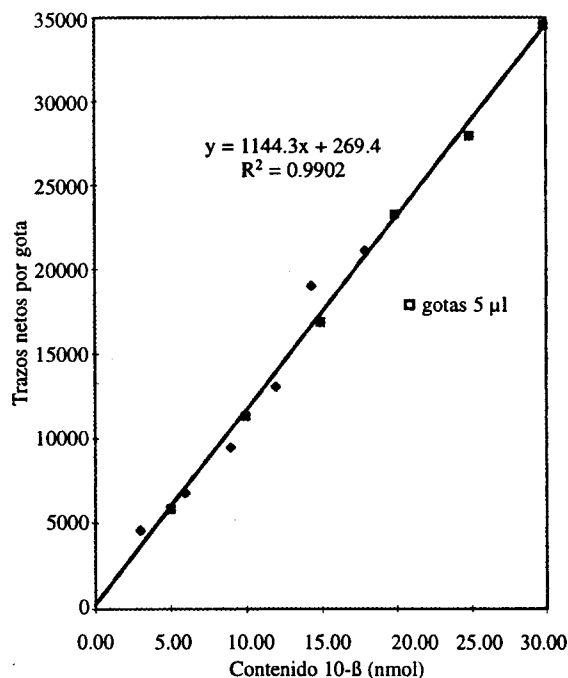


Fig. 1. Curva de calibración para experimento de Abril.

Cuadro 3. Resultados del número de trazos contados por gota para la curva analítica de abril de 1996.

Gota	Concentración de ^{10}B			Trazos/gota	
	ppm	3 μl nmol	5 μl nmol	3 μl	5 μl
1	1.025	2.98	4.97	4560	5790
2	2.050	5.97	9.94	6739	11318
3	3.075	8.95	14.91	9473	16850
4	4.100	11.93	19.89	13083	23286
5	5.125	14.91	24.86	19016	27911
6	6.150	17.90	29.83	21103	34567

Concentración de B natural en las hojas de café de CoopeAtenas y San José

La concentración de ^{10}B se evaluó a través del número de trazos en las hojas y en el estándar (en este caso 82 mM), así como del valor de las fluencias, mediante la ecuación:

$$M_x = M [n_x/n] [\phi_x/\phi] \quad (5)$$

donde:

M_x = concentración por campo del microscopio

M = concentración en el estándar (159×10^{-9} mol),

n_x = número de trazos por campo del microscopio en las hojas

n = número de trazos por campo del microscopio en el estándar

ϕ_x = flujo de neutrones sobre la hoja

ϕ = flujo de neutrones sobre el estándar

De la ecuación (5), al conocer la densidad de la hoja seca, el área de visión y la abundancia isotópica del ^{10}B en el B natural, se obtiene la concentración del B natural en ppm.

En el Cuadro 4 se presentan las concentraciones de B natural en hojas de café provenientes de las Fincas San José y CoopeAtenas.

Cinética del B en hojas de café

Experimento de abril de 1996. La dependencia de Q con el tiempo que transcurre desde que la gota de fertilización es colocada y al

momento que se produce el lavado es una función lineal la cual queda expresada por:

$$Q = 0.45 \times 10^{-06} - 0.91 \times 10^{-09} \tau \quad (6)$$

En $\tau = 0$ la concentración es igual a 0.45 μmol , valor muy cercano a 0.477 mol que corresponde a la cantidad colocada originalmente. De la ecuación se desprende que las hojas están absorbiendo el B a razón de 0.9 nmol/h. La Figura 2 presenta los resultados de la concentración en las gotas de lavado en función del tiempo transcurrido.

Experimento de noviembre de 1996.

Los valores de Q se evalúan con la ecuación (4) y la dependencia de Q con el tiempo transcurrido está dado por las ecuaciones:

$$Q = 0.80 \times 10^{-06} - 5.3 \times 10^{-09} \tau \quad (7)$$

$$Q = 0.81 \times 10^{-06} - 5.0 \times 10^{-09} \tau \quad (8)$$

Con las ecuaciones (7) y (8) se coteja que en $\tau = 0$ el valor de la concentración de ^{10}B es igual a 0.80 y 0.81 μmol , valor muy cercano a 0.795 mol, que corresponde al valor de la concentración de las gotas colocadas en las hojas.

En este caso la razón de absorción de B por las plantas tiene un valor de 5.3 y 5.1 nmol/h.

Cuadro 4. Resultados de las concentraciones de B natural en hojas de las Fincas San José y CoopeAtenas.

Muestra	Descripción	Concentración ppm
SJ 1-a	Síntomas de deficiencia	14 ± 6
SJ 1-b	Hoja adulta normal	42 ± 7
SJ 2	Hoja adulta deficiente	18 ± 9
SJ 3	Hoja adulta normal	48 ± 8
SJ 4-b	Hoja adulta normal	52 ± 3
CA 5	Hoja adulta normal	57 ± 10
CA 6	Hoja adulta tratada	48 ± 9
CA 7	Hoja joven normal	29 ± 7
CA 8	Hoja joven tratada	54 ± 11

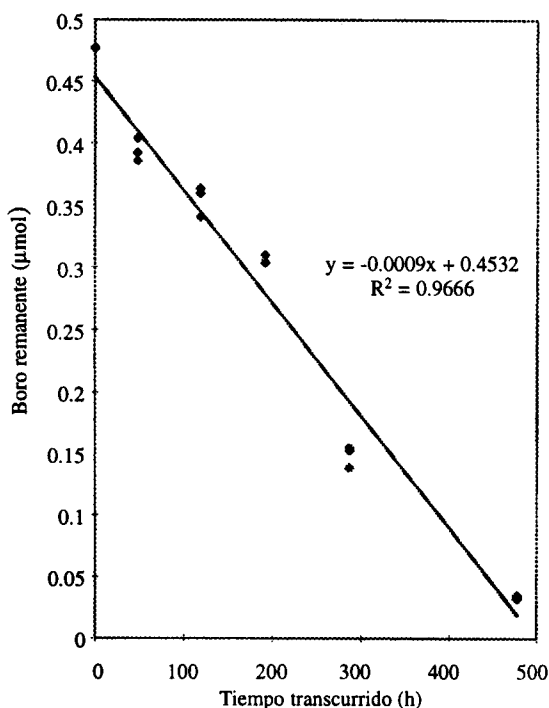


Fig. 2. Contenido de B remanente en las gotas de lavado en función al tiempo (abril 1996).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los 3 experimentos de la cinética del B muestran que la absorción tiene un orden de 10^{-9} nmol/h. Este orden de magnitud para la absorción de B en hojas de café es idéntico al encontrado por Martini y colaboradores (1978) en hojas de trébol. La diferencia encontrada para los valores de absorción de abril y noviembre del 96 se puede deber, a la época del año en que se colocaron las gotas o a la diferencia de concentración utilizada en las gotas de fertilización.

En cuanto a las hojas de café con sintomatología provenientes de las fincas queda demostrado que el profesional por simple inspección puede determinar la deficiencia de este elemento. Los resultados obtenidos concuerdan satisfactoriamente con la observación de campo y con los valores propuestos en la literatura.

Las hojas adultas tratadas (SJ-1b, SJ-3, SJ-4b y CA-6) presentan un valor promedio del

elemento igual a 48.8 ± 6.0 ppm, valor por encima de 40 ppm, que corresponde a la concentración suficiente. También se desprende de los resultados que la aplicación foliar de B en las plantas de café de CoopeAtenas duplican el valor de las hojas jóvenes no tratadas.

La baja absorción de B (SJ-1a, SJ-1b, SJ-2 y SJ-3) puede deberse a la condición física de la planta, a la humedad relativa o a la temperatura. En general ha sido encontrado un alto grado de dificultad para la incorporación del B en los cultivos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores queremos dejar patente nuestro agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el apoyo a través del proyecto 112-95-570, como también a la Agencia Internacional de Energía Atómica, por el entrenamiento recibido, así como por el equipo suministrado, mediante el Convenio Bilateral Cos/2/004. Este trabajo fue presentado en la Jornadas de Investigación de la Universidad de Costa Rica del año de 1997.

LITERATURA CITADA

- AGULHON, H. 1910. Emploi du bore comme engrais catalytique. C.R. Acad. Sci. Paris. p. 150, 288-290.
- CARVAJAL, J. 1984. Cafeto cultivo y fertilización. Instituto Internacional de la Potasa. Berna, Suiza. p. 215-216.
- DE LIMA FILHO, O. F.; MALAVOLTA, E. 1992. Efeito do B sobre o desenvolvimento e crescimento do cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Catuai Amarelo). In: Anais da XX Reuniao Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutricao de Plantas. Piracicaba, Sp, Brazil, p. 158-159.
- JIMENEZ, R.; LORIA, G.; THELLIER, M. 1988. Detection and imaging of boron in plant tissues, for agronomical purposes in Costa Rica, using small ^{252}Cf neutron sources. C.R. Acad. Sci. Paris serie III t. 306: 583-590.
- JONES, J. B.; WOLF, B. 1991. Plant analysis handbook. Macro-Micro Publishing. p. 188-189.

- LORIA, G.; JIMENEZ, R.; GALLARDO, M.; MARTINI, F.; THELLIER, M. 1992. A study of the distribution and uptake of boron in mango fruits using neutron capture radiography. C.R. Acad. Sci. Paris III 315: 255-264.
- MARTINI, F.; DEVAUCHELLE, G.; THELLIER, M. 1978. Etude cinétique de l'absorption foliaire de borate. *Physiol Veg.* 16: 255-264.
- MARTINI, F.; THELLIER, M. 1993. Boron distribution in parenchyma cells of clover leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 777-786.
- SHORROCKS, V. 1990. Behavior, function and significance of boron in agriculture. Report on International Workshop St. John's College, Oxford, England 23-25 July.
- THELLIER, M.; HEURTEAUX, C.; MARTINI, F.; PETERSSON, M.; FERNANDEZ, T.; WISSOCQ, JC. 1988. Quantitative estimations in neutron capture radiography. *Nucl. Instruments and Methods B30*, 567-579.