

## Determinación rápida de clorofila en discos foliares de limonero.

A. TORRECILLAS, A. LEÓN,  
F. DEL AMOR, M.C. MARTÍNEZ-MOMPEÁN

DETERMINATION RAPIDE DE CHLOROPHYLLE  
EN DISQUES FOLIAIRES DE CITRONNIER.

A. TORRECILLAS, A. LEON, F. DEL AMOR  
y M.C. MARTINEZ-MOMPEAN

*Fruits*, Sep. 1984, vol. 39, nº 9, p. 617-622.

RESUME - En utilisant pour l'extraction les N,N-diméthylformamide ou acétone à 80 p. 100, on développe une technique de dosage rapide de la chlorophylle en disques foliaires de 3 mm de diamètre. Dans les deux cas, spécialement pour le premier d'entre eux, on arrive à des niveaux appropriés de récupération du pigment par rapport à ceux qui sont obtenus par extraction par homogénéisation, ainsi qu'à une bonne sensibilité et reproductivité de la méthode.

### INTRODUCCION

Los métodos de extracción de clorofila en los tejidos vegetales (ARNON, 1949), implican laboriosas y lentas manipulaciones que obstaculizan su determinación en cantidades apreciables de muestras. Por estas razones HORESH y LEVY (1981), proponen la simplificación del procedimiento extrayendo el pigmento de discos foliares con N,N dimetil-formamida en reposo.

Dado que estas simplificaciones van examinadas a facultar la utilización de la técnica analítica en ensayos como los de correctores de deficiencias, donde resulta de interés el conocimiento de la relación clorofila a/clorofila b para el diagnóstico de los estados deficitarios de hierro y manganeso (BAR-AKIVA, 1961) y sin embargo, la ecuación de LEVY (1982) para N,N-dimetilformamida sólo permite el cálculo de los contenidos totales de clorofila, nuestro tra-

bajo se dirige en dos sentidos, de una parte la puesta a punto de la mencionada técnica de LEVY y de otra el ensayo de la acetona al 80 % en condiciones de trabajo similares.

### MATERIAL Y METODOS

El material utilizado fueron hojas maduras de limonero Fino, exentas de problemas nutricionales y procedentes de las tradicionales zonas de cultivo de la huerta de Murcia.

Los procedimientos de extracción de clorofilas fueron los siguientes :

a) Homogeneización del material foliar.

Se opera sobre un alícuoto de 0,250 g. de material foliar limpio y finamente troceado, el cual se somete a extracción bien con 10 ml de acetona al 80 % o bien con igual volumen de N,N-dimetilformamida, con un Potter de vidrio con baño externo de hielo. El macerado se filtra sobre embudo de placa porosa y se lava hasta decoloración del residuo.

\* - E.I. de Nutrición, Fertilización y Riego, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, P.O. Box 195 - MURCIA (Espagne).

El filtrado se afora a 50 ml y se mide la intensidad de color en un espectrofotómetro frente al correspondiente blanco a las longitudes de onda indicadas más adelante para cada caso.

b) Mediante discos foliares.

Se colocan en un recipiente cerrado de vidrio, unos 18 discos foliares de 3 mm de diámetro exactamente pesados, junto con 5 ml de acetona al 80 % ó N,N dimetilformamida, manteniéndose en la oscuridad a 4°C durante 72 y 48 horas respectivamente, procediéndose a continuación a su medida espectrofotométrica.

Los contenidos de clorofila se expresan en mg/100 g. m.s. a partir de las ecuaciones de ARNON (1949) para el caso de la acetona al 80 % y mediante la de LEVY (1982) indicada a continuación, para la N,N-dimetilformamida. Clorofila total (mg/l) =  $4 \cdot DO_{665} + 25,5 \cdot DO_{645}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Extracción con N,N-dimetilformamida.

Como consecuencia de la anterior ecuación, se nos planteó verificar si efectivamente la clorofila en N,N-dimetilformamida experimenta un desplazamiento de su máximo de absorción con respecto al que presenta en acetona al 80 % (ARNON, 1949), lo que de acuerdo con la figura 1 resulta evidente, al mismo tiempo que se puede comprobar cómo la absorbancia a 645 nm es análoga en los dos disolventes.

#### • Tamaño de los discos foliares.

Dado que utilizar sólo dos discos foliares de 9 mm  $\Phi$ , cómo recomiendan HORESH y LEVY (1981), puede

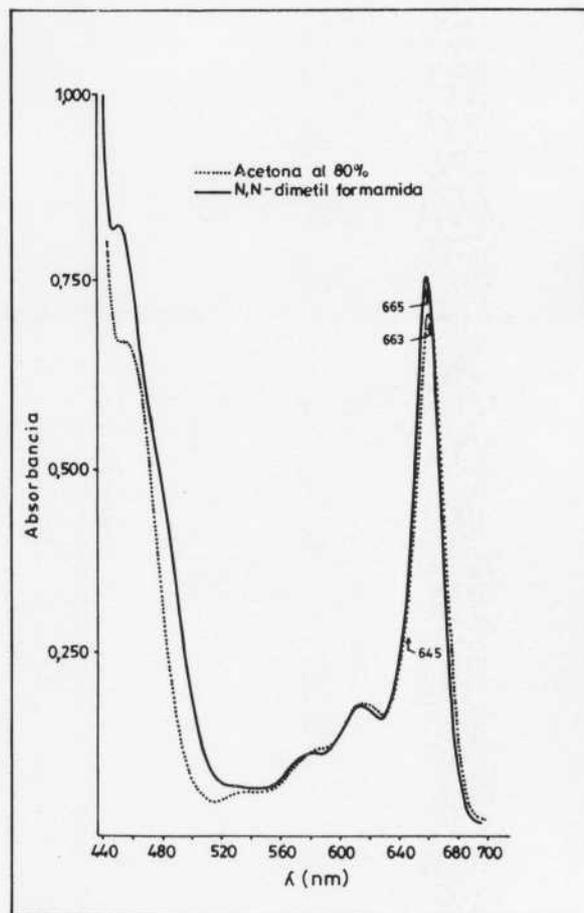


Figura 1 - Espectros de absorción de clorofila en Acetona al 80 % y N,N-dimetilformamida. (440-700 nm).

TABLA 1 - Influencia del tamaño de los discos foliares en la cantidad de clorofila extraída con 5 ml de N,N-dimetilformamida (\*).

| Muestra   | Diámetro de los discos foliares |        |
|---|---------------------------------|--------|
|   | 3 mm                            | 9 mm   |
| 1   | 376,12                          | 362,03 |
| 2   | 367,41                          | 368,87 |
| 3   | 406,06                          | 327,88 |
| 4   | 389,40                          | 380,66 |
| 5   | 380,36                          | 359,44 |
| 6   | 401,14                          | 313,60 |
| 7   | 405,49                          | 329,52 |
| 8   | 418,07                          | 335,14 |
| 9   | 390,08                          | 362,27 |
| 10  | 387,64                          | 350,45 |
| Media   | 392,18                          | 348,99 |
| Significación de la diferencia entre medias (P) | 0,01                            |        |

\* - Los contenidos de clorofila se expresan en mg/100 g m.s.

conducir a la falta de representatividad de una muestra de hojas, pensamos en la posibilidad de ensayar un mayor número de discos de menor tamaño (18 discos de 3 mm de diámetro), con análoga superficie total, que posibilitasen su obtención a partir de un mayor número de hojas.

Con objeto de cuantificar la clorofila extraída por este procedimiento en comparación al empleado por HORESH y LEVY (1981), se procedió según se expone en la tabla 1, a la determinación en 10 alícuotos para discos de cada tamaño, obtenidos a partir de una misma muestra de hojas normales de limonero.

Quedando claramente reflejado cómo los discos 3 mm de diámetro extraen más clorofila que los de 9 mm, lo que evidentemente puede deberse a la mayor facilidad de penetración del extractante en los discos más pequeños.

● Sensibilidad y reproducibilidad del método.

Por otra parte, resultaba conveniente conocer qué cantidad de clorofila se extraía con nuestro procedimiento, en relación a la liberada mediante la homogeneización de los tejidos foliares. Con un diseño análogo al anterior, encontramos (tabla 2), cómo el método de los discos foliares es capaz de recuperar el 97,04 % de la clorofila existente, a la vez que presenta una buena reproducibilidad de los resultados, con un bajo coeficiente de variación.

Una vez establecida la viabilidad de la técnica, resultaba conveniente conocer la capacidad de extracción de los 5 ml de N,N-dimetilformamida empleados. A este respecto, en la tabla 3, se recoge la cantidad de clorofila extraída en función de un variado número de discos foliares, y que

muestran cómo entre 5 y 60 discos, se recupera satisfactoriamente la clorofila, ya que se produce sólo una muy pequeña dispersión de los resultados respecto del valor medio. Esto posibilita el empleo, cuando sea necesario, de un mayor número de discos y en consecuencia de obtener siempre un alícuoto bien representativo de la muestra foliar.

● Tiempo de extracción.

Con fines de operatividad, era conveniente conocer si el tiempo de extracción en la oscuridad a 4°C, podía reducirse o incluso si se cometerían errores al proceder a cuantificar la clorofila extraída con posterioridad a las 48 horas (HORESH y LEVY, 1981). En la figura 2, podemos observar cómo a partir de los dos días se completa la extracción de clorofila sin obtenerse diferencias significativas hasta las 96 horas, por lo que un periodo de 48 horas puede considerarse como el mínimo imprescindible para completar la extracción, no produciéndose degradaciones en todo el periodo de tiempo estudiado.

Extracción con acetona al 80 %.

Por las razones ya apuntadas en la introducción e incluso con el fin de estudiar si este extractante podría producir análogos resultados al ya estudiado, se procedió al ensayo de su capacidad extractante con el mismo procedimiento.

● Tiempo de extracción.

Se procedió en primer lugar a determinar qué tiempo de extracción en la oscuridad a 4°C, era necesario para una extracción máxima de clorofila con acetona al 80 %.

TABLA 2 - Comparación del método de extracción de clorofila con N,N-dimetilformamida en discos foliares de 3 mm de diámetro y mediante homogeneización (\*).

| Muestra | Clorofila (mg/100 g m.s.) |                 | % Recuperación |
|---------|---------------------------|-----------------|----------------|
|         | Homogeneización           | Discos foliares |                |
| 1       | 368,00                    | 355,11          | 96,50          |
| 2       | 375,79                    | 365,84          | 97,35          |
| 3       | 398,39                    | 378,36          | 94,97          |
| 4       | 373,72                    | 370,48          | 99,13          |
| 5       | 390,15                    | 381,12          | 97,69          |
| 6       | 386,50                    | 371,22          | 96,05          |
| 7       | 385,78                    | 377,06          | 97,74          |
| 8       | 387,53                    | 375,21          | 96,82          |
| 9       | 381,90                    | 373,94          | 97,92          |
| 10      | 393,06                    | 378,06          | 96,18          |
| Media   | 384,08                    | 372,64          | 97,04          |
| σ       | 9,32                      | 7,62            |                |
| E.M.    | 2,95                      | 2,41            |                |
| C.V. %  | 2,43                      | 2,04            |                |

\* - Abreviaciones : σ = desviación standard ; E.M. = error de la media  
C.V. = coeficiente de variación.

TABLA 3 - Cantidad de clorofila extraída con 5 ml de N,N-dimetilformamida en función del número de discos foliares utilizados (\*).

| Número de discos de 3 mm de diámetro | Clorofila     |                           |
|--------------------------------------|---------------|---------------------------|
|                                      | mg/100 g m.s. | $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ |
| 5                                    | 332,93        | 41,15                     |
| 10                                   | 347,31        | 40,50                     |
| 15                                   | 347,54        | 42,61                     |
| 20                                   | 353,71        | 43,60                     |
| 40                                   | 349,32        | 42,56                     |
| 60                                   | 339,67        | 41,56                     |
| Media                                | 345,08        | 42,00                     |
| $\sigma$                             | 7,49          | 1,13                      |
| E.M.                                 | 3,06          | 0,46                      |
| C.V. %                               | 2,17          | 2,70                      |

\* - Cada valor de la tabla es la media de tres repeticiones.

TABLA 4 - Influencia del tamaño de los discos foliares en la cantidad de clorofila extraída con acetona al 80 % (\*).

| Muestra   | Diámetro de los discos foliares |        |
|---|---------------------------------|--------|
|   | 3 mm                            | 9 mm   |
| 1   | 436,64                          | 299,87 |
| 2   | 446,09                          | 274,37 |
| 3   | 428,76                          | 324,90 |
| 4   | 426,03                          | 359,94 |
| 5   | 444,81                          | 298,14 |
| 6   | 426,08                          | 281,41 |
| 7   | 422,14                          | 353,91 |
| 8   | 404,60                          | 367,35 |
| 9   | 414,15                          | 318,95 |
| 10  | 450,28                          | 307,45 |
| Media   | 429,96                          | 318,66 |
| Significación de la diferencia entre medias (P) | 0,01                            |        |

\* - Los contenidos de clorofila se expresan en mg/100 g m.s.

En la figura 3, queda establecido como la extracción aumenta hasta los tres días, para estabilizarse posteriormente y dado que la cantidad de clorofila extraída a las 48 horas no difiere estadísticamente de la de 72 horas a un nivel de  $P = 0,01$ , pero sí al nivel  $P = 0,05$  y no existen problemas de degradación, optamos por recomendar para mayor seguridad, un plazo de extracción de tres días.

- Tamaños de discos, sensibilidad y reproductibilidad del método.

Posteriormente quisimos determinar si la acetona al 80 % tenía una mayor capacidad de extracción de clorofila en discos de 9 mm de diámetro que el otro extractante y pudimos comprobar (tabla 4), cómo al igual que la N,N-dimetilformamida extraía más clorofila en discos foliares

de 3 mm, que en los de 9 mm., con análoga superficie total. Sin embargo, aunque este método presenta una buena reproducibilidad de los resultados (tabla 5), análoga al obtenido mediante el método clásico de homogeneización de los tejidos foliares (ARNON, 1949), la recuperación obtenida es menor que con N,N-dimetilformamida (tabla 2). En cualquier caso, siempre que este procedimiento se utilice a nivel de estimación, puede ser también valioso no sólo por las ventajas antes indicadas, sino por emplear un disolvente menos irritante y más económico.

Con objeto de comprobar que la menor cantidad de clorofila extraída en discos foliares, no se debía a un problema de relación entre el peso de los 18 discos de 3 mm

TABLA 5 - Comparación del método de extracción de clorofila con acetona al 80 % en discos foliares de 3 mm de diámetro y el método tradicional por homogeneización.

| Muestra  | Clorofila (mg/100 g m.s.) |                 |                  |
|----------|---------------------------|-----------------|------------------|
|          | Homogeneización           | Discos foliares | Recuperación (%) |
| 1        | 403,71                    | 393,31          | 97,42            |
| 2        | 425,40                    | 377,80          | 88,81            |
| 3        | 389,55                    | 380,00          | 97,55            |
| 4        | 404,07                    | 367,34          | 90,91            |
| 5        | 393,63                    | 372,61          | 94,66            |
| 6        | 413,43                    | 378,39          | 91,52            |
| 7        | 414,22                    | 370,52          | 89,45            |
| 8        | 426,25                    | 377,57          | 88,58            |
| 9        | 416,40                    | 386,97          | 92,93            |
| 10       | 417,22                    | 393,57          | 94,33            |
| Media    | 410,39                    | 379,81          | 92,62            |
| $\sigma$ | 13,00                     | 8,99            |                  |
| E.M.     | 3,92                      | 2,84            |                  |
| C.V. %   | 3,02                      | 2,37            |                  |

TABLA 6 - Cantidad de clorofila extraída con 5 ml de acetona al 80 % en función del número de discos foliares utilizados (\*).

| Número de discos de 3 mm de diámetro | Clorofila     |                         |
|--------------------------------------|---------------|-------------------------|
|                                      | mg/100 g m.s. | $\mu$ g/cm <sup>2</sup> |
| 5                                    | 491,22        | 58,64                   |
| 10                                   | 509,45        | 56,55                   |
| 15                                   | 490,56        | 53,17                   |
| 20                                   | 499,96        | 53,09                   |
| 40                                   | 480,35        | 53,22                   |
| 60                                   | 488,47        | 54,12                   |
| Media                                | 493,34        | 54,80                   |
| $\sigma$                             | 10,08         | 2,30                    |
| E.M.                                 | 4,12          | 0,94                    |
| C.V. %                               | 2,04          | 4,19                    |

\* - Cada valor de la tabla es la media de tres repeticiones.

TABLA 7 - Contenidos en materia fresca y seca de 25 discos de 3 mm de diámetro de hojas de limonero Verna verdes y deficientes en hierro (\*).

| Hojas verdes |           | Hojas con síntomas de deficiencia de Fe |           |
|--------------|-----------|---|-----------|
| Peso fresco  | Peso seco | Peso fresco                             | Peso seco |
| 57,0         | 26,2      | 50,7                                    | 18,3      |
| 54,8         | 25,2      | 48,5                                    | 17,5      |
| 56,2         | 25,9      | 48,4                                    | 17,5      |
| 56,7         | 26,1      | 49,9                                    | 18,0      |
| 56,4         | 26,0      | 45,5                                    | 16,4      |
| 55,5         | 25,5      | 50,5                                    | 18,2      |
| 55,4         | 25,5      | 51,0                                    | 18,4      |
| 56,4         | 26,0      | 49,8                                    | 18,0      |
| Media        | 56,05     | 49,3                                    | 17,8      |
| $\sigma$     | 0,75      | 1,80                                    | 0,65      |
| E.M.         | 0,26      | 0,64                                    | 0,23      |
| C.V. %       | 1,33      | 3,66                                    | 3,67      |

\* - Los pesos se expresan en mg.

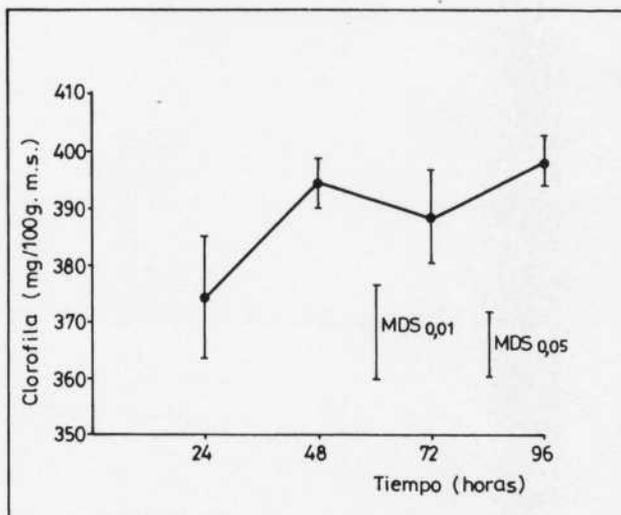


Figura 2 - Influencia del tiempo de extracción en la oscuridad a 4°C, sobre la cantidad de clorofila extraída con 5 ml de N,N-dimetilformamida.

de diámetro y los 5 ml de acetona al 80 % se procedió a la extracción en ese mismo volumen de extractante, de un número de discos entre 5 y 60, mostrando los resultados cómo en todos los casos se obtienen muy similares cantidades de clorofila (tabla 6).

#### Formas de expresión de los contenidos en clorofila.

Los niveles de clorofila extraída por estos procedimientos e incluso otros parámetros fisiológicos (HORESH y LEVY, 1981 ; LEVY, 1980), se expresan con relativa frecuencia, por unidad de superficie foliar y dado que los resultados así expresados en las tablas 3 y 6, presentaban una mayor variabilidad que los referidos a materia seca, nos indujo a pensar que esto fuese debido a una heterogeneidad en el peso de los discos foliares, que aunque no parecía tener excesiva importancia al considerar alicuotos de una misma muestra sí podía serlo al intentar comparar

muestras diferentes, sobre todo si alguna de ellas era de tejidos con alteraciones nutricionales.

En la tabla 7, podemos observar que el peso medio de los discos de hojas con síntomas de deficiencia de hierro es del orden de un 12 % menor que los de hojas verdes e incluso que el contenido en materia seca es un 31 % menor, lo que evidentemente nos lleva a descartar la posibilidad de referir los contenidos de clorofila a unidad de superficie, salvo que los datos a comparar provengan de plantaciones con similar situación nutricional.

Finalmente hemos de destacar que los métodos de determinación de clorofila estudiados, pueden suponer una mayor facilidad para análisis en serie, e incluso en el caso de la dimetilformamida con una buena exactitud, aunque su empleo no deba realizarse cuando se pretenda el conocimiento de los contenidos absolutos de clorofila.

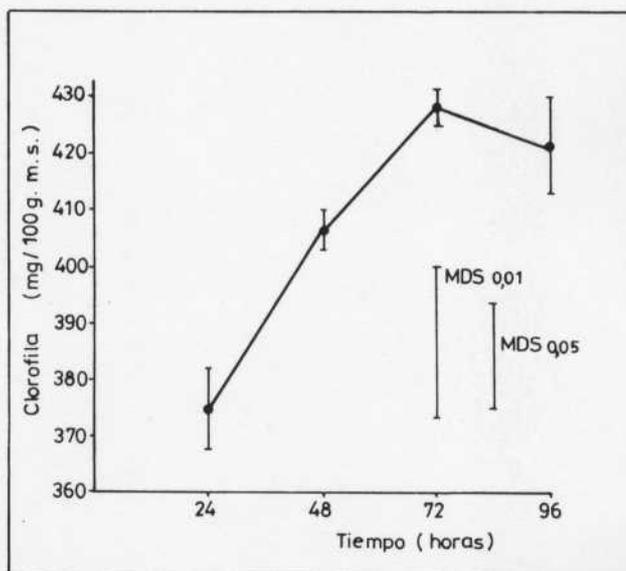


Figura 3 - Influencia de tiempo de extracción en la oscuridad a 4°C, sobre la cantidad de clorofila extraída con 5 ml. de acetona al 80 %

#### BIBLIOGRAFIA

- ARNON (D.I.). 1949.  
Cooper enzymes in isolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*.  
*Plant. Physiol.*, 24, 1-7.
- BAR-AKIVA (A.). 1961.  
Biochemical indications as a means of distinguishing between iron and manganese deficient symptoms in Citrus plants.  
*Nature*, 190, 647-648.
- HORESH (I.) and LEVY (Y.). 1981.  
Response of iron deficient Citrus trees to foliar iron sprays with a low-surface-tension surfactant.  
*Scientia Horticulturae*, 15, 227-233.
- LEVY (Y.). 1980.  
Field determination of free proline accumulation and water-stress in lemon trees.  
*Hort. Science*, 15, 302-303.
- LEVY (Y.). 1982.  
Método de determinación de clorofila con N,N-dimetilformamida  
*Comunicación personal*.