

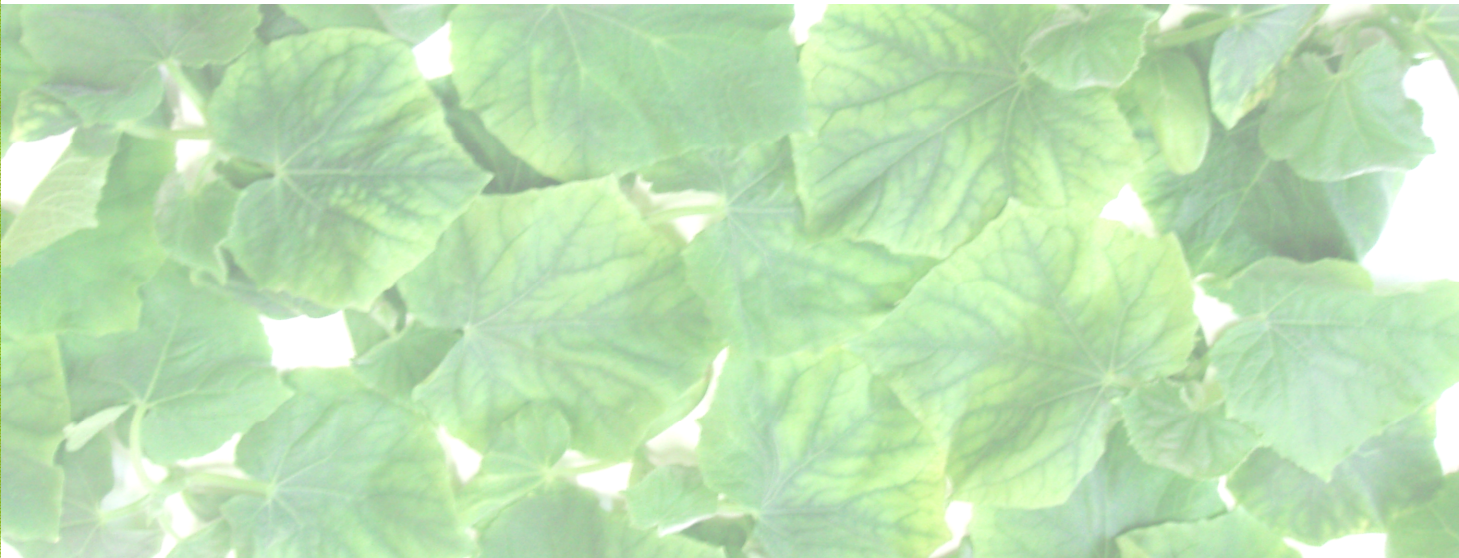


**Universidad Autónoma de Madrid**  
Departamento de Química Agrícola

**TESIS DOCTORAL**

**Quelatos biodegradables y complejos  
como correctores de la clorosis  
férrica.**

**Evaluación de complejos  
Fe-Lignosulfonato**



**Patricia Rodríguez Lucena**  
Madrid, 2010





**Universidad Autónoma de Madrid**  
Departamento de Química Agrícola

## **TESIS DOCTORAL**

**Quelatos biodegradables y complejos  
como correctores de la clorosis férrica.  
Evaluación de complejos Fe-  
Lignosulfonato**

**Patricia Rodríguez Lucena**

**Madrid, 2010**







**Universidad Autónoma de Madrid**  
Departamento de Química Agrícola

**Quelatos biodegradables y complejos como  
correctores de la clorosis férrica.  
Evaluación de complejos Fe-Lignosulfonato**

Memoria presentada para aspirar al  
título de Doctor en Química.

Fdo.: Patricia Rodríguez Lucena

DIRECTORES:

Fdo.: Juan José Lucena Marotta  
*Catedrático de Universidad*

Fdo.: Lourdes Hernández Apaolaza  
*Profesora Titular de Universidad*

*Departamento de Química Agrícola*



*A mis padres*



## ***AGRADECIMIENTOS***

Después de más de cuatro años dedicados a este proyecto son muchas, muchísimas, las personas a las que tengo que agradecer su apoyo y la ayuda que me han prestado durante todo este tiempo. Espero no dejarme a nadie...

En primer lugar quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis Directores de Tesis, el Dr. Juan José Lucena Marotta y la Dra. Lourdes Hernández Apaolaza, ya que cada uno en su medida, cada uno a su manera, han hecho que consigamos llevar hasta el final este proyecto común. A Juanjo, por compartir conmigo su entusiasmo por la investigación, por todo lo que me ha enseñado y por ser una fuente de conocimiento que aún hoy me sigue sorprendiendo. Y, sobre todo, por no permitir que nuestros altibajos científicos empañasen una relación personal que considero envidiable. A Lourdes, porque sin ella este proyecto se hubiese estancado entre altibajo y altibajo. Por ayudarme a encontrar nuevos caminos por los que encauzar esta investigación, por enseñarme a relativizar los malos momentos y por la confianza que siempre me ha demostrado. A los dos, por vuestra paciencia y por la oportunidad que me habéis brindado.

Quiero dar las gracias al resto de profesores del Departamento de Química Agrícola. Muy especialmente a Agustín, Elvira y Esperanza, por el cariño y la preocupación personal que siempre me habéis demostrado. A los demás, Enrique, M<sup>a</sup> Ángeles, Rosa, Pilar, Jesús, Ignacio, Ramón y M<sup>a</sup> José, que tan bien me habéis tratado en todo momento y que me habéis ayudado siempre que lo he necesitado.

Al Dr. Roberto Pinton, de la Università degli Studi di Udine, por recibirme en su grupo de investigación. Debo un agradeciendo muy especial al Dr. Stefano Cesco, que supervisó mi trabajo durante mis meses en Udine y que desde entonces tanto me ha ayudado, demostrándome su confianza y aprecio. A Rosella, Nicola y Cecilia, que me ayudaron en el día a día del laboratorio, y a Stefano, por su compañía y amistad.

Al Dr. Werner Häusler y al Dr. Friedrich Wagner de la Technischen Universität München, que me permitieron utilizar sus equipos para el análisis de mis muestras.

Al Dr. Antonio Vallejo, de la E.T.S.I.A de la Universidad Politécnica de Madrid, y al Dr. Alfredo Polo, del Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC, que un día hace tanto tiempo hicieron que se cruzase en mi camino algo llamado clorosis férrica, y que desde entonces no han dejado de demostrarme su cariño.

A Nadia, nuestra maravillosa secretaria, por estar siempre disponible y ayudarme a resolver todas mis dudas burocráticas. Y a María, por permitirme invadir el laboratorio de prácticas y echarme una mano cuando lo he necesitado.

Por supuesto tengo que dar las gracias a mis compañeros, becarios, post-docs, ayudantes... sobre todo amigos, del Departamento de Química Agrícola. Por demostrarme que la investigación es un trabajo en equipo cuando algunos se empeñan en decir es un camino solitario, por regalarme vuestra amistad, por compartir conmigo tantos y tantos buenos momentos, y por apoyarme en los no tan buenos. A Diego con el

que he tenido la suerte de compartir todos estos años, por tu buen humor y tu amistad incondicional. A mis niñas, que habéis estado siempre ahí para escucharme. A Paloma, por transmitirme tu entusiasmo por todo esto cuando yo no encontraba el mío. A Sandra, que tanto me has recordado que no hay que desesperar porque todo llega. A Diana, por todo lo que me has enseñado. A las pequeñitas, Anita y Cova, que sois tan grandes a la vez. A Edu, por apoyarme en todo momento. A Sonia, por tu amistad y por enseñarme tanto desde hace tanto tiempo. A Cris, por ponerle música a todo esto. A Tere y Carlos, que con vuestra sonrisa perpetua me alegráis tantos momentos. A Rebe por aguantar mis bromas día a día. A Bea, que ya se va acercando a la recta final. A las chicas de la 6ª planta, Yoli y Vane. A todos los demás, María Prieto, Iván, Marcos, Silvia, Yasna, Edgar, José, Guillermo, Sheila, Laura, Elena, Saúl y María Villén.

A mis niñas. A Ana, por todo lo que me has dado desde los lejanos días lioneses. A Celia, por preocuparte tanto, y transmitirme tu optimismo y alegría. A Carmen, porque sé que de haber podido habrías escrito esta tesis por mí. A las tres, por cuidarme tanto, en especial durante estos últimos meses.

A mis ambientólogas. A Silvia, Alo, Laura, Vicky y Rebe, que con tanta paciencia me habéis esperado estos años, perdonándome las llamadas no devueltas y todos los momentos importantes que me he perdido. A las demás, Andrea, Ali y Nuria, por vuestra fuerza y vuestro apoyo, que me han acompañado durante todo este tiempo. Y a Cris, que es casi una ambientóloga más.

A Patri, gracias una y mil veces, porque sin ti no habría llegado al final de todo esto. A Antonio, por respetar este proyecto a pesar de todo. A José, por tu amistad, que es uno de mis pequeños tesoros. A Carmen, que ha llegado casi al final, por todo lo que me has ayudado estos meses. A Juanfra, por el cariño que siempre me demuestras. A Sara y Luis, por seguir ahí desde hace tantos años.

Por último, a mí familia. A mis tíos, Pepe y Emi, y mis primos, Alberto y Marta, por quererme tanto y tan bien. A mi tía Mari Carmen, a la que tanto quiero, por transmitirme su fuerza y por su ayuda en los momentos difíciles que ahora parecen tan lejanos.

A los más importantes, mis padres a los que quiero más de lo que muchas veces les demuestro, para los que sé que esta Tesis es un orgullo que no todos pueden comprender, y a los que nunca podré agradecer lo suficiente todo lo que me dieron y me enseñaron, lo que me dan y me enseñan cada día. A mí madre, por su paciencia y comprensión, que no siempre merezco. A mí padre, por hacerme siempre volar un poco más alto y recordarme que mis límites son sólo los que yo me imponga. A los dos, por respetarme y apoyarme, por transmitirme vuestro orgullo por mi trabajo, por ser la red bajo mis pies que me ayuda a saltar sin miedo y por vuestro amor que me hace tan fuerte. Por todo eso y por mucho más, esta Tesis es sobre todo vuestra.

A todos, porque todos sois coautores de este trabajo.



La presente memoria se ha realizado a través de la financiación de los siguientes proyectos:

- Proyecto AGL2004-07849-C02-01/AGR, “Formulación de enmiendas orgánicas de distintas procedencias para la corrección de la clorosis férrica. Estudio de su eficacia agronómica frente a otros agentes complejantes y quelantes”. Financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.
- Proyecto AGL2007—63756, “Nuevos Fertilizantes de quelatos y complejos de micronutrientes. Relación entre características químicas y efectividad. Biodegradabilidad y efecto de los fortificantes”. Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Proyecto CCG06-UAM/AMB-0365, “Aprovechamiento de subproductos de la industria papelera (lignosulfonatos) como correctores de la clorosis férrica en plantas de pepino”. Financiado por la Comunidad Autónoma de Madrid y la Universidad Autónoma de Madrid.
- Proyecto CCG07-UAM/AMB-1567, “Empleo de isótopos estables para evaluar la eficacia de subproductos de la industria papelera como correctores de la clorosis férrica en plantas de pepino”. Financiado por la Comunidad Autónoma de Madrid y la Universidad Autónoma de Madrid.

Parte de este trabajo se ha presentado en los siguientes congresos:

- **Rodríguez-Lucena P, Hernández-Apaolaza L y Lucena J J.** The complexing capacity of the extract “Quelastim”, obtained of the alpeorujo, a wet solid by product of the olive oil extraction industry (Póster). The Second International Meeting on Environmental biotechnology and Engineering (2 IMEBE). Septiembre 2006. México DF., México.
- **Rodríguez-Lucena P, Tomasi T, Pinton R, Hernández-Apaolaza L, Lucena J J y Cesco S.** Evaluation of <sup>59</sup>Fe-lignosulfonates as Fe-sources for plants (Póster). XIV International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Octubre 2008. Beijing, China.
- **Rodríguez-Castrillón J A, Rodríguez-Lucena P, Moldovan M, García Alonso J I, Lucena J J y Hernández-Apaolaza L.** Use of enriched <sup>54</sup>Fe in combination with isotope pattern deconvolution to determine iron uptake in cucumber plants using <sup>57</sup>Fe enriched iron chelates (Póster). 12ª Jornadas de Análisis Instrumental. Octubre 2008. Barcelona, España.
- **Rodríguez-Lucena P, Hernández-Apaolaza L y Lucena J J.** Foliar application of commercial Fe chelates and complexes to correct iron chlorosis in soybean plants (Póster). 17th International Symposium of CIEC “Plant Nutrient Management under Stress Conditions”. Noviembre 2008. El Cairo, Egipto.



- **Rodríguez-Lucena P, Hernández-Apaolaza L y Lucena J J.** 2008. Foliar application of commercial Fe chelates and complexes to correct iron chlorosis in soybean plants. Proc. 17<sup>th</sup> Intern. Symp. of CIEC, pp. 305-311. NCR. ISBN: 977-5041-60-017. NCR (National Research Center), Eds. El-Zaiem Press, Giza, Egipto.
- **Rodríguez-Lucena P, Roperó E, Hernández-Apaolaza L, y Lucena J J.** Foliar application of ZnMnIDHA and FeIDHA chelates to correct micronutrient deficiencies in soybean plants (Comunicación oral). 17th International Symposium of CIEC “Plant Nutrient Management under Stress Conditions”. Noviembre 2008. El Cairo, Egipto.
- **Rodríguez-Lucena P, Hernández-Apaolaza L y Lucena J J.** Relationship between the structure of Fe-Lignosulfonate complexes determined by FTIR spectroscopy and their reduction by the leaf Fe reductase (Póster). XVI International Plant Nutrition Colloquium “Plant Nutrition for Sustainable Development and Global Health”. Agosto 2009. Sacramento, CA, USA.
- **Rodríguez-Lucena P, Lucena J J y Hernández-Apaolaza L.** 2009. Relationship between the structure of Fe-Lignosulfonate complexes determined by FTIR spectroscopy and their reduction by the leaf Fe reductase. The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI. UC Davis. CA, USA. Disponible en <http://escholarship.org/uc/item/9k69q71d>.

Y ha sido publicado está siendo objeto de revisión en revistas de ámbito internacional bajo los siguientes títulos:

- **Rodríguez-Lucena P, Hernández-Apaolaza L y Lucena J J.** (*in press*). Comparison of iron chelates and complexes supplied as foliar sprays and in nutrient solution to correct iron chlorosis of soybean. J Plant Nutr Soil Sci. (DOI: 10.1002/jpln.200800256).
- **Rodríguez-Lucena P, Tomasi T, Pinton R, Hernández-Apaolaza L, Lucena J J y Cesco S.** 2009. Evaluation of <sup>59</sup>Fe-lignosulfonates as Fe-sources for plants. Plant Soil. (DOI 10.1007/s11104-009-0091-1).
- **Rodríguez-Lucena P, Hernández D, Hernández-Apaolaza L y Lucena J J.** (*enviado en septiembre de 2009*). Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer. J. Agric. Food Chem.
- **Rodríguez-Lucena P, Benedicto A, Lucena J J, Rodríguez-Castrillón J A, Mariella Moldovan M, García Alonso J I y Hernández-Apaolaza L.** (*enviado en noviembre de 2009*). Effectiveness of foliar application of Lignosulfonate/Fe<sup>3+</sup> Complexes to Correct Fe Deficiencies in Cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Ashley) Plants.

## **PRÓLOGO**

Esta memoria de tesis está estructurada en siete capítulos. El primero (Capítulo I) está dedicado a la presentación de una Introducción General, mientras que en el segundo (Capítulo II) se realiza la exposición de los Objetivos de este trabajo. Los siguientes tres capítulos (Capítulos III a V) están dedicados a la presentación y discusión de los resultados experimentales, que se recogen en forma de artículos científicos. El Capítulo VI contiene la Discusión General del manuscrito y el Capítulo VII resume las Conclusiones más relevantes de esta tesis doctoral.

A continuación se presenta un resumen del contenido de los capítulos dedicados a la presentación y discusión de los resultados.

### ***Capítulo III. Corrección de la clorosis férrica en soja por distintos quelatos y complejos de Fe. Aplicación por vía foliar o en disolución nutritiva.***

El Capítulo III recoge un artículo ya aceptado (Journal of Plant Nutrition and Soil Science) en el cual se evalúa la capacidad de distintos quelatos biodegradables y complejos de Fe, aplicados por vía foliar o a la disolución nutritiva, para solventar deficiencias de Fe en plantas de soja desarrolladas en hidroponía pura. Se compararon ambos tipos de productos (quelatos y complejos), intentando dilucidar si la fracción de Fe quelado/complejado es un buen indicador de la eficacia de los mismos, así como si la aplicación de quelatos biodegradables y complejos naturales puede constituir una buena alternativa a otros quelatos tradicionalmente empleados para corregir la clorosis férrica.

### ***Capítulo IV. Aplicación foliar de IDHA/Fe<sup>3+</sup> para corregir la clorosis férrica en plantas de soja. Influencia del estado nutricional y del tipo de adyuvante.***

En el trabajo presentado en el Capítulo IV (artículo no publicado) el quelato biodegradable IDHA/Fe<sup>3+</sup> fue comparado con el EDTA/Fe<sup>3+</sup> al ser aplicado por vía foliar a plantas de soja desarrolladas en hidroponía pura, evaluando el estado nutricional de la planta y la presencia de otras fuentes de Fe y el empleo de distintos adyuvantes.

**Capítulo V. Empleo de complejos de Fe formados con sub-productos de la industria papelera (lignosulfonatos) y olivarera (extractos de alperujo modificados) como correctores de la clorosis férrica en plantas de soja, pepino y tomate. Aplicación del marcaje isotópico al estudio de la absorción y redistribución del Fe aplicado.**

En este Capítulo se incluyen tres trabajos, uno de los cuales ya ha sido publicado en la revista internacional Plant and Soil, mientras que los otros dos se encuentran actualmente en revisión (Journal of Agricultural and Food Chemistry). Se ha estudiado la capacidad de ambos sub-productos para complejar Fe, la estabilidad de los complejos formados, y su eficacia al ser aplicados por vía foliar o a la disolución nutritiva. En el caso concreto de los lignosulfonatos, se compararon productos con distintas concentraciones de grupos funcionales capaces de complejar Fe y se aplicó el marcaje isotópico al estudio de la absorción y redistribución del Fe aportado por los complejos Fe-Lignosulfonato.

## **PREFACE**

This dissertation is structured in seven chapters. The Chapter I contains a General Introduction, while in Chapter II the Objectives of this work are detailed. The next chapters (Chapters III, IV and V) include the experimental work of this dissertation in the form of scientific publications. In this chapters the experimental results are exposed and discussed. Chapter VI corresponds to the General Discussion of the results of the experiments presented in Chapters III, IV and V. The main Conclusions of this Dissertation are reported in Chapter VII.

The chapters in which the experimental results are reported and discussed are briefly summarized below.

### ***Chapter III. Iron chelates and complexes as Fe chlorosis correctors in soybean. Application through foliar sprays or to nutrient solution.***

Several biodegradable synthetic chelates and natural complexes were evaluated in two experiments when applied as foliar sprays or to nutrient solution to soybean chlorotic plants grown in hydroponics. The effectiveness of both group of products (chelates and complexes) was studied, trying to relate their performance with the Fe chelated/complexed fraction of each treatment, as well as to determine whether the application of biodegradable chelates and natural complexes can substitute to recalcitrant chelates. This work is already accepted for publication in Journal of Plant Nutrition and Soil Science.

### ***Chapter IV. Foliar de IDHA/Fe<sup>3+</sup> to overcome Fe chlorosis in soybean plants. Influence of plant nutritional status and surfactants***

The assays and results described in this chapter are presented in the form of a scientific publication, although they have not been submitted for publication. The effectiveness of biodegradable IDHA/Fe<sup>3+</sup> to provide Fe soybean plants with different degrees of Fe deficiency was tested in two experiments under controlled conditions in a

growth chamber. The influence of the type of surfactant, as well as of additional Fe nutrition through roots was also evaluated.

**Chapter V. *Fe complexes formed from pulp and paper industry and olive oil extraction process by-products as Fe chlorosis correctors in soybean, cucumber and tomato plants. Use of isotopes to study Fe uptake and redistribution.***

This chapter includes three works. One of them is already published in Plant and Soil, while the others are currently under revision in Journal of Agricultural and Food Chemistry. The ability of these by-products to form stable complexes has been studied, as well as their performance when applied as foliar sprays or to nutrient solution to soybean, cucumber and tomato plants grown in hydroponics. Their main structural features were also elucidated by FTIR. In the case of pulp and paper by-products (lignosulfonates) isotopes were employed to study Fe uptake and redistribution when supplied as Fe-lignosulfonate complexes.

INDICE DE FIGURAS.....	XI
INDICE DE TABLAS.....	XIV
ABREVIATURAS.....	XVII
	I
RESUMEN.....	1
<b>CAPÍTULO I. <i>Introducción</i></b> .....	5
<b>1. LA CLOROSIS FÉRRICA</b> .....	7
<b>2. BIODISPONIBILIDAD DEL Fe</b> .....	8
<b>3. FUNCIONES DEL Fe EN LAS PLANTAS</b> .....	10
<b>4. LOCALIZACIÓN DEL Fe EN LA PLANTA</b> .....	11
<b>5. RESPUESTAS DE LA RAÍCES ANTE LA DEFICIENCIA DE Fe</b> ... 11	
<b>5.1. Estrategia I</b> .....	12
5.1.1. Acidificación de la rizosfera.....	13
5.1.2. Inducción de la actividad reductasa.....	14
5.1.3. Transporte del Fe <sup>3+</sup> al interior de las células de la raíz.....	15
5.1.4. Otras respuestas.....	15
<b>5.2. Estrategia II</b> .....	18
<b>6. TRANSPORTE DEL Fe EN LA PLANTA</b> .....	19
<b>7. CORRECIÓN DE LA CLOROSIS FÉRRICA</b> .....	21
<b>7.1. Mejora genética y selección de cultivares resistentes</b> .....	22
<b>7.2. Prácticas agrícolas adecuadas</b> .....	22
<b>7.3. Mejora de las condiciones del suelo</b> .....	23
7.3.1. Adición de materia orgánica.....	23
7.3.2. Adición de productos acidificantes.....	23
<b>7.4. Adición de fertilizantes</b> .....	24
7.4.1. Sales inorgánicas.....	24
7.4.2. Quelatos sintéticos.....	24
7.4.3. Complejos de Fe.....	27
7.4.3.1. <i>Lignosulfonatos</i> .....	28
7.4.3.2. <i>Sustancias húmicas (humatos y fulvatos)</i> .....	31
7.4.3.3. <i>Otros agentes complejantes</i> .....	34
<b>7.5. Fertilización foliar</b> .....	36
7.5.1. Adquisición de solutos por vía foliar.....	39
7.5.2. Factores que condicionan la eficacia de la aplicación foliar de fertilizantes de Fe.....	40

7.5.2.1. Factores ambientales.....	41
7.5.2.2. Factores relacionados con la planta.....	42
7.5.2.3. Factores relacionados con la disolución aplicada.....	43
<b>CAPÍTULO II. Objetivos.....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO III. Corrección de la clorosis férrica en soja por distintos quelatos y complejos de Fe.</b>	
<i>Aplicación por vía foliar o en disolución nutritiva.....</i>	<i>53</i>
<b>CAPÍTULO IV. Aplicación foliar de IDHA/Fe<sup>3+</sup> para corregir la clorosis férrica en plantas de soja.</b>	
<i>Influencia del estado nutricional y del tipo de adyuvante.....</i>	<i>75</i>
<b>CAPÍTULO V. Empleo de complejos de Fe formados con subproductos de la industria papelera (lignosulfonatos) y olivarera (extractos de alperujo modificados) como correctores de la clorosis férrica en plantas de soja, pepino y tomate.</b>	
<i>Aplicación del marcaje isotópico al estudio de la absorción y redistribución del Fe aplicado.....</i>	<i>99</i>
V.1. Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer.....	101
V.2. Evaluation of <sup>59</sup> Fe-lignosulfonates complexes as Fe-sources for plants..	127
V.3. Effectiveness of foliar application of Lignosulfonate/Fe <sup>3+</sup> Complexes to Correct Fe Deficiencies in Cucumber ( <i>Cucumis sativus</i> L. cv Ashley) Plants.....	149
<b>CAPÍTULO VI. Discusión General.....</b>	<b>179</b>
<b>CAPÍTULO VII. Conclusiones.....</b>	<b>201</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA DE INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>205</b>

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

### **CAPÍTULO I. Introducción**

**Figura 1.** Hojas cloróticas

**Figura 2.** Hidrólisis de las especies de Fe (III) en equilibrio con el Fe-suelo.

**Figura 3.** Mecanismos de absorción del Fe por la raíz de las plantas.

**Figura 4.** Modelo de las respuestas ante la deficiencia de Fe, Estrategia I (T= transportador, R= reductasa y A= H+ATPasa) y Estrategia II (E= Incremento en la síntesis y liberación de fitosideróforos; Tr = transportador Fe(III)-fitosideróforos; MP= membrana plasmática). (Adaptado de Marschner y Römheld,1995).

**Figura 5.** Agentes quelantes descritos en el texto.

**Figura 6.** Precursores primarios de la lignina y nombre de las unidades aromáticas (Sjöström 1993).

**Figura 7.** Hipótesis de la estructura simplificada de la lignina procedente de maderas blandas y formada por la unión de monómeros de alcohol conilferílico (Tan, 1993).

**Figura 8.** Unidad estructural característica de los LS (Ouyang et al., 2006).

**Figura 9.** Estructura de un ácido húmico propuesta por Stevenson (1994).

**Figura 10.** Estructura de un ácido fúlvico propuesta por Schnitzer y Khan (1972).

**Figura 11.** Fórmula general de un aminoácido.

**Figura 12.** Fórmula del ácido glucónico.



**CAPÍTULO IV. Aplicación foliar de IDHA/Fe<sup>3+</sup> para corregir la clorosis férrica en plantas de soja. Influencia del estado nutricional y del tipo de adyuvante.**

**Figura 1.** Quelatos descritos en el texto.

**CAPÍTULO V. Empleo de complejos de Fe formados con sub-productos de la industria papelera (lignosulfonatos) y olivarera (extractos de alperujo modificados) como correctores de la clorosis férrica en plantas de soja, pepino y tomate. Aplicación del marcaje isotópico al estudio de la absorción y redistribución del Fe aplicado.**

**Capítulo V.1. Revalorización de un residuo del sistema de dos fases de extracción del aceite de oliva como fertilizante de micronutrientes.**

**Figura 1.** Espectro FTIR de los extractos de alperujo modificados (OMWm).

**Figura 2.** Capacidad de complejación de Fe(II), Fe(III), Zn, Cu y Mn de los extractos de alperujo modificados (OMWm).

**Figura 3.** Porcentaje de Fe(II), Fe(III), Zn, Cu and Mn recuperado respecto al elemento total añadido ( $1.0 \cdot 10^{-2}$  M) en una disolución de  $\text{CaCl}_2$   $1.0 \cdot 10^{-2}$  tras tres días de interacción de los complejos de extractos de alperujo modificados (OMWm) a distintos pHs.

**Figura 4.** Porcentaje de metal recuperado en una disolución de  $\text{CaCl}_2$   $2.0 \cdot 10^{-2}$  y HEPES  $2.0 \cdot 10^{-3}$  (pH 8) con respecto al elemento total añadido ( $4.0 \cdot 10^{-3}$ ) en forma de complejos de extractos de alperujo modificados (OMWm), tras tres días de interacción con los dos suelos calcáreos descritos en el texto (Experimento con Suelo I).

**Figura 5.** Porcentaje de metal que permanece en disolución a diferentes tiempos ( $t = 1\text{h}$ ,  $3\text{h}$ ,  $7\text{h}$ ,  $14\text{h}$ ,  $1\text{d}$ ,  $3\text{d}$ ,  $7\text{d}$  y  $14\text{d}$ ) con respecto al elemento total añadido ( $4.0 \cdot 10^{-3}$ ) en forma de complejos de extractos de alperujo modificados (OMWm), tras su interacción con el Suelo 1 (Experimento con Suelo II).

## Capítulo V.2. Evaluación de complejos $^{59}\text{Fe}$ -Lignosulfonato como fuente de Fe para plantas.

**Figura 1.** Cantidad de  $^{59}\text{Fe}$  eluida a través de una columna de suelo (Eutric cambisol) al ser aplicado como  $^{59}\text{Fe}$ -LS o  $^{59}\text{Fe}$ -EDDHA. El eluyente es una disolución nutritiva (A, tamponada con HEPES-KOH pH 7.5 10 mM) sin Fe. Los datos son la media  $\pm$  ET de dos experimentos independientes con tres replicados.

## Capítulo V.3. Eficacia de los complejos Lignosulfonato/ $\text{Fe}^{3+}$ para corregir la clorosis férrica en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv Ashley).

**Figura 1.** Capacidad de complejación de los lignosulfonatos estudiados: LS1 (LS de eucalipto sin modificar); LS2 (LS de eucalipto enriquecido con grupos carboxílicos); LS3 (LS de eucalipto enriquecido con grupos sulfónicos) y LS4 (LS de abeto sin modificar).

**Figura 2.** Espectro FTIR de los lignosulfonatos y de los complejos Fe-LS (A- LS, B- complejos LS/ $\text{Fe}^{2+}$ , C- complejos LS/ $\text{Fe}^{3+}$ ).

**Figura 3.** Porcentaje de Fe que permanece en forma soluble en disolución de  $\text{CaCl}_2$   $10^{-2}$  M tras tres días de interacción a distintos pHs. Los datos son la media  $\pm$  ET de tres replicados independientes.

**Figura 4.** Reducción por discos foliares de plantas de pepino con deficiencias de Fe en presencia de luz de  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{Fe} \cdot \text{L}^{-1}$  añadidos como LS/ $\text{Fe}^{3+}$  y EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$ . En el caso del EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  se compararon plantas con deficiencia (EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  I) y sin deficiencia de Fe (EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  II). Los datos son la media  $\pm$  ET de cinco replicados independientes. Letras distintas entre barras indican diferencias estadísticas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ).

## **ÍNDICE DE TABLAS**

### **CAPÍTULO III. Corrección de la clorosis férrica en soja por distintos quelatos y complejos de Fe. Aplicación por vía foliar o en disolución nutritiva.**

**Tabla 1.** Quelatos y complejos de Fe estudiados, Fe quelato o complejado y Fe soluble de los productos comerciales.

**Tabla 2.** Efecto de los quelatos y complejos aplicados a la disolución nutritiva (Experimento I) en las variaciones de Índice SPAD medido en las hojas formadas tras la aplicación de los tratamientos, el peso seco de las plantas y la concentración foliar de Fe de las plantas de soja crecidas en hidroponía.

**Tabla 3.** Efecto de los quelatos y complejos aplicados por vía foliar (Experimento II) en las variaciones de Índice SPAD medido en las hojas formadas tras la aplicación de los tratamientos, el peso seco de las plantas y la concentración foliar de Fe de las plantas de soja crecidas en hidroponía.

### **CAPÍTULO IV. Aplicación foliar de IDHA/Fe<sup>3+</sup> para corregir la clorosis férrica en plantas de soja. Influencia del estado nutricional y del tipo de adyuvante.**

**Tabla 1.** Tratamientos, adyuvantes y dosis empleadas en el Experimento I.

**Tabla 2.** Tratamientos, adyuvantes y dosis empleadas en el Experimento II.

**Tabla 3.** Valores de SPAD, peso seco, concentración de Fe y Mn en raíz, y relación Fe/Mn y Fe/(Mn+Cu+Zn) en la raíz de plantas de soja al final del Experimento I.

**Tabla 4.** Valores de SPAD, peso seco, concentración de Fe y Mn en raíz y hojas no tratadas, y relación Fe/Mn y Fe/(Mn+Cu+Zn) en la raíz y hojas no tratadas de plantas de soja al final del Experimento II.

**CAPÍTULO V. Empleo de complejos de Fe formados con sub-productos de la industria papelera (lignosulfonatos) y olivarera (extractos de alperujo modificados) como correctores de la clorosis férrica en plantas de soja, pepino y tomate. Aplicación del marcaje isotópico al estudio de la absorción y redistribución del Fe aplicado.**

**Capítulo V.1. Revalorización de un residuo del sistema de dos fases de extracción del aceite de oliva como fertilizante de micronutrientes.**

**Tabla 1.** Caracterización físico-química de los suelos utilizados en los ensayos de interacción.

**Tabla 2.** Capacidad de complejación del extracto de alperujo modificado y formación de complejos con Fe, Zn, Mn y Cu.

**Tabla 3.** Análisis mediante ANOVA de dos factores del peso seco de las plantas, la concentración foliar de Fe y la relación Fe/Mn en hoja, tras la aplicación de los complejos y quelatos de Fe a la disolución nutritiva

**Tabla 4.** Efecto de los diferentes complejos y quelatos férricos aplicados a la disolución nutritiva en el peso seco, la concentración foliar de Fe y la relación Fe/Mn en hoja de las plantas de soja a los 8 y 22 días.

**Tabla 5.** Efecto de los diferentes complejos y quelatos férricos aplicados por vía foliar a la disolución nutritiva en el peso seco, la concentración de Fe en raíz y la relación Fe/Mn en raíz de las plantas de soja a 22 días.

**Capítulo V.2. Evaluación de complejos <sup>59</sup>Fe-Lignosulfonato como fuente de Fe para plantas.**

**Tabla 1.** Características químicas de los LS estudiados.

**Tabla 2.** Solubilización de <sup>59</sup>Fe de <sup>59</sup>Fe-hidróxido por LS tras 22 h de interacción; los LS se añadieron a una concentración final 5 µM a un tubo de diálisis que contenía 10 µmoles de <sup>59</sup>Fe-hidróxido. Los datos corresponden a la media ± ET de dos experimentos

independientes con cuatro replicados, y hacen referencia a la cantidad de  $^{59}\text{Fe}$  recuperada en la disolución. Letras distintas en la misma columna denotan diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). La adición de EDDHA a una concentración final  $5\mu\text{M}$  a la disolución de  $^{59}\text{Fe}$ -hidróxido amorfo solubilizó  $16.33 \pm 2.66$  nmoles de  $^{59}\text{Fe}$ .

**Tabla 3.**  $^{59}\text{Fe}$  eluido a través de una columna de suelo (Eutric cambisol), cuando el  $^{59}\text{Fe}$  se añadió como  $^{59}\text{FeLS}$ . El eluyente es una disolución nutritiva (A, tamponada con HEPES-KOH 10mM, pH 7.5) sin Fe. Los datos corresponden a la media  $\pm$  ET de dos experimentos independientes con cuatro replicados. También se muestra el porcentaje de  $^{59}\text{Fe}$  eluido respecto a los 5 nmoles de  $^{59}\text{Fe}$  añadidos en la parte superior de la columna. La cantidad de  $^{59}\text{Fe}$  eluida al añadir  $^{59}\text{Fe-EDDHA}$  fue  $3162 \pm 87$  pmoles (63.2% de la cantidad total de  $^{59}\text{Fe}$  añadida).

**Tabla 4.** Absorción y translocación de  $^{59}\text{Fe}$  por plantas de tomate con deficiencias de Fe tratadas con  $^{59}\text{Fe-LS}$  o  $^{59}\text{Fe-EDDHA}$  (Fe  $1\mu\text{M}$ ) aplicados a la disolución nutritiva (pH 7.5). También se muestra la tasa de reducción de Fe(III)-LS o Fe(III)-EDDHA (Fe  $10\mu\text{M}$ ) por las raíces de las plantas.

**Tabla 5.** Absorción y translocación de  $^{59}\text{Fe}$  por plantas de tomate con deficiencias de Fe tratadas por vía foliar con  $^{59}\text{Fe-LS}$  o  $^{59}\text{Fe-EDDHA}$ , 7 días después de la aplicación. Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de  $^{59}\text{Fe}$  translocado a las partes de la planta no tratadas. También se muestran los valores de  $^{59}\text{Fe}$  distribuidos a distintos tejidos (expresados como el porcentaje de  $^{59}\text{Fe}$  translocado).

**Tabla 6.** Absorción y translocación de  $^{59}\text{Fe}$  por plantas de pepino con deficiencias de Fe tratadas por vía foliar con  $^{59}\text{Fe-LS}$  o  $^{59}\text{Fe-EDDHA}$ , 7 días después de la aplicación. Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de  $^{59}\text{Fe}$  translocado a las partes de la planta no tratadas. También se muestran los valores de  $^{59}\text{Fe}$  distribuidos a distintos tejidos (expresados como el porcentaje de  $^{59}\text{Fe}$  translocado).

**Tabla 7.** Reducción de Fe(III)-LS o Fe(III)-EDTA por discos foliares de plantas de tomate y pepino con deficiencias de Fe. Las medidas se realizaron en oscuridad.

**Capítulo V.3. Eficacia de los complejos Lignosulfonato/ $\text{Fe}^{3+}$  para corregir deficiencias de Fe en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv Ashley)**

**Tabla 1.** Caracterización y capacidad de complejación de los LS estudiados.

**Tabla 2.** Efecto de la aplicación foliar de LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  y EDTA/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  en el peso seco de las plantas, el Índice SPAD, la concentración total de Fe y la concentración de  $^{57}\text{Fe}$  enriquecido al realizar una única aplicación de los tratamientos (las plantas fueron muestreadas 11 días después de la aplicación de los tratamientos).

**Tabla 3:** Efecto de la aplicación foliar de LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  en el peso seco de las plantas, el Índice SPAD, la concentración total de Fe y la concentración de  $^{57}\text{Fe}$  enriquecido, al comparar el número de aplicaciones realizadas (las plantas fueron muestreadas 21 días después de la primera aplicación de los tratamientos).

**ABREVIATURAS**

<b>AAS</b>	Espectroscopía de Absorción Atómica
<b>AMPSO</b>	Ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil) amino]-2-hidroxiopropanosulfónico
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AOAC</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>APG</b>	Alkylpolyglucoside
<b>BPDS</b>	Ácido 4,7-difenil-1,10-batofenantrolin-disulfónico
<b>CAPS</b>	Ácido 3-(cyclohexilamino)-1-propanosulfónico
<b>CE</b>	Comunidad Europea
<b>CEN</b>	Comité Europeo de Normalización
<b>DOCE</b>	Diario Oficial de las Comunidades Europeas
<b>DOUE</b>	Diario Oficial de la Unión Europea
<b>DTPA</b>	Ácido dietilendiaminopentaacético
<b>DW</b>	Peso seco
<b>EDDS</b>	Ácido etilendiaminodisuccínico
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FC-R</b>	Fe <sup>3+</sup> -quelato reductasa
<b>FS</b>	Fitosideróforo
<b>FTIR</b>	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier
<b>FW</b>	Peso fresco
<b>GLY</b>	Glycine based adjuvant
<b>HEPES</b>	Ácido 2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfónico
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo
<b>IDHA</b>	Ácido n-(1,2-dicarboxietil)-D,L-aspártico
<b>LS</b>	Lignosulfonato
<b>MES</b>	Ácido [2-(N-morfolino)-etanosulfónico]
<b>M<sub>w</sub></b>	Peso molecular
<b>NA</b>	Nicotiamina

<b><i>o,o</i>-EDDHA</b>	Ácido etilendiamino-di-( <i>o</i> -hidroxifenilacético)
<b><i>o,p</i>-EDDHA</b>	Ácido etilendiamino-N-( <i>o</i> -hidroxifenilacético)-N <sup>2</sup> -( <i>p</i> -hidroxifenilacético)
<b>OMW</b>	Alperujo
<b>OMW<sub>m</sub></b>	Extracto de alperujo modificado
<b>Orden APA</b>	Orden ministerial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>PS</b>	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate
<b>RD</b>	Real Decreto
<b>U</b>	Urea based adjuvant
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>WEHS</b>	Fracción soluble en agua de la materia orgánica







## ***RESUMEN***

La clorosis férrica es un desorden nutricional muy común en regiones de suelos calcáreos, donde muchos cultivos se ven afectador por carencias de hierro. La aplicación al suelo de quelatos sintéticos es actualmente la forma más eficaz de resolver estas deficiencias, si bien estos productos presentan una serie de desventajas. Debido a su elevado precio, su aplicación sólo es apropiada en cultivos de alto valor añadido. Además, son normalmente compuestos recalcitrantes o de degradación muy lenta, lo que unido a su lavado desde los horizontes superficiales del suelo por las aguas de riego o por la lluvia, provoca la contaminación de las aguas subterráneas. Por ello, en la presente memoria se han estudiado distintos quelatos biodegradables y complejos de distintas procedencias pero derivados siempre de productos naturales como correctores de la clorosis férrica. Aunque estos quelatos biodegradables y complejos suelen presentar una buena capacidad complejante de Fe, son en general poco estables en suelos calizos, por lo que se ha ensayado su aplicación a la disolución nutritiva de cultivos desarrollados en hidroponía o en forma de rociados foliares.

Al comparar conjuntamente quelatos y complejos, en general los primeros han presentado mayor capacidad para corregir la clorosis férrica independientemente de que su aplicación se realice por vía foliar o a través de la disolución nutritiva. El IDHA/Fe<sup>3+</sup> y el EDDS/Fe<sup>3+</sup> han sido los quelatos biodegradables evaluados. Ambos han mostrado una capacidad comparable a la del EDTA/Fe<sup>3+</sup> para mejorar el estado nutricional de plantas cloróticas. De los resultados de estos ensayos se concluyó además que el tipo de adyuvante puede condicionar notablemente la eficacia las aplicaciones foliares, por lo cual éste debe ser escogido cuidadosamente. Entre los adyuvantes ensayados, los más eficaces han sido los basados en urea y en alquilpoliglucósidos. Por otra parte, se ha comprobado que las aplicaciones foliares son más eficaces si existe una fuente adicional de Fe radicular.

Los complejos incluyen productos de naturaleza muy diversa, siendo muchos de ellos subproductos derivados de la transformación industrial de compuestos naturales, como la lignina. La eficacia como posibles correctores de la clorosis férrica de un extracto de alperujo modificado (obtenido a partir de los subproductos generados en el proceso de extracción del aceite de oliva) y de diferentes lignosulfonatos (subproductos

de la extracción de pasta de celulosa) obtenidos a partir de madera de eucalipto y de abeto ha sido evaluada, comprobándose que ambos eran capaces de proporcionar Fe a plantas cloróticas en hidroponía o a través de rociados foliares, mientras que por su escasa estabilidad en condiciones calcáreas su aplicación a suelos no se recomienda. Al comparar lignosulfonatos de diferentes procedencias en los cuales el contenido en grupos funcionales (carboxílicos y sulfónicos) capaces de complejar Fe había sido incrementado, se ha comprobado que estas modificaciones favorecen la complejación de Fe, pero no su eficacia frente a planta.

Por otra parte, el marcaje isotópico se ha aplicado en un intento por cuantificar la capacidad de los distintos lignosulfonatos para suministrar Fe a la planta, empleando tanto un isótopo radiactivo ( $^{59}\text{Fe}$ ) como un isótopo estable ( $^{57}\text{Fe}$ ). El uso de  $^{59}\text{Fe}$  fue de gran utilidad en ensayos a corto plazo, que fueron una primera aproximación a la cuantificación de la efectividad de los productos al ser aplicados en disolución nutritiva o mediante aplicaciones foliares. Puesto que el empleo de  $^{59}\text{Fe}$  conlleva una serie de limitaciones relacionadas con el manejo y con las condiciones de aplicación de radioisótopos, así como con la limitada duración de los ensayos realizados debido a la pérdida de actividad del isótopo, en dos nuevos experimentos se estudió la eficacia de complejos  $^{57}\text{Fe}$ -Lignosulfonato al ser aplicados mediante rociados foliares y en ensayos de mayor duración. Con este nuevo isótopo, como ya se observó al trabajar con  $^{59}\text{Fe}$ , todos los productos fueron capaces de aportar Fe a las plantas tratadas, y éste era redistribuido a otros órganos en crecimiento.

---

**ABSTRACT**

Iron chlorosis is a common disorder in calcareous regions, where many crops can be affected by this deficiency. Fe chelates applied to soils are the most efficient way to overcome iron chlorosis. However, due to their high price these chelates are only suitable for cash crops. On the other hand, their degradability is scarce in most of cases, and contamination of underground waters can occur due to their washing after rain or irrigation. Thus, in this dissertation the ability of several biodegradable chelates and complexes with different origins but always derived from natural products, to overcome Fe chlorosis has been studied. Since the stability of these products is usually low in calcareous soils, their application has been tested as foliar sprays or through their application to the nutrient solution of crops grown in hydroponics.

When several chelates and complexes were compared, in general biodegradable Fe chelates have exhibited higher ability than complexes to overcome Fe deficiencies, both when applied to nutrient solutions or through foliar sprays. The biodegradable chelates EDDS/Fe<sup>3+</sup> and IDHA/Fe<sup>3+</sup> have been studied, and both behaved as efficiently as EDTA/ Fe<sup>3+</sup> improving the nutritional status of chlorotic plants. The adjuvant used influenced the behavior of the foliar applications, confirming that care should be taken in choosing them. Among the adjuvants tested, the most efficient is the one based in urea, followed by the non-ionic alquilpoliglucoside surfactant. On the other hand, these assays confirmed that the effectiveness of the foliar application of Fe is scarce if Fe is not supplied simultaneously through roots.

Complexes include products with different origins, often derived from the transformation by industrial processes of natural products such as lignin. In this dissertation the efficacy as Fe fertilizers of a modified olive mill waste and of different lignosulfonates has been studied. Both type of products have exhibited a good ability to provide Fe to chlorotic plants as foliar sprays or through the nutrient solution, but since their stability under calcareous soils conditions is very low, their application to soils is not recommended. Several lignosulfonates derived from eucalyptus and spruce wood and modified to increase the percentage of functional groups (carboxylic and sulfonic) capable to complex Fe have also been compared, being concluded that the modifications

of the original molecule improve Fe complexation, but not their efficacy to provide Fe to the plants.

In order to quantify the amount of Fe absorbed and translocated by plants when Fe-Lignosulfonate complexes were applied, labelled Fe has been used. Two isotopes were used as radioactive ( $^{59}\text{Fe}$ ) and stable isotopes ( $^{57}\text{Fe}$ ).  $^{59}\text{Fe}$  has been useful in short term experiment, but due to the intrinsic limitations related to radioactive isotopes (associated to the length of the experiments and to the way in which applications were performed), additional assays with  $^{57}\text{Fe}$ -Lignosulfonate complexes applied through foliar sprays in longer experiments have also been done. Independently of the isotope used, all the lignosulfonate complexes can supply Fe to plants, and the Fe translocated is mostly directed to growing organs

# Capítulo I:

---

## Introducción





## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. LA CLOROSIS FÉRRICA

La clorosis férrica es una deficiencia nutricional muy común que afecta a numerosos cultivos de alto valor añadido como frutales (kiwi, melocotonero, peral, cítricos, etc.), así como a cultivos anuales como arroz, soja, tomate, judía, etc. Por su elevada incidencia, es uno de los principales factores limitantes de la producción agrícola en España (Valle del Ebro, Andalucía y Comunidad Valenciana principalmente) y en otros países de la región mediterránea (Grecia, Francia, Italia, Turquía, Israel, Egipto, etc.), donde se estima que entre el 20 % y el 50 % de los cultivos están afectados por esta deficiencia (Jaeger et al., 2000); así como en otros fuera de esta región, como Estados Unidos, India, etc. Su incidencia en cultivos de alto interés comercial provoca que el gasto en tratamientos correctores sea muy elevado. Concretamente en España en el año 2004 el gasto en tratamientos correctores de carencias de Fe se estimó en 26 millones de euros (García-Marco, 2005).

Las plantas deficientes en Fe muestran diversos síntomas, entre los cuales el más característico es el amarillamiento de las hojas jóvenes (Figura 1) debido a una disminución de la concentración de pigmentos fotosintéticos, fundamentalmente clorofilas (Abadía y Abadía, 1993). Aparece, generalmente, en la zona intervenal de las hojas jóvenes, mientras que los nervios permanecen verdes debido a que el Fe es distribuido escasamente hacia las zonas en crecimiento. En casos extremos, la hoja adquiere un color blanco y puede llegar a manifestar necrosis (Chaney, 1984). Cuando la



**Figura 1.** Hojas cloróticas

clorosis es grave se produce incluso la muerte de la planta.

La deficiencia de Fe suele tener menos efecto sobre el crecimiento de la hoja, que se ve afectado sólo en casos de deficiencia extrema (Abbott, 1967). No obstante, cuando el crecimiento y desarrollo de la

planta se ven afectados, la producción se reduce notablemente (Miller et al., 1984). En frutales, el efecto sobre la producción es especialmente significativo y tiene importantes connotaciones económicas, puesto que, si no se corrige, el crecimiento de los árboles se ve afectado, la floración es menor, los frutos son menos numerosos y más pequeños (Álvarez-Fernández et al., 2003a; Álvarez-Fernández et al., 2005) y el ciclo vital del árbol se reduce, de forma que su fase productiva resulta considerablemente inferior a la normal (Carpena et al., 1965). La deficiencia de Fe reduce el crecimiento de las hojas (Kosegarten et al., 1998) y la raíz (Bertoni et al., 1992) e inhibe el desarrollo de hojas nuevas (Kosegarten et al., 1998).

## 2. BIODISPONIBILIDAD DEL Fe

La clorosis férrica es un desorden fisiológico muy complejo, provocado por causas muy diversas, relacionadas con la disponibilidad del Fe en el suelo, su absorción por las raíces y su distribución en los tejidos vegetales

El Fe es el cuarto elemento en peso de la litosfera después del oxígeno, el silicio y el aluminio, siendo su concentración media del 3,8% en masa (Lindsay, 1979). No es frecuente encontrar bajas concentraciones de Fe total en suelos, aunque podría ocurrir en suelos orgánicos o arenosos degradados (Mengel y Kirkby, 2001). Por otra parte, en

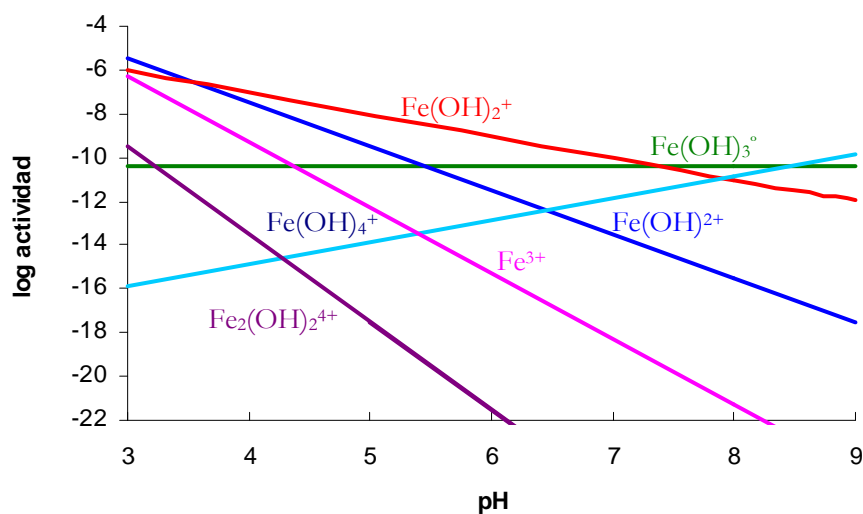


Figura 2. Hidrólisis de las especies de Fe (III) en equilibrio con el Fe-suelo.

suelos alcalinos y calcáreos el Fe se encuentra en forma de **óxidos e hidróxidos de muy baja solubilidad** (Figura 2). En estos suelos la concentración de Fe libre es de aproximadamente  $10^{-10}$  M, mientras que los niveles necesarios para la planta son mucho mayores, cercanos a  $10^{-7}$  M (Loeppert, 1986). Por ello, es frecuente que en estos suelos el Fe sea un nutriente deficitario para las plantas.

Las condiciones que causan una baja solubilidad y/o movilidad del Fe en la solución del suelo son una de las causas principales de la poca disponibilidad de Fe para las plantas (Wallace, 1982). Un pH elevado, altas cantidades de arcillas y carbonatos (Kashirad y Marschner, 1974; Kolesch et al, 1987 a,b), elevada humedad, alta salinidad (Award et al., 1988) y altas cantidades de fosfatos (Lindsay y Schwab, 1982) puede ser desencadenantes de la deficiencia de Fe.

Otros factores que pueden ser responsables de la deficiencia de Fe son aquellos relacionados con la **absorción y metabolismo de Fe** (Romera y de la Guardia, 1991). Por un lado se encuentran los factores que *inhiben el crecimiento de la raíz*: Bajas temperaturas (Chaney, 1984), presencia de herbicidas (Udoh y Nelson, 1986), encharcamiento de los suelos (Yen et al., 1988), enmiendas orgánicas (Römheld y Marschner, 1986) y presencia de bicarbonatos. Y por otro, los que *inhiben la absorción del Fe* (Hansen et al., 2005): bajos niveles de K (Jolley y Brown, 1985; Miller et al., 1990) y S (Astolfi et al., 2003); presencia de elevadas concentraciones de P y de otros metales como Mn (Cohen et al., 1998; Foy et al., 1998; Lucena et al., 2003), Cu (Alcántara et al., 1994; Barton et al., 2000), Zn (Cohen et al., 1998; Lindsay, 1984), Cd (Alcántara et al., 1994; Chang et al., 2003; Moral et al., 1994), Pb (Chang et al., 2003), Co (Barton et al., 2000), Cr (Barton et al., 2000) y Ni (Alcántara et al., 1994; Barton et al., 2000).

Se ha comprobado que la fijación de nitrógeno, proceso reductor en el que se liberan  $H^+$ , actúa aumentando los mecanismos de respuesta a la deficiencia de Fe en algunas plantas (Hansen et al., 2005). Otro aspecto importante es la variabilidad genética, ya que dentro de la misma especie pueden existir variedades eficientes y variedades no eficientes frente a la deficiencia de Fe.

Por otro lado, **el Fe en el interior de la planta puede estar formando parte de reservorios o depósitos inactivos no utilizables**, existiendo una deficiencia de Fe en la

planta aunque las concentraciones de Fe en la misma puedan parecer adecuadas (Morales et al., 1998). Tanto altas cantidades de fosfato como un pH apoplástico elevado podrían causar la precipitación del Fe en el interior de la planta en forma de fosfatos o hidróxidos férricos, formando así compuestos no disponibles para la plantas (Mengel, 1994).

Un factor importante que influye en la biodisponibilidad del Fe es la presencia de bicarbonato (Harley y Linder, 1945) debido al gran número de procesos en los que participa. Se ha propuesto que el bicarbonato puede afectar principalmente al crecimiento y metabolismo de las raíces (Yang et al., 1994), a la toma y transporte de Fe a la parte aérea (Alhendawi et al., 1997) y a la disponibilidad fisiológica del Fe en las hojas. La posible alcalinización del apoplasto y el citoplasma, debida a la presencia de bicarbonato, podría causar la precipitación del Fe en dichos compartimentos (Romera et al., 1992; Mengel, 1994) y una disminución de la actividad capacidad de la raíces para reducir  $\text{Fe}^{3+}$  (Toulon et al., 1992; Susín et al., 1996).

### 3. FUNCIONES DEL Fe EN LAS PLANTAS

Las numerosas funciones que el Fe realiza en la planta derivan de su capacidad para formar complejos y cambiar de estado de oxidación. El Fe es un elemento de transición con gran facilidad para formar complejos octaédricos con diversos ligandos. El potencial del par redox  $\text{Fe(III)} / \text{Fe(II)}$  es bastante elevado en medio ácido ( $E^0$  0,77 V) y disminuye rápidamente al aumentar el pH, debido a la formación de hidróxido férrico. El potencial redox varía con el ligando y esta variabilidad le confiere una especial importancia en los sistemas redox biológicos (Smith, 1984; Marschner, 1995). El Fe es necesario para gran número de funciones biológicas puesto que forma parte de enzimas y otras moléculas de vital importancia. En las plantas, el Fe interviene en la síntesis de clorofila y es esencial para el mantenimiento de la función y estructura del cloroplasto (Abadía, 1992). También interviene en procesos como la respiración, la fijación de nitrógeno (Clark, 1983) y la síntesis de ADN y hormonas (Briat y Lobréaux, 1997). Además, el Fe participa en otros procesos, como la reducción de sulfato (Miller et al., 1984; Naik, 1984) y la eliminación del peróxido de hidrógeno (Marschner et al., 1986; Guerinot y Yi, 1994).

#### 4. LOCALIZACIÓN DEL Fe EN LA PLANTA

En las plantas, el 80% del Fe está localizado en el cloroplasto (Terry y Low, 1982), y aproximadamente un 63% del Fe en la hoja está asociado a proteínas (Price, 1968). El tipo de proteínas en las que se incorpora el Fe se puede clasificar en:

- *Proteínas con grupo hemo.* Este grupo comprende todas las enzimas que contienen un grupo hemo, Fe-porfirina, como grupo prostético. Lo integran proteínas como los citocromos, catalasas y peroxidasas, representando cerca del 10% del Fe en la hoja.
- *Proteínas Fe-S.* En este grupo el Fe está coordinado con el grupo tiol de una cisteína. Este conjunto lo integran proteínas como la ferredoxina, superóxido dismutasa y la aconitasa. Constituyen aproximadamente un 20% del hierro en la hoja.
- *Fitoferritina.* Se trata de una proteína de reserva de Fe, y representa cerca de un 35% del Fe en la hoja, llegando a contener hasta el 80% del hierro de los cloroplastos (Tiffin y Brown, 1962).

#### 5. RESPUESTAS DE LAS RAÍCES ANTE LA DEFICIENCIA DE Fe

Las plantas toman el Fe directamente de la disolución del suelo, mediante un proceso de absorción activa, a través de la raíces (Uren, 1984). Aparentemente, el Fe se absorbe preferentemente en forma de  $Fe^{2+}$ , aunque hay algunas plantas que lo toman como  $Fe^{3+}$  quelado. Cuando la cantidad de Fe a disposición de la planta es suficiente, éstas tienden a utilizar sistemas de transporte de baja afinidad y el sistema de *reductasa standard*, presente en la membrana plasmática de todas las especies vegetales y capaz de reducir aceptores externos de electrones como el ferricianuro. Las plantas absorben sólo la cantidad de Fe necesaria para un óptimo crecimiento, previniendo así una posible toxicidad. El Fe libre puede ser altamente tóxico, ya que al reaccionar con el oxígeno forma radicales libres que dañan componentes celulares como ADN, proteínas, lípidos, etc. (Hell y Stephan, 2003). Sin embargo, bajo condiciones de deficiencia de Fe se produce la inducción de sistemas de transporte de alta afinidad (Andrews et al., 1999;

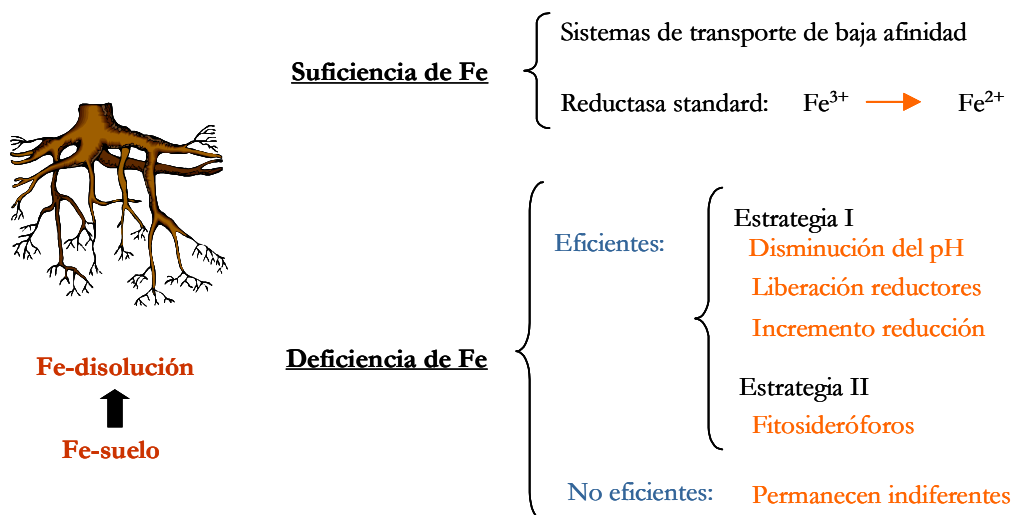


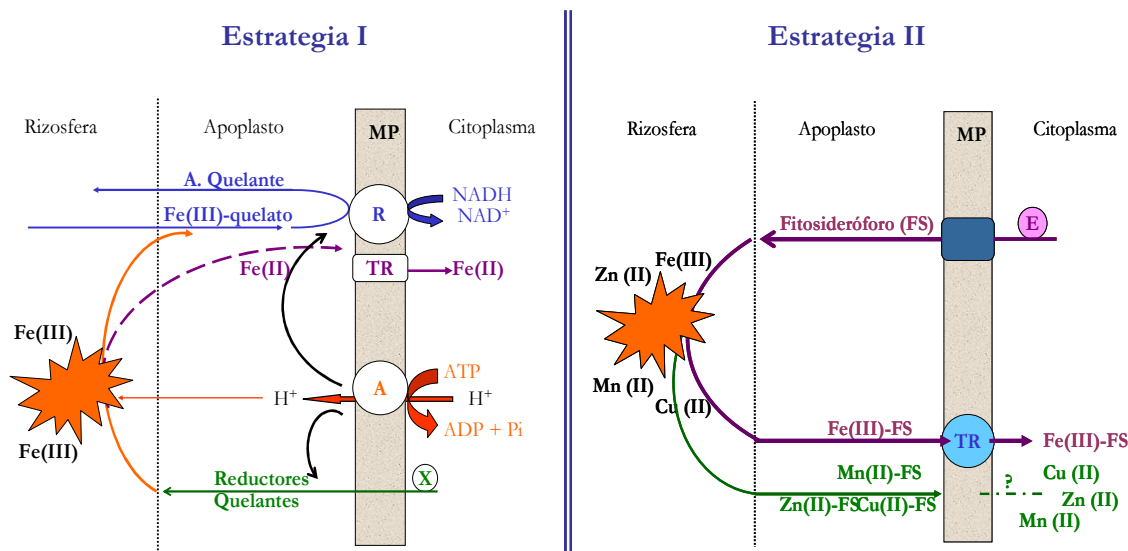
Figura 3. Mecanismos de absorción del Fe por la raíz de las plantas.

Kaplan, 2002). En la actualidad no se sabe con certeza si las plantas poseen ambos sistemas de transporte de Fe (Bauer y Hell, 2005).

El principal sistema para mantener la homeostasis del Fe consiste en la adaptación de los mecanismos de adquisición del Fe a las condiciones externas. Ante la deficiencia de Fe las plantas pueden permanecer indiferentes (plantas no eficientes) o desarrollar mecanismos de adaptación para aumentar su capacidad de tomar Fe del suelo (plantas eficientes) (Figura 3). Se han descrito dos estrategias distintas, que son utilizadas por las plantas eficientes, dependiendo de la forma de adquirir el Fe: la Estrategia II de las gramíneas y la Estrategia I de las dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas (Figura 4).

### 5.1. Estrategia I

Las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas desarrollan en condiciones de deficiencia de Fe una serie de respuestas que afectan a la estructura, morfología y fisiología de las raíces, todas ellas encaminadas a desarrollar mecanismos para aumentar la capacidad de absorción del Fe del suelo. Los fenómenos que afectan a la fisiología de la raíces son: aumento de la capacidad de reducción de quelatos mediante la actividad enzima *turbo reductasa* ( $Fe^{3+}$ -quelato reductasa, FC-R), que aparece unida a la membrana plasmática y es capaz de reducir quelatos de Fe (Chaney et al., 1972; Bienfait,



**Figura 4.** Modelo de las respuestas ante la deficiencia de Fe, Estrategia I (T= transportador, R= reductasa y A=  $H^+$ -ATPasa) y Estrategia II (E= Incremento en la síntesis y liberación de fitosideróforos; Tr = transportador Fe(III)-fitosideróforos; MP= membrana plasmática). (Adaptado de Maschner y Römheld, 1995).

1988a Moog y Brüggemann, 1994); la acidificación de la rizosfera (Alcántara et al., 1991; Rabotti y Zocchi, 1994) y la producción y excreción de compuestos fenólicos, flavinas y ácidos orgánicos. Los tres componentes de esta estrategia (FC-R,  $H^+$ -ATPasa y el transportador de membrana) aumentan su actividad bajo deficiencia de Fe (Hell y Stephan, 2003).

El modelo propuesto para la adquisición de Fe en plantas de Estrategia I se muestra en la Figura 4. Los pasos serían los siguientes: a) excreción de  $H^+$  a través de la inducción de la enzima  $H^+$ -ATPasa para acidificar la rizosfera y aumentar la solubilidad del  $Fe^{3+}$ ; b) reducción del  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  (forma más soluble) por medio de la enzima FC-R; c) transporte del  $Fe^{2+}$  al interior de la célula a través de un transportador de membrana.

### 5.1.1. Acidificación de la rizosfera

Las plantas pertenecientes a la Estrategia I, aunque no todas (Schmidt, 2005) suelen producir un descenso del pH de la solución en la que crecen (Welkie y Miller, 1993; Susín et al., 1994). La acidificación es debida a la bomba de protones dependiente de ATP situada en la membrana plasmática de la raíz (Toulon et al., 1992). La acidificación está localizada en las zonas subapicales de la raíz, diferenciándose de la

acidificación generalizada a lo largo de toda la raíz debida a la absorción preferente de cationes (Römheld et al., 1984). La estimulación de la acidificación en raíces deficientes en Fe varía de un 18% a un 100% (Buckhout et al., 1989; Valenti et al., 1991; Szabó-Nagi y Erdei, 1993; Rabotti y Zocchi, 1994; Susín et al., 1996; Schmidt et al., 1997) y es capaz de acidificar el entorno hasta aproximadamente 2 mm de distancia de la raíz, incluso en suelos calcáreos (Schaller, 1987). El incremento en la capacidad para excretar  $H^+$  y la consecuente disminución del pH de la rizosfera supone un aumento en la solubilidad de los compuestos de Fe del suelo y un aumento en la actividad FC-R (Susín et al., 1996), cuya máxima actividad se consigue a pH 6,5 (Holden et al., 1991), disminuyendo drásticamente a pH elevados. Además, la afinidad de esta enzima por el sustrato aumenta al disminuir el pH, probablemente debido a la neutralización de la carga negativa del quelato férrico, evitándose la repulsión de los centros de reducción (Cohen et al., 1997).

### 5.1.2. Inducción de la actividad reductasa

La reducción del  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  es un paso necesario para la toma de Fe por las plantas de Estrategia I (Chaney et al., 1972). La capacidad de la raíces de reducir  $Fe^{3+}$  del medio aumenta en condiciones de deficiencia de Fe y puede llegar a ser superior en 10-20 veces a los valores control (Moog y Brüggemann, 1994; Susín et al., 1996). Este aumento de actividad se ha observado en todas las plantas de Estrategia I investigadas (Schmidt, 2005). La actividad reductasa se localiza generalmente en la superficie de las partes subapicales de las raíces que muestran engrosamiento, así como en los pelos radiculares (Moog and Brüggemann, 1994).

La reducción ocurre al nivel de la membrana plasmática de la raíz, a través de una enzima específica (FC-R) capaz de reducir quelatos de  $Fe^{3+}$  (Bienfait, 1988a). Sin embargo, el mecanismo por el cual las raíces de las plantas eficientes pertenecientes a la Estrategia I inducen la reducción del  $Fe^{3+}$  distan de estar completamente dilucidados. La enzima FC-R podría ser inducida *de novo* bajo deficiencia de Fe, o ser una proteína constitutiva que se activara en condiciones de deficiencia de Fe. Los genes de la enzima que se han caracterizado (en el caso de la *Arabidopsis*, se han descrito hasta siete genes distintos pertenecientes a la familia FRO y localizados en diversos tejidos, sugiriendo que participan en la asimilación del Fe por la planta a diferentes niveles; mientras que el



FRO2 se ha detectado en raíces y hojas de tomate y guisante (Kim y Guerinot, 2007)) codifican polipéptidos que presentan sitios de unión por FAD y NAD(P)H, que actúan como donadores de electrones para reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  externo (Robinson et al., 1999; Waters et al., 2002; Li et al., 2004).

### 5.1.3. Transporte del $\text{Fe}^{3+}$ al interior de las células de la raíz

El  $\text{Fe}^{2+}$  es transportado al interior de la célula a través de un transportador IRT1, perteneciente a la familia ZIP de transportadores de metales (Kim y Guerinot, 2007), e identificado por primera vez en *Arabidopsis* (Eide et al., 1996). El IRT1 es el principal transportador inducido en raíces como respuesta a la deficiencia de Fe, si bien puede transportar también otros metales divalentes como Zn, Mn y Cd. No obstante, el IRT1 presenta una alta afinidad por el  $\text{Fe}^{2+}$  (Cohen et al., 2004). Además del IRT1, se han identificado otros quince transportadores pertenecientes a la familia ZIP en *Arabidopsis* (IRT2, IRT3, ZIP 1 a ZIP12, y el IAR1).

El transportador IRT1 se expresa en condiciones de deficiencia de Fe, y si el aporte vuelve a ser el adecuado la proteína se degrada (Connolly et al., 2002), evitando la toxicidad (Schmidt, 2005). Una regulación dual de este tipo se ha observado también para el gen FRO2 de la enzima FC-R (Connolly et al., 2003). Parece que se requiere de la presencia de cierta cantidad de Fe para inducir la expresión de ambos genes (Vert et al., 2003). Además, su expresión en la raíz podría estar controlada por la emisión de señales desde la parte aérea que, incluso con niveles adecuados de Fe en el medio, informan sobre el estado nutricional de la planta (Grusak y Pezeshgi, 1996). Esta dependencia de Fe podría ser debida a la relación de la actividad FC-R con el metabolismo de algunas hormonas vegetales (etileno, auxinas) o sus precursores, que se han propuesto como posibles señales que regulan los mecanismos de respuesta generados por las plantas ante la deficiencia de Fe (Romera et al., 2006), cuyas enzimas requieren Fe para su síntesis.

### 5.1.4. Otras respuestas

Además de estas tres reacciones, las plantas de Estrategia I pueden poseer otros mecanismos para aumentar la capacidad de absorción de Fe del suelo (López-Millán, 2000).

- *Cambios morfológicos en la raíz.* En condiciones de deficiencia de Fe muchas especies presentan cambios macro y microscópicos en su estructura radicular. Los cambios macroscópicos incluyen una disminución en el crecimiento de la raíz primaria, un aumento en el número de raíces laterales, la formación de pelos radiculares y el engrosamiento de las zonas subapicales de la raíz. En general, estos cambios macroscópicos permiten aumentar la superficie de contacto entre las raíces y el suelo. Los cambios microscópicos incluyen la presencia de células de transferencia en la epidermis de la zona de engrosamiento, incrementando así la superficie de contacto entre la pared celular y el citoplasma (Welkie y Miller, 1993).
  
- *Excreción de compuestos de bajo peso molecular.* Las raíces de las plantas son capaces de excretar activa o pasivamente gran variedad de compuestos orgánicos, entre los que se encuentran azúcares reductores, aminoácidos y ácidos orgánicos. El tipo de exudados radiculares está determinado genéticamente, aunque existen factores medioambientales que pueden causar una alteración en la composición de estos exudados. La tasa de exudación y su composición dependen del pH, temperatura y tipo de suelo, intensidad de la luz, así como de la edad y el estado nutricional de la planta, y de la presencia de microorganismos (Jones, 1998). La exudación de estos compuestos está estimulada en condiciones de deficiencia de Fe.
  - i) Fenoles: Las plantas deficientes en Fe producen y excretan diferentes compuestos de naturaleza fenólica (Brown y Ambler, 1974). Entre los compuestos identificados se encuentran el ácido cafeico (Olsen et al., 1981), el ácido fenólico, el ácido clorogénico (Hether et al., 1984) y el ácido p-cumárico. Probablemente el papel de los fenoles consista en la inhibición de la degradación de los ácidos orgánicos, cuyo papel en la nutrición férrica como quelantes de Fe es muy importante (Schmidt, 1999).
  - ii) Flavinas: En condiciones de deficiencia de Fe, algunas especies acumulan y excretan flavinas (Welkie y Miller, 1993), principalmente riboflavina (Welkie, 1996) y, en algunas especies, sulfatos de riboflavina (Susín et al., 1994). A pH alto las flavinas se acumulan en la zona subapical de la raíz, siendo excretadas al medio al disminuir el pH (Susín et al., 1994). Las especies que producen flavinas son generalmente muy eficientes en la toma de Fe (Welkie y Miller,

1993). Se sabe que las flavinas son capaces de reducir directamente compuestos de  $\text{Fe}^{3+}$  en presencia de donadores de electrones como el NADH y el NADPH (González-Vallejo et al., 1998). Por otra parte, los sulfatos de riboflavina pueden ejercer, una vez excretados, una acción antimicrobiana en las proximidades de la raíz, disminuyendo la posibilidad de que los microorganismos del entorno compitan con la planta por la adquisición de Fe (Susín et al., 1994).

iii) Ácidos orgánicos: Pueden llegar a ser el componente más abundante entre los compuestos de bajo peso molecular excretados por las raíces deficientes en Fe (Krafczyk et al., 1984). Los ácidos orgánicos están implicados en un gran número de procesos en el suelo, como la movilización y toma de nutrientes por plantas y microorganismos, la detoxificación de metales por las plantas, la proliferación de microorganismos en la rizosfera y la disolución de minerales del suelo (Jones, 1998). En condiciones de deficiencia de Fe la función más probable de estos ácidos consiste en la solubilización del  $\text{Fe}^{3+}$ . Cuando el pH del suelo es bajo, tanto citrato como malato forman complejos muy estables con el  $\text{Fe}^{3+}$ , favoreciendo su disolución en la solución del suelo. En suelos calcáreos, con pH alto, la movilización del Fe por malato y citrato es lenta, puesto que los complejos que se forman son inestables y se degradan rápidamente (Jones et al., 1996). Sin embargo, en estas condiciones la combinación del poder de acidificación de la ATPasa de la raíz con el poder quelante del citrato (que aumenta conforme disminuye el pH) podrían constituir un mecanismo viable para movilizar el Fe de la rizosfera (Jones, 1998).

▪ *Cambios en proteínas de la raíz.* Distintos trabajos realizados mediante electroforesis de dos dimensiones y por translación *in vitro* de mRNA de raíces (Bienfait, 1988b; Herbiak et al., 1996) han demostrado que se producen cambios en la síntesis proteica de distintos polipéptidos en condiciones de deficiencia.

▪ *Acumulación de ácidos orgánicos.* Una de las principales características de las plantas deficientes en Fe es un aumento en la concentración de ácidos orgánicos, principalmente malato y citrato, en todas las partes de la planta (Brown, 1966; Landsberg, 1981; Alhendawi et al., 1997). Las posibles funciones de los ácidos orgánicos son muy diversas.

Sus características como agentes quelantes les permite intervenir en la movilización de Fe en la rizosfera. El citrato tiene un papel muy importante en la translocación y el transporte de Fe a larga distancia (Tiffin, 1966a,b). independientemente de qué proceso sea la causa y cuál la consecuencia, se ha encontrado una correlación entre la acumulación de ácidos orgánicos y la extrusión de protones (Landsberg, 1986; Fournier et al., 1992).

## 5.2. Estrategia II

Las raíces de las gramíneas sintetizan y excretan compuestos de bajo peso molecular, llamados fitosideróforos (FS). Estos compuestos quelan el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en el suelo y posteriormente son absorbidos a través de receptores específicos en la membrana plasmática de la raíz, sin reducción previa, a través de un sistema de transporte  $\text{Fe}^{3+}$ -FS de alta afinidad (Römheld y Maschner, 1986; Takagi, 1976) (Figura 4.). Todos los FS identificados hasta la fecha son aminoácidos análogos al ácido mugínico y se sintetizan en las zonas subapicales de la raíz (Marschner et al., 1987; Mori y Nishizawa, 1987). Los FS forman complejos con  $\text{Fe}^{3+}$  altamente estables, incrementando así la cantidad de Fe en disolución. La naturaleza química de estos compuestos depende de la especie (Marschner y Römheld, 1995).

El mecanismo de excreción de FS todavía no está claro, pero se cree que puede suceder a través de vesículas (Negishi et al., 2002). La cantidad de FS liberada está relacionada con el grado de resistencia a la clorosis (Kawai et al., 1988; Hansen et al., 1996), aumentando la biosíntesis al incrementarse la deficiencia en raíz. La liberación de FS depende también de la temperatura, mostrando máximos diurnos (Kawai y Alam, 2005). El transporte del complejo hasta el citoplasma de la célula se realiza a través de un transportador específico (YS1) (Curie et al., 2001; Kim y Guerinot, 2007), que se localiza en las zonas apicales de la raíz (Marschner y Römheld, 1995), eludiendo el paso reductor del  $\text{Fe}^{3+}$ . Esta proteína está regulada por la deficiencia de Fe en raíz y en tallo y permite también el transporte del complejo nicotiamina/ $\text{Fe}^{2+}$  (NA/ $\text{Fe}^{2+}$ ) y, posiblemente, otros metales (Hell y Stephan, 2003). Una vez que el complejo se encuentra en el citosol, el  $\text{Fe}^{3+}$  es liberado y el FS se degrada o se excreta al exterior nuevamente. Bajo deficiencia de Fe también aumenta la velocidad de absorción de estos complejos. Se ha comprobado que tanto el FS libre como el complejo férrico formado son absorbidos por las raíces de

la planta (Kawai y Alam, 2005). Ambos muestran diferente absorción, sugiriendo que las células de la raíz podrían diferenciar entre el FS libre y el complejado, de manera que el FS libre podría ser excretado de nuevo a la rizosfera.

## 6. TRANSPORTE DEL Fe EN LA PLANTA

Una de las características más llamativas de la clorosis férrica es que en las hojas cloróticas de especies cultivadas en el campo la concentración de Fe total puede ser superior al de las hojas verdes (Morales et al., 1998). Igualmente, la concentración de Fe en las raíces de plantas cloróticas puede ser varias veces superior a la presente en las hojas de estas mismas plantas (Mengel, 1994). Este fenómeno, conocido como “paradoja de la clorosis férrica” (Morales et al., 1998; Römheld, 2000; Nikolic y Römheld, 2002), sugiere que la clorosis férrica es más un problema fisiológico relacionado con los procesos metabólicos en raíces y hojas, que un problema de disponibilidad de Fe en la disolución del suelo. El recorrido del Fe desde la raíz hasta el cloroplasto presenta varias etapas críticas que pueden originar la clorosis férrica.

La absorción de Fe y otros micronutrientes por la planta comienza en el apoplasto de las células epidérmicas de la raíz (Sattelmacher, 2001), y es transportado a la parte aérea vía xilema. El  $\text{Fe}^{3+}$  del apoplasto, en las plantas de Estrategia I, debe ser reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  a través del sistema enzimático FC-R. En suelos calizos, la actividad de esta enzima, que disminuye drásticamente a pH elevados (Susín et al., 1996), puede ser inhibida por la presencia de bicarbonato en el medio (Mengel, 1994; Lucena, 2000a) y, en menor medida, por la absorción de nitrato y su posterior reducción a amonio (Lucena 2000). El  $\text{Fe}^{2+}$  en plantas de Estrategia I o el complejo FS/ $\text{Fe}^{3+}$  en plantas de Estrategia II son transportados al interior de la célula vegetal mediante los transportadores de membrana específicos mencionados anteriormente. Sin embargo, no todo el Fe del apoplasto entra en la célula. En condiciones de buena aireación, parte de este Fe se oxida y precipita en forma de oxihidróxidos o fosfatos, formando una reserva de Fe (Bienfait et al., 1985).

Los iones  $\text{Fe}^{2+}$  libres son muy reactivos y deben ser protegidos para evitar su precipitación, así como su toxicidad potencial debido a que pueden catalizar la transferencia de electrones a especies de oxígeno, para producir finalmente radicales

hidroxilo (Guerinot y Yi, 1994; Hell y Stephan, 2003; Kim y Guerinot, 2007). Esto hace suponer que el Fe en el citoplasma está unido a algún tipo de compuesto que evita estos efectos. Distintos autores (Scholz et al., 1988; Pitch et al., 1997) han propuesto la nicotiamina como principal complejante del Fe libre en las células, siempre que no esté formando parte de proteínas o como ferritina. El transporte del Fe desde las células epidérmicas de la raíz hasta el xilema se realiza a través del simplasto en forma de complejo NA/Fe<sup>2+</sup>. Una vez allí, es oxidado a Fe<sup>3+</sup> y transportado a larga distancia a las partes superiores de la planta como citrato/Fe<sup>3+</sup> (Tiffin, 1966a,b; Chaney, 1989; López-Millán et al., 2001; López-Millán et al., 2009), o bien formando complejos con aniones orgánicos como el malato o el malonato (Brown, 1963; Chaney, 1989) e incluso con otro tipo de sustancias orgánicas (Cataldo et al., 1988). El complejo malato/Fe<sup>3+</sup> se vería favorecido cuando los niveles de citrato fuesen bajos (Chaney, 1989). El tipo de complejo con Fe<sup>3+</sup> puede variar en función de la edad de la planta y en situaciones de estrés, ya que la composición y el pH de la savia del xilema pueden verse afectados en dichos casos.

Como ya se ha comentado anteriormente, es frecuente en plantas cloróticas encontrar concentraciones de Fe mayores en hojas verdes que en hojas cloróticas, lo que sugiere que la clorosis no es sólo un problema de adquisición y transporte del Fe desde la raíz a la parte aérea, sino también de distribución del Fe en las hojas. Cuando el Fe<sup>3+</sup> llega a las hojas tiene que ser reducido para poder entrar en la célula, para lo cual se ha propuesto la existencia de una enzima FC-R similar a la existente en raíz, situada en la membrana plasmática del mesófilo de la hoja, y que usaría la luz como fuente de energía para la reducción (Jolley et al., 1987; Bienfait y Scheffers, 1992; Brüggemann et al., 1993; de la Guardia y Alcántara, 1996; González-Vallejo et al., 1999; Nikolic y Römheld, 1999; Larbi et al., 2001). Se ha demostrado que esta FC-R alcanza su máxima actividad en el intervalo de pH 6,3-6,8 en distintas especies vegetales (Wagner y Moog, 1997), así como que en plantas cloróticas el incremento del pH apoplástico y menor fotosíntesis hace que la actividad de la enzima disminuya (Mengel, 1994; Kosegarten et al., 1999; López-Millán et al., 2001). Todo ello podría inhibir el paso del Fe al interior de la célula. En todo, caso una vez reducido, la entrada del Fe ocurriría de forma similar a la descrita en raíz, tal y como confirma el hallazgo de los genes FRO de la enzima FC-R y IRT del transportador en hoja y raíz de guisante y tomate (Bauer et al., 2004; Kim y Guerinot, 2007).

El cloroplasto es el destino final de gran parte del Fe de la planta (Terry y Abadía, 1986). El transporte del Fe al interior del cloroplasto es activo y dependiente de la luz, y podría estar mediado por una FC-R no dependiente de ATP ni de un flujo de  $H^+$  (Bughio et al., 1997a,b; Mori, 1998). Este transporte es dependiente del pH, con un máximo a pH 8, y a diferencia de lo que ocurre en raíz no se inhibe por la presencia de metales pesados en el medio. Una vez el Fe alcanza su destino final, si no va a ser utilizado se acumula en formas no tóxicas y solubles, para posteriormente ser liberado en función de las necesidades de la plantas. Esta función la realiza la ferritina (Briat, 1996; Briat y Lobréaux, 1997). Otro posible destino final del Fe es la mitocondria, donde se generan la proteínas con enlace Fe-S (Kushnir et al., 2001).

Además del transporte mayoritario del Fe vía xilema, siguiendo la dirección del flujo de masas creado por la transpiración, el Fe es transportado en parte vía floema hasta los órganos en crecimiento. En estos órganos la intensidad de la transpiración es menor debido a la estructura incompleta del xilema (Landsberg, 1994), por lo que es necesario utilizar también la ruta del floema. El hierro libre tiene una movilidad intermedia en el floema (Marschner, 1995), debido sobre todo a su alta afinidad por el fosfato, el anión inorgánico más abundante en él y con el que forma fosfato férrico, altamente insoluble (Hill, 1980). El transporte de Fe en el floema se realiza en forma de uno o varios complejos de Fe (Grusak, 1995), principalmente como NA/Fe<sup>2+</sup> (Kim y Guerinot, 2007; Briat et al., 2007).

## 7. CORRECCIÓN DE LA CLOROSIS FÉRRICA

Si bien son muchas las técnicas empleadas en la corrección de la deficiencia de hierro en los cultivos, son pocas las que se han mostrado realmente eficaces. A continuación se enumeran estas metodologías de prevención y corrección de la clorosis férrica, prestando especial atención al empleo de quelatos sintéticos biodegradables y de complejos, objeto de estudio de la presente memoria.

## 7.1. Mejora genética y selección de cultivares resistentes

La mejora genética es una herramienta prometedora que permitiría solventar la clorosis férrica mediante el cultivo de cultivares resistentes obtenido mediante modificación genética (mejorando los mecanismos de absorción y disminuyendo la susceptibilidad a la clorosis férrica) (Charlson et al., 2003). Sin embargo, con el nivel de conocimiento actual únicamente se ha podido mejorar parcialmente la resistencia de ciertas especies a la deficiencia de Fe. La utilización de cultivares tolerantes está considerada la mejor solución para combatir esta deficiencia en suelos calizos, si bien es frecuente que las variedades tolerantes sean altamente sensibles a otros tipos de estrés (bióticos y/o abióticos) o presenten menor productividad y calidad de los frutos (Tagliavini y Rombolà, 2001). Además la selección de cultivares suele responder más a criterios de productividad y aceptación en el mercado que a su susceptibilidad a sufrir clorosis férrica (Rombolà y Tagliavini, 2006). En todo caso, tanto la mejora genética como la selección de cultivares tolerantes son técnicas preventivas que sólo han de ser tomadas antes de la implantación del cultivo.

## 7.2. Prácticas agrícolas adecuadas

Una vez establecido el cultivo, el empleo de prácticas agrícolas apropiadas resulta crucial para prevenir la aparición de la clorosis férrica (Chen, 1997). Estas prácticas consisten en eliminar los riesgos de compactación, alcalinización y encharcamiento del suelo, favoreciendo un buen drenaje o controlando la frecuencia y el volumen de los riegos (Romera y de la Guardia, 1991). Otra práctica, habitual en árboles frutales y viñedos, es su cultivo junto con otras plantas anuales, reduciendo así la compactación y aumentando la porosidad, filtración y contenido de materia orgánica del suelo (Tagliavini y Rombolà, 2001). Entre estas plantas anuales se incluye el cultivo de especies con estrategia II (gramíneas) que excretan fitosideróforos capaces de aumentar la solubilidad del Fe en el suelo (Rombolà y Tagliavini, 2006).



### 7.3. Mejora de las condiciones del suelo

Una de las causas de la clorosis férrica es la escasa disponibilidad del Fe presente en el la disolución del suelo, por lo que la mejora de las condiciones del mismo, normalmente mediante adición de materia orgánica o acidificación, es una de las técnicas empleadas para reducir el impacto de la clorosis férrica.

#### 7.3.1. Adición de materia orgánica

La capacidad de las sustancias húmicas para formar complejos con micronutrientes catiónicos mediante diferentes enlaces es bien conocida (Stevenson, 1994). El tipo de enlace determinará la estabilidad de esta unión y, por tanto, la capacidad de estas sustancias húmicas para solubilizar el Fe presente en la disolución del suelo. En primer lugar, se forman las uniones de naturaleza más fuerte, y una vez que todos estos sitios de complejación se saturan, pasan a formarse uniones más débiles (Varanini y Pinton, 2006). La estabilidad de estas uniones dependerá también del pH de la disolución del suelo. La capacidad de las sustancias húmicas para formar complejos con el Fe afectará inevitablemente a la disponibilidad de este micronutriente para la planta, manteniendo el Fe del suelo en disolución. Además, la importancia de estos complejos dependerá también de la presencia de otros agentes complejantes y quelantes de origen natural, como sideróforos y fitosideróforos. Por otra parte, el Fe disponible también aumenta debido a la estabilización de la ferrihidrita, que en lugar de cristalizar hacia formas más estables forma complejos con fracciones de sustancias húmicas de elevado peso molecular (Schwertmann, 1991).

#### 7.3.2. Adición de productos acidificantes

La aplicación de sustancias para reducir el pH es poco eficaz, debido al efecto tampón del ión bicarbonato. Entre los productos de este tipo utilizados (con o sin Fe añadido) se encuentran ácidos orgánicos (ácido málico, ácido salicílico, ácido cítrico, etc.), sales de amonio, etc.

## 7.4. Adición de fertilizantes

Cuando un cultivo ya establecido presenta clorosis férrica, la adición de productos fertilizantes es actualmente la técnica más eficaz para corregir estas deficiencias. De forma general, estos productos pueden clasificarse en dos grandes grupos, los quelatos sintéticos y los complejos (de origen natural o derivados de subproductos de diversas actividades industriales). No obstante, también es frecuente la aplicación de otro tipo de productos, como sales inorgánicas de Fe.

### 7.4.1. Sales inorgánicas de Fe

El sulfato ferroso se ha aplicado tradicionalmente al suelo para corregir carencias de Fe (Rombolà y Tagliavini, 2006), aunque esta práctica por sí sola resulta ineficiente, ya que el  $\text{Fe}^{2+}$  del sulfato ferroso oxida rápidamente a  $\text{Fe}^{3+}$  y precipita en forma de hidróxido férrico, dejando de estar disponible para la planta. Este tipo de aplicaciones sigue siendo común en países en vías de desarrollo, donde la aplicación de quelatos férricos resulta inviable dado su elevado coste.

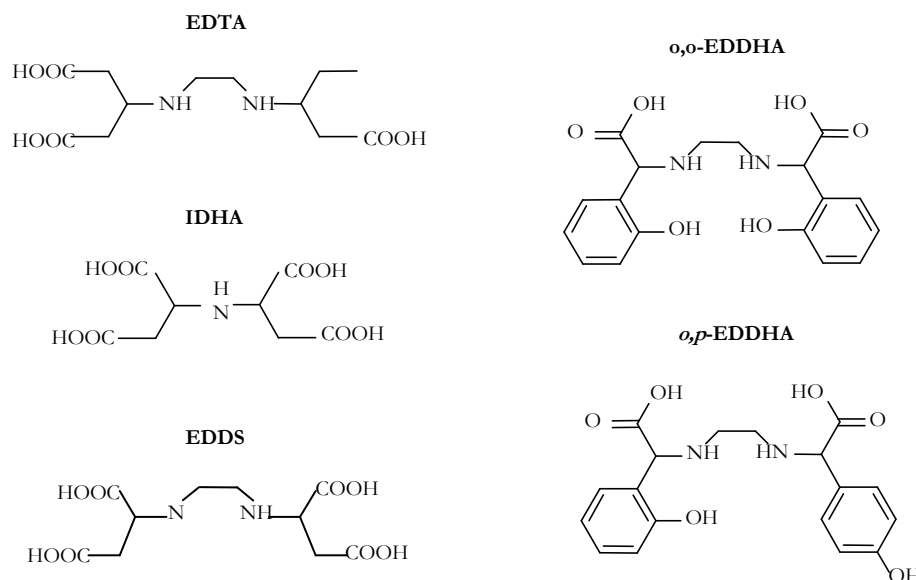
### 7.4.2. Quelatos sintéticos

Los quelatos metálicos son aniones orgánicos complejos, llamados agentes quelantes o ligando, con dos o más grupos funcionales capaces de compartir pares de electrones con un ión metálicos central. De esta manera, se forma una estructura cíclica en la que el metal queda retenido impidiéndose así su precipitación (Lehman, 1963). La formación de quelatos con metales (Fe, Mn, Cu, Zn) proporciona a estos últimos un incremento en la solubilidad y mayor estabilidad, favoreciendo su transporte hacia las raíces de las plantas. No obstante, su elevado precio hace que su aplicación esté restringida solamente a cultivos de gran rentabilidad, como es el caso de los frutales.

Los agentes quelantes más utilizados son ácidos poliaminocarboxílicos, y se clasifican en dos grandes grupos dependiendo de la presencia o no de grupos fenólicos en su estructura. Por un lado, se encuentran los agentes quelantes que tienen una estructura similar al ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Figura 5), a los que se denomina *no fenólicos* y, por otros, los que estructuralmente se parecen al ácido

etilendiamino-di-(*o*-hidroxifenilacético) (*o,o*-EDDHA) (Figura 5), que se denominan *fenólicos*. La normativa europea que legisla la comercialización de quelatos sintéticos se encuentra recogida en el Reglamento (CE) nº 2003/2003 (D.O.C.E. 21 de noviembre de 2003), que define los productos autorizados como agentes quelantes. Según este Reglamento, se denomina quelato de Fe al producto obtenido por combinación química de Fe con un agente quelante mencionado en la lista de agentes quelantes autorizados. Esta normativa se encuentra transpuesta en la legislación española a través del R.D. 824/2005 sobre productos fertilizantes y la Orden APA/863/2008.

La creciente preocupación ambiental de los últimos años ha llevado a proponer y evaluar nuevos quelatos sintéticos como correctores de la clorosis férrica. En general se trata de quelatos nos fenólicos, con muchas similitudes estructurales con el EDTA. Entre estos nuevos quelatos se encuentra el ácido *n*-(1,2-dicarboxietil)-D, L-aspártico o ácido iminodisuccínico (**IDHA**) y el ácido etilendiaminodisuccínico (**EDDS**) (Figura 5). El IDHA es una agente quelante biodegradable (Nörtemann, 2005) que ha sido propuesto para su uso en agricultura (Mitschker et al., 2004). Este agente quelante comparte similitudes estructurales con el EDTA pero también con el *o,p*-EDDHA



**Figura 5.** Agentes quelantes descritos en el texto.

(Figura 5), ya que sólo posee cinco grupos funcionales capaces de quelar el Fe. Precisamente esta característica es la que parece determinar la eficacia de este agente quelante, ya que si bien su estabilidad es menor a la de aquellos que cuentan con seis

grupos funcionales capaces de complejar Fe ( $\log K^\circ$  es 15.4 en el caso del IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  (Tandy et al., 2004) y 27.6 para el EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  (Lindsay, 1979)), se ha comprobado que los quelatos que contienen seis grupos funcionales capaces de quelar el Fe pueden presentar cinéticas de acción más lentas que los que sólo poseen cinco (García-Marco et al., 2006; Lucena et al., 2008). El EDDS es estructuralmente similar al EDTA, con seis grupos funcionales capaces de enlazar el Fe, y está empezando a reemplazar a este último en tareas de descontaminación de suelos. Su uso agrícola parece apropiado, si bien la estabilidad del EDDS/ $\text{Fe}^{3+}$  es ligeramente inferior a la del EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  ( $\log K^\circ$  22.0 (Tandy et al., 2004)). El EDDS contiene dos carbonos quirales en su estructura, presentando tres estereoisómeros: [R,R], [R,S]/[S,R] y [S,S]. De ellos, sólo el [S,S] es biodegradable, mientras que el isómero [R,R] es recalcitrante, y la mezcla isomérica [R,S]/[S,R] se biodegrada muy lentamente y sólo de forma parcial (Schowanek et al., 1997; Vandevivere et al., 2001; Nörtemann, 2005; Tandy et al., 2006).

Tanto el IDHA y como [S,S]-EDDS pueden constituir una buena alternativa a otros quelatos no fenólicos, si bien en ambos casos los estudios evaluando su capacidad para proporcionar Fe a la planta son escasos. Villén et al. (2007a) observaron que una formulación pura de IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  proporcionaba Fe a plantas de soja cloróticas crecidas en hidroponía pura más rápidamente que el EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$ . El trabajo de Lucena et al. (2008) comparando formulaciones comerciales de EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  e IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  confirman estos resultados al ser aplicados en campo o en hidroponía comercial a plantas de tomate y judía verde. En general ambos quelatos presentaron un comportamiento similar. Al ser aplicados por vía foliar a melocotoneros crecidos en campo con deficiencias de Fe, se observó que el EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  era capaz de producir un mayor incremento en la concentración de clorofilas que el IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  (Fernández et al., 2006). Sin embargo, también se ha comprobado que la eficacia de la aplicación foliar de ambos quelatos está muy influenciada por el tipo de surfactante añadido a la disolución (Fernández et al., 2008). En el caso del EDDS/ $\text{Fe}^{3+}$ , el número de trabajos evaluando su eficacia es aún menor. Ylivainio et al. (2004) comprobaron que la aplicación foliar de una mezcla isomérica de EDDS/ $\text{Fe}^{3+}$  (25% [S,S], 25% [R,R], 50% [S,R],[R,S]) a plantas de lechuga incrementaba la concentración de Fe a niveles superiores a los logrados por el EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  y el EDDHA/ $\text{Fe}^{3+}$ , tanto en suelos calizos como en ácidos. Al ser aplicados al suelo (ácido o básico), los tres quelatos favorecieron de manera similar la concentración foliar de Fe y el crecimiento de la planta. Los mismos autores compararon

el isómero biodegradable [S,S]-EDDS/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$  con la mezcla isomérica mencionada anteriormente, con el EDTA/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$  y con el EDDHA/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$ , al ser aplicados en suelos ácidos y calizos a plantas de lechuga (Ylivainio et al., 2006). Concluyendo que en suelos ácidos no había diferencias en la eficacia de los quelatos, mientras que en suelos básicos el EDDHA/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$  sobresalía frente al resto y el [S,S]-EDDS/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$  se comportaba de manera similar al EDTA/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$  y la mezcla isomérica de EDDS/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$ .

### 7.4.3. Complejos de Fe

Al igual que los quelatos, los complejos son moléculas formadas por un ión metálico que es un aceptor de electrones y por una sustancia orgánica capaz de compartir los electrones con el metal. Mientras que en la terminología química un quelato es un tipo de complejo en el que la sustancia comparte dos o más pares de electrones, en la terminología agrícola la diferencia entre quelatos y complejos está basada en la fortaleza del enlace y se encuentra recogida en el Reglamento (CE) n° 2003/2003 (D.O.C.E. 21 de noviembre de 2003). En dicho Reglamento se definen los productos autorizados como agentes quelantes, pero se deja la lista de agentes complejantes pendiente de elaboración.

Con la intención de concretar algunas disposiciones de este Reglamento y de refundir y actualizar la normativa existente, la Orden APA/863/2008 (que modifica el R.D. 824/2005 sobre productos fertilizantes) recoge una lista de agentes complejantes permitidos para su uso exclusivo en aplicaciones foliares y en fertirrigación en España, que incluye: ácido lignosulfónico, ácido glucónico, ácido heptagluconico, sustancias húmicas, aminoácidos libres y ácido cítrico. En este R.D. y Orden Ministerial se hace una revisión de los métodos analíticos existentes para la determinación del contenido de nutrientes totales y solubles en agua, mientras que los métodos analíticos necesarios para la determinación de la fracción complejada están pendientes de elaboración. Recientemente, Villén et al. (2007b) han propuesto una metodología basada en adiciones crecientes de metal y precipitación a pH elevado para determinar el elemento complejo.

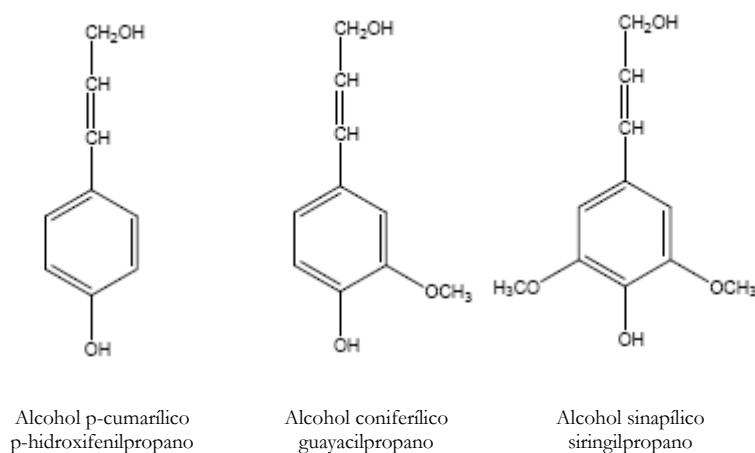
Puesto que se espera la incorporación futura a la legislación europea de los agentes complejantes, ya sean de estructura química definida (ácidos orgánicos, gluconatos, etc.) o variable (lignosulfonatos, sustancias húmicas y mezclas de aminoácidos), es necesario

un conocimiento exhaustivo de su acción agronómica y de los métodos disponibles para su determinación analítica.

#### 7.4.3.1. Lignosulfonatos

La madera está constituida por celulosa, hemicelulosas, ligninas y cantidades menores de otras sustancias que se engloban bajo el nombre genérico de componentes minoritarios. La lignina es un polímero de naturaleza fundamentalmente aromática localizado en la pared celular de la célula vegetal, y en el cual se encuentran embebidas las fibras de celulosa. La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (p-cumarílico, coniferílico y sinapílico) (Figura 6). El acoplamiento aleatorio de estos radicales da origen a un polímero amorfo de estructura tridimensional, característico de la lignina (Figura 7). Dada la complejidad de este polímero, no es posible describir una estructura definida de la lignina, si bien se han propuesto numerosos modelos para representarla.

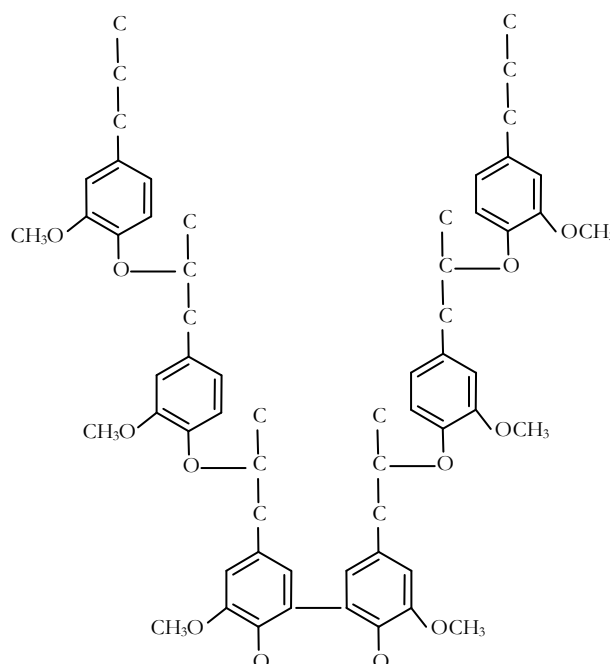
La lignina es insoluble en agua, ácidos y en muchos disolventes orgánicos y posee una elevada resistencia a la descomposición microbiana que la hace acumularse en el suelo, donde dependiendo de las condiciones, puede resultar en la formación de la turba que a su vez puede convertirse en lignita, carbón y depósitos de petróleo. Es sin



**Figura 6.** Precursores primarios de la lignina y nombre de las unidades aromáticas (Sjöström 1993).

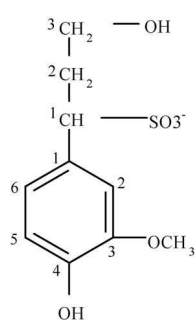
embargo soluble en álcalis fuertes como el hidróxido de sodio. Esta propiedad se aprovecha en los procesos de obtención de pasta de celulosa, de los que se obtienen

además las llamadas “ligninas comerciales”. En este grupo se incluyen los lignosulfonatos y las ligninas de Kraft.



**Figura 7.** Hipótesis de la estructura simplificada de la lignina procedente de maderas blandas y formada por la unión de monómeros de alcohol conilferílico (Tan, 1993).

Los lignosulfonatos (LS) son un subproducto obtenido en la industria del papel por el proceso al sulfito de la madera, en el cual se emplea bisulfito sódico para promover la separación de la lignina de las fibras celulósicas. La acción del bisulfito



**Figura 8.** Unidad estructural característica de los LS (Ouyang et al., 2006)

sobre la lignina produce la sulfonación de las moléculas de lignina, generando ácidos lignosulfónicos más hidrofílicos. La efectividad de la deslignificación durante este procedimiento se debe las reacciones de hidrólisis y sulfonación. Esto hace que la lignina sea más hidrofílica al haberse introducido grupos sulfónicos en su estructura y la posterior rotura hace que se generen enlaces éteres dando lugar a nuevos grupos fenólicos. Además surgen moléculas de menor tamaño molecular. Este procedimiento es importante en la fabricación de derivados de celulosa como la

viscosa.

Los lignosulfonatos son por tanto polímeros de origen natural, y poseen propiedades adhesivas, dispersantes, emulsificantes y secuestrantes. Esta última característica le confiere su capacidad para complejar metales. Como en el caso de la lignina, los lignosulfonatos son polímeros cuya estructura se desconoce, si bien las unidades básicas que los componen presentan muchas similitudes con los alcoholes fenilpropílicos precursores de la lignina (Figura 8).

Sólo en China se estima que se producen 300.000 t/año de lignosulfonatos, constituyendo un recurso abundante y barato que, sin embargo, es frecuentemente almacenado en lugar de reutilizado (Pang et al., 2008). Por ello, es necesario un estudio de sus propiedades y efectividad en los diferentes campos de aplicación.

En el terreno agrícola, los complejos comerciales de metales con lignosulfonatos se han aplicado frecuentemente en campo con resultados variables (Hilgeman, 1969; Salardini y Murphy, 1978; Anderson, 1982; Cihacek, 1984). En los últimos años se ha profundizado además en el estudio del efecto de la aplicación de complejos metal-LS, ya sean estos comerciales o formados en laboratorio, si bien los ensayos se han centrado en los complejos LS/Zn<sup>2+</sup>.

Al ser aplicados a suelos ácidos, se ha observado que los LS/Zn<sup>2+</sup> producen un aumento de Zn en maíz con respecto al tratamiento control (López-Valdivia et al., 2002). Los mayores contenidos de Zn en planta se producen para los tratamientos de EDTA/Zn<sup>2+</sup> y LS/Zn<sup>2+</sup>. Además, la especiación del Zn en el suelo después de la cosecha muestra que, cuando se trata con fertilizantes a base de LS, los suelos presentan contenidos de Zn lábil comparable al EDTA/Zn<sup>2+</sup>. Álvarez et al. (1996) estudiaron la movilidad relativa del LS/Zn<sup>2+</sup> y EDTA/Zn<sup>2+</sup> en suelos calizos mediante columnas de lixiviación. Observaron que para el LS/Zn<sup>2+</sup> se producía una baja migración del producto, mientras que el EDTA/Zn<sup>2+</sup> migraba a lo largo de la columna, perdiéndose alrededor del 50% del Zn por lixiviación. En el mismo trabajo se evaluó la influencia aplicar un recubrimiento al fertilizante en la migración del mismo a través de la columna de lixiviación. Para el LS/Zn<sup>2+</sup> los resultados fueron similares, mientras que mejoraron notablemente en el caso del EDTA/Zn<sup>2+</sup>, pasando la lixiviación del 50% mencionado



anteriormente a sólo 10%. Estos mismos autores concluyeron que la aplicación de LS/ $Zn^{2+}$  en suelo calizo producía menos incrementos en la concentración de Zn en maíz que el EDTA/ $Zn^{2+}$ , el EDDHA/ $Zn^{2+}$  y diversos complejos (fenolatos y poliflavonoides complejados con Zn) (Álvarez y González, 2006). En experimentos en hidroponía, Martín–Ortiz et al. (2009) concluyeron que los complejos LS/ $Zn^{2+}$  eran tan eficaces como el  $ZnSO_4$  aportando  $Zn^{2+}$  a plantas de trigo y maíz crecidas a pH de suelo calizos. En resultados están en la línea de los obtenidos por Goos et al, (2000) comparando EDTA/ $Zn^{2+}$ , un complejo Humato-LS/ $Zn^{2+}$  y  $ZnSO_4$  al ser aplicados a plantas de maíz. Estos autores observaron que la eficacia de los diferentes fertilizantes estaba estrechamente ligada al modo en que eran aplicados (en forma de gránulos, en polvo o mezclados con el suelo), concluyendo que a largo plazo las tres fuentes promovían un desarrollo de las plantas y una concentración final de Zn parecidos. Además los valores de Zn extraíble con DTPA en suelo era similares para todas las fuentes estudiadas.

Otros autores (Raese y Staiff, 1988) han demostrado la eficacia de los LS para aliviar la clorosis férrica en peral cuando los complejos eran aplicados por vía foliar. No se observaron efectos fitotóxicos en el fruto derivados de las aplicaciones foliares.

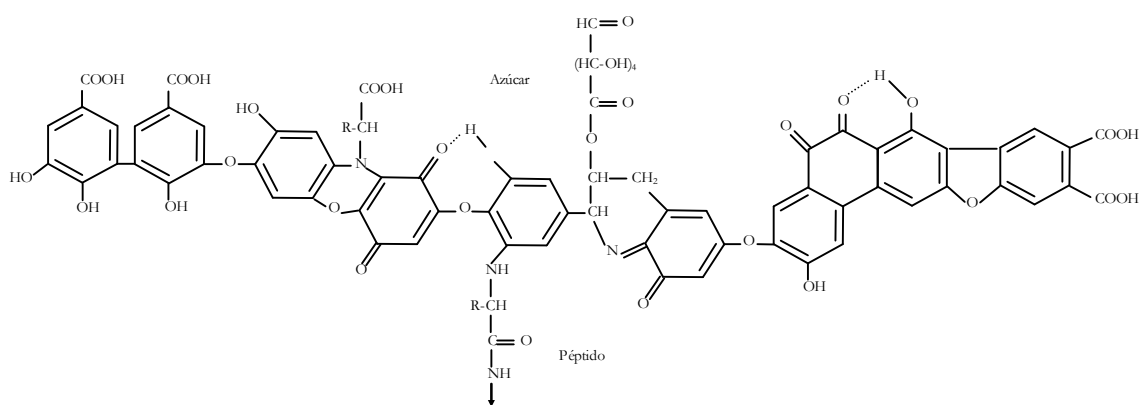
Por otra parte, los LS en concentraciones apropiadas, han mostrado un efecto bioestimulante en la raíz y en el crecimiento de la planta (Kevers et al., 1999). Al margen de los beneficios como fertilizantes, se ha demostrado que aplicados a suelos pueden inhibir la actividad de la ureasa, disminuyendo la hidrólisis de urea (Xie et al., 1993). Además se ha visto que en los suelos tratados con LS, el N se acumula en forma de  $NH_4^+$ , lo que hace pensar que también inhiben la nitrificación (Meier et al., 1993).

#### 7.4.3.2. Sustancias húmicas (*humatos y fulvatos*)

Las sustancias húmicas se originan a través de la transformación en el suelo de residuos animales y vegetales. Esta transformación se produce a través de procesos físicos y químicos, y da lugar a una mezcla químicamente heterogénea de compuestos, más estables que sus precursores.

Las diferentes fracciones presentes en las sustancias húmicas pueden clasificarse en función de su solubilidad a diferentes pH (Aiken et al., 1985). Los ácidos húmicos

(Figura 9) están constituidos por la fracción insoluble en agua a pH inferior a 2, pero soluble a pH superiores. Los ácidos fúlvicos (Figura 10) son la fracción soluble en agua a cualquier pH, y la humina está constituida por la fracción insoluble en todo el intervalo de pH. Las sustancias húmicas constituyen más del 60 % de la materia orgánica del suelo, influyendo notablemente en las propiedades del mismo. Esto afecta su vez al crecimiento y nutrición de las plantas, ya que las sustancias húmicas actúan como fuente de



**Figura 9.** Estructura de un ácido húmico propuesta por Stevenson (1994).

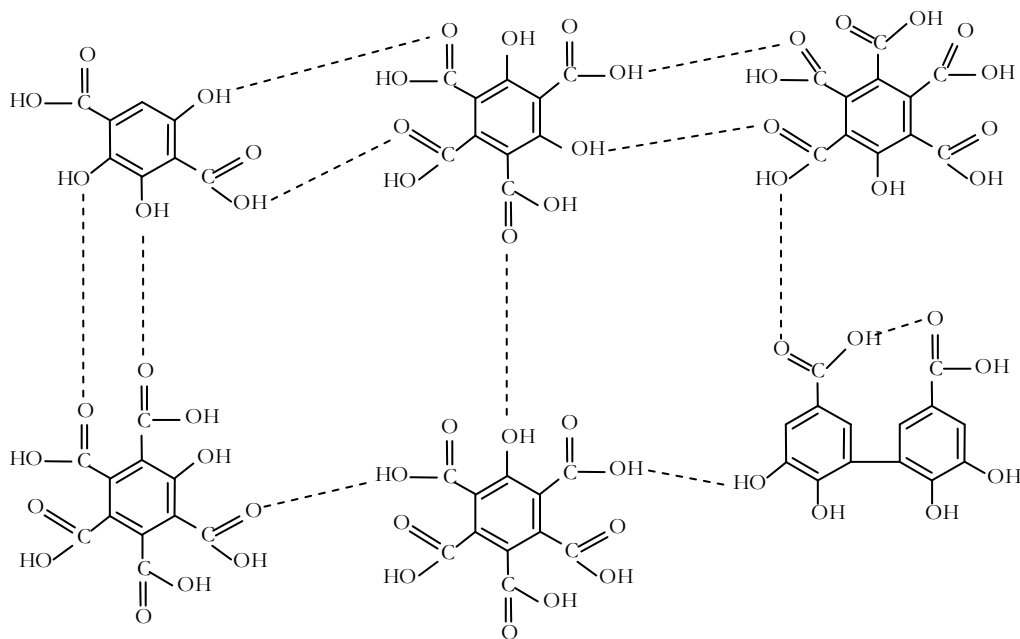
micronutrientes, intervienen en la capacidad de intercambio catiónico del suelo y pueden actuar como fuente de micro y macronutrientes para las plantas (Chen y Aviad, 1990).

Atendiendo a la capacidad de las sustancias húmicas y de la materia orgánica en general para formar complejos metálicos y afectar a la nutrición de la planta, Stevenson (1994) hace referencia cuatro grupos principales:

- *Metales esenciales para la planta pero que no forman parte de enlaces de coordinación:* se trata de todos los cationes monovalentes ( $K^+$ , por ejemplo) y  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  como cationes divalentes.
- *Metales esenciales para las plantas y que forman enlaces coordinados con ligandos orgánicos,* como  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ .
- *Metales sin una función bioquímica conocida pero que, sin embargo, se acumulan en el ambiente.* Se incluyen en este grupo metales contaminantes como  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Hg^{2+}$ .

En la disolución del suelo, los cationes metálicos se encuentran rodeados de moléculas de agua, de modo que el oxígeno (negativo) del agua está orientado hacia la

carga positiva del catión. La formación de complejos se produce cuando las moléculas de agua que rodean a los cationes metálicos son sustituidas por otras moléculas o cationes, formándose el compuesto de coordinación. La habilidad de las sustancias húmicas para formar complejos con cationes metálicos dependerá de su contenido en grupos funcionales donantes de electrones (Stevenson, 1994). La complejación de los metales



**Figura 10.** Estructura de un ácido fúlvico propuesta por Schnitzer y Khan (1972).

puede ocurrir de dos modos: en el primero y más importante, los metales se unen por los grupos fenólicos y carboxílicos (Van Dijk, 1971) y en el segundo, sólo se unen a grupos carboxílicos (Schnitzer, 1969 y Gamble, et al., 1970). También se pueden producir interacciones a través de puentes de hidrógeno, enlace relativamente débil que sólo cobra importancia para metales con una elevada energía de hidratación. El tipo de complejo formado dependerá en última instancia del grado de saturación, ya que los enlaces débiles jugarán un papel más importante cuando los sitios de los enlaces fuertes ya están saturados. La formación de más de un enlace entre el metal y la molécula dará lugar a complejos más estables. Esta estabilidad también se ve influida por el pH de la disolución.

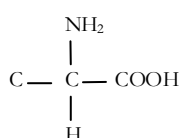
Debido a su capacidad para mantener el Fe en disolución, las sustancias húmicas pueden actuar como quelatos naturales de Fe. Las sustancias húmicas son beneficiosas para la nutrición férrica de las plantas (Chen y Aviad, 1990; Sánchez-Sánchez et al., 2002)

y las sustancias húmicas enriquecidas en Fe sirven como fuente de Fe para las plantas (Lobartini y Orioli, 1988). Estas moléculas se han mostrado eficaces para recuperar plantas de pepino (Estrategia I) y cebada (Estrategia II) deficientes en Fe (Cesco et al., 2002). Asimismo, son capaces de solubilizar el Fe nativo de diferentes sustratos y suelos (Cesco et al., 2000).

Además de las sustancias húmicas extraídas de la materia orgánica, se han ensayado también diversos productos, como compost de turba, compost derivados de residuos de origen vegetal y animal, e incluso residuos procedentes de diversas actividades industriales (Alva y Obreza, 1998; Bar-Ness y Chen, 1991; Plessner et al., 1998). Entre estos últimos pueden incluirse muchos productos, como biosólidos (subproductos derivados de tratamientos de potabilización del agua) o extractos líquidos obtenidos a partir de alperujos (subproductos generados tras el molturado de la aceituna en los procesos de extracción del aceite de oliva). Pérez-Sanz et al. (2002) concluyeron que la aplicación de biosólidos enriquecidos con Fe era menos eficaz que el uso de quelatos férricos sintéticos aportando dicho metal a cítricos y melocotoneros con deficiencias de Fe. Sin embargo, en ensayos previos realizados sobre melocotoneros, cítricos, pepino, tomate y pimiento cultivados en campo e invernaderos comerciales en condiciones controladas se obtuvieron producciones iguales al aplicar quelatos sintéticos o complejos naturales debido a la mejora ocasionada en el balance nutricional de las plantas tratadas con biosólidos (Pérez-Sanz, 1998).

#### 7.4.3.3. Otros agentes complejantes

Además de LS y sustancias húmicas, la legislación española recoge otros productos que pueden ser empleados como agentes complejantes para corregir carencias de micronutrientes, Ca y Mg. Se trata de aminoácidos, citrato, gluconato y heptagluconato.



**Figura 11:** Fórmula general de un aminoácido.

▪ *Aminoácidos:* Los aminoácidos empleados como agentes complejantes están presentes en residuos industriales, como es el caso de las melazas generadas en industrias azucareras o los residuos de animales de la industria ganadera. Son las unidades estructurales

fundamentales de las proteínas, y contienen un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) libres (Figura 11). Los aminoácidos son importantes ligandos de bajo peso molecular en los sistemas biológicos. Tanto los aminoácidos ácidos como los básicos pueden enlazar iones metálicos a través de los grupos  $\alpha$ -amino y carboxílicos. Aunque la formación de complejos entre metales y aminoácidos es, en general baja, existe una mayor afinidad entre el Zn y la glicina, metionina, cisteína, ácido aspártico, arginina, tirosina e histidina. El Fe, sin embargo, sólo forma complejos estables con cisteína y el ácido glutámico.

Los aminoácidos tienen distintas funciones en la planta: aumentan la disponibilidad de aminoácidos fácilmente utilizables, son fuente de energía ya que facilitan el uso de nitrógeno por la planta, mejoran de los mecanismos de defensa de los cultivos frente a condiciones adversas (Breteler y Arnozis, 1985) y poseen acción quelante (Ashmead, 1986), bioestimulante y/o fitohormonal. Este efecto se ha comprobado cítricos crecidos en condiciones de campo (Sánchez-Sánchez et al., 2002), ya que la aplicación conjunta de EDDHA/Fe<sup>3+</sup> y aminoácidos comerciales incrementaba la eficacia del quelato.

▪ *Ácidos orgánicos:* Los ácidos orgánicos pueden definirse como compuestos de bajo peso molecular que contienen uno o más grupos carboxílicos y que se encuentran en todos los organismos. Los ácidos orgánicos poseen la capacidad de complejar metales en disolución. El grado de complejación depende del ácido orgánico en particular (número y proximidad de los grupos carboxílicos), de la concentración y tipo de metal y del pH de la disolución del suelo. Por esta razón, están implicados en varios procesos como la movilización y toma de nutrientes por las plantas y microorganismos, detoxificación de metales como el Al, proliferación microbiana en la rizosfera, etc. La mayor parte de estos proceden de los exudados de las raíces, de los restos de plantas muertas y de la descomposición microbiana de estos productos. Los principales ácidos orgánicos presentes en las raíces de las plantas son el lactato, acetato, oxalato, succinato, fumarato, malato, citrato, isocitrato y aconitato. En la mayoría de los casos aquellos empleados en agricultura se obtienen industrialmente de la fermentación de azúcares. Por ejemplo, el ácido cítrico es obtenido de la fermentación de la sacarosa por *Aspergillus Níger*.

Los ácidos orgánicos con un sólo grupo carboxílico como el lactato o acetato, poseen una baja capacidad de complejación. A partir de las constantes de formación publicadas por Martell y Smith (1976-1989) se puede concluir que el malato, citrato y oxalato presentan una elevada afinidad por metales trivalentes como el Al<sup>3+</sup> y Fe<sup>3+</sup>. Sin

embargo, esto no implica que se produzca una buena complejación al pH de los suelos (Mench y Martin, 1991). Por ejemplo, empleando el programa de especiación química Geochem-PC (Parker et al., 1995), se puede predecir que la complejación del Fe por el malato, citrato y oxalato es altamente dependiente del pH de la disolución del suelo con una baja o nula complejación en suelos con pH elevados. Además, el citrato, malato y oxalato tienen tendencia a precipitar en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Debido a su capacidad de complejar metales, los ácidos orgánicos participan en biodisponibilidad y en el transporte de metales en los suelos. Pueden formar complejos específicos con los grupos funcionales presentes en las superficies de los minerales afectando a las características de la carga de estas superficies (Yao y Yeh, 1996) y competir con otras sustancias retenidas por los lugares de adsorción (Geelhoed et al., 1998, Grafe et al., 2002).

▪ *Ácido glucónico:* Los polisacáridos presentes en el suelo tienen propiedades distintas a los que se encuentran en la planta, debido a que están sometidos a descomposición por parte de los microorganismos para la obtención de alimento y energía. Los polisacáridos del suelo pueden protegerse de la degradación uniéndose a otros constituyentes del suelo como las arcillas o cationes metálicos. Por tanto, tienen influencia en las propiedades físicas del suelo como las reacciones de intercambio catiónico, retención de aniones, metabolismo del carbono, actividad biológica y las reacciones de complejación de



**Figura 12:** Fórmula del ácido glucónico.

metales. El ácido glucónico (Figura 12) es el producto de oxidación de la D-glucosa en el C1. Si bien es posible oxidar la D-glucosa a D-glucono- $\delta$ -lactona por métodos electroquímicos, químicos y enzimáticos, el método fermentativo es el actualmente utilizado por su bajo coste. La sal sódica del ácido glucónico es el derivado con mayor importancia comercial, debido a sus excelentes propiedades como agente complejante.

## 7.5. Fertilización foliar

La aplicación foliar de Fe (mediante complejos, quelatos, sales inorgánicas, etc.) es una técnica barata que permite aportar el Fe directamente a la hoja (Abadía et al., 2002;

Álvarez-Fernández et al., 2004; Fernández et al., 2008a). Sin embargo, la eficacia de la aplicación de rociados foliares es muy variable debido a factores relacionados con el ambiente en el cual se desarrolla la plantas y con factores físico-químicos, y por ello la reproducibilidad de los resultados obtenidos es también difícil (Fernández y Ebert, 2005). El conocimiento limitado de los factores implicados en la penetración, translocación y biodisponibilidad del Fe aportado mediante fertilización foliar dificulta la formulación de fertilizantes foliares de Fe, por lo que actualmente este tipo de aplicaciones sólo constituyen un complemento a la nutrición tradicional por vía radicular.

Los criterios empleados para evaluar la eficacia de la aplicación foliar de fertilizantes de Fe son el grado de reverdecimiento de la hoja, la tasa de absorción y la translocación del Fe aplicado desde los órganos tratados (Fernández, 2004; Fernández et al., 2006; 2008a). Por tanto, se considera que al menos tres procesos diferentes y estrechamente interrelacionados tienen lugar como respuesta a la fertilización foliar con Fe (Fernández y Eichert, 2009a): (i) la penetración de Fe aplicado a través de la superficie de la hoja; (ii) la distribución del Fe desde los órganos tratados; y (iii) la participación activa del Fe aplicado por vía foliar en los procesos fisiológicos de la planta.

La bibliografía referida a fertilización foliar con Fe es abundante. Una de las características comunes de estos trabajos es la falta de criterios en cuanto al tipo de productos, dosis, momento de aplicación, etc., más apropiados. La tendencia general ha sido comparar la eficacia de productos de diversa naturaleza diversa (sales inorgánicas, quelatos sintéticos, complejos, etc.), aplicados en combinación con diferentes agentes surfactantes.

Desde comienzos del siglo pasado son muchos los trabajos centrados en la fertilización foliar en condiciones de campo. Estos trabajos hacen referencia principalmente a la fertilización de frutales con diferentes macro y micronutrientes como Fe (Wallace, 1928; Burke, 1932; Guest y Chapman, 1949; Wallihan et al., 1964), nitrógeno (Hamilton et al., 1942; Weinberger et al., 1949; Bullock et al., 1952; Cook y Boyton, 1952) o Zn y Mn (McClung, 1954; Wallihan y Heymann-Herschberg, 1956; Cook, 1957; Leyden y Toth, 1960; Labanauskas et al., 1963; Embleton et al., 1964; Labanauskas y Puffer, 1964).

En los últimos años se han publicado diversos trabajos que intentan comparar la eficacia de diferentes quelatos y complejos de Fe como correctores de la clorosis férrica, muchos de ellos en condiciones controladas y empleando isótopos como trazadores, con el fin de intentar reducir la enorme variabilidad de resultados observada en este tipo de fertilización. Así, Nikolic et al. (2003) comprobaron que el EDTA/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$  era capaz de aportar más Fe por vía foliar a plantas de girasol (desarrolladas con o sin deficiencia de Fe) que un complejo férrico formado con la fracción hidrosoluble de una turba (WEHS/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$ ). La aplicación foliar de diferentes complejos formados con sideróforos también se ha mostrado eficaz aportando Fe por vía foliar. Se observó además que este Fe era redistribuido a otros órganos tras su absorción por la hoja (Fernández et al., 2004).

Al comparar la aplicación de  $\text{FeSO}_4$  y distintos quelatos (EDDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  y DTPA/ $\text{Fe}^{3+}$ ) en condiciones de campo a frutales se concluyó que el reverdecimiento era similar en ambos casos, por lo que el uso del quelato no parecía justificado (Pestana et al., 2001; Álvarez-Fernández et al., 2004). Fernández et al. (2006) observaron que la aplicación foliar de  $\text{FeSO}_4$  y citrato férrico era más eficaz que el uso de distintos quelatos sintéticos (EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$ , DTPA/ $\text{Fe}^{3+}$ , IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$ ) favoreciendo el reverdecimiento de las hojas y aumentando la concentración de clorofilas al ser aplicados a frutales en condiciones de campo. Sin embargo, los resultados obtenidos para quelatos deben considerarse con cautela, ya que la adición de surfactantes condiciona la eficacia de los mismos por la interacción entre el quelato y el surfactante (Fernández et al., 2008a). Estos autores observaron que la eficacia de formulaciones puras de EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  e IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  aplicadas por vía foliar para reverdecer hojas era muy dependiente del tipo de surfactante empleado, mientras que el DTPA/ $\text{Fe}^{3+}$ , citrato/ $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{FeSO}_4$  no se veían influidos por el tensoactivo aplicado.

En todo caso, la reproducibilidad de resultados es complicada en este tipo de aplicaciones debido al gran número de variables que participan en los procesos de absorción foliar, y que se relacionan con las propias características de la planta y con las condiciones de aplicación de los rociados foliares.



### 7.5.1. Adquisición de solutos por vía foliar

A diferencia de las raíces, las hojas de las plantas superiores se encuentran cubiertas de una capa impermeable que evita la pérdida de agua hacia el exterior de la misma. Esta capa se conoce con el nombre de cutícula. A pesar de ello, entre el 5% y el 10% del agua transpirada por la hoja tiene lugar a través de la cutícula, lo cual prueba que ésta puede ser excretada vía epidermis. Por tanto, es de esperar que también tenga lugar el proceso inverso de entrada de agua y sustancias disueltas en ella.

La cutícula es una bicapa lipídica constituida principalmente por cutina, un polímero compuesto principalmente por ácidos grasos de cadena larga estrechamente entrecruzados entre sí. Asociadas a la cutina aparece el otro componente principal de la cutícula: las ceras. Éstas pueden encontrarse embebidas en el polímero de cutina, en cuyo caso nos referiremos a ceras intracuticulares, o bien en la superficie de la misma, denominándose en este caso ceras epicuticulares. Por último, en la cutícula aparecen polisacáridos de pectina.

Las ceras actúan como la interfase final que separa la hoja y el medio. La composición química de las ceras es variable (n-alcanos, ésteres, alcoholes y ácidos grasos, de cadena larga en las ceras epicuticulares y de cadena corta en las intracuticulares) y varía entre los distintos grupos filogenéticos, en incluso dentro del mismo grupo entre especies o hasta entre individuos. Las ceras, por su composición química y su capacidad para formar sobre la cutina una capa externa, constituyen la principal barrera a la pérdida de agua desde el interior al exterior de la hoja (Schönherr, 1976). Las ceras pueden formar estructuras cristalinas o amorfas, en todo caso estas estructuras son muy variables. En su conjunto, la cutícula resulta una estructura tortuosa y con múltiples irregularidades, debidas sobre todo a la presencia de las ceras.

Atravesando la cutícula desde el exterior hasta al mesófilo aparecen los estomas. Estas estructuras pueden encontrarse en una o ambas caras de la hoja (siendo normalmente más abundantes en la cara abaxial), y parecen ser las responsables del intercambio de gases y agua con el medio. El interior del estoma se encuentra recubierto de una cutícula similar a la del resto de la hoja.

Tradicionalmente se consideró que los *estomas* debían servir como vía de entrada para la penetración de los compuestos aplicados foliarmente a la hoja. Sin embargo, esta hipótesis fue prácticamente descartada tras la publicación del trabajo de Schönherr y Bukovac (1972). Estos autores concluyeron que los estomas estaban protegidos frente a la entrada de líquidos por la combinación de tres mecanismos: (i) la escasa mojabilidad del estoma, al estar recubierto de una cutícula similar a la del resto de la hoja; (ii) la elevada tensión superficial del agua y las soluciones acuosas; y (iii) la geometría específica del estoma. En la última década se han retomado las investigaciones en torno a la posible penetración de solutos a través del estoma, y varios estudios han sugerido que ésta ocurre por difusión a través del poro estomático (Eichert y Goldbach, 2008; Eichert et al., 2008).

Por otra parte, se ha demostrado que también la cutícula es permeable al agua, electrolitos y compuestos polares (Kerstiens, 2006), y se han propuestos dos vías distintas de penetración a través de la misma (Schönherr, 2006). Las moléculas sin carga atravesarían la cutícula por disolución y difusión en los dominios lipofílicos constituidos por la cutina y las ceras cuticulares (*vía lipofílica*), mientras que las especies iónicas penetrarían en la hoja a través de estructuras conocidas como poros acuosos (Schönherr, 2006), microporos y/o imperfecciones de la cutícula (Luque et al., 1995). Esta vía se conoce como *vía de difusión polar*. Es poco lo que se sabe de los poros acuosos, que atravesarían la membrana de la cutícula y aparecerían por hidratación de los grupos funcionales polares de la misma.

### 7.5.2. Factores que condicionan la eficacia de la aplicación foliar de fertilizantes

Son muchos los factores que determinan la eficacia de las aplicaciones foliares, y se relacionan con el ambiente en el cual se desarrolla la planta y en el cual tiene lugar el rociado foliar, con las características de la especie vegetal y variedad tratada, y con el producto aplicado

### 7.5.2.1. Factores ambientales

Diversos factores ambientales como humedad relativa, temperatura y luz influyen en la eficacia de la fertilización foliar. En campo, la continua interacción entre estos y otros factores da lugar a resultados muy variables, y distintos de los obtenidos al trabajar en condiciones controladas.

La humedad relativa es un elemento clave en el éxito de los rociados foliares. Cuando es elevada, la permeabilidad de la cutícula aumenta por hidratación de la misma, evitándose además la formación de depósitos por el secado de la disolución (Currier y Dybing, 1959; Schönherr, 2001). Por tanto, las sustancias cuyo punto de delicuescencia sea inferior a la humedad relativa del ambiente permanecerán en disolución y podrán ser absorbidas por la hoja. Schönherr et al. (2005) observaron que la penetración a través de cutículas aisladas y sin estomas de *Populus x canescens* era insignificante cuando la humedad relativa era inferior al 90%, sugiriendo que la aplicación foliar de compuestos de Fe podía ser poco efectiva en áreas áridas y semiáridas. Sin embargo, diversos trabajos de campo en estas regiones, con humedades relativas comprendidas entre el 30% y el 60% han demostrado que la aplicación foliar de disoluciones de Fe favorecía en reverdecimiento y aumentaba el rendimiento y la calidad de los frutos tenía efectos beneficiosos en diversos cultivos afectados por clorosis férrica (cítricos, peral, melocotonero, manzano, etc.) (Fernández et al., 2006, 2008a).

Temperaturas moderadamente cálidas favorecen también la penetración foliar (Currier y Dybing, 1959) a través de cambios en procesos fisiológicos (mayor fotosíntesis y translocación desde la hoja) y en las características físico-químicas de la disolución.

En cuanto a la luz, en su presencia se estimula la apertura de los estomas y diversos procesos fisiológicos como la fotosíntesis o el flujo a través del xilema (Currier y Dybing, 1959; Jyung y Wittwer, 1964). Estos procesos pueden influir en mayor o medida la absorción de Fe a través de la superficie de la hoja. Diversos autores han observado que la absorción y redistribución del Fe aportado por vía foliar se ven favorecidas en presencia de luz (Wallihan et al., 1964; Fernández, 2004; Schlegel et al., 2006), lo cual se relaciona con la presencia de una enzima FC-R en la membrana plasmática de las células de las hojas (de la Guardia y Alcántara, 1996; Larbi et al., 2001). Esta enzima sería similar

a la descrita en raíz, siendo la reducción del Fe un requisito necesario para su absorción por la célula. La actividad de la enzima parece estar favorecida en presencia de luz.

Por otra parte, las condiciones ambientales también influyen en las características de la hoja a nivel morfológico y estructural (grosor de la cutícula, cantidad y composición de las ceras cuticulares, etc.) (Currier y Dybing, 1959; Koch et al., 2004) y, consecuentemente, en los procesos de absorción a través de la superficie de la hoja.

#### *7.5.2.2. Factores relacionados con la planta*

Las características concretas de cada especie vegetal y las condiciones de crecimiento van a influir en los procesos de absorción foliar. Aunque tanto la cara abaxial como la adaxial participan en los procesos de absorción, estos parecen tener lugar mayoritariamente a través de la superficie abaxial de la hoja, donde la abundancia de estomas es mayor. En todo caso, la penetración dependerá de la presencia de estomas y de las variaciones en la composición de la cutícula entre ambas superficies (Currier y Dybing, 1959; Wójcik, 2004). Ambos factores varían además entre distintas especies y variedades.

La composición y estructura de la cutícula determinarán la mojabilidad de la hoja, así como la retención de sustancias en su superficie y su penetración a través de la misma. Por otra parte, las hojas jóvenes son más permeables que aquellas totalmente desarrolladas (Sargent y Blackman, 1962).

Diversos factores relacionados con el estado fisiológico de la planta, como la temperatura y el potencial osmótico de la raíz, o el estado nutricional, parecen determinar la efectividad de la aplicación de rociados foliares (Weinbaum, 1996). En árboles cloróticos se han observado cambios morfológicos y estructurales (Fernández et al., 2008b) que influirán en los procesos fisiológicos de la planta y determinarán la absorción foliar del Fe.

### 7.5.2.3. Factores relacionados con la disolución aplicada

La penetración de las disoluciones aplicadas por vía foliar a través de la superficie de la hoja ocurre por difusión. Por tanto, estará influida por la concentración existente en el interior y el exterior de la hoja. Debido al gran número de factores que limitan la absorción de solutos por la hoja, las concentraciones empleadas en los rociados foliares son superiores a las usadas al ser aplicadas por vía radicular. En la literatura se encuentran concentraciones de Fe aplicadas muy dispares, desde 1 mM (Leonard, 1967; Rombolà et al., 2000) a 29 mM. Las concentraciones en el interior de la hoja son sin embargo mucho menores, por lo que la absorción debería estar controlada por la concentración aplicada, siendo mayor cuanto mayor sea la concentración.

No obstante, muchas observaciones experimentales contradicen este supuesto. Schönherr et al. (2005) y Fernández (2004) detectaron una correlación negativa entre la concentración de quelatos de Fe aplicados mediante rociados foliares y la tasa de penetración de Fe. Un efecto similar se ha observado para otros nutrientes y compuestos (Chamel, 1996; Tukey et al., 1961; Middleton y Sanderson, 1965; Liu, 2004). Este fenómeno se ha atribuido a la progresiva saturación de las vías de entrada de los solutos (Chamel, 1996). En el caso concreto del Fe, Schönherr et al. (2005) sugirieron que las concentraciones elevadas podrían saturar y disminuir el tamaño de los poros acuosos.

Respecto a la influencia del peso molecular del compuesto aplicado en la absorción, en diversos experimentos se ha comprobado que no existe una relación clara entre ambos factores (Fernández et al., 2005, 2006, 2008a; Schönherr et al., 2005).

En cuanto al pH, tampoco existe un intervalo óptimo establecido, si bien parece que los pH ácidos favorecen la absorción foliar. Las cutículas son polielectrolitos, con puntos isoeléctricos en torno a 3 (Schönherr y Bukovac, 1972). El pH al cual se apliquen las soluciones foliares influirá en la capacidad de intercambio iónico de la misma. Las soluciones con pH superiores a 3 cargan la cutícula negativamente (Schönherr y Hüber, 1977). No obstante, conviene tener en cuenta que un pH excesivamente ácido afectaría negativamente a la hoja. Los mejores resultados se han obtenido con productos aplicados a pH comprendidos entre 4,5 y 5,5 (Fernández et al., 2005).

- *Empleo de surfactantes:* El empleo de adyuvantes es una técnica eficaz para incrementar la eficacia de las aplicaciones foliares en zonas áridas de semiáridas donde la humedad relativa es baja (Schönherr et al., 2005).

El adyuvante será cualquier sustancia que añadida a la disolución activa sobre el ingrediente activo (en nuestro caso el quelato o complejo de Fe) aumentando su eficacia (Hazen, 2000). Generalmente se clasifican en dos grandes grupos: (i) aquellos que modifican el ingrediente activo aumentando su actividad, penetración dispersión y retención (por ejemplo los surfactantes); y (ii) los que no cambian las características del ingrediente activo pero facilitan su actuación, aumentando por tanto su eficacia (McMullan, 2000; Penner, 2000). Debido a las características propias de la superficie foliar, el uso de adyuvantes puede favorecer los procesos de absorción foliar aumentando la mojabilidad de la hoja, así como la retención, dispersión y penetración de la disolución (Tamura et al., 2001; Liu, 2004; Schönherr et al., 2005). El uso de surfactantes (Weinbaum y Neumann, 1977; Chamel, 1988; Wójcik, 2004; Schlegel et al., 2006; Fernández et al., 2008b) y otros aditivos como urea, dimetilsulfóxido o glicina-betaína (Leonard, 1967; Chamel y Simiand, 1970; Basiouny y Biggs, 1971; Chamel, 1988; Weinbaum, 1988; Díaz-Zorita et al., 2001; Fernández et al., 2006) aumenta notablemente la eficacia de las aplicaciones foliares de Fe.

Los surfactantes constituyen el grupo de adyuvantes empleados con mayor frecuencia en fertilización foliar. A pesar del efecto beneficioso de su aplicación, se han observado con frecuencia fenómenos de fitotoxicidad al adicionar el surfactante a la disolución de fertilizantes (Jansen et al., 1961).

Su estructura molecular consiste en una porción hidrofóbica (no polar), constituida por una cadena alquil, y una porción hidrofílica (polar). Ambas porciones deben estar suficientemente separadas entre sí, para poder reaccionar independientemente con las superficies y el ingrediente activo. Los surfactantes se clasifican en base a la carga de la cabeza polar en iónicos (aniónicos y catiónicos), no-iónicos y anfotéricos, siendo los no-iónicos los usados más frecuentemente en fertilización foliar, al ser los que menos interaccionan con el ingrediente activo. Entre este grupo de surfactantes, aquellos empleados más frecuentemente son los que presentan como cabeza monómeros de óxido de etileno y los surfactantes organosiliconados.

En los últimos años ha incrementado el uso de surfactantes de ambos tipos obtenidos a partir de carbohidratos, por lo que deberían presentar baja o nula toxicidad. Sin embargo, Fernández et al. (2009) han observado recientemente que la adición de un surfactante no iónico organosiliconado a una disolución de EDTA/Fe<sup>3+</sup> modificaba el espectro de masas del surfactante. El pico característico del EDTA/Fe<sup>3+</sup> continúa observándose en el valor m/z 344,0 pero además aparecen una serie de polímeros cargados negativamente en el intervalo m/z comprendido entre 550 y 1000, asociados a la ionización del surfactante en presencia del EDTA/Fe<sup>3+</sup>, e indicativos de la interacción entre el EDTA/Fe<sup>3+</sup> y el surfactante.

Por tanto, y debido a las múltiples interacciones existentes, con el nivel de conocimiento actual no es posible predecir la eficacia de un ingrediente activo concreto al ser combinado con un surfactante (Liu, 2004; Ramsey et al., 2005; Wang y Liu, 2007; Fernández et al., 2008b).





## **Capítulo II:**

---

### **Objetivos**



## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales**

Los objetivos de la presente memoria contribuyen a la búsqueda de alternativas al empleo tradicional de quelatos sintéticos, de escasa biodegradabilidad, aplicados al suelo para la corrección de la clorosis férrica. Se incluyen entre estos nuevos correctores agentes quelantes biodegradables, así como agentes complejantes de naturaleza muy diversa que tienen en común su origen natural. Debido a la menor estabilidad de este tipo de productos respecto a los quelatos tradicionalmente empleados en agricultura, su aplicación foliar o a través de la disolución nutritiva en el caso de cultivos hidropónicos resulta una buena alternativa.

Dado que el empleo de estos productos, más “eco-compatibles” que los quelatos sintéticos y económicamente viables en función del tipo de cultivo tratado, no está contemplado en la legislación vigente en la actualidad a nivel europeo (Reglamento N° 2003/2003), se pretende justificar su empleo, al menos parcialmente, en base a criterios de eficacia. Se intenta de este modo llenar las lagunas existentes en el ámbito de la aplicabilidad de dichos productos, en especial en el caso de los agentes complejantes. Puesto que dicha efectividad aparece estrechamente ligada al modo de aplicación escogido y, sobre todo en el caso de los complejos, a sus características físico-químicas, su estudio se ha abordado mediante el empleo de plantas modelo (pepino, soja y tomate) y en condiciones controladas. Estas aportaciones contribuirán a crear un listado específico de agentes complejantes, así como a ampliar el de agentes quelantes autorizados a nivel europeo. Los trabajos incluidos en esta memoria se plantearon para desarrollar los objetivos específicos mencionados a continuación.

### **Objetivos Específicos**

- **Objetivo 1:** Evaluar la eficacia, al ser aplicados por vía foliar o directamente a la disolución nutritiva, de un amplio grupo de quelatos biodegradables y complejos de hierro presentes en el mercado, o que están siendo estudiados, como

correctores de la clorosis férrica en plantas desarrolladas en hidroponía pura. Asimismo se pretende evaluar la relación entre la fracción de Fe complejada/quelada con su estabilidad y efectividad.

- **Objetivo 2:** Evaluar la eficacia del quelato biodegradable IDHA/Fe<sup>3+</sup> para corregir la clorosis férrica en plantas desarrolladas en hidroponía pura y con distintos grados de deficiencia de Fe al ser aplicado mediante rociados foliares, estudiando la influencia del tipo de adyuvante usado y de la presencia de una fuente adicional de Fe.
  
- **Objetivo 3:** Evaluar la capacidad de extractos de alperujo modificados y de distintos lignosulfonatos para mejorar la nutrición férrica de plantas desarrolladas en hidroponía pura y afectadas por deficiencias de Fe, al ser aplicados a la disolución nutritiva o mediante rociados foliares. Se pretende además evaluar los procesos de absorción y redistribución del Fe aportado por los complejos Fe-LS, mediante el empleo de isótopos (<sup>59</sup>Fe y <sup>57</sup>Fe).

## **OBJECTIVES**

### **General Objectives**

The objective of this dissertation is to find alternatives to the traditional application to soils of recalcitrant or scarcely degradable synthetic chelates to overcome Fe chlorosis. New products such as biodegradable chelates and complexes with different origins but derived from natural products are under consideration. Since these compounds are usually less stable than the chelates commonly used in agriculture, different application ways such as foliar sprays or nutrient solution application in the case of plants grown in hydroponics should be considered.

These products can be a cheaper and more eco-compatible alternative than traditional synthetic chelates. In spite of this, these compounds are not included in the European legislation (EU Directive No. 2003/2003). Since the application way and the physical-chemical characteristics of the compounds (especially for complexes) influence their efficiency, different plant species (soybean, cucumber and tomato) were studied, and controlled conditions have been used. The conclusions of these assays will be an important contribution to evaluate the incorporation of biodegradable chelating agents in the list of authorized products and to create an European list of authorized complexing agents. The specific objectives of this dissertation are described below.

### **Specific Objectives**

- **Objective 1:** Compare the effectiveness of different biodegradable chelates and complexes, most of them already available in the market or currently under evaluation, to overcome Fe chlorosis of plants grown in hydroponics when applied through foliar sprays or to the nutrient solution. Moreover the relationship between the chelated/complexed fraction and stability and efficacy of the compound will be studied.

- **Objective 2:** Asses the efficacy of the foliar application of the biodegradable chelate IDHA/Fe<sup>3+</sup> to overcome Fe chlorosis in plants with mild or severe chlorosis grown in hydroponics. Evaluate the influence of the type of adjuvant used and of the presence or absence of an additional source of Fe besides the foliar sprays.
  
- **Objective 3:** Asses the ability of modified olive mill wastes and lignosulfonates to improve Fe nutritional status of chlorotic plants grown in hydroponics, when the complexes were applied to the nutrient solution or through foliar sprays. Labeled Fe (<sup>59</sup>Fe y <sup>57</sup>Fe) will be used to evaluate uptake and redistribution of the Fe supplied as Fe-LS complexes.

## **Capítulo III:**

---

**Corrección de la clorosis  
férrica en soja por distintos  
quelatos y complejos de Fe.  
Aplicación por vía foliar o en  
disolución nutritiva.**





---

## Comparación de quelatos y complejos de Fe aplicados por vía foliar o a través de la disolución nutritiva como correctores de la clorosis férrica en soja

### **RESUMEN**

Los quelatos sintéticos son los correctores más eficaces de la clorosis férrica. Sin embargo, son productos caros y generalmente poco degradables, por lo que recientemente se han comenzado a estudiar nuevos quelatos biodegradables para su uso como correctores de la clorosis férrica. Por otra parte, los complejos de Fe son fertilizantes con un precio inferior al de los quelatos sintéticos y derivados frecuentemente de productos naturales, que también se emplean en la corrección de la clorosis férrica. En dos experimentos se estudió la eficacia de cinco quelatos sintéticos (Fe-EDDS, Fe-IDHA y tres formulaciones comerciales de Fe-EDTA) y diez complejos (humatos, lignosulfonatos, aminoácidos, glicoproteínas, polipéptidos, citrato y gluconato) al ser aplicados a plantas de soja con deficiencias de Fe desarrolladas en hidroponía pura. En el primer ensayo, los correctores fueron aplicados a la disolución nutritiva, mientras que en el segundo la aplicación se realizó por vía foliar. En ambos ensayos se determinaron el peso seco de las plantas, la concentración de Fe en raíz y en parte aérea, y los valores SPAD, con el fin de evaluar la eficacia de los correctores utilizados. En las aplicaciones a la disolución nutritiva los quelatos sintéticos favorecieron el crecimiento de las plantas en mayor medida que los quelatos, así como el incremento en la concentración de Fe y en el índice SPAD. Entre los complejos sólo la transferrina mostró una eficacia similar a la de los quelatos. En cuanto a la aplicación foliar de los productos, el mayor reverdecimiento de las hojas correspondió a las plantas rociadas con quelatos sintéticos y aminoácidos, pero la translocación a raíz del Fe aplicado sólo fue evidente en el caso del lignosulfonato. El Fe-EDDS y el Fe-EDTA mostraron eficacias similares en ambos tipos de aplicaciones.

**Comparison of iron chelates and complexes supplied as foliar sprays  
and in nutrient solution to correct iron chlorosis of soybean**

**Patricia Rodríguez-Lucena, Lourdes Hernández-Apaolaza and Juan J. Lucena\***

Agricultural Chemistry Department, Autónoma University,, Av. Fco. Tomás y Valiente  
7,28049 Madrid, Spain

Journal of Plant Nutrition and Soil Science (DOI: 10.1002/jpln.200800256).

---

***COMPARISON OF IRON CHELATES AND COMPLEXES SUPPLIED AS FOLIAR SPRAYS AND IN NUTRIENT SOLUTION TO CORRECT IRON CHLOROSIS OF SOYBEAN***

**ABSTRACT**

The application of synthetic chelates is the most efficient remedy for correcting iron (Fe) chlorosis. However, chelates are usually expensive and non-degradable products. Recently, new degradable chelates have been proposed for their use as Fe fertilizers. Also, Fe complexes cheaper than synthetic chelates and derived from natural products are also used to correct Fe deficiencies. Fifteen products, including five different synthetic chelates (Fe-EDDS, Fe-IDHA and three Fe-EDTA formulations) and ten natural complexes (humates, lignosulfonates, amino acids, glycoproteins, polyamines, citrate and gluconate), have been compared when applied at low concentration to soybean (*Glycine max* L.) chlorotic plants grown in hydroponics under controlled conditions. In the first experiment, Fe compounds were applied to the nutrient solution, while in the second trial Fe was foliar-supplied. Dry matter, Fe concentration in shoots and roots, and SPAD values were used to evaluate the effectiveness of the Fe in the different products. In the nutrient solution experiment, synthetic chelates provided better plant growth, Fe concentration and SPAD values than complexes. Among the Fe complexes, transferrin generally provided good plant responses, similar to those obtained with synthetic chelates. After foliar application, the highest re-greening was observed for plants treated with synthetic chelates and amino acid complexes, but the translocation to roots only occurred for Fe lignosulfonate. Fe-EDDS and Fe-EDTA performed in a similar way when applied in nutrient solution or as foliar sprays.

## 1. INTRODUCTION

Iron (Fe) chlorosis is a common plant disorder throughout the world that occurs mainly on calcareous and/or alkaline soils. Under these conditions, calcium carbonate buffers soil solution pH in the range 7.5-8.5 (Lindsay and Schwab, 1982) and there is a high concentration of bicarbonate in the soil solution (Lucena, 2000). Consequently, Fe precipitates as Fe oxyhydroxides (Lindsay, 1979), and Fe availability is reduced. In the Mediterranean area, it is estimated that 20-50% of fruit crops are affected by Fe deficiency (Jaeger et al., 2000).

At present, different types of products can be used to overcome Fe chlorosis. The EU Directive No. 2003/2003 (EU Directive, 2003) includes chelates (synthetic products of high stability) and complexes (derived natural products) as Fe fertilizers. Chemically, both of them are chelates, because they bind the metal ions through multiple sites. However, based on EU legal terms synthetic Fe chelates are polyamino-carboxylic acids, with a known structure, that can be classified as phenolic and non-phenolic chelates. Non-phenolic chelates, such as ethylene diamine tetraacetic acid (Fe-EDTA), have a relatively low stability and are unable to maintain Fe in the solution in calcareous or alkaline soils, so their use is recommended in hydroponics, fertigation or foliar applications. In phenolic chelates such as ethylenediamine - N,N'- bis o-hydroxyphenylacetic acid (Fe-o,o-EDDHA) and its analogues, two phenolic groups replace two of the carboxylic groups of Fe-EDTA, which increases the stability of the Fe chelate. The high price of Fe chelates means that only the top cash crops can be treated with these products (Chen and Barak, 1982). Moreover, most of these chelates are recalcitrant products in soils and waters, and there has been growing concern in recent years about the environmental risk of their application to soils (Hyvönen et al., 2003). New products, such as the biodegradable N-(1,2-dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid (IDHA) and ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) have been proposed as chelating agents for micronutrient fertilizers (Mitschker et al., 2004; Lucena et al., 2008).

Iron complexes include a large number of substances (e.g. humates, lignosulfonates, amino acids, gluconate, citrate) with different origins, derived always from natural products and including both polymeric and non-polymeric molecules. Complexes usually have a low stability, so they are intended for mild chlorotic conditions

(i.e. crops grown under low Fe concentration that suffer only moderate chlorosis), non-susceptible crops, fertigation or foliar sprays. They are cheaper than synthetic Fe chelates, so their application to low-value crops can be a profitable and environmentally friendly alternative. While the stability of chelates is a good index of their effectiveness, this has not been demonstrated for complexes. Due to the large number of competing reactions, with different impacts on the compounds studied, an effective theoretical comparison of the stability of the chelates and complexes requires a speciation calculation of the pFe (related to the binding strength between the metal and the ligand) for each compound under different agronomic conditions. That would inform about the different chemical species formed by the Fe complex and their availability to plants depending on pH, Fe concentration and soil solution characteristics. While this has been successfully undertaken for chelates (Yunta et al., 2003), in the case of Fe complexes it is almost impossible. There are many different complexing sites with various stability constants, so single stability constants cannot be obtained and the calculation of the chemical species formed cannot be done. The relative stability of the complexes can be related to their ability to maintain the element in solution at high pH, as shown by the method presented by Villén et al. (2007a).

Foliar application of synthetic chelates, complexes and inorganic salts can be used to overcome Fe chlorosis. These applications have been tested by several authors (Álvarez-Fernández et al., 2004; Fernández et al., 2006; Fernández et al., 2008; Rodríguez-Lucena et al., 2009) with variable results, as the factors controlling foliar absorption are diverse (depending on treated leaf, type of compound applied, surfactant, etc.) and optimum foliar fertilizer formulation is still difficult to specify (Fernández et al., 2006).

The objective of this work is to compare the ability of Fe chelates and complexes prepared from commercial sources to correct Fe deficiency in Fe-susceptible plants, i.e. without mechanisms to overcome Fe chlorosis. Given the environmental risks associated with the soil application of recalcitrant chelates, biodegradable Fe chelates (EDDS and IDHA) and Fe complexes (humates, lignosulfonates, amino acids, polyamines, proteins and organic acids) have been evaluated. Both nutrient solution and foliar applications have been tested in separate experiments using soybean (*Glycine max* L.) as test plant. In

both assays, regreening effect, growing parameters and total Fe concentration in relation to the application of the products were determined.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Fe-containing products**

Fifteen Fe compounds with different chemical properties were compared (Tab. 1):

- Five synthetic Fe chelates: EDDS, IDHA and three EDTA formed with commercial sources of chelating agents and FeSO<sub>4</sub>. HPLC analysis revealed that they were all Fe(III) chelates.
- Three Fe amino acid complexes: one of them with glycine as main component (Gly) and mixtures of glycine with glutamate (Gly/Glu) and arginine (Gly/Arg) formed with commercial sources of amino acid extracts and FeSO<sub>4</sub>. Theoretical speciation indicated that mainly Fe(II) complexes were formed, suggesting that Fe(II) oxidation was limited when these complexes were formed.
- Transferrin (TR): a commercial complex with a Fe(III) binding protein, but the Fe bonded naturally is approximately 0.1%, and the commercial product contains added Fe bonded to the amino acid chain. It can therefore be considered a polypeptide complex.
- One modified anionic polyamine complex (POL/Fe): a polyethyleneamine acetate with FeSO<sub>4</sub> added. Like in EDTA, Fe is bonded by carboxylate and amine groups in the POL/Fe, so it is expected that it will oxidize to Fe(III).
- Two humate complexes from leonardite: Fe-humate, comprising humic acid (H); and Fe-humate/fulvate, a mixture of humic and fulvic acids (HF). Both were formed using FeSO<sub>4</sub>, though oxidation to Fe(III) complexes was expected, at least partially.
- Two Fe organic acid complexes: citrate (CA) and gluconate (GA), also prepared using FeSO<sub>4</sub>. According to Bechtold et al. (2002) gluconate forms mainly Fe(III) complexes, with the same behavior being expected for citrate.

Table 1: Fe chelates and complexes studied, and percentage of chelated or complexed and water-soluble Fe of the commercial products.

Treatments	Chelating or complexing agent	Chelated or complexed Fe (%)	Soluble Fe (%)	Fe chelated or complexed fraction (%)
<b>Chelates</b>				
<b>EDDS</b>	EDDS	8.3 ± 0.1	8.3 ± 0.1	100.0 ± 0.1
<b>IDHA</b>	IDHA	8.6 ± 0.1	8.6 ± 0.5	100.0 ± 0.3
<b>EDTA1</b>	EDTA	2.9 ± 0.1	12.5 ± 0.1	103.5 ± 0.1
<b>EDTA2</b>	EDTA	9.8 ± 0.1	12.6 ± 0.1	77.8 ± 0.1
<b>EDTA3</b>	EDTA	10.1 ± 0.2	12.8 ± 0.4	78.9 ± 0.3
<b>Complexes</b>				
<b>Gly</b>	Amino acid (Glycine) Free amino acids: 24 % Polypeptides: 15 %	0.3 ± 0.01	21.5 ± 0.5	1.4 ± 0.2
<b>Gly/Glu</b>	Amino acid (Glycine + Glutamate) Free amino acids: 19 % Polypeptides: 3 %	0.02 ± 0.01	5.6 ± 0.2	0.4 ± 0.01
<b>Gly/Arg</b>	Amino acid (Glycine + Arginine) Free amino acids: 10 % Polypeptides: 14 %	0.02 ± 0.01	4.3 ± 0.3	0.5 ± 0.1
<b>POL</b>	Modified anionic polyamine	8.5 ± 1.1	8.8 ± 0.1	95.8 ± 2.3
<b>TR</b>	Transferrin (polypeptides)	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1	96.1 ± 0.6
<b>H/</b>	Humate	5.5 ± 0.3	5.3 ± 0.1	103.5 ± 9.3
<b>HF</b>	Humate + Fulvate Humic acids: 25 % Fulvic acids: 8 %	7.9 ± 0.2	7.8 ± 0.1	100.8 ± 2.1
<b>LS</b>	Lignosulfonate	6.9 ± 0.2	6.1 ± 1.4	113.8 ± 5.3
<b>CA</b>	Citrate	12.7 ± 1.5	12.5 ± 0.1	101.1 ± 0.9
<b>GA</b>	Gluconate	2.4 ± 1.1	12.9 ± 0.3	18.5 ± 2.8

Data are means ± standard error (SE) of three independent replicates. Chelated Fe has been determined using ion-pair chromatography. The methodology by Lucena et al. (1996) was employed for EDTA and EDDS. IDHA was measured according to prEN 15950, methodology under review by the CEN TC 260 WG 5. Complexed Fe was determined using the precipitation method described by Villén et al. (2007a).

- Lignosulfonate complex (LS): Pulp-paper based natural polymers complexed with Fe using FeSO<sub>4</sub>. Unpublished data from our laboratory reveal that Fe is mainly complexed in the Fe(II) form.

All products were originally in solid form, except for TR, Gly/Glu and Gly/Arg, which were liquid formulations.

## 2.2 Determination of chelated or complexed Fe and soluble Fe

The content of chelated Fe for EDTA and EDDS chelates was determined by HPLC as described by Lucena et al. (1996). IDHA-chelated Fe was determined using HPLC ion-pair chromatography, according to according to prEN 15950, methodology under review by the CEN TC 260 WG 5. For Fe complexed by natural complexes the precipitation method by Villén et al. (2007a) was used. This method can also be considered as an index of the stability of complexes at high pH.

The soluble Fe content in all the products was measured according to the European official method for fertilizers (EU Directive, 2003), based on dissolution of the fertilizers in water and determination of soluble element after removal of organic compounds to allow the assessment of the element by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS, Perkin-Elmer AAnalyst 800 Spectrophotometer).

## 2.3 Greenhouse experiment

Soybean plants (*Glycine max* L. cv. Stine 0480), were used in both experiments. Seedlings were obtained in the growth chamber by standard growing procedure (Villén et al, 2007b) after three days of germination, five days of growing in 1/5 diluted nutrient solution and six days with complete micronutrient buffered nutrient solution without Fe. Plants were then moved to the greenhouse and transferred to 2 L polyethylene pots containing 2 L of full-strength nutrient solution. The stems of two plants were wrapped together with foam, and placed in the pots (three holes in the lid, six plants per pot). This nutrient solution had the same composition than the initial one, but was not buffered on micronutrients. The pH was adjusted at 7.5 with 1.0 M KOH, and buffered with 1.0 x 10<sup>-4</sup> M HEPES and 0.4 g of solid CaCO<sub>3</sub> per pot. Water was added every 2 d, and the solution was renewed every week.



## 2.4 Treatment application

When the plants were moved to the greenhouse, Fe treatments (three replicates) were applied with the applications being repeated every 7 d.

**Experiment I** (nutrient solution application): Fe was added at a low concentration (5.0  $\mu\text{M}$ ). As the plants did not recover from chlorosis after 1 week, the concentration was increased to 10.0  $\mu\text{M}$  in the second and third application. Treatments were prepared according to the soluble Fe concentration (Tab. 1). Two control treatments (Control +Fe and Control -Fe) were established. For control +Fe 50  $\mu\text{M}$  *o,o*-EDHHA/ $\text{Fe}^{3+}$  standard solution (LGC Standards, Teddington, United Kingdom) was added to the nutrient solution. For control -Fe, no Fe was added to the solution.

**Experiment II** (foliar application): Each pair of plants was sprayed with 2 mL of the products using a nebulizer system, with a Fe concentration of 5.0 mM, calculated according to the soluble Fe concentration (Tab. 1). Contamination of the nutrient solution was avoided by placing a plastic sheet and a paper layer over the pot lid, below the shoots, to collect any possible spill from the leaves. Leaf sprays were applied both on the adaxial and abaxial leaf surface. All solutions were adjusted to pH 5.0 to avoid altering the ion exchange properties of the cuticle (Fernández et al., 2005). Tween 80 (non-ionic surfactant; PROBUS, Barcelona, Spain) was added to the foliar solutions (rate 0.1 % (v/v)), just before leaf spraying. The same controls (+Fe and -Fe) were prepared as in the nutrient solution application experiment.

## 2.5 Measurements

SPAD readings were taken with a chlorophyll meter (Minolta SPAD-502) for all the leaf stages (average of three readings per leaf) every 2 or 3 d. Whole plants were sampled 8 d after transplanting (DAT, two pairs of plants) and 22 DAT (one pair of plants) after transplanting. The sampled roots, stems and leaves were separated and washed as described by Álvarez-Fernández et al. (2001), dried at 65°C for 3 d and weighed to calculate dry matter production. After dry digestion micronutrients were determined in the leaves using AAS.

## **2.6 Statistical analysis**

Data were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) with the program SPSS 13.0. Means were compared using Duncan's test at  $P < 0.05$  in order to find significant differences between treatments. Applying Pearson Correlation Analysis, correlations between Fe complexed or chelated fraction and different plant parameters (SPAD value, dry weight and leaf Fe concentration) was studied at  $P < 0.05$ .

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1 Soluble and complexed Fe concentration**

Data for soluble and chelated or complexed Fe concentrations, as well as for the chelated or complexed fractions (percentage of chelated or complexed Fe with respect to soluble Fe) are shown in Tab. 1. The Fe chelated or complexed fraction is an index of complex stability, which can be related to the efficiency of the Fe fertilizer. In the case of pure synthetic chelates stability is closely related to stability constants (the higher  $\log K^{\circ}$ , the higher the stability of the chelate). Nevertheless, in the manufacturing process, impurities that reduce the efficiency of the commercial chelates may be produced. For the products studied in our experiments, Fe chelated or complexed fractions are high in most cases (e.g. synthetic chelates, transferrin, polyamine, humates, lignosulfonate and citrate). Since for EDTA2 and EDTA3 the chelated fraction is lower (77.8% and 78.9%, respectively) than for EDTA1, IDHA/Fe and EDDS (100%), their stability and effectiveness is expected to be lower. The high Fe complexed fraction of transferrin, polyamine, humates, lignosulfonate and citrate (around 100%) is expected to favor the performance of these products. For amino acids, this value is very low, so the ability of the amino acid complex to deliver Fe to plants is questionable. In the case of the gluconate complex, this percentage is also quite low.

### **3.2 Nutrient solution experiment**

Table 2 presents changes Tab. 2 presents the variations in SPAD values in the second level of leaves 21 days after the application of the treatments to the nutrient solution". In order to find differences between treatments, very low concentrations of

Fe were used in the nutrient solution (except for control +Fe) so changes in SPAD readings were generally low. At the end of the experiment (21 d after transplanting), for all Fe chelates increases in the SPAD values were recorded, especially for EDDS (similar to control +Fe), while for complexes only TR and LS resulted in significantly higher SPAD values. Table 2 also presents plant dry weight and leaf Fe concentration at the 2nd sampling. Only the EDDS, IDHA and EDTA1 were statistically different to control -Fe with regard to plant dry weight, while the highest leaf Fe concentrations (apart from control +Fe) were found after application of synthetic chelates, POL, TR and GA.

**Table 2:** Effect of the Fe chelates and complexes applied to the nutrient solution (Experiment I) on changes in SPAD values measured in the second level of leaves, plants dry weight and leaf Fe concentration of soybean plants grown in hydroponics.

Treatments	$\Delta$ SPAD (from 0 to 21 DAT)	2nd Sampling (22 DAT)			
		Biomass (g plant <sup>-1</sup> , DW)		Leaf Fe Concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	
Control - Fe	-2.8 $\pm$ 0.5 cd	1.1 $\pm$ 0.1 e		26.9 $\pm$ 1.3 i	
Control + Fe	7.5 $\pm$ 4.9 a	3.8 $\pm$ 0.3 a		184.4 $\pm$ 1.8 a	
EDDS	17.2 $\pm$ 3.5 a	2.9 $\pm$ 0.8 b		52.8 $\pm$ 4.2 c	
IDHA	1.5 $\pm$ 0.4 bcd	2.4 $\pm$ 0.4 bcd		55.8 $\pm$ 0.7 c	
EDTA1	2.0 $\pm$ 0.8 bc	2.6 $\pm$ 0.3 bc		65.9 $\pm$ 2.2 b	
EDTA2	0.6 $\pm$ 0.2 bcd	1.9 $\pm$ 0.3 cde		51.5 $\pm$ 0.8 cd	
EDTA3	4.1 $\pm$ 0.7 b	1.7 $\pm$ 0.4 cde		54.5 $\pm$ 3.7 c	
Gly	-1.8 $\pm$ 0.6 cd	1.3 $\pm$ 0.3 e		38.5 $\pm$ 3.1 efg	
Gly/Glu	-0.7 $\pm$ 0.3 bcd	1.3 $\pm$ 0.1 e		33.8 $\pm$ 0.1 ghi	
Gly/Arg	-2.6 $\pm$ 0.8 cd	1.6 $\pm$ 0.1 de		43.2 $\pm$ 0.3 def	
POL	-3.6 $\pm$ 0.5 cd	1.4 $\pm$ 0.1 de		54.3 $\pm$ 4.2 c	
TR	4.1 $\pm$ 1.1 b	1.5 $\pm$ 0.2 de		54.5 $\pm$ 5.8 c	
H	-3.9 $\pm$ 0.8 cd	1.1 $\pm$ 0.1 e		29.1 $\pm$ 1.7 hi	
HF	-4.4 $\pm$ 1.7 d	1.1 $\pm$ 0.1 e		34.1 $\pm$ 1.3 ghi	
LS	1.2 $\pm$ 0.1 bcd	1.2 $\pm$ 0.1 e		31.7 $\pm$ 2.5 ghi	
CA	-4.6 $\pm$ 0.7 cd	1.3 $\pm$ 0.2 e		28.1 $\pm$ 1.1 i	
GA	0.4 $\pm$ 1.8 bcd	1.6 $\pm$ 0.6 de		47.4 $\pm$ 3.2 cde	

Data are means  $\pm$  standard error (SE) of three independent replicates. Two pairs of plants per pot (twelve plants in total) were analyzed at 1st sampling time. The remaining pairs of plants were sampled at the end of the assay (six plants in total).

Different letters in the same column denote significant differences between the treatments ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). DW: dry weight.

One of the aims of this work was to compare the effectiveness of chelates and complexes. In general, all the parameters studied (Tab. 2) were higher for synthetic chelates than for natural complexes, indicating that in most cases chelates behaved more efficiently than natural complexes. For commercial products, both the type of ligand and the formulation of the product are relevant for their efficacy. A positive correlation was

expected between the Fe chelated or complexed fraction and plant dry weight, SPAD value and plant Fe concentration. For synthetic chelates, Fe chelated fraction and stability constants ( $\log K^\circ$ ) can explain their high efficiency. By applying Pearson Correlation Analysis ( $P < 0.05$ ), a positive and statistically significant correlation was found between Fe chelated fraction and Fe concentration in leaves ( $R = 0.903$ ), while for plant dry weight and SPAD value the correlation was also high and positive, although not statistically significant, possibly due to the low Fe concentrations used in the experiment.

The chelates with the highest Fe chelated fraction (EDDS and EDTA1) showed the best results. The lower effectiveness of EDTA2 and EDTA3 confirmed the influence of Fe chelated fraction on the performance of the products. The stability of the Fe chelates also influenced the effectiveness of the chelates.  $\log K^\circ$  is higher for EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  (27.6; Lindsay, 1979) than for EDDS/ $\text{Fe}^{3+}$  (22.0; Tandy et al., 2004), so EDTA is expected to be more capable of maintaining Fe in solution. However, competition of other metals e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  for the chelating agents is also important. For EDDS  $\log K^\circ$  values for Ca, Mn and Zn (7.9, 8.6 and 13.0, respectively) are lower than for EDTA (12.3, 15.5 and 18.1, respectively) reducing the competing effect and stabilizing the EDDS/ $\text{Fe}^{3+}$  chelate similarly to the EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  (Lindsay, 1979; Orama et al., 2002).

The lower stability of IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  ( $\log K^\circ$  15.2; Tandy et al., 2004), related to the presence of only five functional groups able to bind Fe, might explain the lower effectiveness of the IDHA treatments with regard to the EDDS and the EDTA1. In previous studies (Villén et al., 2007b), we found that pure IDHA was faster than pure EDTA in delivering Fe to soybean plants grown in hydroponics. However, in the experiment presented here, the plants treated with EDTA1 had a higher leaf Fe concentration and presented higher SPAD values than those treated with IDHA at the end of the experiment, while statistical differences between IDHA and EDTA2 or EDTA3 did not appear. These results are consistent with those obtained in greenhouse experiments (Lucena et al. 2008) applying Fe to green bean and tomato plants grown in commercial hydroponics with rockwool as substrate. In the case of green bean, EDTA was more efficient than IDHA in delivering Fe to plants, whereas no differences were found when these products were applied to tomato plants.

Regarding the natural complexes studied, no positive or statistically significant correlations (data not shown) were found between Fe complexed fraction and SPAD value, dry weight or leaf Fe concentration. The low concentrations used in this experiment were useful for elucidating differences concerning the efficacy of chelates. However, the response was very low for complexes, making it difficult to pinpoint the influence of the Fe complexed fraction in their effectiveness. Competition with other cations, especially with  $\text{Ca}^{2+}$ , may have contributed to the reduced effectiveness of the complexes by displacement of complexed Fe and precipitation of Fe hydroxide. Thus, higher concentrations that would increase the availability of Fe in the solution should be assayed with this type of products in further research. Humates, lignosulfonate, citrate, transferrin and polyamine showed a high amount of complexed Fe, but solely transferrin and polyamine increased leaf Fe concentration to the levels of plants treated with synthetic chelates. Transferrin is a Fe-binding protein that, despite being considered a complex because of its polymeric and natural origin, has similarities with phenolic chelates (EDDHA and other) with respect to the way Fe is bound to the binding sites (by phenolates, carboxylates and amine nitrogens), which could explain its efficiency. In the case of polyamine, Fe bonds are similar to those found in proteins and EDDS-type chelates.

Fe complexed fraction for humates and lignosulfonates was also high, but these compounds are polymers with different binding sites that can form Fe complexes of variable stability ( $\log K^\circ$  ranging from 2 to 12; García-Mina et al., 2004) depending on the Fe/ligand ratio. If the ratio is high, complexes are of low stability while at low ratios they are highly stable (Stevenson, 1994). If weakly bound Fe is released, the remaining Fe will be strongly bound and may not be available for plant use. The Fe complexed fraction was very low for the amino acids studied (Gly, Gly/Arg, Gly/Glut), and this explains the low efficiency observed for these products. However, since the stimulating effect of amino acids on plant development has been described previously (Breteler et al., 1985; Ashmead, 1986), and this effect has also been observed when Fe chelates and amino acids were simultaneously applied to the plant (Sánchez-Sánchez et al., 2002), the combined application of Fe chelates and amino acids could be an alternative for improving the efficiency of these products.

### 3.3 Foliar spray experiment

Variations in SPAD values in the second level of leaves after foliar application are shown in Tab. 3. In general, synthetic chelates were more efficient than complexes in improving SPAD values. At the end of the trial most of the synthetic chelates (EDDS, EDTA1, EDTA2 and EDTA3) did not show statistical differences compared with the control +Fe treatment. In fact, at that time the highest SPAD values were found for EDTA3. All natural complexes (except Gly, Gly/Arg and TR) showed statistically lower SPAD values compared to control +Fe at the end of the experiment. However dark spots were observed for all the treatments and the control –Fe at the end of the trial, probably associated to the damage of the leaf surface after spraying the leaves. Therefore, SPAD measurements have to be considered with caution. Regarding dry weight no statistical differences were found comparing chelate/complex treatments with the control –Fe at the end of the trial (22 DAT, Tab. 3), while data corresponding to leaf

**Table 3:** Effect of foliar applied Fe chelates and complexes (Experiment II) on changes in SPAD values measured in the second level of leaves, plants dry weight and root Fe concentration of soybean plants grown in hydroponics.

Treatments	$\Delta$ SPAD (from 0 to 21 DAT)	2 <sup>nd</sup> Sampling (22 DAT)			
		Biomass (g plant <sup>-1</sup> , DW)		Root Fe concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	
Control - Fe	-4.5 $\pm$ 0.7 g	0.8 $\pm$ 0.2	b	54.1 $\pm$ 1.7	cde
Control + Fe	16.7 $\pm$ 2.9 a	1.7 $\pm$ 0.1	a	193.2 $\pm$ 8.6	a
EDDS	9.5 $\pm$ 3.6 abc	1.1 $\pm$ 0.2	b	60.7 $\pm$ 4.1	cd
IDHA	-1.3 $\pm$ 0.4 efg	1.1 $\pm$ 0.1	b	44.8 $\pm$ 6.9	de
EDTA1	14.3 $\pm$ 3.3 ab	1.0 $\pm$ 0.3	b	65.7 $\pm$ 6.5	cd
EDTA2	8.6 $\pm$ 1.3 abcd	0.8 $\pm$ 0.3	b	76.5 $\pm$ 10.6	c
EDTA3	17.9 $\pm$ 4.5 a	0.9 $\pm$ 0.2	b	66.9 $\pm$ 2.4	cd
Gly	9.5 $\pm$ 2.3 abc	1.1 $\pm$ 0.1	b	45.7 $\pm$ 5.1	de
Gly/Glu	6.9 $\pm$ 1.8 bcde	1.1 $\pm$ 0.1	b	72.2 $\pm$ 17.1	cd
Gly/Arg	12.4 $\pm$ 3.4 abc	0.9 $\pm$ 0.1	b	49.1 $\pm$ 6.5	cde
POL	4.5 $\pm$ 1.6 cdef	1.1 $\pm$ 0.1	b	47.6 $\pm$ 2.4	de
TR	14.3 $\pm$ 2.3 ab	1.1 $\pm$ 0.2	b	50.7 $\pm$ 11.5	cde
H	2.3 $\pm$ 1.1 defg	0.6 $\pm$ 0.1	b	55.1 $\pm$ 6.7	cde
HF	-2.2 $\pm$ 0.8 fg	0.8 $\pm$ 0.1	b	58.2 $\pm$ 3.4	cde
LS	2.7 $\pm$ 0.6 cdefg	1.0 $\pm$ 0.1	b	129.5 $\pm$ 16.5	b
CA	2.9 $\pm$ 1.1 cdefg	1.0 $\pm$ 0.1	b	33.1 $\pm$ 1.1	de
GA	5.1 $\pm$ 3.1 cdefg	1.1 $\pm$ 0.3	b	48.1 $\pm$ 2.9	de

Data are means  $\pm$  standard error (SE) of three independent replicates. Two pairs of plants per pot (twelve plants in total) were analyzed at 1st sampling time. The remaining pairs of plants were sampled at the end of the assay (six plants in total).

Different letters in the same column denote significant differences between the treatments ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). DW: dry weight.

Fe concentration were not taken into consideration since it was not possible to assure that Fe remaining on leaf surfaces could be removed after washing. With regard to root Fe concentration, a significant increase was only found for the lignosulfonate treatment compared with control –Fe.

Any attempt failed to correlate Fe chelated or complexed fraction with plant dry weight, SPAD values or root Fe concentration. EDDS, EDTA compounds, amino acids and transferrin were the most efficient treatments for re-greening leaves. Fernández et al. (2006) tested the effectiveness of EDTA/Fe<sup>3+</sup>, IDHA/Fe<sup>3+</sup> and other Fe-containing compounds applied through foliar sprays to peach orchards, showing that EDTA/Fe<sup>3+</sup> produced a higher increase in leaf chlorophyll concentration than IDHA/Fe<sup>3+</sup>. In our experiment, an increase in SPAD values was not observed for IDHA. The type of surfactant can have a major influence on the efficiency of IDHA/Fe<sup>3+</sup> and EDTA/Fe<sup>3+</sup> chelates (Fernández et al., 2008). This effect can be minimized by the use of non-ionic surface-active agents such as the one employed in our experiment. Regarding the EDDS, its foliar application to lettuce was more effective than EDTA/Fe<sup>3+</sup> in regreening leaves (Ylivainio et al., 2004), while in our trial both chelates behaved similarly.

Evidence for different absorption rates of synthetic chelates and complexes has already been described. Rodríguez-Lucena et al. (2009) compared the effectiveness of LS/<sup>59</sup>Fe<sup>3+</sup> complexes foliar application and EDTA/<sup>59</sup>Fe<sup>3+</sup> to chlorotic cucumber and tomato plants and observed that a higher amount of <sup>59</sup>Fe was absorbed and redistributed to other plant organs when Fe was applied as EDTA/<sup>59</sup>Fe<sup>3+</sup>. This observation is not consistent with the high root Fe concentration found in the LS treatment. The factors that promoted the better behavior of LS with regard to the other treatments cannot be identified from our data. However, since statistical differences among the other treatments did not appear, even for those products with negligible Fe complexed fraction (e.g. amino acids), this better behavior could be ascribed to a higher Fe uptake when Fe was supplied as commercial LS/Fe sprays. In any case, this highest Fe concentration did not imply a better Fe nutritional status. The low root Fe concentration presented by the rest of products suggests that Fe uptake was very low, even for those complexes with a high Fe complexed fraction (humates and citrate).

## **4. CONCLUSIONS**

Synthetic chelates have been more efficient than natural complexes at correcting Fe chlorosis when applied in a nutrient solution or through foliar sprays. The Fe chelated fraction can be used as an index of the effectiveness of commercial chelates. When applied at low concentrations to the nutrient solution, biodegradable EDDS was more efficient than EDTA or IDHA, whereas EDDS behaved similarly to EDTA in foliar applications. Therefore, EDDS may be an efficient and environmentally friendly alternative to less degradable EDTA for curing Fe chlorosis in susceptible plants.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Projects AGL2004-07849-C02-01/AGR and AGL2007—63756) and by Tradecorp. P. Rodríguez-Lucena was on a Spanish Ministry of Science and Education “FPI” pre-doctoral contract co-financed by the European Social Fund. We thank Prof. R. J. Goos (North Dakota State University, Fargo, USA) for supplying the soybean seeds and Guillermo Esteban and Edgar Roperro for their technical support during the development of these experiments.



## REFERENCES

- Álvarez-Fernández A, García-Laviña P, Fidalgo C, Abadía J and Abadía A.** 2004. Foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.) trees. Plant Soil. 263: 5-15.
- Álvarez-Fernández A, Pérez-Sanz A and Lucena J J.** 2001. Evaluation of washing procedures on mineral analysis for orange and peach leaves sprayed with seaweed extracts enriched with iron. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 32:157-170.
- Ashmead H D.** 1986. The absorption mechanism of amino acids chelates by plant cells. In.: Foliar Feeding of Plants with Amino Acid Chelates. Ashmead H D, Ashmead H H, Miller G W, Hsu H. H. eds. Noyes Publications, New Jersey, pp. 219-235.
- Bechtold T, Burtscher E and Turcano A.** 2002.  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Fe}^{3+}$ -D-gluconate-complexes in alkaline solution. Complex stabilities and electrochemical properties. J. Chem. Soc., Dalton Trans.:2683-2688.
- Breteler H and Arnozis P A.** 1985. Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf bean. Phytochemistry 24:653-657.
- Chen Y and Barak P.** 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. Adv. Agron. 5:217.
- EU Directive.** 2003. Regulation (EC) No 2003/2003 of the European Parliament and of the Council of 13 October 2003 relating to fertilizers. Off. J. Eur. Union, 21-11-2003, L 304/1.
- Fernández V and Ebert G.** 2005. Foliar Iron Fertilization: A Critical Review. J. Plant Nutr. 28:2113-2124.
- Fernández V, Río V, Abadía J and Abadía A.** 2006. Foliar iron fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): effects of iron compounds, surfactants and other adjuvants. Plant Soil. 289:239-252.
- Fernández V, Del Río V, Pumariño L, Igartua E, Abadía J and Abadía A.** 2008. Foliar fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) with different iron formulations: Effects on re-greening, iron concentration and mineral composition in treated and untreated leaf surfaces. Sci. Hort. 117:241-248.

- García-Mina J M, Antolín M C and Sánchez-Díaz M. 2004.** Metal-humic complexes and plant micronutrient uptake: A study based on different plant species cultivated in diverse soil types. *Plant Soil*. 258:57-68.
- Hyvönen H, Orama M, Saarinen H and Aksela R. 2003.** Studies on biodegradable chelating agents: complexation of iminodisuccinic acid (ISA) with Cu(II), Zn(II), Mn(II) and Fe(III) ions in aqueous solution. *Green Chem*. 5:410-414.
- Jaeger B, Goldbach H and Sommer K. 2000.** Release from lime induced iron chlorosis by CULTAN in fruit trees and its characterisation by analysis. *Acta Hort*. 531:107–113.
- Lindsay W L. 1979.** *Chemical Equilibria in Soils*. John Wiley & sons. New York, pp. 129-149.
- Lindsay W L and Schwab A P. 1982.** The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr*. 5:821-840.
- Lucena J J, Barak P and Hernández-Apaolaza L. 1996:** Isocratic ion-pair high performance liquid chromatography method for the determination of various iron (III) chelates. *J. Chromatogr. A*. 727:253-264.
- Lucena J J. 2000.** Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron chlorosis. A review. *J. Plant Nutr*. 23:1591-1606.
- Lucena J J, Sentís J A, Villén M, Lao T and Pérez-Sáez M. 2008.** IDHA chelates as a micronutrient source for green bean and tomato in fertigation and hydroponics. *Agron. J*. 100:813-818.
- Mitschker A, Moritz R J and Nawrocki A. 2004.** Eur. Pat. EP 1411037 A1 20040421 Appl., p. 7; Chelated plant micronutrients. Bayer Chemicals AG.
- Orama M, Hyvonen H, Saarinen H and Aksela R. 2002.** Complexation of [S,S] and mixed stereoisomers of N,N'-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) with Fe(III), Cu(II), Zn(II) and Mn (II) ions in aqueous solution. *J. Chem. Soc., Dalton Trans*. 24:4644-4648.
- Rodríguez-Lucena P, Tomasi T, Pinton R, Hernández-Apaolaza L, Lucena J J, Cesco S. 2009.** Evaluation of <sup>59</sup>Fe-lignosulfonates complexes as Fe-sources for plants. *Plant Soil*. DOI 10.1007/s11104-009-0091-1.

- Sánchez-Sánchez A, Sánchez-Andreu J, Juárez M, Jordá J and Bermúdez D.** 2002. Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate FeEDDHA in lemon trees. *J. Plant Nutr.* 25:2433-2442.
- Stevenson F J.** 1994. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reaction.* John Wiley & Sons, New York, pp. 428-405.
- Tandy S, Bossart K, Mueller R, Ritschel J, Hauser L, Schulin R and Nowack B.** 2004. Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 38:937-944.
- Villén M, Cartagena M C, Bravo R, García-Mina J M, Martín de la Hinojosa M I and Lucena J J.** 2007a. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers and the complexing capacity of complexing agents. *J. Agric. Food Chem.* 55:5746-5753.
- Villén M, García-Arsuaga A and Lucena J J.** 2007b. Potential use of biodegradable chelate N-(1,2-Dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid/Fe<sup>3+</sup> as an Fe fertilizer. *J. Agric. Food Chem.* 55:402-407.
- Yunta F, Sierra M A, Gómez-Gallego M, Alcázar R, García-Marco S and Lucena J J.** 2003. Methodology to screen new iron chelates. Prediction of their behaviour in nutrient solution and soil conditions. *J. Plant Nutr.* 26:1955-1968.
- Ylivainio K, Jaakkola A and Aksela R.** 2004. Effects of Fe compounds on nutrient uptake by plants grown in sand media with different pH. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 167, 602-608.



## Capítulo IV:

---

**Aplicación foliar de  
IDHA/Fe<sup>3+</sup> para corregir la  
clorosis férrica en plantas de  
soja. Influencia del estado  
nutricional y del tipo de  
surfactante.**



---

## **Aplicación foliar de IDHA/Fe<sup>3+</sup> a plantas de soja afectadas por clorosis férrica: Efecto del estado nutricional de la planta y de los adyuvantes empleados**

### **RESUMEN**

Se realizaron dos experimentos para estudiar la efectividad de la aplicación foliar de IDHA/Fe<sup>3+</sup> mediante rociados foliares. En el primer ensayo, se estudió la eficacia del IDHA/Fe<sup>3+</sup> y del EDTA/Fe<sup>3+</sup> al ser aplicados a plantas de soja con deficiencias de Fe acusadas, en las que los rociados de Fe eran la única fuente de Fe para la planta. Se evaluaron además dos adyuvantes no iónicos, y uno aniónico basado en glicina. Para todos los quelatos la recuperación de las plantas fue escasa. Respecto a la eficacia de los adyuvantes estudiados, el más efectivo fue un tensoactivo no iónico basado en alquilpoliglucósido (APG), si bien independientemente del adyuvante añadido a los quelatos siempre se observaron daños en la superficie de la hoja (que podrían asociarse a un posible efecto de fitotoxicidad o al nivel acusado de clorosis que afectaba a las plantas). Los mismos quelatos fueron evaluados en el segundo experimento, en el cual los rociados foliares eran un complemento a la aplicación de EDTA/Fe<sup>3+</sup> a la disolución nutritiva. Se estudió la eficacia del APG al ser aplicado junto con el IDHA/Fe<sup>3+</sup> en estas nuevas condiciones, comparando su capacidad para favorecer los procesos de absorción foliar con la de un adyuvante basado en urea (U). En este segundo ensayo se apreciaron mejorías para todos los tratamientos, especialmente para el FeIDHA+U, que además fue el único que no produjo daños en la superficie foliar, y para la combinación de FeEDTA+APG. Por tanto, se concluyó que el IDHA/Fe<sup>3+</sup> constituye una alternativa “eco-compatible” a la aplicación foliar de EDTA/Fe<sup>3+</sup>.

**Iron supply to soybean plants through foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup>: effect of plant nutritional status and adjuvants**

**Patricia Rodríguez-Lucena, Edgar Roperro, Lourdes Hernández-Apaolaza and Juan J. Lucena.**

Agricultural Chemistry Department, Autónoma University of Madrid. Av. Fco. Tomás y Valiente, 7, 28049 Madrid, Spain.



---

***IRON SUPPLY TO SOYBEAN PLANTS THROUGH FOLIAR APPLICATION OF IDHA/Fe<sup>3+</sup>: EFFECT OF PLANT NUTRITIONAL STATUS AND ADJUVANTS***

**ABSTRACT**

The efficiency of IDHA/Fe<sup>3+</sup> foliar sprays applied to soybean chlorotic plants grown in hydroponics was evaluated in two experiments. In the first assay, the effectiveness of the foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> and EDTA/Fe<sup>3+</sup> to soybean plants with severe Fe chlorosis was studied when the foliar sprays were the only source used to provide Fe to plants. In addition, an anionic glycine based and two non-ionic adjuvants were tested. Both chelates behaved similarly, the recovery of the plants being scarce at the end of the experiment in all the cases. Among the adjuvants tested, a non-ionic alkylpolyglucoside (APG) was the most effective, though in all the cases black spots (which may be associated to phytotoxicity or to severe chlorosis) were observed. The same chelates were tested in the second experiment, in which foliar sprays were applied as an additional source of Fe for mildly chlorotic plants, which were also being supplied with low concentrations of Fe applied to the nutrient solution as EDTA/Fe<sup>3+</sup>. Moreover the APG of the first experiment was compared with the application of urea (U) as adjuvant. In this assay plant recovery was appreciable in all the cases, especially for the FeIDHA+U, that was the only formulation that did not damage leaf surface, and for the FeEDTA+APG. Thus, the foliar application of the biodegradable chelate IDHA/Fe<sup>3+</sup> can be an environmentally friendly alternative to the recalcitrant EDTA/Fe<sup>3+</sup>.

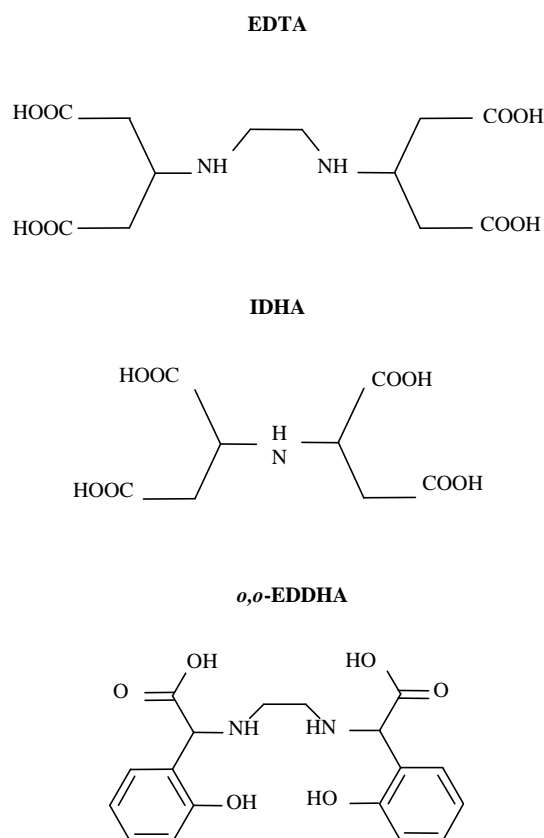
## 1. INTRODUCTION

Iron chlorosis is a widespread agricultural problem, especially on crops grown on calcareous soils, where calcium carbonate buffers soil solution pH in the range of 7.5-8.5 (Lindsay and Schwab, 1982) and high bicarbonate concentration is present. In soil, the solubility of Fe is controlled by Fe oxides (Lindsay, 1991) and the most soluble Fe oxide limits total soluble Fe concentration at around  $10^{-10}$  M in calcareous soils, much lower than that required ( $10^{-8}$  M) for optimal plant growth (Römheld and Marschner, 1986). Intervential leaf yellowing, due to the reduction of leaf photosynthetic pigments concentration, is the most characteristic visual symptom in chlorotic plants, whose fruit quality, size and yield are severely reduced.

Fe chelates applied to soils are the most efficient remedy to control Fe chlorosis. Most of these chelates degrade very slowly in the environment, and the concern about the environmental risk of its application (Hyvönen et al., 2003) has risen in the last decades. Recently the biodegradable chelating agent N-(1,2-dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid, commonly known as iminodisuccinic acid or IDHA (Figure 1), has been proposed for its use in agriculture (Mitschker et al., 2004). The IDHA shares structural similarities with EDTA (Figure 1), but only contains five functional groups able to complex Fe. Due to this characteristic, the IDHA/Fe<sup>3+</sup> presents lower stability than the EDTA/Fe<sup>3+</sup> and high reactivity in agronomic conditions. However, the IDHA/Fe<sup>3+</sup> has been comparable to EDTA/Fe<sup>3+</sup> providing Fe through nutrient solution to cucumber and soybean plants, cultivated in a growth chamber in hydroponics under calcareous soil conditions (Villén et al., 2007). When applied to tomato or green bean plants grown under field conditions or in commercial hydroponics, the IDHA/Fe<sup>3+</sup> behaved similarly to EDTA/Fe<sup>3+</sup> solving Fe chlorosis (Lucena et al., 2008).

As an alternative to conventional supply of Fe to soil or nutrient solution, foliar application of Fe-compounds is nowadays under consideration, but controversial results have been obtained due to the numerous uncertainties around this type of fertilization. Aerial parts of plants are covered by a cuticle that represents the major barrier to overcome when chemicals are sprayed on leaves. Cuticles present at the same time hydrophilic and lipophilic properties, and the routes and factors controlling penetration of ionic species are still poorly understood. The use of adjuvants enhances retention of

foliar sprays and can increase cuticular penetration, diffusion into the apoplast and uptake by leaf cells (Schönherr and Baur, 1996). Nevertheless, as many adjuvants can cross the cuticle and damage cells and cell membranes, those applied with foliar fertilizers should not penetrate or penetrate very slowly. Moreover, they should be biodegradable and non-phytotoxic products and behave efficiently when applied at low concentration.



**Figure 1:** Fe chelates described in the text

Foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> has been assayed previously under field conditions with variable results. Working with Fe deficient peach trees, Fernández et al. (2006) observed that EDTA/Fe<sup>3+</sup> was more efficient than IDHA/Fe<sup>3+</sup> when applied with an alkyl-glucoside adjuvant. In a different experiment testing the influence of the type of adjuvant in the performance of these chelates when applied to chlorotic peach trees, the same authors concluded that their effectiveness was very dependent on the

type of adjuvant used. In general, the EDTA/Fe<sup>3+</sup> promoted higher leaf re-greening than the IDHA/Fe<sup>3+</sup>, while leaf Fe concentration was more elevated in the trees sprayed with IDHA/Fe<sup>3+</sup> (Fernández et al., 2008).

Given the variability of the results obtained in field experiments, the aim of this work was to assess the ability of IDHA/Fe<sup>3+</sup> foliar sprays to overcome Fe chlorosis under controlled conditions when applied to soybean (*Glycine max.*), a non-efficient model plant for Fe nutrition. First, the effectiveness of the foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> to soybean plants with severe chlorosis was studied when the foliar sprays were the only source used to provide Fe to plants, and different adjuvants (non-ionic or glycine based) were applied in combination with the chelate. In a second experiment the efficiency of the IDHA/Fe<sup>3+</sup> applied with urea or with a non-ionic adjuvant to provide foliar Fe to plants was tested, when applied to soybean mildly chlorotic plants which were also being supplied with Fe at low concentrations (as EDTA/Fe<sup>3+</sup>) through the nutrient solution to simulate the low availability of Fe in calcareous soils. For comparison EDTA/Fe<sup>3+</sup>, frequently used in foliar applications in field, was evaluated in both experiments.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Fe containing compounds**

The IDHA/Fe<sup>3+</sup> (8.7% (w/w) Fe as IDHA/Fe<sup>3+</sup>) was provided by ADOB Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Consultingowe, and was prepared by dissolution of the solid and filtration, while the EDTA/Fe<sup>3+</sup> (7.4% (w/w) Fe as EDTA/Fe<sup>3+</sup>) was prepared in the laboratory. For this, first the ligand (Na<sub>2</sub>EDTA, Merck) was dissolved and then an amount of Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O (Merck) calculated to be 5% in excess of the molar amount of ligand, was added slowly. During chelation, the pH was maintained between 6.0 and 8.0 and adjusted to 5.5 at the end. Solution was left to stand overnight to allow excess of element to precipitate as oxides. Finally, the solution was filtered through 0.45 µm Millipore membrane and made up to volume with water. Light exposure of all the chelate solutions was avoided during their preparation and storage because of the potential photodecomposition of chelates (Hill-Cottingham, 1955).

## 2.2 Adjuvants

Different adjuvants were tested: two non-ionic products with ethylene oxide groups as hydrophilic component (an alkylpolyglucoside (*APG*) and polyoxyethylene(20)sorbitan monooleate (*PS*)), an anionic glycine based solution (*GLY*) and an urea based adjuvant (*U*).

## 2.3 Plant material, experimental design and treatments

Soybean seeds (*Glycine max* L. cv Stine 0480, gently provided by Prof. R. J. Goos, North Dakota State University, Fargo, United States) were germinated using a standard seed growing procedure in sterilized trays. The seeds were washed with water during 30 minutes. After, seeds were placed in trays between two sheets of cellulose paper moistened with distilled water. The trays were kept in darkness, at 28° C for three days in a thermostated stove. After germination, seedlings were transferred to a growth chamber, where were grown under controlled climatic conditions: day/night photoperiod, 16/8 h; temperature (day/night) 30/25 °C; R.H. (day/night) 50/70 %. Seedlings of similar development were placed on a holed plate, floating over containers with continuously aerated 1/5 diluted nutrient solution for six days. Then, diluted nutrient solution was changed by full strength solution with the following composition: (macronutrients in mM) 1.0 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.9 KNO<sub>3</sub>, 0.3 MgSO<sub>4</sub>, 0.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; (cationic micronutrients in μM, as buffered micronutrient solution) 2.5 MnSO<sub>4</sub>, 1.0 CuSO<sub>4</sub>, 10.0 ZnSO<sub>4</sub>, 1.0 NiCl<sub>2</sub>, 1.0 CoCl<sub>2</sub>, 5.0 Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 120.5 EDTANa<sub>2</sub>, 50.0 KOH; (anionic micronutrients in μM) 35.0 NaCl, 10.0 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. The pH was buffered with HEPES 1.0 x 10<sup>-4</sup> M and adjusted at 7.5 with KOH 1.0 M.. Seedlings were kept in this solution for six days, until chlorotic symptoms were observed. After this time, the stems of two plants were wrapped together with foam, and placed in 2 L polyethylene vessels (three holes in the lid, six plants per pot) containing 2 L of a full strength nutrient solution with the same composition than the initial one, except in the content of micronutrients (not buffered micronutrient solution, in μM): 1.0 MnSO<sub>4</sub>, 0.5 M CuSO<sub>4</sub>, 0.5 ZnSO<sub>4</sub>, 0.1 NiCl<sub>2</sub>, 0.1 CoCl<sub>2</sub>. In the Experiment I Fe was not added in this nutrient solution, while in the Experiment II 5.0 μM EDTA/Fe<sup>3+</sup> was added to avoid severe chlorosis. The pH was adjusted at 7.5 with KOH 1.0 M and buffered with HEPES 1.0 x 10<sup>-4</sup> and 0.4 g<sup>-1</sup> of solid CaCO<sub>3</sub> per pot were added. Water was added every two days,

and the solution was renewed every week. Three replicates were prepared for each treatment and for each control.

At this point, Fe treatments were applied (Table 1 for Experiment I and Table 2 for Experiment II), and applications were repeated after 8 and 15 days.

**Table 1:** Treatments, adjuvants and doses tested in the Experiment I

	Foliar		Nutrient Solution
	Treatment	Adjuvant	
<i>Fe treatments</i>			
FeIDHA + APG	5 mM IDHA/Fe <sup>3+</sup>	Oligomeric alkylpolyglucoside (APG) 0.1 % (v/v)	Non added Fe
FeIDHA + GLY		Glycine based (GLY) 0.3 % (v/v)	
FeIDHA + PS		Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (PS) 0.1 % (v/v)	
FeEDTA + APG	5 mM EDTA/Fe <sup>3+</sup>	Oligomeric alkylpolyglucoside (APG) 0.1 % (v/v)	
<i>Control</i>			
Control -Fe		Non added Fe	

**Table 2:** Treatments, adjuvants and doses tested in the Experiment II

	Foliar		Nutrient Solution
	Treatment	Adjuvant	
<i>Fe treatments</i>			
FeIDHA + APG I	5 mM IDHA/Fe <sup>3+</sup>	Oligomeric alkylpolyglucoside (APG) 0.1 % (v/v)	Non added Fe
FeIDHA + APG II			
FeIDHA + U		Urea (U) 0.15 % (v/v)	5 μM EDTA/Fe <sup>3+</sup>
FeEDTA + APG	5 mM EDTA/Fe <sup>3+</sup>	Oligomeric alkylpolyglucoside (APG) 0.1 % (v/v)	
<i>Control</i>			
Control -Fe		Non added Fe	
Control FeEDTA		Non added Fe	5 μM EDTA/Fe <sup>3+</sup>

*EXPERIMENT I: Foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> and EDTA/Fe<sup>3+</sup> to soybean plants affected by severe chlorosis without an additional source of Fe.* Each pair of plants was sprayed with 2 mL of the 5 mM IDHA/Fe<sup>3+</sup> or EDTA/Fe<sup>3+</sup> solutions at pH 5.5 (Table 1). Leaf sprays were applied both on the adaxial and the abaxial leaf with a nebulizer system. The corresponding adjuvant (Table 1) was added to each solution just before leaf spraying at the rate indicated in Table 1. One control in which Fe was supplied neither through foliar sprays nor to the nutrient solution was included (control-Fe).

*EXPERIMENT II: Foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> and EDTA/Fe<sup>3+</sup> to mildly soybean chlorotic plants, as a complement to Fe supply through roots.* Application was performed as described in Experiment I, but in order to evaluate the redistribution of the Fe applied through foliar sprays only the first four levels of leaves were treated. The corresponding adjuvant was added to each solution just before leaf spraying (Table 2), the rate varying depending on the surface active agent. Two control treatments (control –Fe and control FeEDTA) were established. For control –Fe, Fe was not added to the nutrient solution or applied through foliar sprays. In the case of control FeEDTA (established to evaluate the influence of the Fe supplied through the nutrient solution in plant development) 5.0  $\mu\text{M}$  EDTA/Fe<sup>3+</sup> was applied to the nutrient solution. For control treatments, foliar applications were not performed.

## 2.4 Measurements

During the experiments, SPAD readings with a chlorophyll meter (Minolta SPAD-502) were taken for all the leaf stages (average of three readings per leaf) periodically. Whole plants were sampled 8 days (two pairs of plants) and 22 days (one pair of plants) after the first application of treatments. Sampled roots, stems, treated leaves and non treated leaves (only in the Experiment II) were separated, weighted, washed with 0.1 % HCl and 0.01 % non-ionic detergent solution, and rinsed twice with ultrapure water. Then, samples were dried in a forced air oven at 65 °C for three days. Micronutrients were determined in the leaves and roots after dry digestion procedure by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS, Perkin-Elmer Analyst 800).

## 2.5 Statistical analysis

Data were statistically evaluated using Analysis of Variance (ANOVA) with the program SPSS 15.0 to assess the significance of the main factors and interactions. Means were also compared using Duncan's test at  $P \leq 0.05$  in order to find significant differences between treatments.

### 3. RESULTS

#### 3.1 EXPERIMENT I: Foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> and EDTA/Fe<sup>3+</sup> to soybean plants affected by severe chlorosis without an additional source of Fe

##### 3.1.1 Micronutrient contents and biometric data

In this experiment, foliar sprays described in Table 1 were the only source of Fe for plants, which showed severe chlorosis symptoms. The effect of the foliar application of the treatments on plant dry weight, root Fe and Mn concentration, and Fe/Mn and Fe/(Mn+Zn+Cu) was studied using one-way ANOVA. Statistical differences only appeared for root Fe concentration (at  $P \leq 0.05$ ), and indicate that the combination of FeIDHA+GLY was more effective than the other Fe containing compounds and adjuvants tested.

In order to evaluate the redistribution of Fe foliarly applied from leaves to other plant organs, Fe and other micronutrient concentrations in roots were measured. Fe and Mn concentration, as well as Fe/Mn and Fe/(Mn+Zn+Cu) ratio in roots are presented in Table 3. The same measurements were also performed in treated leaves, but as it was not possible to ensure that the fraction of Fe applied through foliar sprays and not absorbed by leaves was completely removed after washing, these data were not taken into consideration. The highest Fe concentration corresponded to FeIDHA+GLY, that was the only treatment statistically different to control –Fe, and to FeIDHA+APG. Mn concentrations also indicate that uptake of Mn from the nutrient solution was lower in plants treated with Fe sprays, even if most of these treatments were not statistically different to the control –Fe. The low Fe/Mn and Fe/(Mn+Cu+Zn) ratios for control –Fe with regard to treated plants indicates that the plants which were not supplied with Fe presented higher affinity for other metals. In spite of the differences in micronutrient concentrations and ratios, none on the treatments presented statistical differences on plant dry weight with control –Fe.



**Table 3:** SPAD values, dry weight, root Fe and Mn concentrations, and root Fe/Mn and Fe/(Mn+ Zn + Cu) ratios in soybean plants sprayed with the Fe chelates tested, at the end of the Experiment I.

	SPAD	Root DW (g plant <sup>-1</sup> DW)	Fe Concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	Mn Concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW)	Fe/Mn	Fe/ (Mn+Zn+Cu)
<b>FeIDHA+APG</b>	11.3 ± 0.7 a	0.51 ± 0.05 ns	61.1 ± 1.4 ab	165.7 ± 21.4 b	0.38 ± 0.04 a	0.20 ± 0.02 a
<b>FeIDHA+GLY</b>	8.9 ± 0.6 ab	0.57 ± 0.02	74.2 ± 7.9 a	18.6 ± 28.3 ab	0.36 ± 0.07 a	.20 ± 0.02 a
<b>FeIDHA+PS</b>	9.6 ± 0.7 ab	0.62 ± 0.13	50.6 ± 10.7 b	186.5 ± 6.7 ab	0.28 ± 0.07 ab	0.15 ± 0.04 ab
<b>FeEDTA+APG</b>	11.6 ± 1.3 a	0.69 ± 0.12	50.2 ± 0.5 b	235.7 ± 21.4 ab	0.21 ± 0.01 ab	0.13 ± 0.01 ab
<b>Control -Fe</b>	7.3 ± 1.1 b	0.43 ± 0.12	41.5 ± 3.3 b	306.3 ± 73.1 a	0.15 ± 0.03 b	0.09 ± 0.01 b

Data are means ± standard error (SE) of three independent replicates, except for SPAD values (average of 18 measurements). Different letters in the same column denote significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

DW: Dry weight basis

### 3.1.2 SPAD measurements

SPAD was measured periodically in all the levels of leaves. Two-way ANOVA analysis showed that SPAD values measured for each treatment in the third level of leaves were strongly influenced (at  $P \leq 0.001$ ) by the treatment applied and by the age of the plants (days since the first application of the treatments), but interaction between both factors did not occur. Average SPAD values are reported in Table 3, and indicate that for all the treatments average SPAD was higher than for control -Fe. The best results corresponded to plants treated with Fe-compounds combined with APG as adjuvant (FeIDHA+APG and FeEDTA+APG), while the other treatments were not statistically different to control -Fe.

## 3.2 EXPERIMENT II: Foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> and EDTA/Fe<sup>3+</sup> to mildly soybean chlorotic plants, as a complement to Fe supply through roots

In the second experiment, foliar sprays were a complement to Fe nutrition through roots (Table 2), as usually occurs when Fe foliar sprays are applied under field conditions. Consequently, plants exhibited mild chlorosis. In order to test redistribution from treated leaves to non treated leaves only the first four levels of leaves were sprayed. Regarding the adjuvants, an urea based solution (U) was compared with the APG used in the Experiment I when applied in combination with IDHA/Fe<sup>3+</sup> through foliar sprays.

### 3.2.1 Micronutrient contents and biometric data

The influence of the treatments on plants dry weight, Fe and Mn concentration, and Fe/Mn and Fe/(Mn+Zn+Cu) ratios in non treated leaves and roots was tested

separately for each factor using one-way ANOVA. The treatments strongly affected Fe and Mn concentration and Fe/Mn and Fe/(Mn+Cu+Zn) ratio in roots (at  $P \leq 0.001$  in all the cases).

The data corresponding to dry weight, Fe and Mn concentration and Fe/Mn and Fe/(Mn+Zn+Cu) ratio in non treated leaves and roots at the end of the experiment are reported in Table 4. In non treated leaves, statistical differences due to the treatments were not observed for any of the parameters studied. However, when micronutrient concentrations and ratios were analyzed in roots, IDHA treatments including supply of Fe to roots (FeIDHA+APG II and FeIDHA+U) were the most effective and presented statistical differences with control -Fe. Nevertheless in most of cases these treatments were not statistically different to control FeEDTA (where foliar applications were not performed). The only treatment in which Fe was not added to the nutrient solution (FeIDHA+APG I), did not show statistical differences with control -Fe. With regard to roots dry weight, the highest values were found for FeIDHA+U and FeEDTA+APG, while statistical differences were not observed in roots dry weight between FeIDHA+APG I (without Fe supply through the nutrient solution) and control -Fe.

### *3.2.2 SPAD measurements*

SPAD was measured periodically in all the levels of leaves. Two-way ANOVA analysis showed that SPAD values for each treatment in the third level of leaves were strongly influenced (at  $P \leq 0.001$ ) by the treatment applied and by the age of the plants (days since the first application of the treatments), but interaction between both factors did not occur. Average SPAD values are reported in Table 4, and indicate that all the treatments except FeIDHA+APG I (without Fe added to the nutrient solution) were statistically different to control -Fe. On the other hand, very low SPAD measurements were recorded when foliar sprays were not performed (control FeEDTA). The best treatments improving SPAD values were FeIDHA+U and FeEDTA+APG.

**Table 4:** SPAD values, non treated leaves and roots dry weight, non treated leaves and roots Fe and Mn concentrations, and non treated leaves and roots Fe/Mn and Fe/(Mn+Zn+Cu) ratios in soybean plants sprayed with the Fe chelates tested, at the end of the Experiment II.

SPAD	Biomass (g plant <sup>-1</sup> DW)		Fe Concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW)		Mn Concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW)		Fe/Mn		Fe/ (Mn+Cu+Zn)	
	Non treated	Root	Non treated	Root	Non treated	Root	Non treated	Root	Non treated	Root
	leaf		leaf		leaf		leaf		leaf	
<b>FeEDHA+APGI</b>	4.4 ± 0.7 d	0.6 ± 0.1 ab		47.9 ± 1.9 c		215.9 ± 36.6 a		0.2 ± 0.1 c		0.20 ± 0.02 b
<b>FeEDHA+APG II</b>	10.1 ± 1.4 bc	1.2 ± 0.1 ab	46.5 ± 0.5 ns	135.3 ± 21.7 a	70.8 ± 1.8 ns	23.3 ± 2.1 b	0.7 ± 0.01 ns	5.9 ± 1.1 b	0.4 ± 0.1 ns	2.3 ± 0.3 a
<b>FeEDHA+U</b>	14.8 ± 1.4 a	1.5 ± 0.4 a	45.1 ± 8.9	105.3 ± 9.1 ab	63.8 ± 12.1	12.5 ± 1.9 b	0.8 ± 0.3	8.7 ± 0.9 a	0.5 ± 0.2	2.3 ± 0.1 a
<b>FeEDTA+APG</b>	14.1 ± 1.6 ab	0.5 ± 0.2 b	40.7 ± 3.3	89.4 ± 10.4 b	70.4 ± 20.6	8.6 ± 0.2 b	0.7 ± 0.2	10.4 ± 1.2 a	0.4 ± 0.1	2.0 ± 0.1 a
<b>Control -Fe</b>	3.2 ± 0.4 d	0.5 ± 0.1 b		33.1 ± 1.8 c		194.8 ± 26.9 a		0.2 ± 0.1 c		0.10 ± 0.04 b
<b>Control FeEDTA</b>	6.5 ± 0.7 cd	0.6 ± 0.1 ab	31.4 ± 4.2	140.4 ± 17.9 a	97.6 ± 25.5	15.8 ± 0.4 b	0.4 ± 0.1	8.9 ± 1.1 a	0.2 ± 0.1	2.5 ± 0.2 a

Data are means ± standard error (SE) of three independent replicates or 24 SPAD measurements. Different letters in the same column denote significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

DW: Dry weight basis.

FeEDHA + APGI and Control -Fe did not develop levels of non treated leaves.

## 4. DISCUSSION

### 4.1 EXPERIMENT I: Foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> and EDTA/Fe<sup>3+</sup> to soybean plants affected by severe chlorosis without an additional source of Fe

#### 4.1.1 Comparison of Fe compounds

The IDHA is a biodegradable chelating agent recently proposed for its agricultural use (Mitschker et al., 2004). Consequently, at present few works evaluating the effectiveness of IDHA/Fe<sup>3+</sup> to overcome Fe chlorosis are available. The ability of this chelate to solve Fe deficiencies when applied to roots under controlled (Villén et al., 2007; Lucena et al., 2008) or field conditions (Lucena et al., 2008) has been tested successfully, but due to its relatively low stability its application through foliar sprays is also under consideration. In this sense, several field trials to assess its performance have been carried out in the last years (Fernández et al., 2006, 2008), although to our knowledge the foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> chelates under controlled conditions to correct Fe deficiencies in plants has not been studied yet. One of the objectives of this work was to evaluate the behavior of this chelate under controlled conditions. So, all the possible sources of Fe would be fixed in the experimental design and any improvement in plant Fe nutrition could be attributed to the Fe supplied through the treatments.

In the studies assessing the effectiveness of IDHA/Fe<sup>3+</sup> foliar sprays when applied in field to peach trees (Fernández et al., 2006, 2008), the IDHA/Fe<sup>3+</sup> behaved as efficiently as EDTA/Fe<sup>3+</sup> if the appropriate adjuvant was employed, although the results were always very variable. Since in soil experiments a fraction of soluble Fe is always available for plants, even under calcareous soils conditions, foliar sprays are not the only source of Fe. Thus, the results will be influenced by soil conditions and Fe availability in it.

In the first experiment described in this work, foliar sprays were the only source of Fe for plants. In general, the IDHA/Fe<sup>3+</sup> behaved as efficiently as the EDTA/Fe<sup>3+</sup>. Root Fe concentration and the other nutritional parameters reported in Table 3 suggest that redistribution of Fe from leaves to roots occurred. Evidence of translocation from leaves has been observed in other experiments working with soybean, cucumber and tomato and Fe chelates labeled with <sup>57</sup>Fe (Rodríguez-Lucena et al., submitted), and <sup>59</sup>Fe

(Rodríguez-Lucena et al., 2009). For our results, differences in Fe and Mn concentrations and ratios in roots with regard to control –Fe were observed, even if these differences were not significant in all the cases. This suggests that redistribution of foliar applied Fe occurred, although at low rates due to the limited absorption of Fe through leaf surfaces (Fernández et al., 2009) and to the scarce mobility this micronutrient through the phloem (Kim and Guerinot, 2007). Data corresponding to Fe/Mn and Fe/(Mn+Zn+Cu) ratios indicate that the affinity of roots for Mn, Cu and Zn decreased when Fe sprays were performed, supporting the idea of Fe redistribution from roots. Taken together, these data would reflect, in some extent, the relative normalization of the metabolic processes of the plants, as already observed in previous works with IDHA/Fe<sup>3+</sup> applied through foliar sprays (Fernández et al., 2006). Moreover, these results indicate that foliar application of biodegradable IDHA/Fe<sup>3+</sup> can be a good alternative to EDTA/Fe<sup>3+</sup> when applied under appropriate conditions, as expected due to the similarities between both chelates. The better performance of EDTA/Fe<sup>3+</sup> with regard to other chelates when applied through foliar sprays has been attributed, at least in some extent, to the photoreduction of this chelate (Bityuskii et al., 1995) that would favor Fe uptake by leaf cells. However, from our results it is concluded that this phenomenon can not explain the different behavior observed for EDTA/Fe<sup>3+</sup> and IDHA/Fe<sup>3+</sup> in previous assays, which can be attributed to the different experimental conditions. Biodegradation of IDHA, that may be more favored in crops grown in field than under the controlled conditions of a growth chamber, could explain the lower effectiveness of IDHA/Fe<sup>3+</sup> with regard to EDTA/Fe<sup>3+</sup> when used under field conditions.

#### 4.1.2 Comparison of adjuvant solutions

Three biodegradable adjuvants were tested in this first experiment: i) two non-ionic products (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (*PS*) and an oligomeric alkylpolyglucoside (*APG*) product) and ii) an anionic glycine based (*GLY*) solution (Table 1). Non-ionic adjuvants are the most commonly used in foliar applications, since the interaction with the active ingredient are minimized, although not completely avoided (Fernández et al., 2009), in this type of compounds. At the same time, they increase the cuticular penetration of the active ingredient through complex interactions between the active ingredient, the adjuvants and leaf surfaces (Stock and Holloway,

1993). PS adjuvants have not been commonly applied in foliar formulations. In the case of APG, these adjuvants favor cuticular penetration of solutions in general (Schönherr et al., 2001) and Fe solutions in particular (Fernández et al., 2006). For anionic adjuvants, it is important to keep in mind that these molecules may interact with the electrolyzed cations of the Fe-compound solutions, forming large molecules that may block cuticular pores and interfere with the process of leaf Fe penetration (Fernández and Ebert, 2005). However when applied through foliar sprays, GLY could penetrate leaf surfaces and was translocated to other plant organs (Espasa-Manresa, 1983), so solutions based in this amino acid may improve Fe penetration.

In previous works (Fernández et al., 2006, 2008), foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> and EDTA/Fe<sup>3+</sup> in combination with an APG and a GLY based adjuvant was tested, being concluded that both chelates could increase green surface and chlorophyll content in peach leaves. However, to our knowledge the foliar application of solutions containing only Fe-compounds and GLY based or PS adjuvants has not been assayed previously. Our results indicate that the application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> in combination with GLY (FeIDHA+GLY) or PS adjuvants (FeIDHA+PS) was slightly less efficient than the use of an APG adjuvant (FeIDHA+APG), in spite of the interaction between IDHA/Fe<sup>3+</sup> and APG adjuvants described elsewhere (Fernández et al., 2006, 2008).

Independently of the Fe compound and the adjuvant employed, leaf burn was always observed in treated leaves, even when the non-phytotoxic APG surface active agent was used. This observation is in accordance with the results obtained by Fernández et al. (2009), who detected the ionization of a non-ionic adjuvant in the present of EDTA. However, these symptoms were similar to the necrotic spots observed for control -Fe, so it was not possible to confirm if they were due to the foliar sprays (the damage observed on leaves might be related to the Fe-compound applied, to the dissolution of the cuticle as a negative consequence of the application of adjuvants, to a detrimental interaction between the adjuvant and the Fe-compound) or to the severe chlorosis of the plants.

## 4.2 EXPERIMENT II: Foliar application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> and EDTA/Fe<sup>3+</sup> to mildly soybean chlorotic plants, as a complement to Fe supply through roots

### 4.2.1 Comparison of Fe compounds

The results of the Experiment I indicated that foliar applied Fe can re-green leaves and be distributed to other plant organs, although due to the limited absorption of Fe through leaf surfaces (Fernández et al., 2009) and to the low mobility of Fe in the phloem (Briat et al., 2007; Kim y Guerinot, 2007) this type of applications can not fully satisfy plant Fe demand. Since Fe fertilization through foliar sprays can only be used as a complementary technique to direct application to soil or to nutrient solution of Fe chelates (Pestana et al., 2001; Álvarez-Fernández et al., 2004), in the second experiment presented in this work foliar sprays were applied as a complement to the application of Fe chelates to the nutrient solution of soybean plants grown in hydroponics under calcareous soil conditions.

The results of this assay confirm that even if Fe foliar sprays can not fully substitute conventional supply of Fe chelates to roots, they contribute to overcome Fe chlorosis when applied as a complementary source of Fe. Under these conditions, re-greening of leaves and redistribution of Fe from treated leaves to other organs occurred. Foliar application of Fe chelates when EDTA/Fe<sup>3+</sup> was added to the nutrient solution (FeIDHA+APG II, FeIDHA+U and FeEDTA+APG) promoted increments in root Fe concentration. This suggests that Fe was translocated to roots, as already observed when labeled Fe was used (Hüve et al., 2003; Nikolic et al., 2003; Rodríguez-Lucena et al., 2009); and/or that uptake of Fe from the nutrient solution was enhanced due to the transmission of signals from the shoot (Romera et al., 2006) that activate Fe uptake mechanism by roots. None of the treatments tested was clearly more efficient than the rest favoring redistribution of Fe to non treated organs, but the highest SPAD values corresponded to FeIDHA+U.

### 4.2.2 Comparison of adjuvant solutions

Though the APG adjuvant was the most efficient product used in combination with IDHA/Fe<sup>3+</sup>, the interaction between both compounds has been described in

previous works. Thus, the effectiveness of the APG was compared with urea (U) when added in IDHA/Fe<sup>3+</sup> formulations.

The use of U in foliar sprays favors Fe assimilation by leaves (Swietlik and Faust, 1984), due to its capacity to increase the permeability of leaf membranes and to its surfactant properties. At the same time, these applications constitute an additional source of nitrogen for the plant, although urea must be supplied at low rates to avoid the inhibition of photosynthesis (Orbovic et al., 2001). The extra supply of nitrogen related to the application of urea may explain the high SPAD values for the FeIDHA+U treatment.

Regarding burn signs on leaf surfaces, they were less abundant in the mildly chlorotic plants used in this experiment. However, except for FeIDHA+U, treated leaves always presented dark spots that could be associated to leaf damage. This confirms that the use of APG affected negatively the leaf surface even if this type of adjuvants have been described as non-phytotoxic. For U negative interactions among sprays components and leaf surfaces did not seem to occur. Nevertheless, it should be kept in mind that the additional supply of nitrogen might have helped to improve leaves status.

## **5. CONCLUSIONS**

IDHA/Fe<sup>3+</sup> behaved similarly to EDTA/Fe<sup>3+</sup> and presented a potential ability to provide Fe to soybean when applied through foliar sprays under controlled conditions and with the appropriate adjuvant. Moreover, the application of IDHA/Fe<sup>3+</sup> was more effective when urea was also used. Thus, foliar application with IDHA/Fe<sup>3+</sup> and urea formulations, both degradable compounds, may constitute an environmental friendly alternative to traditional use of EDTA/Fe<sup>3+</sup> in foliar Fe fertilizers formulations, although further research is recommended to optimize formulations and application procedures.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was partly supported by ADOB, and by the Spanish Ministry of Science and Education Project AGL2007—63756, co-financed with FEDER and the Commission of European Communities. P. Rodríguez-Lucena was on a Spanish Ministry of Science and Education “FPI” pre-doctoral contract co-financed by the European Social Fund.

## REFERENCES

- Álvarez-Fernández A, García-Laviña P, Fidalgo C, Abadía J and Abadía A.** 2004. Foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Plant Soil*. 263:5-15.
- Bityustkii N P.** 1995. Effects of carboxylic and phosphonic Fe-chelates on root and foliar plant nutrition. *Russ. J. Plant Physl.* 42:444-453.
- Briat J F, Curie C and Gaymard F.** 2007. Iron utilization and metabolism in plants. *Plant Biol.* 10:276-282.
- Fernández V and Ebert G.** 2005. Foliar Iron Fertilization: A Critical Review. *J. Plant Nutr.* 28:2113-2124.
- Espasa-Manresa R.** 1983. La fertilización foliar con aminoácidos. *Horticultura.* 2:33-35.
- Fernández V, Río V, Abadía J and Abadía A.** 2006. Foliar Iron Fertilization of Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): Effects of Iron Compounds, Surfactants and Other Adjuvants. *Plant Soil.* 289:239-252.
- Fernández V, Del Río V, Pumariño L, Igartua E, Abadía J and Abadía A.** 2008. Foliar fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) with different iron formulations: Effects on re-greening, iron concentration and mineral composition in treated and untreated leaf surfaces. *Sci. Hortic.* 117:241-248.
- Fernández V, Orera I, Abadía J and Abadía A.** 2009. Foliar iron-fertilisation of fruit trees: present knowledge and future perspectives - a review. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 84:1-6.
- Hill-Cottingham, D. G.** 1955. Photosensitivity of iron chelates. *Nature* 175:347-348.
- Hüve K, Remus R, Lüttschwager D and Merbach W.** 2003. Transport of foliar applied iron ( $^{59}\text{Fe}$ ) in *Vicia faba*. *J. Plant Nutr.* 26:2231-2242.
- Hyvönen H, Orama M, Saarinen H and Aksela R.** 2003. Studies on biodegradable chelating agents: complexation of iminodisuccinic acid (ISA) with Cu(II), Zn (II), Mn (II) and Fe (III) ions in aqueous solution. *Green Chem.* 5:410-414.
- Kim A S and Guerinot M L.** 2007. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters* 581:2273-2280.

- Lindsay W L.** 1979. Chemical Equilibria in Soils. John Wiley and sons. N.Y., USA.
- Lindsay W L and Schwab A P.** 1982. The chemistry of iron soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr.* 5:821-840.
- Lindsay W L.** 1991. Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability. *In: Iron nutrition and Interaction in Plants.* Eds. Chen Y and Hadar Y. Kluwer Academic Pub., The Netherlands.
- Liu Z.** 2004. Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides – a complex scenario. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 35:149–153.
- Lucena J J, Sentís J A, Villén M, Lao T and Pérez-Sáez M.** 2008. IDHA chelates as a micronutrient source for green bean and tomato in fertigation and hydroponics. *Agron. J.* 100:813-818.
- Mitschker A, Moritz R J and Nawrocki A.** 2004. Chelated plant micronutrients. Bayer Chemicals A.-G., Germany; Przedsiębiorstwo Produkcyjno Consultingowe Adob. Eur. Pat. EP 1411037 A1 20040421 Appl., 2004; 7 pp.
- Nikolic M, Cesco S, Römheld V, Varanini Z and Pinton R.** 2003. Uptake of iron ( $^{59}\text{Fe}$ ) complexed to water-extractable humic substances by sunflower leaves. *J. Plant Nutr.* 26:2243-2252.
- Orbovic V, Jifon J L and Syvertsen J P.** 2001. Foliar-applied surfactants and urea temporally reduce carbon assimilation of grapefruit leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:486-490.
- Pestana M, Correia P J, de Varennes A, Abadía J and Araújo-Faria E.** 2001. Effectiveness of different foliar iron applications to control iron chlorosis in orange trees grown on a calcareous soil. *J. Plant Nutr.* 24:613-622.
- Rodríguez-Lucena P, Tomasi T, Pinton R, Hernández-Apaolaza L, Lucena J J and Cesco S.** 2009. Evaluation of  $^{59}\text{Fe}$ -lignosulfonates complexes as Fe-sources for plants. *Plant Soil.* (DOI 10.1007/s11104-009-0091-1).
- Rodríguez-Lucena P, Hernández-Apaolaza L and Lucena J J.** 2010. Comparison of iron chelates and complexes supplied as foliar sprays and in nutrient solution to correct iron chlorosis of soybean. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* (in press).

- Rodríguez-Lucena P, Benedicto A, Lucena J J, Rodríguez-Castrillón J A, Moldovan M, García Alonso J I and Hernández-Apaolaza L.** Effectiveness of foliar application of Lignosulfonate/ $\text{Fe}^{3+}$  Complexes to Correct Fe Deficiencies in Cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Ashley) Plants. Under revision J. Agric. Food Chem.
- Romera F J, Lucena C and Alcántara E.** 2006. Plant hormones influencing iron uptake in plants. pp.: 103-127. In: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms. Barton L L y Abadía, J, Eds.; Springer-Verlag Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Römheld V and Marschner H.** 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. In B Tinker, A Laüchli, Eds., Advances in Plant Nutrition, vol. 2. Praeger, New York.
- Schönherr J and Baur P.** 1996. Effects of temperature, surfactants and other adjuvants on rates of uptake of organic compounds, p. 135-155. In: G. Kerstiens (ed.). Plant cuticles-An integrated functional approach. Bios Sci. Publisher Ltd., Oxford, United Kingdom.
- Schönherr J.** 2001. Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions, and adjuvants. J Plant Nutr Soil Sci. 164:225–231.
- Schönherr J, Fernández V and Schreiber L.** 2005. Rates of cuticular penetration of chelated FeIII: role of humidity, concentration, adjuvants, temperature and type of chelate. J Agric Food Chem. 53:4484–4492.
- Stock D and Holloway P J.** 1993. Possible mechanisms for surfactant-induced foliar uptake of agrochemicals. Pesticide Science 38:165–177.
- Swietlik D and Faust M.** 1984. Foliar nutrition of fruit crops. Hort. Rev. 6:287–356.
- Villén M, García-Arsuaga A and Lucena J J.** 2007. Potencial use of biodegradable chelate N-(1,2-Dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid/ $\text{Fe}^{3+}$  as an Fe fertilizer. J. Agric. Food Chem. 55:402-407.

## Capítulo V:

---

**Empleo de complejos de Fe formados con subproductos de la industria papelera (lignosulfonatos) y olivarera (extractos de alperujo modificados) como correctores de la clorosis férrica en plantas de soja, pepino y tomate.**

**Aplicación del marcaje isotópico al estudio de la absorción y redistribución del Fe aplicado.**



## Revalorización de un extracto de subproductos del aceite oliva como fertilizante de micronutrientes

### **RESUMEN**

La aplicación de complejos metálicos es una de las alternativas empleadas para corregir deficiencias de micronutrientes en los cultivos. Un extracto obtenido a partir de la modificación de los subproductos (conocidos como alperujos) generados en el sistema de dos fases de extracción del aceite de oliva (OMWm) se caracterizó mediante espectroscopía FTIR, evaluándose también su capacidad para complejar micronutrientes metálicos (Fe, Zn, Mn y Cu) y la estabilidad de los complejos formados. A continuación se estudió la habilidad de los complejos Fe(III)OMWm para aportar Fe a plantas de soja cloróticas (*Glycine max.* cv Stine 0480) desarrolladas en hidroponía pura, al aplicarlos por vía foliar o a la disolución nutritiva. Los extractos de alperujo modificados presentaban similitudes estructurales con la fracción fúlvica de alperujos no modificados, y tenían un alto contenido el grupos funcionales capaces de complejar metales (grupos fenólicos y carboxílicos principalmente). A pesar de su buena capacidad para formar complejos con los micronutrientes metálicos estudiados, la estabilidad de estos complejos en condiciones de suelos calizos era en general baja. En los experimentos biológicos se observó que eran capaces de aportar Fe a la planta a través de la disolución nutritiva, así como que su aplicación foliar ayudó a reducir el amarillamiento de las hojas. Por tanto, estos complejos son una alternativa prometedora y eco-compatible para corregir deficiencias de micronutrientes, si bien es necesario profundizar en el estudio de sus características y de su eficacia.

**Revalorization of a two-phase olive mill waste extract into a micronutrient fertilizer**

**Patricia Rodríguez-Lucena, Diana Hernández, Lourdes Hernández-Apaolaza, Juan J. Lucena**

Departamento de Química Agrícola, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, E-28049-Madrid, Spain.

Under revision (Journal of Agricultural and Food Chemistry).



---

***REVALORIZATION OF A TWO-PHASE OLIVE MILL WASTE  
EXTRACT INTO A MICRONUTRIENT FERTILIZER*****ABSTRACT**

Micronutrient deficiencies in plants may be treated using metal complexes. A modified two-phase olive mill waste (OMWm) was characterized using FTIR spectroscopy. A study was also made of micronutrient (Fe, Zn, Mn and Cu) complexation and the stability of complexes. An evaluation was then made of the effectiveness of Fe(III)OMWm to supply Fe to soybean (*Glycine max.* cv Stine 0480) chlorotic plants through nutrient solution and foliar application. The OMWm presented structural similarities with the fulvic fraction of raw OMW containing abundant phenolic-hydroxyl and carboxyl groups able to form complexes. The OMWm could complex Fe, Zn, Mn and Cu, although the stabilities of the complexes under agronomic conditions were low. In dealing with Fe chlorosis, Fe(III)-OMWm improved the Fe nutritional status of soybean chlorotic plants when applied to the nutrient solution, while only re-greening of leaves was observed in foliar applications. Hence, OMWm complexes constitute a promising eco-compatible and cheap alternative to synthetic chelates in dealing with micronutrient deficiencies when applied foliarly or to the nutrient solution, although further research is necessary to improve the stability and effectiveness of the complexes.

## 1. INTRODUCTION

Most olive oil production is located in countries within the Mediterranean basin. Spain is the world's major producer, with a mean output of 1,100,000 tons per year for the 2001-2007 period (International Olive Council database, 2008). Technical improvements in oil extraction systems in recent decades have favored the increase in production. Today, around 90 % of olive mills in Spain use the so-called "continuous two-phase system", whose main disadvantage is the production of two-phase olive mill wastes (OMW), commonly known as "alperujos". OMW are solid and very wet by-products, with acidic pH and low consistency, rich in organic matter, potassium and nitrogen, also containing fats, water-soluble carbohydrates and phenols. It is estimated that 4,000,000 tons of OMW are generated yearly in Spain, and their disposal constitutes a technical, financial and environmental concern (Alburquerque et al., 2004). The application of OMW to soils as amendments or plant nutrient fertilizers (in most of cases after composting of the raw material) is one of their possible uses (Alburquerque et al., 2006; Plaza et al., 2008).

Iron (Fe) chlorosis is a common and worldwide nutritional disorder occurring mainly in plants growing in calcareous and/or alkaline soils, where calcium carbonate buffers soil solution pH in the range 7.5-8.5 (Lindsay and Schwab, 1982), high bicarbonate concentration is present and Fe precipitates as Fe oxyhydroxides (Lindsay, 1979). In the case of zinc (Zn), the high pH and the presence of active lime in the soil induces the retention of the cation, due the adsorption and the precipitation of Zn solid phases (Lindsay, 1972; Papadopoulos and Rowell, 1989; Uygur and Rimmer, 2000), reducing plant uptake. The solubility of manganese (Mn) is affected by pH, redox potential and complexation, and its availability to plants is lower in alkaline soils due to the low solubility of Mn compounds under high pH conditions (Lindsay, 1979). Copper (Cu) deficiencies in plants appear mainly because its availability is very low in several types of soils, including organic, peaty and calcareous soils and some with high clay contents (Mengel and Kirkby, 2001). All these deficiencies are very common in Mediterranean areas, where calcareous soils reduce the availability of Fe, Zn, Mn and Cu, reducing the growth and yield of the affected crops.

Currently, different types of products are used to overcome micronutrient deficiencies. At present, Fe chelates formed with polyamino-carboxylates constitute the most efficient remedy for controlling Fe chlorosis (Lucena, 2006). However, due to their high price and, in most of cases, scarce degradability, alternative products such as complexes have been considered. Complexes are natural products that are cheaper than synthetic chelates, albeit with lower stability, so they are expected to deliver micronutrients to plants in mildly deficient conditions. Hence, their application to low value crops can be a profitable and environmentally friendly alternative. OMW are natural polymers containing carboxylic and phenolic groups, whereby they can complex micronutrients. Moreover, due to the low micronutrient concentrations applied as fertilizers, raw OMW could be employed to form metal complexes, without prior composting. Given the lower stability of complexes, the foliar application of this type of products to deficient plants, mostly in the form of Fe complexes, has been tested by several authors (Nikolic et al., 2003; Álvarez-Fernández et al., 2004; Fernández et al., 2006; Rodríguez-Lucena et al., 2009) as an alternative way of correcting crop nutritional disorders.

Although their composition means that OMW can complex micronutrients, several constraints impair their direct use as micronutrient fertilizers. The two-phase system OMW have an important solid fraction formed by the remaining parts of the olive (stone, pulp, etc.), with fats being a significant part of this organic matter (around 13 % according to Albuquerque et al., 2004). Accordingly, OMW have to be processed before they can be used to complex micronutrients. One such modification is that proposed by Canet-Benavent (2006), which suggests a series of steps in which the liquid fraction of the original OMW was modified (by centrifugation, biological treatment, alcoholic fermentation, filtration and concentration) to produce a valued and multi-purpose concentrate (OMWm).

This work assesses the ability of the OMWm extract to overcome micronutrient deficiencies. Firstly, a study was made of the structural characteristics of the OMWm and its ability to complex Fe, Zn, Mn and Cu. The stability of the complexes at different pHs, their reactivity with soils and their perdurability under agronomic conditions were also tested. Two plant experiments were then conducted with soybean (*Glycine max.* cv Stine 0480) chlorotic plants grown in hydroponics to study the efficacy of

Fe(III)OMWm complexes to cure Fe chlorosis when applied to the nutrient solution or through foliar sprays.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Description of the OMWm

The OMWm was kindly supplied by Ges-Biolives, and derived from fresh OMW subjected to a series of steps to obtain a valued by-product (Canet-Benavent, 2006). The valorized extract has an important fulvic fraction ( $270 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), acidic pH (5.5) and lower total organic matter content than raw OMW ( $330 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). With regard to the nutrient content, nitrogen ( $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), phosphorous ( $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and potassium ( $55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) are the most significant. The mass spectra of the resulting OMWm consist largely of low molecular weight fractions, with the most abundant appearing in the range from M/z 160 to  $460 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

### 2.2 Structural characterization of the OMWm

The OMWm was freeze-dried and analyzed by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. FTIR spectra were obtained on a FTIR Bruker IFS60v spectrophotometer with a MTC detector and diffuse reflectance (DRIFT) accessory. Spectra of OMWm samples were recorded in the  $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$  region at a resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$  in the diffuse reflectance mode.

### 2.3 Complexing ability of Fe, Zn, Cu and Mn and preparation of metal-OMWm complexes

The ability of the OMWm to complex micronutrients was determined as described by Villén et al.2007, by adding increasing volumes of  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  solutions of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (the source of Fe commonly used in the production of Fe fertilizers),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (as an alternative to  $\text{FeSO}_4$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , and  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  over 20 mL of the OMWm. The complexed elements were determined by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS, Perkin-Elmer Analyst 800 spectrophotometer) after removal of the organic compounds by digestion and the addition of a matrix modifier.

After determining the highest complexing ability of the OMWm for each metal, OMWm-metal complexes were formed by adding the appropriate amount of metal solution ( $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , and  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) to the OMWm. To ensure that the whole amount of metal is complexed by the OMWm, an excess of complexing agent was used in the formation of the complexes, with the metal:OMWm ratio being 1:1.1. Soluble and complexed elements were determined. The precipitation method of Villén et al. (2007) was used for the complexed elements. The soluble element content was measured according to official EC methods 9.2 and 9.4 (Regulation (EC) N° 2003/2003 of the European Parliament and of the Council, relating to fertilizers. Regulation (EC) N° 2003/2003 of the European Parliament and of the Council, relating to fertilizers.).

#### 2.4 Stability of OMWm complexes in agronomic conditions

The stability of the metal-OMWm complexes was tested in three independent experiments in order to evaluate the effect of pH, their stability in interaction with soils at a fixed alkaline pH and their perdurability in agronomic conditions. Fe(II)OMWm, Fe(III)OMWm, Zn(II)OMWm, Cu(II)OMWm and Mn(II)OMWm complexes were studied in all the cases, and three replicates per complex were performed in each experiment. Interactions were made in the dark to avoid the possible photodecomposition of the complexes.

**Stability of OMWm complexes in solution.** *Effect of pH:* The amount of complexed metal remaining in solution at different pH values was studied following the methodology described by Álvarez-Fernández et al.(2002). In brief, for each micronutrient studied 1 mL of  $10^{-2}$  M solutions of the metal-OMWm complexes were added to 25 mL of Type I water and 5 mL of a solution containing  $1.0 \cdot 10^{-1}$  M  $\text{CaCl}_2$  and  $1.0 \cdot 10^{-2}$  M biological buffer (MES, HEPES, CAPS and AMPSO). The pH was then adjusted to 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, or 11.0 with NaOH or HCl and the volume was increased to 50 mL. Samples were placed in a shaker bath at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $56 \text{ min}^{-1}$  for 3 days. Blanks for the complexes, prepared in a similar manner but without including the soil, were also provided.

**Interaction of OMWm complexes with soils (Soil Experiment I):** The interaction experiments were performed according to Álvarez-Fernández et al. (2002). In brief, 2 g

of two calcareous soils (S1 and S2) collected from different Spanish regions (S1 from Valencia and S2 from Lérida) were allowed to interact with 5 mL of  $4.0 \cdot 10^{-4}$  M metal-OMWm solution, 5 mL of a solution containing  $2.0 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{CaCl}_2$  and  $2.0 \cdot 10^{-3}$  M HEPES (pH 8) in 60 mL sterile polyethylene flasks. The soils had already been characterized elsewhere (Álvarez-Fernández et al., 2002) and their main characteristics are reported in Table 1. In addition, blanks for both the complexes and the soils were provided, prepared in a similar manner, albeit without the addition of the soil or the complexes, respectively. The flasks were shaken for 1 h at 25 °C and  $56 \text{ min}^{-1}$  and then allowed to stand for 3 days in a thermostated incubator at 25 °C.

**Table 1.** Chemical and Physical Characteristics of the Soils Used in the Interaction Assays

	S1	S2
Sand ( $\text{g kg}^{-1}$ )	650	460
Silt ( $\text{g kg}^{-1}$ )	120	280
Clay ( $\text{g kg}^{-1}$ )	230	260
Texture	Sandy loam	Sandy clay loam
pH ( $\text{H}_2\text{O}$ )	7.69	7.82
pH (KCl)	7.15	7.23
EC, extract, 1:5 ( $\text{dS m}^{-1}$ )	0.235	0.188
OM oxidizable ( $\text{g kg}^{-1}$ )	8.0	24.0
[N], Kjeldahl ( $\text{g kg}^{-1}$ )	0.79	1.40
C / N	10.5	9.9
$\text{CaCO}_3$ ( $\text{g kg}^{-1}$ )	150	179
Active lime ( $\text{g kg}^{-1}$ )	40	52
<b>Macronutrient (Soltanpour, <math>\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}</math>)</b>		
Ca	1.76	1.55
Mg	1.72	0.66
K	1.26	1.02
Na	0.150	0.047
<b>Micronutrient (Soltanpour, <math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>		
Fe	14.3	27.0
Mn	13.0	5.4
Cu	1.46	47.1
Zn	1.08	4.3

**Perdurability of OMWm complexes in solution under agronomic conditions (Soil Experiment II):** The perdurability of the complexes over time was determined after their interaction with a soil (S1). Five mL of  $4.0 \cdot 10^{-4}$  M metal-OMWm solutions were

added in 60 mL sterile polyethylene flasks containing 2 g of S1 and 5 mL of Type I water. Samples were placed in a shaker bath at 25 °C and 56 min<sup>-1</sup> for 1 h, 3 h, 7 h, 14 h, 1 d, 3 d, 7 d and 14 days. In addition, blanks for both the complexes and the soils were provided, prepared in a similar manner, albeit without the addition of the soil or the complexes, respectively. The solutions were filtered through 0.45 µm Millipore membranes at the end of the corresponding interaction time (three days in the first and second experiments) and at timed intervals in the third one, and the pH was measured using an Orion Research Ion Analyzer (EA920). After acidification, the total element in the filtrate (Fe, Zn, Mn and Cu) was quantified by AAS.

## 2.5 Biological experiments

Two biological experiments were performed in hydroponics to test the ability of Fe(III)OMWm complex to provide Fe to soybean chlorotic plants, which are Fe-susceptible, when this complex was applied to the nutrient solution (Biological Experiment I) or through foliar sprays (Biological Experiment II).

Its effectiveness was compared with two commercial products used to correct micronutrient deficiencies: a synthetic chelate commonly used to treat Fe chlorosis (Fe(III)EDTA), and a commercial lignosulfonate (pulp paper natural polymer obtained during the sulfite pulping process when original lignin is broken down, Fe(III)LS) (Rodríguez-Lucena et al., *in press*). In both cases, the soluble element was measured according to official EC methods 9.2 and 9.4 (Regulation (EC) N° 2003/2003 of the European Parliament and of the Council, relating to fertilizers.). The percentage of Fe complexed by the LS (6.9 %) was determined following the precipitation methodology of Villén et al. (2007), while the method proposed by Lucena et al. (1996) was used for Fe chelated by EDTA (12.9 %). For both products, the complexed vs. soluble Fe was 100 %. Furthermore, one control treatment without Fe addition was fixed (Control –Fe).

Soybean plants (*Glycine max* L. cv Stine 0480) were used in the biological experiments. Soybean seeds were kindly supplied by Prof. R. J. Goos (North Dakota State University, Fargo, USA). The seeds were washed with distilled water for 30 minutes and then placed in trays, on filter paper moistened with distilled water and with another filter paper placed over them. Thirty mL of distilled water and 20 mL of CaSO<sub>4</sub> 1.0 · 10<sup>-3</sup> M were added. The trays were placed in a thermostated stove, in darkness, at 28 °C, for

three days. After this time, seedlings were transferred to a growth chamber, where they were grown under controlled climatic conditions: day/night photoperiod, 16/8 h; temperature (day/night) 30/25 °C; R.H. (day/night) 50/70 %. The seedlings of similar development were placed on a perforated plate, floating over containers with continuously aerated 1/5 diluted nutrient (with 5 µM Fe(III)EDTA) solution for five days.

The diluted nutrient solution was then replaced by a full-strength solution, with the following composition (macronutrients in M):  $1.0 \cdot 10^{-3}$  Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $9.0 \cdot 10^{-4}$  KNO<sub>3</sub>,  $3.0 \cdot 10^{-4}$  MgSO<sub>4</sub>,  $1.0 \cdot 10^{-4}$  KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; (cationic micronutrients in M, as EDTA buffered micronutrient solution)  $2.5 \cdot 10^{-6}$  MnSO<sub>4</sub>,  $1.0 \cdot 10^{-6}$  CuSO<sub>4</sub>,  $10.0 \cdot 10^{-6}$  ZnSO<sub>4</sub>,  $1.0 \cdot 10^{-6}$  NiCl<sub>2</sub>,  $1.0 \cdot 10^{-6}$  CoCl<sub>2</sub>,  $115.5 \cdot 10^{-6}$  EDTANa<sub>2</sub>,  $2.31 \cdot 10^{-4}$  M KOH; (anionic micronutrients, in M)  $35.0 \cdot 10^{-6}$  NaCl,  $10.0 \cdot 10^{-6}$  H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,  $5.0 \cdot 10^{-8}$  Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. The pH was adjusted to 7.5 with KOH 1.0 M, and buffered with HEPES  $1.0 \times 10^{-4}$  M. The seedlings were kept in this solution for six days, until chlorotic symptoms were observed.

After this time, the plants were transferred to 2 L polyethylene pots containing 2 L of full-strength nutrient solution. The stems of two plants were wrapped together with foam and placed in the pots (three holes in the lid, three pairs of plants per pot). This nutrient solution had the same composition as the initial one, except in the cationic micronutrients content (not buffered micronutrient solution, in M):  $1.0 \cdot 10^{-6}$  MnSO<sub>4</sub>,  $5.0 \cdot 10^{-7}$  CuSO<sub>4</sub>,  $5.0 \cdot 10^{-7}$  ZnSO<sub>4</sub>,  $1.0 \cdot 10^{-7}$  NiCl<sub>2</sub>,  $1.0 \cdot 10^{-7}$  CoCl<sub>2</sub>. The pH was adjusted to 7.5 with KOH 1.0 M, and buffered with HEPES  $1.0 \cdot 10^{-4}$  M, and 0.2 g·L<sup>-1</sup> of solid CaCO<sub>3</sub> per pot were added. Water was added every two days, and the solution was renewed every week. At this point, Fe treatments were applied, being repeated 8 and 15 days after transplanting in both experiments.

**Biological Experiment I (treatments applied to the nutrient solution):** Firstly, Fe was added in a small dose of 5.0 µM. The concentration for each treatment was calculated according to the soluble Fe content of the products (Table 2). As plants did not recover from chlorosis after a week, the dose was increased to 10.0 µM in the second and third applications. For Control –Fe, Fe was not added to the solution.

**Biological Experiment II (application through foliar sprays):** Each pair of plants was sprayed with 2 mL of the products, with Fe concentration of 5.0 mM. The



concentration for each treatment was calculated according to the water-soluble Fe content of the products (Table 2). Leaf sprays were applied both on the adaxial and abaxial leaf surface using a nebulizer system. All solutions were adjusted to pH 5.0 to avoid altering the ion exchange properties of the cuticle (Fernández and Ebert, 2005). Tween 80 (non-ionic surfactant, PROBUS) was added to the foliar solutions just before leaf spraying at a rate of 0.1 % (v/v). For Control –Fe, leaves were sprayed with 2 mL of distilled water containing Tween 80 at the same rate as the treatments.

**Table 2.** OMWm complexing ability and formation of complexes with Fe, Zn, Mn and Cu

Sample	OMWm complexing ability		Metal-OMWm complexes		
	Mol of element · kg <sup>-1</sup> of FW OMWm <sup>a</sup>	% recovered element / added element <sup>b</sup>	Mol of complexed element · kg <sup>-1</sup> of FW complex <sup>a</sup> (%) <sup>c</sup>	Mol of soluble element · kg <sup>-1</sup> of FW complex (%) <sup>d</sup>	% complexed element / soluble element
<b>Fe(II)OMWm</b>	0.43	60.4	0.28	0.50	57.2
<b>Fe(III)OMWm</b>	0.56	89.6	0.54	0.77	70.1
<b>Zn(II)OMWm</b>	0.52	50.2	0.45	0.62	72.5
<b>Cu(II)OMWm</b>	0.85	83.6	0.81	0.98	82.5
<b>Mn(II)OMWm</b>	0.51	42.3	0.25	0.50	50.9

<sup>a</sup>Determined according to the titration methodology described in Villén et al., 2007.

<sup>b</sup>Obtained from the intersection point of the two segments obtained in the titration curves, as presented in Figure 2.

<sup>c</sup>Determined according to the AOAC modified methodology described in Villén et al., 2007.

<sup>d</sup>Official EC methods 9.2 and 9.4 ( Regulation (EC) N° 2003/2003 of the European Parliament and of the Council, relating to fertilizers. .

FW: fresh weight

In both assays, three replicates per treatment were performed. During the experiments, SPAD readings were regularly taken with a chlorophyll meter (Minolta SPAD-502) for all the leaf stages (average of three readings per leaf). Whole plants were sampled after transplanting at 8 days (two pairs of plants) and 22 days (one pair of plants). The sampled roots, stems and leaves were separated and washed (Álvarez-Fernández et al., 2001), weighed and dried at 65 °C for three days. Micronutrients in the leaves were determined by AAS after dry digestion procedure.

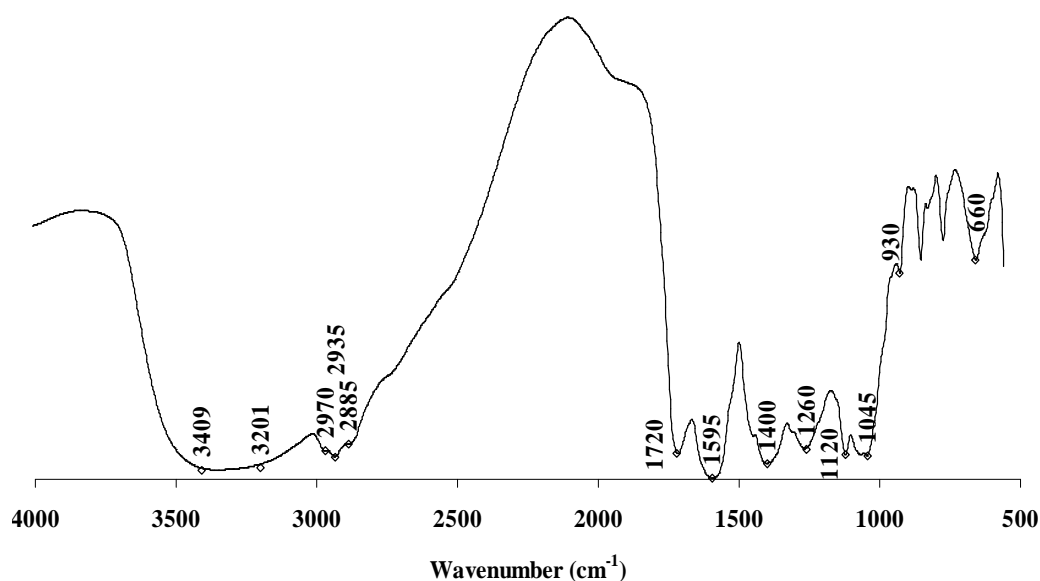
## 2.6 Statistical analysis

Data were statistically evaluated using Analysis of Variance (ANOVA) with SPSS 15.0 software to assess the significance of the main factors and interactions. Means were also compared using Duncan's test at  $P \leq 0.05$  in order to find significant differences between treatments.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Structural characterization of the OMWm

The FTIR spectrum for the OMWm is presented in Figure 1. Infrared bands were interpreted according to Plaza et al. (2008) and Ait Baddi et al. (2004), and its main features were:



**Figure 1.** FTIR spectrum of the OMWm.

(1) a broad band at  $3409\text{ cm}^{-1}$  due to O-H stretching of phenol, alcohol or carboxyl OH and also to amide and amine N-H stretching; (2) bands at  $2970\text{--}2935\text{ cm}^{-1}$  and at  $2885\text{ cm}^{-1}$  due to aliphatic C-H stretching; (3) a band at  $1720\text{ cm}^{-1}$  due to C=O stretching of COOH, and also ascribed to other carbonyl groups such as ketones and aldehydes; (4) a band at  $1595\text{ cm}^{-1}$  that could be considered a group of unresolved absorptions mainly due to aromatic C=C, C=O stretching of amide groups, quinonic C=O and/or C=O of H-bonded conjugated ketones; (5) a band at  $1400\text{ cm}^{-1}$  attributed to stretching of anti-symmetric  $\text{COO}^-$ , aliphatic C-H bending, O-H bending and C=O stretching of phenolic groups; (6) a band at  $1260\text{ cm}^{-1}$  due to C-O stretching of aryl ethers and phenols and C-O stretching and O-H deformation of carboxylic groups; (7) a band at  $1120\text{ cm}^{-1}$  due to alcoholic group vibrations; (8) a band at  $1045\text{ cm}^{-1}$  due to C-O stretching of

carbohydrates and polysaccharides; and (9) peaks at 930-660  $\text{cm}^{-1}$  attributed to C-H bending of substituted aromatic groups.

The FTIR study indicates that the complexing groups able to complex micronutrients, mostly phenolic and carboxylic, were abundant. These structures would be included in the low molecular fractions shown by the mass spectra, and could be attributed to organic acids and natural chelating agents, such as siderophores and phytosiderophores. On the other hand, the major bands observed in the spectra are the same as those observed in the fulvic fraction acids extracted from OMW in the first stage of the composting process (Ait Baddi et al., 2004), suggesting that the fulvic fraction is very important in the OMWm studied here, and supports its potential ability to form metal complexes (Stevenson, 1994). The abundance of carboxylic and phenolic groups capable of complexing metals also supports this hypothesis.

### **3.2 Complexing ability of Fe, Zn, Cu and Mn and preparation of metal-OMWm complexes**

The ability of OMWm to complex Fe, Zn, Cu and Mn was evaluated. In the case of Fe complexes, they are usually prepared with Fe(II) (from  $\text{FeSO}_4$ ) when commercial complexes are manufactured and its natural oxidation to Fe(III) is expected to occur. In this experiment, the complexing ability of OMWm with both forms of Fe and the stability of the Fe complexes were studied in order to evaluate the influence of the initial status of Fe in the behavior of the complex.

Figure 2 shows the measured vs. added element when the complexing ability was studied. The curves obtained are consistent with those described by Villén et al. (2007), having a rising segment that corresponds with the complexing process, followed by another decreasing one that implies the coagulation of the material through the excess of metal. In addition, for each metal Table 2 presents the percentage of element that remains in solution with regard to the added element (obtained from the intersection point of the two lines in figure 2). As elucidated from the FTIR spectra, all the elements studied could be complexed by the OMWm, especially in the case of Fe(III) and Cu, although a fraction of the added element flocculated and/or precipitated as from the beginning of the addition of the metal solutions to the OMWm (the measured element was always lower than the added element), especially in the case of Zn and Mn. This

indicates that both the strong and the weak complexing sites produce coagulation of the complex or precipitation of the metal. In addition, different complexation abilities were measured for Fe(II) and Fe(III).

The different behavior for both Fe forms suggests that the expected Fe(II) oxidation did not occur in the experimental period and that less stable Fe complexes were formed with divalent than with trivalent Fe. Hence, the formation of Fe-OMWm complexes with Fe(III) would be recommended.

Once the complexing ability was known, the metal-OMWm complexes were formed and characterized. The highest percentage of complexed element with regard to soluble element corresponded to Cu, Zn and Fe(III). In any case, for all the elements the amount of metal complexed and the degree of complexation exceeded the requirements of Spanish Regulation Order APA/863/2008, so they can be commercialized.

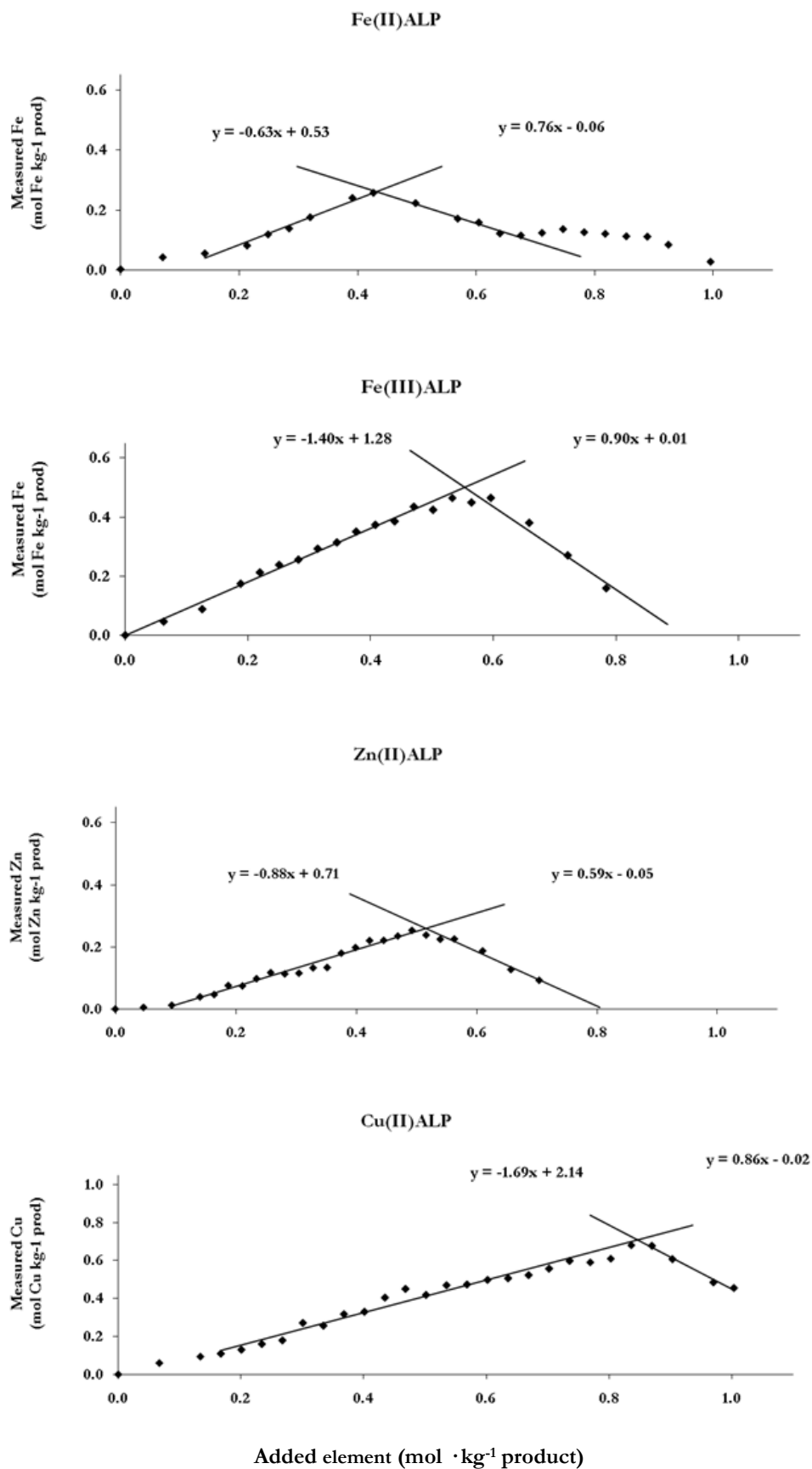


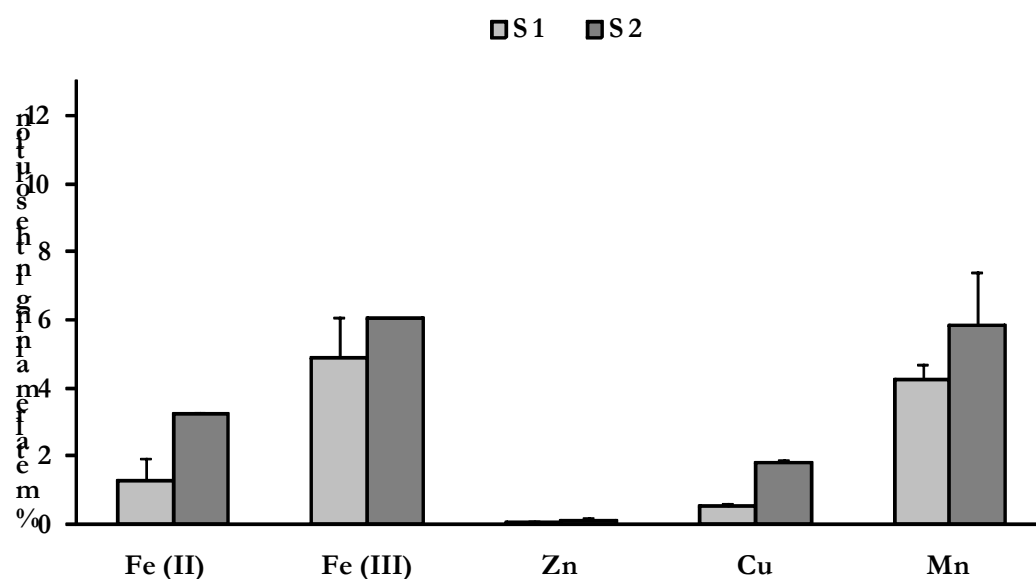
Figure 2. Complexing ability for OMWm with Fe (divalent and trivalent), Zn, Cu and Mn.

### 3.3 Stability of OMWm complexes in agronomic conditions

The effect of pH on the amount of element remaining in solution after three days is reported in Figure 3. For Fe(III), the recovery was negligible in the alkaline pH range. In the case of Cu, the solubility of the complex was high in the entire pH interval studied, decreasing only between pH 6 to 8.

This behavior was ascribed to the solubility of inorganic Cu species below pH 6 and to the strong complexation processes occurring over pH 8. Mn and Zn complexes readily maintained a high amount of the element in the pH range corresponding to alkaline soils, with the complexed element decreasing sharply when the pH was above 9. Figure 4 reports the amount on Fe, Zn, Cu or Mn remaining in solution with regard to the total amount of element added in the interaction of the complexes with both calcareous soils (Soil Experiment I). Soil blanks showed that the contribution of the soils to the amount of metal found in solution was negligible (data not shown). After three days of interaction, the percentage of metal recovered was very low, especially for Zn(II)OMWm. The highest values corresponded to the complexes formed with trivalent Fe and Mn, although in both cases the metal remaining in solution was below 8 %.

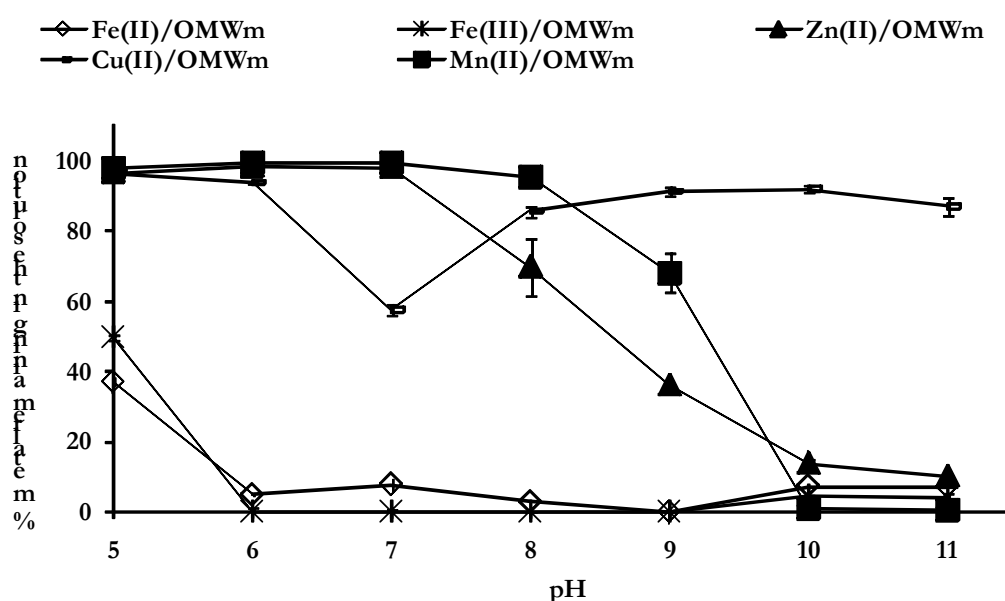
Two-way ANOVA indicated that there were no statistical differences in the percentage of recoverable metal according to the type of soil used or to the metal interacting with the soil (data not shown).



**Figure 4.** Percentage of metal remaining in a  $2.0 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{CaCl}_2$  and  $2.0 \cdot 10^{-3}$  M HEPES (pH 8) solution with regard to the total element added ( $4 \cdot 10^{-4}$  M) for the different OMWm complexes after three days of interaction with the two soils studied (Soil Experiment I).

In order to evaluate the perdurability of the complexes in agronomic conditions, Fe, Zn, Cu and Mn complexes were allowed to interact with a calcareous soil (S1, Figure 5) at different periods (Soil Experiment II). For all the complexes, less than 5 % of the initial amount of element remained in solution after 24 h of interaction. Fe complexes recorded a slightly better behavior than the rest, especially in the case of trivalent Fe.

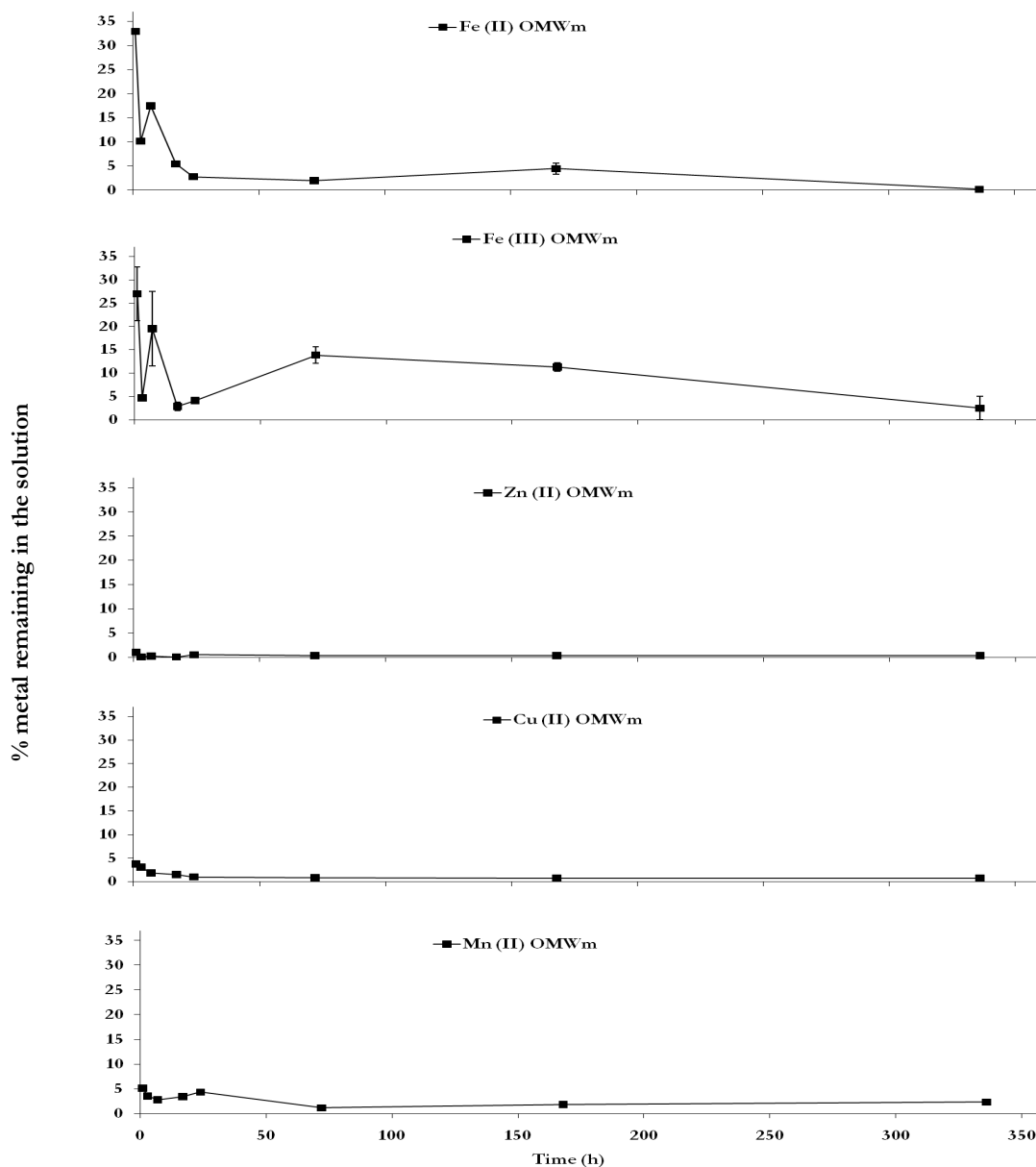
In studies of this nature, a decrease in the metal concentration remaining in solution can be due to complex sorption, element displacement from the complex and precipitation or complex degradation. In the case of Fe complexes, whether this decrease is a consequence of complex retention or Fe displacement cannot be elucidated from our



**Figure 3.** Percentage of Fe(II), Fe(III), Zn, Cu and Mn remaining in a  $1.0 \cdot 10^{-1}$  M  $\text{CaCl}_2$  solution with regard to the total element added ( $1.0 \cdot 10^{-2}$  M) for the different OMWm complexes at different pHs after three days of interaction.

data. The study of complexing ability indicated that OMWm formed stable complexes with Fe, especially with Fe(III), under the conditions described in the methodology used (Villén et al., 2007), after 24 hours of interaction at pH 9. Since the experiment testing the stability of the complexes at different pHs showed that soluble Fe did not remain in the solution in the alkaline pH range, it can be concluded that Fe-OMWm complexes were not stable after three days in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . However, soluble Fe was recovered after three days of interaction for both experiments with calcareous soils (Soil Experiments I and II); the percentage of recoverable Fe being higher when the pH of the initial metal-OMWm solution was not fixed and  $\text{Ca}^{2+}$  was not added to the solution. The different concentration of Fe-OMWm used in the pH assay and in both soil

experiments could explain these differences. For LS polymers, their structural swelling at high alkaline pHs has been described (Pang et al., 2008) and this phenomenon has been related to the ionic groups inside the molecule and its branched structure in aqueous solution. This would favor  $\text{Ca}^{2+}$  complexation because the polymer “opens” and more complexing sites can be used to form complexes. Although a similar study has not been performed for OMWm, the similarities between both complexing agents with regard to



**Figure 5.** Percentage of metal remaining in the solutions at different sampling times ( $t = 1\text{h}, 3\text{h}, 7\text{h}, 14\text{h}, 1\text{d}, 3\text{d}, 7\text{d}$  and  $14\text{d}$ ) with regard to the total element added ( $4.0 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ ) for the different OMWm complexes interacting with the S1 (Soil Experiment II).



the presence of functional groups able to complex metals (mostly carboxylic and phenolic hydroxyl radicals) suggest that swelling and expansion could also occur in the case of OMWm. The lower concentrations used in both soil experiments would have favored swelling to a higher extent, promoting the contact between the Fe and the complexing sites and, consequently, the complexation process. Regarding the differences between both soil experiments, it is important to bear in mind that the pH and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were fixed in the assay Soil Experiment I (pH 8 and  $2.0 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{CaCl}_2$ ) whereas they were not in the second one. Theoretical modeling using Visual Minteq ver.2.52 confirmed this hypothesis, since the initial pH and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations decreased when they were not fixed, favoring the presence of soluble Fe.

For Zn, Mn and Cu complexes, more than 60 % of the initial amount of metal remained in the solution at alkaline pH when the complexes did not interact with soils (Figure 3). The low concentration of element remaining after interaction with soils (Figure 4 and 5) suggests that in this case the sorption of the complex or the displacement of the metal occurred. This supposition is confirmed by the results of the experiment of perdurability under agronomic conditions.

### 3.4 Biological experiments

#### Nutrient Solution Application

In general, all the treatments recorded a low ability to recover plant Fe deficiencies. Since Fe(III)OMWm complexes performed better than Fe(II)OMWm with regard to their complexing ability and in the stability experiments, trivalent Fe was used to form the Fe-containing compounds used in the biological experiments. The trend in the SPAD Index from the beginning of the experiment showed that the highest re-greening values corresponded to the Fe(III)EDTA treatment, followed by Fe(III)OMWm (without statistical differences with Fe(III)EDTA), Fe(III)LS and Control -Fe. The average values in the second level of leaves were  $12.9 \pm 1.1(a)$ ,  $10.0 \pm 0.6(a)$ ,  $5.4 \pm 0.7(b)$  and  $5.7 \pm 1.1(b)$ , respectively, with different letters denoting statistical differences between treatments.

Two-way ANOVA of plant dry weight, leaf Fe concentration and Fe/Mn ratio in leaves was performed, using the treatments and sampling time as factors (Table 3). The

analysis revealed that statistical differences due to the interaction between both factors occurred for plant dry weight and leaf Fe concentration.

**Table 3.** Two-way ANOVA analysis of data corresponding to plant dry weight, leaf Fe concentration, and leaf Fe/Mn ratio after application of the Fe compounds to the nutrient solution.

	Dry weight	Fe	Fe/Mn
<b>Treatment</b>	***	***	*
<b>Time</b> (days since the 1 <sup>st</sup> application of the treatments)	***	ns	**
<b>Treatment*Time</b>	**	**	ns

ns: non-significant; \*: significant at  $P \leq 0.05$ ; \*\* significant at  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*significant at  $P \leq 0.001$ .

**Table 4.** Effect of the different Fe-containing compounds applied to the nutrient solution on the dry weight and leaf Fe concentration and Fe/Mn ratio in soybean plants grown in hydroponics after 8 and 22 days.

	Dry weight (g · plant <sup>-1</sup> DW)	Fe Concentration (µg · g <sup>-1</sup> DW)	Fe/Mn
<i>8 days after the 1<sup>st</sup> application of the treatments</i>			
<b>Fe(III)OMWm</b>	0.94 ± 0.02 ns	48.5 ± 5.8 a	0.49 ± 0.14 ns
<b>Fe(III)LS</b>	0.79 ± 0.09	40.1 ± 5.7 ab	0.29 ± 0.06
<b>Fe(III)EDTA</b>	1.01 ± 0.15	44.5 ± 3.9 ab	0.38 ± 0.05
<b>Control -Fe</b>	0.72 ± 0.05	31.5 ± 0.4 b	0.22 ± 0.01
<i>22 days after the 1<sup>st</sup> application of the treatments</i>			
<b>Fe(III)OMWm</b>	1.46 ± 0.12 b	37.4 ± 0.3 b	0.19 ± 0.03 b
<b>Fe(III)LS</b>	1.17 ± 0.09 b	31.7 ± 2.5 bc	0.11 ± 0.01 c
<b>Fe(III)EDTA</b>	2.61 ± 0.31 a	65.9 ± 2.2 a	0.38 ± 0.02 a
<b>Control -Fe</b>	0.96 ± 0.06 b	26.9 ± 1.3 c	0.16 ± 0.01 bc

Data are means ± SE. Different letters within the same column denote significant differences between the treatments ( $P < 0.05$ ). ns: non-significant. DW: dry weight basis.

Table 4 reports biometric data for all treatments at both sampling times. For the first sampling time there were no statistical differences between the treatments tested with regard to plant dry weight, but at the end of the assay Fe(III)EDTA treated plants recorded higher growth than the rest. The same behavior was observed for Fe concentration and Fe/Mn ratio in leaves. Statistical differences between treatments were observed only at the end of the assay, with Fe(III)EDTA treated plants recording the highest values. After this chelate, Fe(III)OMWm was the most efficient compound, while Fe(III)LS was not statistically different to the Control –Fe.

These data indicate that Fe(III)EDTA and Fe(III)OMWm improved plant nutritional status, though recovery was scarce in all cases. Fe(III)EDTA was clearly the

most efficient treatment, which may be explained by the percentage of chelated Fe, which was higher than the amount of element complexed by Fe(III)OMWm and Fe(III)LS. In other experiments, we have shown that synthetic chelates were more efficient than complexes at recovering Fe chlorotic plants (Rodríguez-Lucena et al., *in press*). Regarding the effectiveness of Fe complexes, Fe(III)LS was less efficient than Fe(III)OMWm in spite of the higher complexing capacity of the amount of Fe complexed (6.9 % and 3.0 %, respectively) and although the stability of Fe(III)OMWm at alkaline pHs was lower than that described for Fe(III)LS in a previous paper (Lucena et al., 2009). In this case, complexation and plant development were not correlated. Stability constants may explain the lower effectiveness of Fe(III)LS. As could be elucidated from the FTIR spectra (Figure 1), the OMWm studied was rich in functional groups able to complex metals, and the results reported here suggest that the OMWm molecule could release Fe to the plant more easily than the LS. Stability constants are usually used to explain this behavior. However, stability constants in this type of polymers correspond to a range of values that are highly dependent on several factors, such as pH,  $p_e + pH$  and others, so comparison is difficult. The Fe/ligand ratio also has to be considered to explain the effectiveness of complexes, since low stability ones have a high ratio (Stevenson, 1994). When weakly bound Fe is released, the remaining Fe would be strongly bonded and may not be available for use by the plants. Thus, higher concentrations should be tested in order to improve the effectiveness of complexes with regard to synthetic chelates.

### **Foliar Application**

The same Fe compounds applied to the nutrient solution were tested when applied through foliar sprays. None of the treatments was particularly effective at recovering plants suffering from severe chlorosis. One-way ANOVA revealed that the SPAD Index recorded statistical differences between treatments. The trend in the SPAD Index during the assay showed that Fe(III)EDTA favored re-greening of leaves to a higher extent than the other treatments. Fe(III)OMWm was also effective at increasing SPAD values, while Fe(III)LS was not statistically different to the Control -Fe. The average values in the second level of leaves were  $20.3 \pm 3.0(a)$ ,  $15.9 \pm 3.1(ab)$ ,  $10.5 \pm 1.4(b)$  and  $5.2 \pm 1.0(c)$ , respectively, with different letters denoting statistical differences among treatments.

Two samplings were made in order to determine plant dry weight. For this parameter, statistical differences between treatments and for sampling time were studied using two-way ANOVA, as well as for the interaction between both factors, which revealed no interaction between them. The dry weight of the plants was influenced solely by the time elapsed after the application of the foliar sprays (at  $P \leq 0.001$ ), while no statistical differences between treatments were observed. Since contamination of the treated leaves due to the foliar sprays has been observed previously (Rodríguez-Lucena et al., *in press*), Fe concentration and Fe/Mn ratio were measured only in roots at the end of the experiment. Statistical differences between treatments were observed for both parameters (at  $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.05$  for leaf Fe concentration and Fe/Mn ratio, respectively).

**Table 5.** Effect of the different Fe-containing compounds applied through foliar sprays on the dry weight and root Fe concentration and Fe/Mn ratio in soybean plants grown in hydroponics after 22 days.

	Dry weight (g · plant <sup>-1</sup> , DW)	Fe Concentration (µg · g <sup>-1</sup> DW)	Fe/Mn
<b>Fe(III)OMWm</b>	0.74 ± 0.06 ns	65.1 ± 9.1 b	0.18 ± 0.04 b
<b>Fe(III)LS</b>	0.97 ± 0.15	129.6 ± 16.5 a	0.38 ± 0.06 a
<b>Fe(III)EDTA</b>	0.96 ± 0.23	65.7 ± 6.5 b	0.15 ± 0.02 b
<b>Control -Fe</b>	0.82 ± 0.19	54.1 ± 1.7 b	0.17 ± 0.02 b

Data are means ± SE. Different letters within the same column denote significant differences between the treatments ( $P < 0.05$ ); ns: non-significant; DW: dry weight basis.

Fe concentration and Fe/Mn ratio in roots are reported in Table 5 and indicate that a significant redistribution of Fe foliarly applied from leaves to roots occurred only for Fe(III)LS, but this did not improve the general nutritional status of the plants.

The redistribution to roots of Fe applied through foliar sprays has been observed previously working with labeled Fe and mildly chlorotic plants complexed by humic substances and LS (Nikolic et al., 2003; Rodríguez-Lucena et al., 2009). The foliar application of Fe is usually performed in plants with an additional supply of Fe through the roots (Álvarez-Fernández et al., 2004; Rodríguez-Lucena et al., 2009). Thus, given the low mobility of Fe through the phloem, the performance of Fe(III)OMWm should be considered when applied to mildly chlorotic plants receiving an additional supply of Fe through the roots.

## 4. CONCLUSIONS

The OMWm extracts tested in the work are valorized by-products capable of complexing Fe, Zn, Cu and Mn. The OMWm formed micronutrient complexes suitable for commercialization according to Spanish legislation, although given their low stability under alkaline soil conditions their use is recommended solely for application to the nutrient solution in hydroponic systems or when applied through foliar sprays. Due to the low concentrations of complexes applied in micronutrient fertilization, the composting of the extract can be omitted and raw materials could be used. Further research is necessary to elucidate the structural characteristics that may improve the stability of the complexes, and FTIR analysis may be a useful tool in the structural analysis of modified OMWm. Hence, Fe-OMWm complexes constitute a promising eco-compatible and cheap alternative to synthetic chelates for dealing with micronutrient deficiencies when applied foliarly or to the nutrient solution of hydroponically grown plants.

## ACKNOWLEDGMENTS

Work funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Projects AGL2004-07849-C02-01/AGR and AGL2007—63756) and by Ges-Biolives. P. Rodríguez-Lucena was supported by a Spanish Ministry of Science and Innovation “FPI” pre-doctoral contract co-financed by the European Social Fund.

## REFERENCES

- Ait Baddi G A, Hadifi M, Cegarra J, Albuquerque J A, González J, Gilard V and Revel J.** 2004. Characterization of fulvic acids by elemental and spectroscopic (FTIR and <sup>13</sup>C-NMR) analyses during composting of olive mill wastes plus straw. *Bioresour. Technol.* 93:285-290.
- Alburquerque J A, González J, García D and Cegarra J.** 2004. Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour. Technol.* 91:195–200.
- Alburquerque J A, González J, García D and Cegarra J.** 2006. Composting of a solid olive-mill by product (“alperujo”) and the potential of the resulting compost for cultivating pepper under commercial conditions. *Waste Manage.* 26:620–626.
- Álvarez-Fernández A, García-Laviña P, Fidalgo C, Abadía J and Abadía A.** 2004. Foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Plant Soil.* 263:5-15.
- Álvarez-Fernández A, Pérez-Sanz A and Lucena J J.** 2001. Evaluation of washing procedures on mineral analysis for orange and peach leaves sprayed with seaweed extracts enriched with iron. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32:157-170.
- Álvarez-Fernández A, Sierra M A and Lucena J J.** 2002. Reactivity of synthetic iron chelates with soils and soils components. *Plant Soil* 241:129-137.
- Canet-Benavent, M.** 2006. Method for the industrialised production of olive mill by-products and product thus obtained. Patent WO/2006/ 058938 A3,
- Fernández V and Ebert G.** 2005. Foliar Iron Fertilization: A Critical Review. *J. Plant Nutr.* 28:2113-2124.
- Fernández V, Río V, Abadía J and Abadía A.** 2006. Foliar iron fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): effects of iron compounds, surfactants and other adjuvants. *Plant Soil* 289:239-252.
- Lindsay W L and Schwab A P.** 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr.* 5:821-840.
- Lindsay W L.** 1972. Zinc in soils and plant nutrition. *Adv. Agron.* 24: 147-186.

- Lindsay W L.** 1979. Iron. In: Chemical Equilibria in Soils; Lindsay W L. John Wiley & Sons: New York; pp. 129-149.
- Lucena J J, Barak P and Hernández-Apaolaza L.** 1996. Isocratic ion-pair high performance liquid chromatography method for the determination of various iron (III) chelates. *J. Chromatogr. A* 727:253-264.
- Lucena J J.** 2006. Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants. In: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms; Barton L L and Abadía J., Eds. Springer-Verlag Academic Publishers, Dordrecht. pp 103-127.
- Lucena J J, Gárate A and Villén M.** 2009. Evaluation of micronutrient complexes as fertilizers in soils, fertirrigation and foliar use. *J. Plant Nutr, Soil Sci.* (submitted).
- Mengel K and Kirkby E A.** 2001. Principles of Plant Nutrition, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 607-609.
- Nikolic M, Cesco S, Römheld V, Varanini Z and Pinton R.** 2003. Uptake of iron ( $^{59}\text{Fe}$ ) complexed to water-extractable humic substances by sunflower leaves. *J. Plant Nutr.* 26:2243-2252.
- Pang Y, Qiu X, Yang D and Lou H.** 2008. Influence of oxidation, hydroxymethylation and sulfomethylation on the physicochemical properties of calcium lignosulfonate. *Colloids Surf. A.* 312:154-159.
- Papadopoulos P and Rowell D L.** 1989. The reactions of copper and zinc with calcium carbonate surfaces. *J. Soil Sci.* 40: 39-48.
- Plaza C, Nogales R, Senesi N, Benitez E and Polo A.** 2008. Organic matter humification by vermicomposting of cattle manure alone and mixed with two-phase olive pomace. *Bioresour. Technol.* 99:5085–5089.
- Regulation (EC) N° 2003/2003** of the European Parliament and of the Council, relating to fertilizers. Official Journal of the European Union, 21-11-2003, L 304/1.
- Rodríguez-Lucena P, Tomasi T, Pinton R, Hernández-Apaolaza L, Lucena J J and Cesco S.** 2009. Evaluation of  $^{59}\text{Fe}$ -lignosulfonates complexes as Fe-sources for plants. *Plant Soil* (DOI 10.1007/s11104-009-0091-1 available on line ).

- Rodríguez-Lucena P, Hernández-Apaolaza L and Lucena J J.** 2009. Comparison of iron chelates and complexes supplied as foliar sprays and in nutrient solution to correct iron chlorosis of soybean. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* (in press).
- Stevenson F J.** 1994. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reaction*; John Wiley & Sons, New York,
- Uygur V and Rimmer D L.** 2000. Reactions of zinc with iron coated calcite surfaces at alkaline pH. *Eur. J. Soil Sci.* 51:511-516.
- Villén M, Cartagena M C, Bravo R, García-Mina J M, Martín de la Hinojosa M I and Lucena J J.** 2007. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers and the complexing capacity of complexing agents. *J. Agric. Food Chem.* 55:5746-5753.



## Evaluación de distintos complejos $^{59}\text{Fe}$ -Lignosulfonato como fuente de Fe para plantas

### RESUMEN

La clorosis férrica es una deficiencia nutricional muy común, que afecta a la productividad de los cultivos. La aplicación al suelo o en forma de rociados foliares de quelatos sintéticos como el EDDHA o el EDTA se utiliza habitualmente para corregir carencia de Fe, si bien se trata de productos de precio muy elevado. Por ello, se evaluó la capacidad de distintos lignosulfonatos (LS), con cantidades variables de grupos carboxílicos y fenólicos, para mantener el Fe complejado en forma soluble en suelo, así como para aportar Fe por vía foliar o al ser aplicados a la disolución nutritiva a plantas desarrolladas en hidroponía pura.

Los LS mostraron escasa capacidad para solubilizar  $^{59}\text{Fe}$  de hidróxido férrico amorfo, y la movilidad de los complejos  $^{59}\text{Fe(III)}$ -LS en una columna de suelo (pH 7,5) fue muy inferior a la del  $^{59}\text{Fe(III)}$ -EDDHA. Sin embargo, su eficacia fue similar a la del  $^{59}\text{Fe(III)}$ -EDDHA al ser aplicados a plantas de tomate en hidroponía pura, indicando que la reducida efectividad de estos complejos en aplicaciones a suelo estaría relacionada con su retención en el mismo.

La efectividad de los complejos  $^{59}\text{Fe(III)}$ -LS al ser aplicados como rociados foliares a plantas de pepino con deficiencias de Fe se comparó con la del  $^{59}\text{Fe(III)}$ -EDTA, observándose que la cantidad de Fe absorbido y reducido era similar en todos los casos. Cuando los mismos productos se aplicaron a plantas de tomate cloróticas, la absorción fue menor para los LS, aunque la reducción era parecida a la encontrada para el  $^{59}\text{Fe(III)}$ -EDTA.

Por tanto, puede concluirse que los complejos Fe-LS constituyen una alternativa eficaz, barata y respetuosa con el ambiente para corregir la clorosis férrica al ser aplicados por vía foliar o a la disolución nutritiva de plantas desarrolladas en hidroponía pura.

## Evaluation of $^{59}\text{Fe}$ -lignosulfonates complexes as Fe-sources for plants

Patricia Rodríguez-Lucena<sup>a</sup>, Nicola Tomasi<sup>b</sup>, Roberto Pinton<sup>b</sup>, Lourdes Hernández-Apaolaza<sup>a</sup>, Juan J. Lucena<sup>a</sup> and Stefano Cesco<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Agricultural Chemistry Department, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università degli Studi di Udine, Via delle Scienze 208, 33100, Udine, Italia.

Plant Soil (DOI 10.1007/s11104-009-0091-1).

---

## ***EVALUATION OF <sup>59</sup>FE-LIGNOSULFONATES COMPLEXES AS FE-SOURCES FOR PLANTS***

### **ABSTRACT**

Iron chlorosis is a wide-spread limiting factor of production in agriculture. To cope with this problem, synthetic chelates (like EDTA or EDDHA) of Fe are used in foliar-spray or in soil treatments; however, these products are very expensive. Therefore paper-production byproducts, like Lignosulfonates (LS), with varying content of carboxylate and sulfonate groups, were tested with respect to their ability to maintain Fe in the solution of soils and to feed plants grown in hydroponics with Fe through foliar sprays or application to the nutrient solution.

Results show that LS had a low capability to solubilize <sup>59</sup>Fe-hydroxide and that preformed <sup>59</sup>Fe(III)-LS complexes had poor mobility through a soil column (pH 7.5) and scarce stability when interacting with soils compared to <sup>59</sup>Fe(III)-EDDHA. However when <sup>59</sup>Fe(III)-LS were supplied to roots in a hydroponic system, they demonstrated an even higher capability to feed Fe-deficient tomato plants than <sup>59</sup>Fe(III)-EDDHA. Hence, data here presented indicate that the low Fe use efficiency from Fe-LS observed in soil-applications is due to interactions of these Fe-sources with soil colloids rather than to the low capability of roots to use them.

Foliar application experiments of <sup>59</sup>Fe(III)-LS or <sup>59</sup>Fe(III)-EDTA to Fe-deficient cucumber plants show that uptake and reduction rates of Fe were similar between all these complexes; on the other hand, when <sup>59</sup>Fe(III)-LS were sprayed on Fe-deficient tomato leaves, they showed a lower uptake rate, but a similar reduction rate, than <sup>59</sup>Fe(III)-EDTA did.

In conclusion, Fe-LS may be a valid, eco-compatible and cheap alternative to synthetic chelates in dealing with Fe chlorosis when applied foliarly or in the nutrient solution of hydroponically grown plants.

## 1. INTRODUCTION

Iron (Fe) chlorosis is a plant nutritional disorder mainly occurring in alkaline and/or calcareous soils. Intervenal leaf yellowing, due to the reduction of leaf photosynthetic pigments concentration, is the most characteristic visual symptom in Fe-deficient plants, whose fruit quality, size and yield are severely reduced. Fe chlorosis is a limiting factor for agricultural production in many areas in the world. In the Mediterranean region, it is estimated that from 20 to 50 % of fruit crops are affected by Fe deficiency (Jaeger et al., 2000). In this type of soils, calcium carbonate buffers soil solution pH in the range 7.5-8.5 (Lindsay and Schwab, 1982) and elevated bicarbonate concentration is present in solution (Lucena, 2000). The solubility of Fe in well aerated soils is controlled by Fe oxides (Lindsay, 1991) and by the pH of calcareous soils, the most soluble Fe oxide limits total soluble Fe concentration at around  $10^{-10}$  M, much lower than that required ( $10^{-8}$  M) for optimal plant growth (Römheld and Marschner, 1986). In addition, bicarbonate may hinder Fe uptake and its translocation in plants.

Currently use of synthetic Fe chelates derived from polyamine-carboxylic acids is the most common and efficient agricultural practice to control Fe chlorosis (Lucena, 2006). Most of them degrade very slowly, are easily lost by lisciviation and are expensive, so only cash crops are treated with them. Given that natural Fe complexes are cheaper and more easily degradable than synthetic chelates, their application is under consideration in spite of their lower efficacy (Aly et al., 1998; Goos et al., 2001). These products are formed by complexation of Fe with molecules of natural origin.

Lignosulfonates (LS) are pulp paper polymers obtained during the sulfite pulping process, when original lignin is broken down and fragments are made water-soluble by the introduction of sulfonic acid groups. In the lignin molecule, -OH radicals can be bonded to carbon and behave as carboxylic groups like in organic acids. On the other hand, in soils the degradation of lignin can work as humic substances precursor. These characteristics are consistent with the capability of LS to complex Fe and other metals, and are at the basis of their possible use as Fe chlorosis correctors.

The correction of micronutrient deficiencies applying the micronutrient complexed by LS has been assayed by several authors with variable results. It was observed that LS/ $Zn^{2+}$  complexes behave efficiently providing Zn to maize and wheat plants when

applied to calcareous soils or to the nutrient solution (Rico et al., 1996; Martín-Ortiz et al., 2009). Comparison of LS and HEDTA (N-(hydroxyethyl)-ethylenediaminetriacetic acid) as Fe suppliers when applied to butterhead lettuce grown in hydroponics revealed that LS were almost as efficient as HEDTA in keeping Fe in solution and providing Fe for plant uptake (Demeyer et al., 2001).

Fe-LS have shown low stability in interaction experiments under calcareous soil conditions (Goos et al., 2001). The authors found that negligible Fe remained in the solution after one day of incubation with this type of soil. On the other hand, we have observed (data unpublished) that from 20 to 30 % of initially complexed Fe was found in the solution after three days of interaction of different commercial Fe-LS with different soil materials (peat, illite and ferrihydrite).

Given the low stability shown by Fe-LS when applied to soils or to nutrient solution, foliar application of Fe-LS complexes can be used as an alternative way to overcome Fe chlorosis. This type of applications have been tested by several authors with synthetic chelates, natural complexes and inorganic salts (Pérez-Sanz et al., 1996; Pestana et al., 2001; Nikolic et al., 2003; Álvarez-Fernández et al., 2004; Fernández et al., 2006) with variable results, due to the diverse factors controlling foliar absorption (characteristics concerning the treated leaf, the type of molecule applied, surfactant, etc.) and difficulties in achieving an optimum formulation of foliar fertilizer.

Although LS have a good ability to complex Fe, to our knowledge there are few studies evaluating the effectiveness of these complexes to cure Fe chlorosis, and in most of cases are referred to commercial complexes. Thus, the influence of the characteristic of the LS in the use efficiency at the root and leaf levels of the Fe-LS, has not been evaluated. In addition no information concerning the mechanisms of Fe acquisition from Fe-LS sources at the root and leaf levels are available to date. In the present work four LS, differing in their physical and chemical characteristics, were compared with regard to their ability to solubilize Fe from sparingly soluble  $^{59}\text{Fe}$ -hydroxide and from soils. Mobility of  $^{59}\text{Fe}$ -LS complexes through soil columns was also evaluated. Furthermore, the different efficiency of  $^{59}\text{Fe}$ -LS complexes to supply Fe to cucumber and tomato plants through root (nutrient solution) or foliar applications was studied, also evaluating the long- and short-distance transport of foliarly applied  $^{59}\text{Fe}$ .

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Preparation of $^{59}\text{Fe}$ -sources

The freshly precipitated amorphous  $^{59}\text{Fe}$ -hydroxide was obtained insolubilizing  $^{59}\text{FeCl}_3$  at alkaline pH (Guzmán et al., 1994); the specific activity was  $23 \text{ KBq } \mu\text{mol}^{-1} \text{ Fe}$ .

$^{59}\text{Fe}$ -EDDHA or  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA complex (specific activity of 11 and  $65 \text{ KBq } \mu\text{mol}^{-1} \text{ Fe}$ , respectively) were prepared according to Römheld and Marschner (1986) by mixing  $^{59}\text{FeCl}_3$  with o,o-EDDHA or EDTA with a molar ratio of 1:1.1.

Hardwood (eucalyptus) and softwood (spruce) lignosulfonate samples produced by the sulphite process were obtained from LignoTech Ibérica.  $^{59}\text{Fe}$ -lignosulfonate ( $^{59}\text{Fe}$ -LS) complexes were prepared by mixing LS with  $^{59}\text{FeCl}_3$  in 5mM MES-NaOH at pH 5.5; the LS:Fe ratio was  $1.0 \mu\text{mol } ^{59}\text{Fe}$  and  $1.1 \mu\text{mol LS}$ . Lignosulfonates (LS) samples were obtained through sulfite treatment of hardwood (eucalyptus; LS1) and softwood (spruce; LS4) sources. LS2 and LS3 were obtained from LS1 by industrial modifications in order to increase the amount of functional groups of the polymer capable to complex Fe. In LS2 the percentage of sulfonic and carboxylic groups with regard to LS1 was increased. LS3 differed from LS2 in the percentage of sulfonic groups, which was increased in this last modification, although the process implied a slight reduction of the percentage of phenolates present in the polymer. The variations from the original LS1 to LS2 and LS3 also altered their molecular weight, which was increased with each modification. The molecular weight (Fredheim et al., 2002), organic S-content (Foley et al., 1960), and contents of carboxylic and phenolic groups (Pobiner et al., 1983) were determined and the results are presented in Table 1. For the root-uptake experiments the specific activity of  $^{59}\text{Fe}$ -LS was  $11 \text{ KBq } \mu\text{mol}^{-1} \text{ Fe}$ , while for the foliar application this activity was increased up to  $65 \text{ KBq } \mu\text{mol}^{-1} \text{ Fe}$ . Furthermore, just before leaves spraying all the

**Table 1:** Chemical characteristics of the LS tested

Sample	Wood type	Mw ( $\text{g mol}^{-1}$ )	Org. S ( $\text{g kg}^{-1} \text{ LS}$ )	-COOH ( $\text{g kg}^{-1} \text{ LS}$ )	Phenolic -OH ( $\text{g kg}^{-1} \text{ LS}$ )
LS1	Eucalyptus	6282	49	30	19
LS2	Eucalyptus	6954	49	60	19
LS3	Eucalyptus	7654	57	60	17
LS4	Spruce	32413	55	26	19

solution containing  $^{59}\text{Fe}$ -LS and that of  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA were adjusted to pH 5.0 to avoid altering the ion exchange properties of the cuticle (Fernández et al., 2005) and added with Tween 80 (non ionic surfactant; PROBUS, Barcelona, Spain) (0.1 % v/v).

## 2.2 Solubilization of Fe by LS

The capacity of LS to solubilize Fe from insoluble forms was evaluated with the experimental approach described by Cesco et al. (2000). The freshly precipitated amorphous  $^{59}\text{Fe}$ -hydroxide (2.5 mL of suspension containing 10  $\mu\text{mol}$  Fe) were transferred into a dialysis tube (ZelluTrans/Roth 6.0,  $\text{Ø}$  16mm, exclusion limit of 10-12 kDa, Karlsruhe, Germany) and mixed with 7.5 mL of nutrient solution (Solution A) with the following composition: 0.7 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.1 M KCl, 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM HEPES-KOH, pH 7.5). Thereafter, the dialysis tube was transferred into a 250 mL glass containing 230 mL of the same nutrient solution A. To maintain homogeneity throughout the time-course of the experiment in both solutions, continuous aeration was provided inside and outside the dialysis tube. Both solutions, inside and outside the dialysis tube, were continuously aerated in order to maintain them homogeneous during the experiment. The experiment was started by adding LS inside the dialysis tube (final LS concentration 5  $\mu\text{M}$ ). As controls, EDDHA (final concentration 5  $\mu\text{M}$ ) and distilled water were used. For each LS or control, four replicates were performed. At timed intervals samples from the outside solution were collected, and the amount of  $^{59}\text{Fe}$  was measured by liquid scintillation counting. In this experiment only the behavior of the three fractions with the lower molecular weight (LS1, LS2 and LS3) was evaluated.

Moreover, to determine the ability of the complexing agent to solubilize native Fe an experiment with soil columns was performed with the LS2. For this, 50, 500 or 5000 nmol of LS2 were loaded on the top of a soil column ( $\text{Ø}$  16 mm, height 6.5 mm) containing 7.5 g of soil (Eutric cambisol, pH 6, bulk density 1.1  $\text{g cm}^{-3}$ ). The elution of  $^{59}\text{Fe}$  through the column was performed loading carefully the solution A, the flow rate, due to the gravity, being about 2  $\text{mL min}^{-1}$ . The first 20 mL of the solution eluted through the column were collected and the amount of Fe solubilized as Fe-LS was measured by Atomic Absorption Spectroscopy (AAS). Three replicates for each amount of LS were fixed; for controls, EDDHA (50 nmol) or water were used.

### 2.3 Stability and mobility of $^{59}\text{Fe}$ -LS complexes in soils

To study the stability of  $^{59}\text{Fe}$ -LS in soils, Fe-LS solutions containing 50 nmol of  $^{59}\text{Fe}$  were allowed to interact with 10 g of soil (Eutric cambisol, pH 6, bulk density  $1.1 \text{ g cm}^{-3}$ ) and 20 mL of distilled water in 50 mL sterile polyethylene flasks. The flasks were shaken at room temperature and  $200 \text{ min}^{-1}$ . At timed intervals 1 mL aliquots were taken, and the amount of  $^{59}\text{Fe}$  was measured by liquid scintillation counting after centrifugation ( $14000 \text{ min}^{-1}$ ) of the aliquot. For comparison, mobility of  $^{59}\text{Fe}$  chelated by EDDHA was tested. Three replicates were established for each LS.

The mobility in the soils of the  $^{59}\text{Fe}$  complexed by LS was evaluated as described by Cesco et al. (2000) loading 5 nmol of  $^{59}\text{Fe}$ -LS on the top of a column ( $\text{Ø}$  16 mm, height 6.5 mm) containing 7.5 g of soil (Eutric cambisol, pH 6, bulk density  $1.1 \text{ g cm}^{-3}$ ). The elution of  $^{59}\text{Fe}$  through the column was performed loading carefully the solution A, the flow rate, due to the gravity, being about  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . The first 20 mL of the solution eluted through the column were collected and the amount of  $^{59}\text{Fe}$  was determined by liquid scintillation counting. For comparison, elution of  $^{59}\text{Fe}$  chelated by EDDHA was tested. Four replicates were established for each of the LS fractions and EDDHA.

### 2.4 Plant materials

Tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* L., cv. Marmande) were germinated for 6 days on filter paper moistened with 5 mM  $\text{CaSO}_4$ . Then, the seedlings were transferred to 2.2 L plastic vessels with continuously aerated nutrient solution having the following composition: (macronutrients) 0.7 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.1 mM KCl, 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; (micronutrients) 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , (pH 7.5); 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4$ , 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ , 10 nM  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (adjusted at pH 6.0 with 0.1M KOH). Nutrient solution was renewed every 3 days. The plants were kept in a growth chamber under the following controlled climatic conditions: day/night photoperiod, 16/8; temperature (day/night) 25/20 °C; RH 65/75 %, light intensity  $350 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . During the first 21 days of hydroponic culture, the plants were supplied with Fe which was added to the solution as Fe-EDTA at the final Fe concentration of 5  $\mu\text{M}$ . In the following 7 days, Fe was completely omitted from the nutrient solution.



Cucumber seeds (*Cucumis sativus* L., cv. Lungo della Cina) were germinated for 5 days on filter paper moistened with 5 mM CaSO<sub>4</sub>. Then, the seedlings were transferred to the nutrient solution described previously, and were kept for 13 days in a growth chamber with controlled conditions as described for tomato plants. Plants were grown without any exogenous addition of Fe.

### 2.5 <sup>59</sup>Fe uptake from <sup>59</sup>Fe-LS by roots of intact tomato plants

Uptake of <sup>59</sup>Fe from <sup>59</sup>Fe-LS complexes was evaluated using the procedure described by Cesco et al. (2002). Briefly, roots of intact Fe-deficient 34-day-old tomato plants were washed with micronutrient-free nutrient solution for 30 min and then transferred to beakers containing 250 mL of a freshly prepared micronutrient-free nutrient solution, where <sup>59</sup>Fe-LS complexes was added in order to give a final Fe concentration of 1 μM and 1.1 μM LS; as control, 1 μM <sup>59</sup>Fe-EDDHA has been used. Four replicates per treatment (one plant per replicate) were performed. Uptake solution was buffered at pH 7.5 with 10 mM HEPES-KOH and the uptake period lasted 24 hours. In order to limit photo-chemical reduction phenomena of Fe in the nutrient solution (Zancan et al., 2006) added by the Fe-sources, during the entire experiment, beakers have been covered. After the uptake period, plants were transferred to a freshly prepared <sup>59</sup>Fe-free nutrient solution for 10 min, root extraplasmatic <sup>59</sup>Fe pool was removed by 1.2 g L<sup>-1</sup> sodium dithionite and 1.5 mM 2,2'-bipyridyl in 1 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> under N<sub>2</sub> bubbling according to the method described by Bienfait et al. (1985) and then roots and aerial part were harvested separately. Roots and shoots were oven-dried at 80°C, weighed, ashed at 550°C, and suspended in 1 M HCl for <sup>59</sup>Fe determination by liquid scintillation counting. The <sup>59</sup>Fe uptake rate, measured as nmol <sup>59</sup>Fe, is referred to the whole plant (root + shoot) and is presented per g dry weight of roots in 24 hours. The <sup>59</sup>Fe translocation rate is presented as nmol <sup>59</sup>Fe measured in shoot per g of root dry weight in 24 hours.

### 2.6 Foliar application of <sup>59</sup>Fe-LS to intact cucumber and tomato plants

Uptake and translocation of foliar applied <sup>59</sup>Fe by intact cucumber and tomato plants were evaluated using the procedure described by Nikolic et al. (2003). Briefly, the fully-expanded young leaf of cucumber and the apical portion of fully-expanded young leaves of tomato plants were immersed for 1 minute in 40 mL <sup>59</sup>Fe-labeled solution

containing 1 mM Fe supplied either as  $^{59}\text{Fe}$ -LS or  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA. Three replicates per treatment (one plant per replicate) were performed. Seven days after the foliar  $^{59}\text{Fe}$  application, the plants were harvested. The  $^{59}\text{Fe}$ -treated part of leaf was cut and Fe was removed from the leaf surface as described by Bienfait et al. (1985), with minor changes. The leaf sections were washed for 15 min in 50 mL of a  $\text{N}_2$ -bubbling solution containing 1.5 mM 2,2'-bipyridyl, 0.5 mM  $\text{CaSO}_4$  and 7.5 mM sodium dithionite to ensure reductive conditions. To remove any possible contamination by  $^{59}\text{Fe}$ , also the untreated sections of the sampled leaf were washed as above. At harvest, material of cucumber plants was divided into five parts [(i) the treated leaves (the second fully-expanded leaves); (ii) the leaves grown before the treatments were applied (the first-level leaves); (iii) the new leaves grown after the application of the treatments; (iv) the stem (v) and the roots] while tomato plants were divided into six parts [(i) the treated sections of fully-expanded leaves (three apical leaflets); (ii) the untreated sections of the above leaves (the part closest to the petiole); (iii) the leaves grown before the  $^{59}\text{Fe}$  application; (iv) the new leaves grown after the  $^{59}\text{Fe}$  application; (v) the stem (vi) and the roots]. The plant material was oven dried for 3 days, ashed at 550 °C and dissolved in 1 M HCl to measure  $^{59}\text{Fe}$  radioactivity by liquid scintillation counting. The  $^{59}\text{Fe}$  uptake rate, measured as nmol  $^{59}\text{Fe}$ , is referred to the total amount of  $^{59}\text{Fe}$  in whole plant per gram dry weight basis of the treated leaf portion.

### **2.7 Fe(III) reduction by intact roots and leaf discs**

Reduction of Fe(III)-LS or Fe(III)-EDDHA by roots of intact Fe-deficient 34-d-old tomato plants was measured as previously described by Pinton et al. (1999) using the bathophenanthrolinedisulfonate (BPDS) reagent (Chaney et al., 1972). Roots were incubated for 20-30 min in an aerated solution containing 0.5 mM  $\text{CaSO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$  BPDS, 10 mM Mes-KOH (pH 5.5) in the dark at 25°C; also Fe-sources (Fe-LS complexes or Fe-EDDHA) were added at a final Fe concentration of 10  $\mu\text{M}$ . Three replicates per Fe source were established, and each replicate was constituted by an individual plant. The Fe-LS complexes were prepared as described above by mixing LS with non-labeled  $\text{FeCl}_3$  at pH 5.5.

Vacuum-infiltrated samples consisting of 30 leaf discs (8 mm diameter) isolated from leaves of Fe-deficient 34-d-old tomato and 18-d-old cucumber plants were incubated in 5 mL assay solution to measure Fe(III) reduction according to the methods

described by Nikolic and Römheld (1999). Leaf discs were incubated for 40-60 min in continuous-orbital shaking solution containing 0.5 mM CaSO<sub>4</sub>, 250 mM Sorbitol, 100 µM BPDS, 10 mM MES-KOH (pH 6.0) in the dark at 25°C; Fe-sources (Fe-LS complexes or Fe-EDTA, three replicates per Fe source) were added at a final Fe concentration of 10 µM. Ferric reduction was determined as formation of the Fe(II)-BPDS complex at 535 nm after the leaf discs incubation.

## 2.8 Statistical Analysis

Data were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) with the program SPSS 13.0. Means were also compared using Duncan's test at  $P < 0.05$  in order to find significant differences among treatments.

## 3. RESULTS

### 3.1 Fe solubilization by LS, stability and mobility of Fe-LS complexes

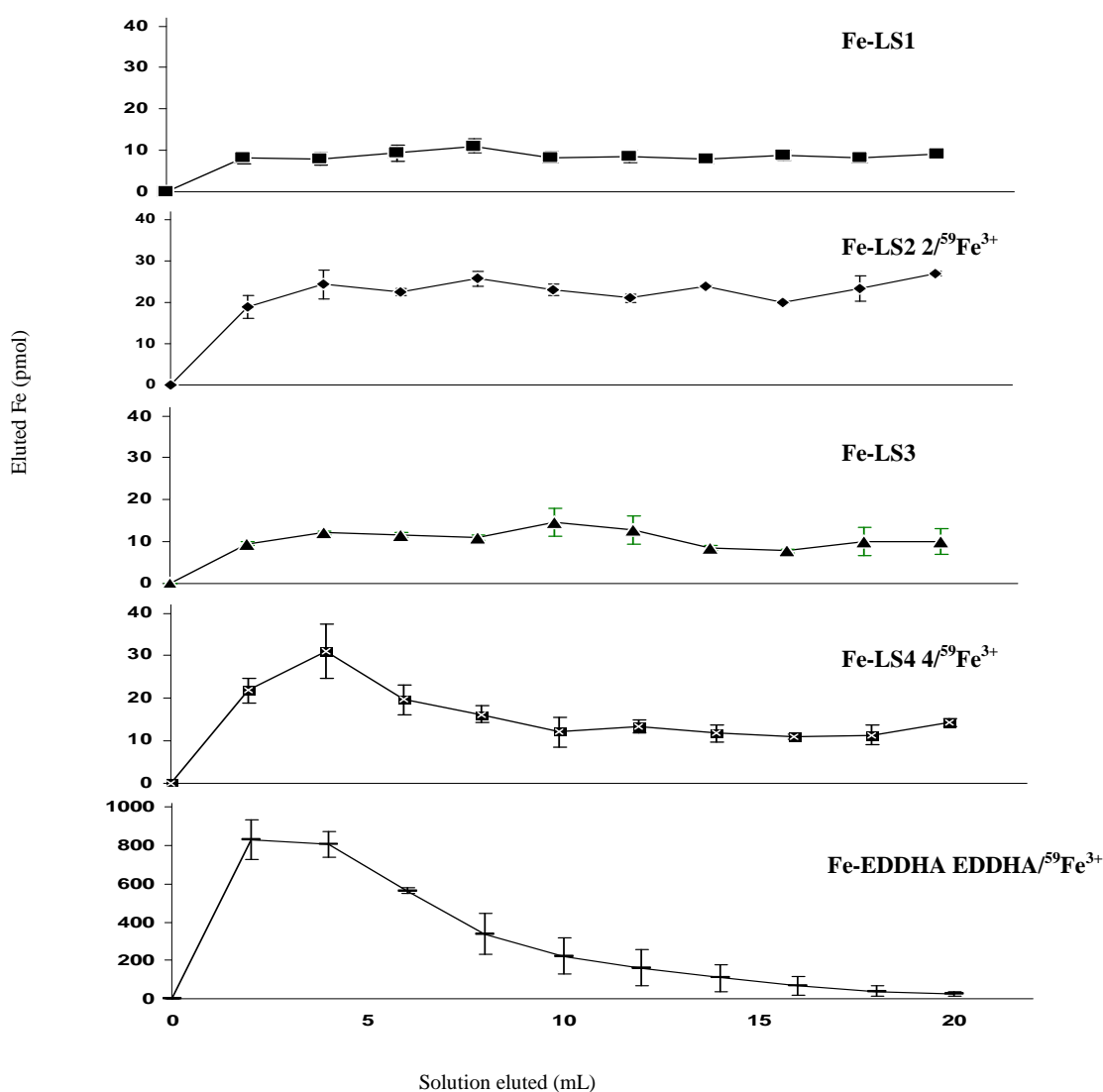
The capacity of LS to solubilize Fe from a sparingly soluble <sup>59</sup>Fe-hydroxide was studied following the movement of <sup>59</sup>Fe across a dialysis membrane. In this experiment only the behavior of the three fractions with the lower molecular weight (LS1, LS2 and LS3) was evaluated. The addition of LS fractions to the solution containing amorphous <sup>59</sup>Fe-hydroxide inside the dialysis tube slightly increased the amount of <sup>59</sup>Fe recoverable in the external solution, at least for the LS1 fraction, with respect to the control (complexing agent-free) treatment (Table 2). None of the LS tested were able to solubilize <sup>59</sup>Fe at the level reached by EDDHA.

**Table 2:** <sup>59</sup>Fe solubilization from <sup>59</sup>Fe-hydroxide by LS after 22 h of treatment; the LS were added at a final concentration of 5 µM to a dialysis tube containing 10 µmol <sup>59</sup>Fe-hydroxide. The addition to the solution containing amorphous <sup>59</sup>Fe-hydroxide of EDDHA at a final concentration of 5µM solubilized 163.3 ± 2.7 nmol <sup>59</sup>Fe.

	Solubilized <sup>59</sup> Fe (nmol <sup>59</sup> Fe)	
<b>LS1</b>	24.0 ± 1.4	a
<b>LS2</b>	22.9 ± 1.1	ab
<b>LS3</b>	21.6 ± 0.9	b
<b>Control</b>	21.2 ± 1.1	b

Data are means ± SD of four replicates, and refer to the amount of <sup>59</sup>Fe recovered in the outer solution. Different letters in the same column denote significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

The study of  $^{59}\text{Fe}$ -LS complex stability in soil (Eutric cambisol) showed that the amount of Fe recoverable after the interaction of the complexes with a soil was negligible (0.4 % and 0.2 % after 1 h and 24 h from the beginning of the interaction, respectively, data not shown). The mobility in the soil of Fe complexed by LS was tested by measuring the  $^{59}\text{Fe}$  content in the solutions eluted from soil columns previously loaded with different  $^{59}\text{Fe}$ -LS complexes. Figure 1 shows that  $^{59}\text{Fe}$ -LS could move through the soil column, the highest elution levels being observed for  $^{59}\text{Fe}$ -LS2 and  $^{59}\text{Fe}$ -LS4 (Fig. 1). In any case for all the LS tested, less than 5 % of the total  $^{59}\text{Fe}$  loaded onto the soil column could be recovered in the 20 mL of eluted solution (Table 3). In the case



**Figure 1:** Elution patterns of  $^{59}\text{Fe}$ , pre-loaded as  $^{59}\text{Fe}$ -LSs or  $^{59}\text{Fe}$ -EDDHA, through a soil (Eutric cambisol) column. The eluent is a nutrient solution (A, buffered with 10 mM HEPES-KOH pH 7.5) containing no Fe. Data are means  $\pm$  SD of two independent experiments with three replicates.

of Fe-EDDHA the recovery of  $^{59}\text{Fe}$  accounted to 63% of the chelate loaded on to the column.

The ability of LS to solubilize native Fe from Eutric cambisol soil samples was evaluated loading different amounts (50, 500 or 5000 nmol) of LS2 (LS able to form Fe-LS complexes with the highest mobility through the soil column) on the top of soil columns and measuring the elution of Fe. The amount of Fe collected outside of the column was slightly increased (+3%) with respect to the control (water) only when 5  $\mu\text{mol}$  of LS2 were applied (data not shown). For comparison, the loading of 50nmol of EDDHA caused an increase of about 42 % of Fe recovered outside the column (data not shown).

**Table 3:** Elution of  $^{59}\text{Fe}$ , pre-loaded as  $^{59}\text{FeLS}$ , through a soil (Eutric cambisol) column. The eluent is a nutrient solution (A, buffered with 10mM HEPES-KOH pH 7.5) containing no Fe. Percentage of  $^{59}\text{Fe}$  eluted with respect to the 5nmol of  $^{59}\text{Fe}$  pre-loaded on the top of the column, are also reported.

Elution of  $^{59}\text{Fe}$  pre-loaded as  $^{59}\text{Fe-EDDHA}$  was  $3162 \pm 87$  pmol (63.2% of the  $^{59}\text{Fe}$  pre-loaded on the column).

	$^{59}\text{Fe}$ eluated		
	pmol	%	
<b>Fe-LS1</b>	$87 \pm 11$	$1.7 \pm 0.2$	c
<b>Fe-LS2</b>	$230 \pm 36$	$4.6 \pm 0.7$	a
<b>Fe-LS3</b>	$107 \pm 13$	$2.1 \pm 0.3$	c
<b>Fe-LS4</b>	$163 \pm 26$	$3.3 \pm 0.5$	b

Data are means  $\pm$  SD of four replicates. Different letters in the same column denote significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

### 3.2 Utilization of $^{59}\text{Fe}$ from $^{59}\text{Fe-LS}$ by roots of intact Fe-deficient tomato plants

To verify the capacity of tomato plants to use Fe-LS complexes as a Fe sources, Fe-deficient 34-d-old plants were incubated for 24 hours in a nutrient solution (pH 7.5) supplied with  $^{59}\text{Fe-LS}$  complexes at a final Fe concentration of  $1\mu\text{M}$  Fe and  $1.1\mu\text{M}$  LS; a solution containing  $1\mu\text{M}$   $^{59}\text{Fe-EDDHA}$  was used as control. Results reported in Table 4 show that plants were able to absorb  $^{59}\text{Fe}$  from those sources. With the exception Fe-LS4, uptake and translocation of  $^{59}\text{Fe}$  from Fe-LS complexes was higher than that observed when plants were supplied with  $^{59}\text{Fe-EDDHA}$ .  $^{59}\text{Fe}$ -uptake and translocation from  $^{59}\text{Fe-LS4}$  were respectively similar or even lower than those observed in  $^{59}\text{Fe-}$

EDDHA treated plants. Roots of intact Fe-deficient tomato plants were also able to reduce Fe(III) complexed by LS.

**Table 4:** Uptake and translocation of  $^{59}\text{Fe}$  by Fe-deficient tomato plants treated in nutrient solution (pH 7.5) with  $^{59}\text{Fe}$ -LS or  $^{59}\text{Fe}$ -EDDHA (1  $\mu\text{M}$  Fe).

Values of Fe(III)-LS or Fe(III)-EDDHA reduction (10  $\mu\text{M}$  Fe) by roots of intact plants, are also reported.

	Uptake (nmol $^{59}\text{Fe}$ g $^{-1}$ root DW in 24h)	Translocation (nmol $^{59}\text{Fe}$ g $^{-1}$ root DW in 24h)	Reduction of Fe <sup>III</sup> -sources (nmol Fe <sup>2+</sup> g $^{-1}$ root FW h $^{-1}$ )
<b>Fe-LS1</b>	2044 $\pm$ 385 a	263 $\pm$ 97 a	150 $\pm$ 52 b
<b>Fe-LS2</b>	1720 $\pm$ 218 a	194 $\pm$ 65 ab	231 $\pm$ 37 b
<b>Fe-LS3</b>	1992 $\pm$ 140 a	299 $\pm$ 122 a	163 $\pm$ 48 b
<b>Fe-LS4</b>	1241 $\pm$ 101 ab	55 $\pm$ 14 c	239 $\pm$ 63 b
<b>Fe-EDDHA</b>	1120 $\pm$ 147 b	147 $\pm$ 59 b	634 $\pm$ 107 a

Data are means  $\pm$  SD (four replicates for the uptake and translocation experiment, three replicates in the case of the Fe(III)-reduction assay). Different letters within the same line denote significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

### 3.3 Uptake and translocation of foliar applied $^{59}\text{Fe}$ -LS complexes in intact Fe-deficient tomato and cucumber plants

Uptake and translocation of Fe from Fe-LS complexes by intact leaves were evaluated putting in contact half of fully-expanded young leaves (the three apical leaflets) of intact 34-d-old Fe-deficient tomato plants with 1 mM  $^{59}\text{Fe}$ -LS complexes for 1 minute and by measuring  $^{59}\text{Fe}$  tissues content 7 days after  $^{59}\text{Fe}$ -LS application (1 mM Fe and 1.1 mM LS); a solution containing 1mM  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA was used as control. Results presented in Table 5 show that leaves of tomato plants were able to utilize  $^{59}\text{Fe}$  from Fe-LS complexes supplied by foliar application. Values of  $^{59}\text{Fe}$  uptake from  $^{59}\text{Fe}$ -LS, calculated as the total amount of  $^{59}\text{Fe}$  accumulated in the whole plant on a gram dry weight basis of the treated leaf portion, were lower than those recorded when Fe was supplied as from  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA. Furthermore a lower amount of  $^{59}\text{Fe}$  was translocated to untreated tissues in  $^{59}\text{Fe}$ -LS treated plants. Results concerning the relative distribution of  $^{59}\text{Fe}$  in the parts of plant that were not directly treated with  $^{59}\text{Fe}$  sources, show that the highest levels of  $^{59}\text{Fe}$  translocation occurred toward the leaves formed after the  $^{59}\text{Fe}$  application, irrespective of the Fe sources.

In order to evaluate the utilization of Fe from foliarly applied Fe-LS sources in a different plant species, the same experiment was performed using 18-d-old Fe-deficient cucumber plants. Table 6 shows that, with the exception of  $^{59}\text{Fe}$ -LS4,  $^{59}\text{Fe}$  accumulation from  $^{59}\text{Fe}$ -LS and  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA showed similar values. Low values of  $^{59}\text{Fe}$  translocation to

the untreated plant tissues were recorded, particularly when Fe-LS were used. With the exception of the oldest leaves, Table 6 shows that the micronutrient was distributed essentially in similar amount inside the different untreated plant tissues, irrespective of the Fe-source.

**Table 5:** Uptake and translocation of foliarly applied  $^{59}\text{Fe}$ -LS or  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA in Fe-deficient tomato plants measured 7-days after leaf application. Values in parentheses represent percentage of  $^{59}\text{Fe}$  translocated to the untreated part of the plants. Values of  $^{59}\text{Fe}$  distributed into untreated different plant tissues (expressed as percentage  $^{59}\text{Fe}$  translocation) are also reported.

	Uptake (nmol $^{59}\text{Fe}$ g $^{-1}$ treated-leaf DW)	Translocation	Distribution of $^{59}\text{Fe}$ in different untreated plant tissues (%)				
			Untreated leaf section	Old leaves	New leaves	Stem	Root
<b>Fe-LS1</b>	35 ± 6 c	6 ± 1 c (18)	9.4 ± 1.4 b	3.9 ± 0.6 a	55.6 ± 8.9 a	16.1 ± 2.8 a	15.0 ± 2.4 ab
<b>Fe-LS2</b>	53 ± 20 bc	11 ± 2 b (21)	9.5 ± 1.7 b	3.3 ± 0.4 a	67.7 ± 11.2 a	8.1 ± 1.2 b	11.4 ± 2.0 b
<b>Fe-LS3</b>	106 ± 49 ab	14 ± 2 b (13)	15.4 ± 2.2 a	3.8 ± 0.5 a	58.5 ± 8.2 a	9.2 ± 1.3 b	13.1 ± 1.8 ab
<b>Fe-LS4</b>	83 ± 26 b	10 ± 2 b (12)	20.8 ± 4.1 a	3.3 ± 0.5 a	48.4 ± 10.1 a	10.0 ± 1.9 b	17.5 ± 3.5 a
<b>Fe-EDTA</b>	254 ± 90 a	59 ± 7 a (25)	16.0 ± 1.7 a	4.0 ± 0.4 a	54.4 ± 5.9 a	10.0 ± 0.9 b	15.6 ± 1.7 a

Data are means ± SD of three replicates. Different letters within the same line denote significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

**Table 6:** Uptake and translocation of foliar applied  $^{59}\text{Fe}$ -LSs or  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA in Fe-deficient cucumber plants measured 7-days after leaf application. Values in parentheses represent percentage of  $^{59}\text{Fe}$  translocated to the untreated part of the plants. Values of  $^{59}\text{Fe}$  distributed into untreated different plant tissues (expressed as percentage  $^{59}\text{Fe}$  translocation) are also reported.

	Uptake (nmol $^{59}\text{Fe}$ g $^{-1}$ treated-leaf DW)	Translocation	Distribution of $^{59}\text{Fe}$ in different untreated plant tissues (%)			
			Old leaves	New leaves	Stem	Root
<b>Fe-LS1</b>	151 ± 68 ab	9 ± 2 b (6)	5.0 ± 0.7 b	30.0 ± 4.1 c	46.6 ± 7.9 a	18.4 ± 2.2 c
<b>Fe-LS2</b>	214 ± 26 a	9 ± 1 b (4)	7.6 ± 0.8 a	54.9 ± 5.9 a	10.1 ± 0.9 c	27.4 ± 3.0 b
<b>Fe-LS3</b>	146 ± 30 ab	6 ± 2 bc (4)	4.9 ± 0.9 b	40.1 ± 7.8 bc	17.4 ± 2.9 b	37.6 ± 5.4 ab
<b>Fe-LS4</b>	105 ± 15 b	4 ± 1 c (4)	5.1 ± 1.1 b	37.4 ± 7.4 bc	22.6 ± 4.1 b	34.9 ± 4.9 b
<b>Fe-EDTA</b>	232 ± 61 a	21 ± 4 a (9)	3.3 ± 0.6 c	41.1 ± 6.8 b	5.4 ± 1.0 d	50.2 ± 9.5 a

Data are means ± SD of three replicates. Different letters within the same line denote significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

Table 7 shows that Fe(III)-LS complexes could be reduced by tomato leaf discs at levels comparable or even higher than those observed using Fe(III)-EDTA. Leaf discs of cucumber plants also exhibited Fe(III)-reducing capacity, but at very low levels especially when Fe-LS complexes were used.

**Table 7:** Reduction of Fe(III)-LS or Fe(III)-EDTA by leaf discs of Fe-deficient tomato or cucumber plants. The measurements were performed in darkness.

	TOMATO	CUCUMBER
	(nmol Fe <sup>2+</sup> g <sup>-1</sup> FW h <sup>-1</sup> )	
<b>Fe-LS1</b>	53 ± 12 b	4.9 ± 2.1 b
<b>Fe-LS2</b>	93 ± 15 a	4.2 ± 2.2 b
<b>Fe-LS3</b>	41 ± 3 b	5.1 ± 2.8 b
<b>Fe-LS4</b>	78 ± 6 a	9.8 ± 3.2 ab
<b>Fe-EDTA</b>	45 ± 15 b	11.7 ± 3.1 a

Data are means ± SD of three replicates. Different letters within the same line denote significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

## 4. DISCUSSION

To cope with Fe-deficiency in the Mediterranean region, field applications of synthetic chelates to the soil or to the canopy are often used, although they are very expensive and only allow a temporary re-greening of the leaves (Tagliavini and Rombolà, 2001). An eco-compatible and cost-friendly alternative to these products might be represented by the use of natural Fe-sources (Chen, 1996).

In the present work we tested lignosulfonates (LS) of different origins with respect to their capacity to provide complexed Fe to plant roots or leaves. In particular, two LS were obtained through sulfite treatment of hardwood (eucalyptus; LS1) and softwood (spruce; LS4) sources. By means of industrial transformations of LS1, new lignosulfonates enriched in functional groups able to complex Fe were obtained (LS2 and LS3).



Data presented here show that LS possess a limited capacity to mobilize Fe from barely soluble Fe-hydroxide (Table 2). Since this experiment was run at pH 7.5, which is closed to that encountered in calcareous soils, it might be concluded that LS are not particularly efficient in complexing endogenous Fe when added to this kind of soils. This idea is further supported by the low mobility of the pre-formed Fe-LS complexes along a soil column (Table 3 and Figure 1), as well as by the low solubilization by LS of endogenous Fe from Eutric cambisol soil samples (data not shown). These data are consistent with known low stability of Fe-LS complexes in alkaline solution (Goos et al. 2001). Furthermore, in a separate experiment (unpublished data) we could demonstrate that after adding Fe-LS to a 1 mM CaCl<sub>2</sub> solution buffered at pH 6.5, about 80-85 % of Fe remained in solution while the percentage of soluble Fe strongly decreased when the pH of the solution increased above 6.5. This behavior appears to be different from that of other natural Fe-sources like e.g. Fe complexed to a water-extractable humic fraction (Cesco et al., 2000). The low mobility of the Fe-LS complexes could be also ascribed to factors like the binding of the complexes to clay and organic particles of the soil as observed for the siderophores ferrioxamine B (Powel et al., 1980). Moreover, in a separate experiment (unpublished results) we also observed that Fe-LS complexes could interact with solid soil components like ferrihydrite and peat. Notwithstanding the general low capacity to mobilize Fe and limited mobility of the Fe-LS complexes, differences among the LS fractions tested were observed with LS2 being the most efficient. Moreover, our data show that, under the experimental conditions used in the present work, the modification of the original LS1, performed in order to increase the acidity of the products, only ameliorates the performance of the original product in the case of LS2.

Although data reported above indicate that LS and their Fe complexes might play a minor role in providing Fe to plants in the soil, when the roots of intact Fe-deficient tomato plants were put in contact with the different <sup>59</sup>Fe-LS complexes in a hydroponic system buffered at pH 7.5, they could absorb and translocate <sup>59</sup>Fe at levels even higher than those observed supplying synthetic <sup>59</sup>Fe-EDDHA (Table 4). The Fe(III)-LS complexes could be reduced by roots of intact plants indicating that the utilization of these Fe-sources occurs, at least in part, via a reduction-based mechanism. However, rates of reduction were significantly lower than those measured with Fe-EDDHA possibly suggesting that use of Fe complexed to LS might also occur via an indirect

mechanism involving ligand exchange with plant-borne chelating agents (Yehuda et al., 1996; Cesco et al., 2002). No significant differences in plant use (uptake and translocation of complexed Fe) were observed among LS1, LS2 and LS3, while LS4 was used at the lowest level. These results indicate that the low Fe use efficiency from Fe-LS observed in soil-applications (Sadiq and Hussain, 1993) is due to interactions of these Fe-sources with soil colloids rather than to the low capability of roots to use them.

In order to prevent or cure mild Fe-chlorosis, a reliable tool could be represented by application of natural Fe compounds as foliar sprays (Tagliavini and Rombolà, 2001; Abadía et al., 2002). In the present work we show that tomato plants were able to utilize  $^{59}\text{Fe}$  from foliarly applied  $^{59}\text{Fe}$ -LS complexes (Table 5). As compared to synthetic  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA, uptake and translocation from  $^{59}\text{Fe}$ -LS to the untreated plant tissues were considerably lower, although the relative distribution in the untreated tissues was similar for all the Fe-sources used and preferentially directed towards new leaves. Reduction of Fe(III)-LS by vacuum-infiltrated leaf discs could be observed in the dark (Table 7), with levels comparable or even higher than those measured using Fe(III)-EDTA. Photoreduction of this latter Fe-source, occurring at high light intensity (Norvell 1991), could explain the higher  $^{59}\text{Fe}$  accumulation. Moreover, the lower uptake rates from  $^{59}\text{Fe}$ -LS might be related to a limited penetration of the leaf cuticle (Fernández et al. 2006).

Cucumber leaves were also able to absorb  $^{59}\text{Fe}$  from  $^{59}\text{Fe}$ -LS at levels similar to those obtained with  $^{59}\text{Fe}$ -EDTA (Table 6). However,  $^{59}\text{Fe}$  translocation to untreated plant tissues was very poor and not clearly directed toward a specific sink. Fe(III)-reduction by leaf tissues showed lower values when Fe(III)-LS were used as substrate as compared to Fe(III)-EDTA.

In conclusion, results of the present work clearly show that Fe applied to leaves as Fe-LS complexes can be absorbed by tomato and cucumber leaf cells via Fe(III)-reduction-based mechanism and therefore translocated to untreated plant tissues; these observations suggest that the practice of foliar application with Fe-LS complexes might be an eco-compatible and cost-friendly Fe source alternative to synthetic chelates, although showing a lower efficiency and different use among plant species. Fe-LS complexes might be used also by roots, and the possible use of these natural Fe-complexes in hydroponic growth system might be taken into consideration. In calcareous soil conditions it is unlikely that suitable amounts of Fe would reach the

roots. Data here presented also show that treatments to increase the amount of functional groups did not lead to any clear ameliorative effect on the capability of the products to increase Fe availability for plants. Nevertheless, indicate that in general eucalyptus LS presented higher efficiency than those obtained from spruce.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Work funded by the Italian Ministry for University Education and Research (MIUR), the Spanish Ministry of Education and Science (Projects AGL2004-07849-C02-01/AGR and AGL2007—63756) and by the DGUI of the Comunidad Autónoma de Madrid and the Autónoma University of Madrid (Project CCG07-UAM/AMB-1567/07). P. Rodríguez-Lucena was supported by a Spanish Ministry of Science and Education “FPI” pre-doctoral contract co-financed by the European Social Fund.

## REFERENCES

- Abadía A, Sanz M, de las Rivas J and Abadía J.** 2002. Correction of iron chlorosis by foliar sprays. *Acta Hort* 594:115-121.
- Álvarez-Fernández A, García-Laviña P, Fidalgo C, Abadía J and Abadía A.** 2004. Foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Plant Soil* 263:5-15.
- Aly S S M and Soliman S M.** 1998. Impact of some organic acids on correcting iron chlorosis in two soybean genotypes grown in calcareous soil. *Nutr Cycl Agroecosys* 51:185-191.
- Bienfait H F, Van den Briel W and Mesland-Mul N T.** 1985. Free space iron pools in roots: generation and mobilization. *Plant Physiol* 78:596-600.
- Chen Y.** 1996. Organic matter reactions involving micronutrients in soils and their effect on plants. In *Humic substances in Terrestrial Ecosystems*. Piccolo A (Ed), 13:507-529.
- Chaney R L, Brown J C and Tiffin L O.** 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol.* 50:208–213.
- Cesco S, Römheld V, Varanini Z and Pinton R.** 2000. Solubilization of iron by water-extractable humic-substances. *J. Plant Nutr Soil Sci.* 163:285-290.
- Cesco S, Nikolic M, Römheld V, Varanini Z and Pinton R.** 2002. Uptake of <sup>59</sup>Fe from soluble <sup>59</sup>Fe-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant Soil* 241:121-128.
- Demeyer A, Verloo M, Ceustermans N and Benoit F.** 2001. Use of lignosulfonates as Fe-chelates for the growth of butterhead lettuce in nutrient film technique (NFT). *Acta Hort.* 548:25-131.
- Fernández V and Ebert G.** 2005. Foliar Iron Fertilization: A Critical Review. *J Plant Nutr.* 28:2113-2124.
- Fernández V, Río V, Abadía J and Abadía A.** 2006. Foliar iron fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): effects of iron compounds, surfactants and other adjuvants. *Plant Soil* 289:239-252.

- Foley F R and Johnson L H.** 1960. Direct determination of sulfonate and nonsulfonate sulphur in Spent Sulfite Liquor. *Anal Chem.* 32:850-852.
- Fredheim G E, Braaten S M and Christensen B E.** 2002. Molecular weight determination of lignosulfonates by size-exclusion chromatography and multi-angle light scattering. *J Chromatography A* 942:191-199.
- Goos R J and Germain S.** 2001. Solubility of twelve iron fertilizer products in alkaline soils. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 32:2317-2323.
- Guzman G, Alcantara E, Barron V and Torrent J.** 1994. Phytoavailability of phosphate absorbed on ferrihydrite, hematite and goethite. *Plant Soil* 159:219-225.
- Jaeger B, Goldbach H and Sommer K.** 2000. Release from lime induced iron chlorosis by CULTAN in fruit trees and its characterization by analysis. *Acta Hort.* 531:107-113.
- Lindsay W L and Schwab A P.** 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J Plant Nutr.* 5:821-840.
- Lindsay W L.** 1991. Iron oxide solubilisation by organic matter and its effect on iron availability. In: *Iron Nutrition and Interaction in Plants.* Eds. Y Chen and Y Hadar. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 29-36.
- Lucena J J.** 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron chlorosis. A review. *J Plant Nutr.* 23:1591-1606.
- Lucena J J.** 2006. Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants. In: *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms.* Eds. Barton L.L., Abadía J. Springer-Verlag Academic Publishers, Dordrecht. pp 103-127.
- Martín-Ortiz D, Hernández-Apaolaza L and Gárate A.** 2009. Efficiency of a zinc lignosulfonate as Zn source for wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) under hydroponic culture conditions. *J Agric Food Chem.* 57:226-231.
- Nikolic M and Römheld V.** 1999. Mechanism of Fe uptake by the leaf symplast: is Fe inactivation in leaf a cause of Fe deficiency chlorosis? *Plant Soil* 215:229–237.
- Nikolic M, Cesco S, Römheld V, Varanini Z and Pinton R.** 2003. Uptake of iron ( $^{59}\text{Fe}$ ) complexed to water-extractable humic substances by sunflower leaves. *J Plant Nutr.* 26:2243-2252.

- Norvell, W A.** 1991. Reactions of metal chelates in soils and nutrient solutions. In *Micronutrients in Agriculture*, 2nd Ed.; Mortvedt, J.J., et al., Eds.; SSSA: Madison, WI. pp. 187–227.
- Pérez-Sanz A, Eymar E and Lucena J J.** 1996. Effects of foliar sprays on turfgrass of an extract of peat and kelp amended with iron. *J Plant Nutr.* 19:1179-1188.
- Pinton R, Cesco S, Santi S, Agnolon F and Varanini Z.** 1999. Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant Soil* 210:145–157.
- Pestana M, Correia P J, de Varennes A, Abadía J and Araújo-Faria E.** 2001. Effectiveness of different foliar iron applications to control iron chlorosis in orange trees grown on a calcareous soil. *J Plant Nutr.* 24:613-622.
- Pobiner H.** 1983. Improved inflection points in the non-aqueous potentiometric titration of acid functionalities in lignin chemicals by using internal standardization and ion exchange. *Analytica Chimica Acta* 155:57-65.
- Rico M I, Álvarez J M and Mingot J I.** 1996. Efficiency of zinc ethylenediaminetetraacetate and zinc lignosulfonate soluble and coated fertilizers for maize in calcareous soil. *J Agric Food Chem.* 44:3219-3223.
- Romheld V and Marschner H.** 1986. Mobilization of iron in the rizosphere of different plant species. In: *Advances in Plant Nutrition*. Eds. B Tinker and A Läuchli. Praeger Scientific, New York. pp. 155-204.
- Sadiq M and Hussain G.** 1993. Effect of chelate fertilizers on metal concentrations and growth of corn in a pot experiment. *J Plant Nutr.* 16:699-711.
- Tagliavini M and Rombola A D.** 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems—review. *Eur J Agronomy* 15:71–92.
- Yehuda Z, Shenker M, Römheld V, Marschner H, Hadar Y and Chen Y.** 1996. The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. *Plant Physiol.* 112:1273–1280.
- Zancan S, Cesco S and Ghisi R.** 2006. Effect of UV-B radiation on iron content and distribution in maize plants. *Environm Exp Bot.* 55:266-272.

---

**Eficacia de la aplicación foliar de complejos Lignosulfonato/ $\text{Fe}^{3+}$  para corregir deficiencias de Fe en planta de pepino (*Cucumis sativus* L. cv Ashley)**

***RESUMEN***

La capacidad de cuatro lignosulfonatos (LS) para complejar Fe fue evaluada. Las características estructurales de los diferentes complejos y agentes complejantes se dilucidaron mediante espectroscopía FTIR, y se estudió la estabilidad de los complejos a diferentes pH. La capacidad de los complejos Fe-LS para aportar Fe a la planta se estudió en primer lugar midiendo la actividad  $\text{Fe}^{3+}$ -quelato reductasa en discos de hojas de plantas de pepino cloróticas, y a continuación se realizaron dos ensayos para evaluar el aporte de Fe a plantas a través de rociados foliares con complejos LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$ , comparando su efectividad con la del EDTA/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$ . Fe-LS. El primer experimento fue de corta duración (11 días) y se realizó una única aplicación de los tratamientos. En el segundo los tratamientos se aplicaron dos veces y las plantas se muestrearon a las tres semanas desde la primera aplicación. Los LS resultados obtenidos indican que los LS presentaban una buena capacidad para complejar Fe y mantenerlo en disolución hasta pH 7.5, y los complejos LS/ $\text{Fe}^{3+}$  podían ser reducidos por la enzima  $\text{Fe}^{3+}$ -quelato reductasa. Sin embargo, al ser aplicados a plantas de pepino mediante rociados foliares se comprobó que aunque los complejos LS/ $\text{Fe}^{3+}$  eran capaces de aportar Fe a las plantas, eran menos eficaces que el EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  en este tipo de aplicaciones. Su eficacia aumentó cuando las plantas recibieron una segunda aplicación de los tratamientos.

**Effectiveness of foliar application of Lignosulfonate/Fe<sup>3+</sup> Complexes to Correct Fe Deficiencies in Cucumber (*Cucumis sativus* L. cv Ashley) Plants**

**Patricia Rodríguez-Lucena<sup>a</sup>, Ana Benedicto<sup>a</sup>, Juan J. Lucena<sup>a</sup>, José Angel Rodríguez-Castrillón<sup>b</sup>, Mariella Moldovan<sup>b</sup>, J. Ignacio García Alonso<sup>b</sup>, and Lourdes Hernández-Apaolaza\*<sup>a</sup>**

*<sup>a</sup>Agricultural Chemistry Department, Universidad Autónoma de Madrid, Francisco Tomás y Valiente N° 7, 28049 Madrid, Spain*

*<sup>b</sup>Physical and Analytical Chemistry Department, University of Oviedo, Julián Clavería N° 8, 33006 Oviedo, Spain.*

Submitted to Journal of Agricultural and Food Chemistry



---

***EFFECTIVENESS OF FOLIAR APPLICATION OF LIGNOSULFONATE/Fe<sup>3+</sup> COMPLEXES TO CORRECT FE DEFICIENCIES IN CUCUMBER (CUCUMIS SATIVUS L. CV ASHLEY) PLANTS***

**ABSTRACT**

Four lignosulfonates (LS) were tested with regard to their ability to complex Fe. The main structural characteristics were elucidated by FTIR spectroscopy and their stability at different pH was studied. Leaf plasma membrane ferric reductase was tested to evaluate the capability of the lignosulfonates to supply Fe to the plants by using leaf discs of cucumber (*Cucumis sativus* L., cv Ashley) chlorotic plants. The ability of Fe-LS to supply Fe to cucumber chlorotic plants through foliar sprays was evaluated in two biological experiments using LS/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> in comparison with EDTA/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup>. The first one was shorter and with one foliar application and in the second two foliar applications were done. Lignosulfonates were effective to complex Fe and to keep it in solution until pH 7.5. Fe<sup>3+</sup> reduction rates by the ferric reductase enzyme were higher for LS/Fe<sup>3+</sup> than for EDTA/Fe<sup>3+</sup>. However, plant experiments indicated that LS complexes were less efficient than EDTA/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup>, but could provide Fe to cucumber plants though foliar sprays, and their effectiveness rose when more than one application was performed.

## 1. INTRODUCTION

Iron (Fe) chlorosis is a nutritional disorder that induces interveinal leaf yellowing which can be overcome by application of certain Fe compounds (Carpena, 1966). It is a widespread agricultural problem, especially in crops grown on calcareous soils, where calcium carbonate buffers soil solution pH in the range of 7.5-8.5 (Lindsay and Schwab, 1982) and high bicarbonate concentration is present (Lucena, 2000).

Fe-efficient plants have developed two different strategies to assimilate Fe when its availability is low. Strategy I plants (dicots and nongrass monocots) may increase a plasma membrane-bound  $\text{Fe}^{3+}$  reductase (FC-R) that reduces extracellular chelates/  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$  (Chaney et al., 1972; Bienfait, 1985). The  $\text{Fe}^{2+}$  can be transported into the roots by a plasma membrane transporter (Fox et al., 1996). Inside the root cells,  $\text{Fe}^{2+}$  is oxidized to  $\text{Fe}^{3+}$  and transported as citrate/ $\text{Fe}^{3+}$ , via xylem, to the leaves (López-Millán et al., 2009). Subsequently, a second  $\text{Fe}^{3+}$  reduction step is needed for the uptake of apoplastic  $\text{Fe}^{2+}$  by leaf mesophyll cells, that it is mediated by a leaf plasma membrane ferric reductase (Kim and Guerinot, 2007).

At present, different types of products can be used to overcome Fe chlorosis. The EU Directive No. 2003/2003 (*EU Directive*, 2003) includes chelates (synthetic products of high stability) and complexes (derived natural products or manufacturing by-products) as Fe fertilizers. Chemically, both of them are chelates, because they bind the metal ions through multiple sites. However, based on EU legal terms synthetic Fe chelates are polyamino-carboxylic acids, with a known structure. Fe complexes include a large number of substances (e.g. humates, lignosulfonates, amino acids, gluconate, citrate) with different origins and often with not well-known structures.

Nowadays synthetic Fe chelates are the most efficient remedy to control Fe chlorosis (Lucena, 2006). However, due to its high price and in most of cases scarce degradability, Fe complexes, cheaper and usually more easily degradable than synthetic chelates, are under consideration in spite of their lower efficacy (Aly and Soliman, 1998; Goos and Germain, 2001).

Lignosulfonates (LS) are pulp and paper industrial by-products obtained during the sulfite pulping process, when original lignin is broken down and fragments are made

water-soluble by the introduction of sulfonic acid groups. LS are polymers formed by hydrophilic (sulfonic and carboxylic acid, and phenolic hydroxyl groups) and hydrophobic groups (carbon chain). LS are anionic surfactants that exhibit some wettability, adsorptivity and dispersibility (Pang et al., 2008), which may promote surface adsorption, foaming and further particle dispersion. Among their applications, LS are commonly used as dispersing agents, binders and complexing agents. The correction of micronutrient deficiencies with metal-LS complexes has been assayed by several authors, concluding that LS could provide Zn and Fe to plants grown in hydroponics (Demeyer et al., 2001; Martín-Ortíz et al., 2009). On the other hand, a negligible amount of Fe remained in solution after one day of incubation when two commercial Fe-LS interacted with different calcareous soils (Goos and Germain, 2001), indicating their scarce ability to supply Fe to plants under calcareous soil conditions. Also they have shown a low mobility in a pH 6.5 soil column irrigated with a pH 7.5 buffered nutrient solution (Rodríguez-Lucena et al., 2009). This fact was also observed when Zn-LS were applied to calcareous soils (Álvarez et al., 1996). Given the scarce stability shown by Fe-LS under calcareous soil conditions foliar application of Fe-LS complexes can be used as an alternative way to overcome Fe chlorosis. This type of applications have been tested with synthetic chelates, natural complexes and inorganic salts (Pestana et al., 2001; Nikolic et al., 2003; Fernández et al., 2006; Rodríguez-Lucena et al., *in press*) with variable results, due to the different factors controlling foliar absorption (characteristics concerning the treated leaf, the type of molecule and surfactant applied, etc.) and difficulties in achieving an optimum formulation of foliar fertilizer (Fernández et al., 2006).

For years the absorption and translocation of Fe in the plant has been studied using different approaches. Many authors suggest the use of radioactive isotopes as  $^{59}\text{Fe}$  (Cesco et al., 2002). However, the use of this isotope requires specific laboratory facilities, trained personal and does not allow long-term trials because the isotope activity drops over time. Mössbauer spectroscopy using  $^{57}\text{Fe}$  has also been used in the study of the Fe chemistry in plants (Kóvacs et al., 2005), but the concentration of Fe in plant tissues is usually too low to be detected by this technique. As an alternative, ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) can be used for studying the  $^{57}\text{Fe}$  in plant tissues using isotope pattern deconvolution (Rodríguez-Castrillón et al., 2008). The main advantage of this technique lies in the high precision and the low detection limits.

Moreover, since  $^{57}\text{Fe}$  is a stable isotope, no special requirements are necessary to handle with it and long-term experiments can be performed.

Although LS have a good ability to complex Fe, to our knowledge most of the studies evaluating their ability to solve Fe chlorosis are referred to commercial complexes and do not establish any relationship between the characteristics of the LS and their effectiveness. In the present work four LS, differing in their physical and chemical characteristics, were compared with regard to their ability to complex Fe. The chemical and structural characteristics of the LS and Fe-LS were determined, and the stability of the Fe-LS at different pH and in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  was also evaluated. In order to test if Fe-LS complexes can be used by leaves to overcome Fe chlorosis, the activity of leaf plasma membrane ferric reductase was studied in cucumber leaf discs. Then two biological experiments were performed to test the ability of LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  to provide Fe to mildly Fe deficient cucumber plants grown in hydroponics when applied through foliar sprays. In the first assay, only one application was performed to evaluate the uptake and redistribution of  $^{57}\text{Fe}$  occurred as well as the efficiency of the treatments. The effect of the number of foliar applications in the effectiveness of the LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  was studied in the second experiment.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Reagents**

All reagents used to study Fe complexing ability and determine soluble and complexed Fe [ $\text{H}_2\text{O}_2$ , HCl and NaOH (PA, Panreac)], to form the Fe complexes [ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (PA, Panreac)], to study the effect of pH and  $\text{Ca}^{2+}$  on soluble Fe [ $\text{CaCl}_2$  (PA, Panreac), and HEPES, MES, CAPS and AMPSO (Merck)], to measure the leaf plasma membrane reductase activity [ $\text{CaSO}_4$ , KCl (PA, Panreac),  $\text{Na}_2\text{BPDS}$  (Fluka) and  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Tritiplex III, Merck)], to grow plants in the biological experiments [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{NiCl}_2$ , NaCl,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$  (PA, Panreac)] and in the digestion of plant material [ $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and HF (Suprapur, Merck)] were of recognized analytical grade. The water used for the preparation of reagents or standards conforms to EN ISO

3696:1987, grade I, free of organic contaminants (Millipore, Milford, USA).  $^{57}\text{Fe}$  was obtained from Isoflex (San Francisco, CA, USA) as elemental powder (metal form, 95.38 % isotopic enrichment). EDDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  (Torneo ®) used to grow Fe sufficient plants in the leaf plasma membrane reductase activity was obtained from Bayer Hispania, S.A.

## 2.2 Characterization of the LS

Lignosulfonates (LS), kindly provided by Lignotech Ibérica S.A., were already described somewhere else (Rodríguez-Lucena et al., 2009). In brief, LS liquid samples were obtained through sulfite treatment of hardwood (eucalyptus; LS1) and softwood (spruce; LS4) sources. LS2 and LS3 derived of the chemical modification of LS1 to increase the amount of functional groups in the molecule capable to complex Fe. In LS2 the percentage of sulfonic and carboxylic groups with regard to LS1 was increased. LS3 presented higher percentage of sulfonic groups than LS2. With regard to the spruce LS (LS4), it mostly differs from the others in its highest Mw and LS content. The main characteristics of the LS (pH, dry content, LS content, carboxylic and phenolic OH concentration, organic S concentration, and molecular weight [Mw]) are reported in Table 1.

**Table 1:** Characterization and complexing ability of the LS tested

	LS1	LS2	LS3	LS4
<b>Wood type</b>		Eucalyptus		Spruce
<b>pH</b>	4.3	6.8	4.7	3.6
<b>Purity</b> (g LS · kg <sup>-1</sup> product)	315	268	317	420
<b>Org. S</b> (g · kg <sup>-1</sup> DW) <sup>b</sup>	51	45	57	55
<b>Phenolic -OH</b> (g · kg <sup>-1</sup> DW) <sup>c</sup>	19	18	18	19
<b>-COOH</b> (g · kg <sup>-1</sup> DW) <sup>c</sup>	35	77	67	26
<b>Mw</b> (g mol <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	6275	7550	7903	25732
<b>Complexing ability</b>				
<b>Mol Fe · kg<sup>-1</sup> LS<sup>e</sup></b>	3.04	3.91	3.92	3.67
<b>Formation of Fe-LS complexes</b>				
<b>% complexed Fe / soluble Fe<sup>f</sup></b>	93.6	99.6	98.3	93.3

DW: Dry weight

<sup>a</sup>Joyce and Kleinert (1957), <sup>b</sup>Foley et al. (1960), <sup>c</sup>Pobiner et al. (38), <sup>d</sup>Fredheim et al. (1983), <sup>e</sup>Villén et al. (2007), <sup>f</sup>European Official method for Fertilizers (methods 9.2 and 9.4 EC 2003/2003 regulation).

### 2.3 Fe Complexing ability of the LS and formation of the Fe-LS complexes and Fe-chelates

The Fe complexing ability of the LS was performed as described by Villén et al. (2007), based in the addition of increasing volumes of a  $\text{FeSO}_4$  solution ( $200 \text{ g L}^{-1}$ ) to 20 mL of LS solution ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ) and the precipitation of non-complexed inorganic forms like oxides or hydroxides at pH 9.0. Complexed Fe (that corresponds to the fraction of Fe that remains in solution) was determined by Atomic Absorption Spectrometry (AAS, Perkin-Elmer Analyst 800) after removal of the organic compounds by digestion and addition of a matrix modifier (EU Directive 2003/2003, methods 9.3, Official Journal of the European Union, 21-11-2003, L 304/1).

Solutions of Fe-LS complexes for each experiment were prepared by mixing a  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$  ( $200 \text{ g/L}$  solutions in both cases) or  $^{57}\text{Fe}$  (dissolved in Suprapur  $\text{HNO}_3$ ) solutions with the suitable amount of LS, calculated on the basis of their highest complexing ability. In all the cases, the LS added was 10 % in excess than the calculated to ensure the total metal complexation. For Fe-EDTA chelates, the ligand was dissolved in Milli-Q water and Fe ( $\text{FeCl}_3$  or  $^{57}\text{Fe}$ ) was added slowly and the amount of Fe was calculated to be 5 % higher than the amount of chelating agent. During complexation or chelation, pH was maintained between 6.0 and 8.0, and finally adjusted to 7.0. Fe-LS and Fe-EDTA solutions were left to stand overnight, filtered through a  $0.45 \mu\text{M}$  Millipore membrane and diluted to final volume with Milli-Q water. Exposure of the complexes or the chelate to light was avoided during their preparation and storage to prevent their potential photo decomposition.

### 2.4 Structural characterization of the LS and the Fe-LS complexes by FTIR spectroscopy

The LS and Fe-LS samples were analyzed by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy in order to determine the main structural characteristics of the complexing agents and complexes. Moreover, the influence of the source of Fe ( $\text{Fe}^{2+}$ , as  $\text{FeSO}_4$ , or  $\text{Fe}^{3+}$ , as  $\text{FeCl}_3$ ) in the structural characteristics of the compounds was also evaluated. After freeze-drying of the LS and the Fe-LS complexes, FTIR analyses were performed. FTIR spectra were obtained on a FTIR Bruker IFS60v spectrophotometer with a MTC detector and diffuse reflectance (DRIFT) accessory. Spectra of the samples were

recorded in the region 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  at a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  using the potassium bromide pellet method, in the transmittance mode. Fe-LS complexes were prepared by mixing LS with  $\text{FeSO}_4$  or  $\text{FeCl}_3$ , the LS:Fe ratio being 1.1:1.0.

## 2.5 Study of effect of pH and $\text{Ca}^{2+}$ on soluble Fe

LS/ $\text{Fe}^{2+}$  were allowed to react in a  $\text{Ca}^{2+}$  solution at various pH to study the stability of the complexes. Five milliliters of LS/ $\text{Fe}^{2+}$  solutions were added to 15 mL of  $10^{-2}$  M buffer solution (HEPES, MES, CAPS, AMPSO) at different pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 and 11.0) and 5 ml of  $5.0 \cdot 10^{-2}$  M  $\text{CaCl}_2$  solution. Samples were shaken for three days at  $25^\circ\text{C}$  and  $56 \text{ min}^{-1}$ . Then, the solutions were filtered through  $0.45 \mu\text{m}$  Millipore membranes and final pH was measured with an Orion Research ion analyzer (EA920). Fe concentration in the filtrate was determined by Atomic Absorption Spectrometry (AAS, Perkin-Elmer Analyst 800) after removal of the organic compounds (EU Directive 2003/2003, methods 9.3, Official Journal of the European Union, 21-11-2003, L 304/1). Three replicates per pH were performed.

## 2.6 Biological experiments

### 2.6.1 $\text{Fe}^{3+}$ reduction by cucumber leaf discs.

Vacuum-infiltrated cucumber leaf discs were used to measure  $\text{Fe}^{3+}$  reduction (LS/ $\text{Fe}^{3+}$  and EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  as substrates). Cucumber seeds were germinated in standard seed germination papers moistened with a macronutrient solution in diffuse light in a growth chamber for 7 days. Uniform seedlings were selected and the stems of two individual plants were wrapped together with polyurethane foam and placed in a 12 L polypropylene bucket (12 pairs of plants per bucket). The buckets contained a continuously aerated EDTA buffered nutrient solution (Degryse et al., 2006) with the following composition: (macronutrients)  $1.0 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $9.0 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{KNO}_3$ ,  $3.0 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{MgSO}_4$ ,  $1.0 \cdot 10^{-4}$  M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; [cationic micronutrients (buffered micronutrient solution)]  $2.5 \cdot 10^{-6}$  M  $\text{MnSO}_4$ ,  $1.0 \cdot 10^{-6}$  M  $\text{CuSO}_4$ ,  $1.0 \cdot 10^{-5}$  M  $\text{ZnSO}_4$ ,  $1.0 \cdot 10^{-6}$  M  $\text{CoSO}_4$ ,  $1.0 \cdot 10^{-6}$  M  $\text{NiCl}_2$ ,  $115.5 \cdot 10^{-6}$  M  $\text{EDTANa}_2$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$  M EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  (for Fe deficient plants),  $5.0 \cdot 10^{-5}$  M EDDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  (for Fe sufficient plants); (anionic micronutrients)  $35.0 \cdot 10^{-6}$  M  $\text{NaCl}$ ,  $1.0 \cdot 10^{-5}$  M,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $5.0 \cdot 10^{-8}$  M  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  and  $1.0 \cdot 10^{-4}$  M HEPES. The pH was adjusted to 7.5 with KOH 1.0 M. Plants were grown for 25 days in this nutrient

solution in a Dycometal type CCK growth chamber provided with fluorescent and sodium vapour lamps with a 16 h, 30 °C and 50% humidity day and 8 h, 25 °C and 70% humidity night regime. Water was added every 2 days, and the nutrient solution was renewed every 7 days. The four LS/Fe<sup>3+</sup> and the EDTA/Fe<sup>3+</sup> were tested as substrates for leaf plasma membrane reductase in Fe deficient plants (grown with 5.0 · 10<sup>-6</sup> M EDTA/Fe<sup>3+</sup>). In order to compare the influence of the nutritional status of plants in the reduction of Fe<sup>3+</sup>, an additional treatment with EDTA/Fe<sup>3+</sup> as substrate and sufficient Fe supply (5.0 · 10<sup>-5</sup> M EDDHA/Fe<sup>3+</sup>) through roots was tested. Blanks without discs but with the complex or the chelate were also studied. Leaf discs (5 mm diameter) were punched by a cork borer from the leaf area without main veins of the third and fourth levels of young leaves of Fe-deficient 25-d-old cucumber plants. Samples containing 40 leaf discs were washed twice for 10 min in 5 mL of washing solution (De la Guardia and Alcántara, 1996; Nikolic and Römheld, 1999) (5.0 · 10<sup>-4</sup> M CaSO<sub>4</sub>, 1.0 · 10<sup>-2</sup> M MES-KOH (pH 6.0) and 1.0 · 10<sup>-3</sup> M KCl). Then the solution was replaced by the 5 mL of the assay solution (5.0 · 10<sup>-4</sup> M CaSO<sub>4</sub>, 1.0 · 10<sup>-2</sup> M MES-KOH (pH 6.0), 1.0 · 10<sup>-3</sup> M KCl, 3.0 · 10<sup>-4</sup> M BPDS, and 1.0 · 10<sup>-4</sup> M LS/Fe<sup>3+</sup> or EDTA/Fe<sup>3+</sup>). After vacuum infiltration (32 kPa) during 20 minutes (2 periods of 10 minutes, after each period the solution was replaced) leaf discs were incubated for 60 min in the assay solution in continuous-orbital shaking (125 rpm) in light at 25°C. Reduction rates were determined as formed BPDS<sub>3</sub>/Fe<sup>2+</sup> by measuring the absorbance at 535 nm against blanks (without leaf discs) with an UV-Visible Recording Spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu) and using extinction coefficient of 22.14 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Fox et al., 1996).

#### 2.6.2 Foliar application of Fe-LS complexes

Two experiments were carried out to test the ability of the LS/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> complexes to provide Fe to cucumber, which is a Fe-efficient strategy I model plant, through foliar sprays.

In both experiments the seeds were germinated as described in chapter 6.1. After germination uniform seedlings were selected and the stem of two plants were wrapped together with foam and placed in 2 L polyethylene vessels (three holes in the lid, six plants per pot). The vessels contained 2 L of continuously aerated EDTA buffered nutrient solution with the same composition than that previously mentioned in chapter 6.1. The pH was buffered at 7.5 with 1.0 · 10<sup>-4</sup> M HEPES and 0.2 g L<sup>-1</sup> of CaCO<sub>3</sub> per pot



were added to simulate the conditions of calcareous soils. Plants were grown in a growth chamber with controlled climatic conditions: photoperiod (day/night) 16/8 h; temperature (day/night) 30/25 °C; R.H. (day/night) 50/70 %. Water was added every 2 days and the nutrient solution was renewed every 7 days.

After 16 days of growth under these conditions chlorotic symptoms appeared and treatments were applied.

*2.6.2.1 Effectiveness of LS/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> as foliar source of Fe for cucumber stressed plants.* The aim of this experiment was to evaluate Fe uptake when LS/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> complexes were applied through foliar sprays. One control with EDTA/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> was fixed. All the plants (three replicates per treatment, one pair of plants per replicate) were sprayed with the treatments at the beginning of the assay and whole plants were sampled after eleven days. Each pair of plants was sprayed at the beginning of the assay with 2 mL of the products at 5.0 · 10<sup>-3</sup> M Fe concentration, by using a nebulizer system. The dose of each treatment was calculated according to the soluble Fe content of the LS (Table 1). For the EDTA/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> plants were sprayed with 2 mL of 5.0 · 10<sup>-3</sup> M EDTA/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup>. In order to evaluate the redistribution of <sup>57</sup>Fe to non treated organs only the first four levels of leaves were treated. Contamination of non treated leaves was avoided by covering them with a plastic sheet during the application of the foliar sprays. Leaf sprays were applied both on the adaxial and abaxial leaf surface. All the solutions were adjusted to pH 5.0 to avoid altering the ion exchange properties of the cuticle. Since LS behave as surface active agents, surfactants were not included in the foliar solutions. For the treatment with EDTA/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> the non-ionic surfactant Tween 80 (PROBUS) was used at 0.1 % (v/v) rate. During the experiments, SPAD readings were taken with a chlorophyll meter (Minolta SPAD-502) for all the leaf stages (average of three readings per leaf). After sampling plant nutritional status and <sup>57</sup>Fe redistribution were studied. The sampled roots, stems, treated leaves and non treated leaves were separated, weighted and washed with 0.1 % HCl and 0.01 % non-ionic detergent (Tween 80) solution, and rinsed twice with ultrapure water. Then, samples were dried in a forced air oven at 65 °C for three days. Micronutrients were determined in roots, stems, treated leaves and non treated leaves after microwave (CEM Corporation MARS 240/50) digestion with HNO<sub>3</sub> 65 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % and HF 40 % by AAS. <sup>57</sup>Fe quantification was carried out by isotope pattern

deconvolution analysis on a Q-ICP-MS instrument (7500 c, Agilent Technologies) (Rodríguez-Castrillón et al., 2008).

*2.6.2.2 Effect of the number of applications.* In this assay, only the four LS complexes were studied (LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$ ). To evaluate the influence of the number of applications performed in the effectiveness of the products, all the plants (three replicates per treatment, one pair of plants per replicate) were sprayed with the LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  complexes at the beginning of the experiment while only half of them received a second application (11 days after since the first application). One control without foliar application of Fe (control -Fe) was fixed. Whole plants were sampled 21 days after the first application of the treatments. The same procedures described in chapter 6.2.1. for the preparation and application of the treatments, SPAD measurements, sampling of plant material (roots, stems, treated leaves, non treated leaves and flowers), preparation and digestion of samples, and measurement of micronutrients and  $^{57}\text{Fe}$  were followed in this experiment.

## 2.7 Statistical analysis.

Data were statistically evaluated using Analysis of Variance (ANOVA) with the program SPSS 15.0 to assess the significance of the main factors and interactions. Means were also compared using Duncan's test at  $P \leq 0.05$  in order to find significant differences between treatments.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Fe Complexing ability of the LS and formation of the Fe-LS complexes

Figure 1 presents the measured versus the added element when the complexing ability was studied. The curves obtained agree with those described by Villén et al. (2007), having a rising segment that corresponds with the complexing process, followed by another decreasing segment that implies the coagulation of the material and/or the precipitation of the excess of Fe. In Table 1 the amount of Fe complexed by each LS, obtained from the intersection point of the two lines, is showed. Once the complexing ability was elucidated, FeLS complexes were formed. The percentage of complexed Fe with regard to soluble Fe was always above 90% (Table 1). For all the LS the amount of

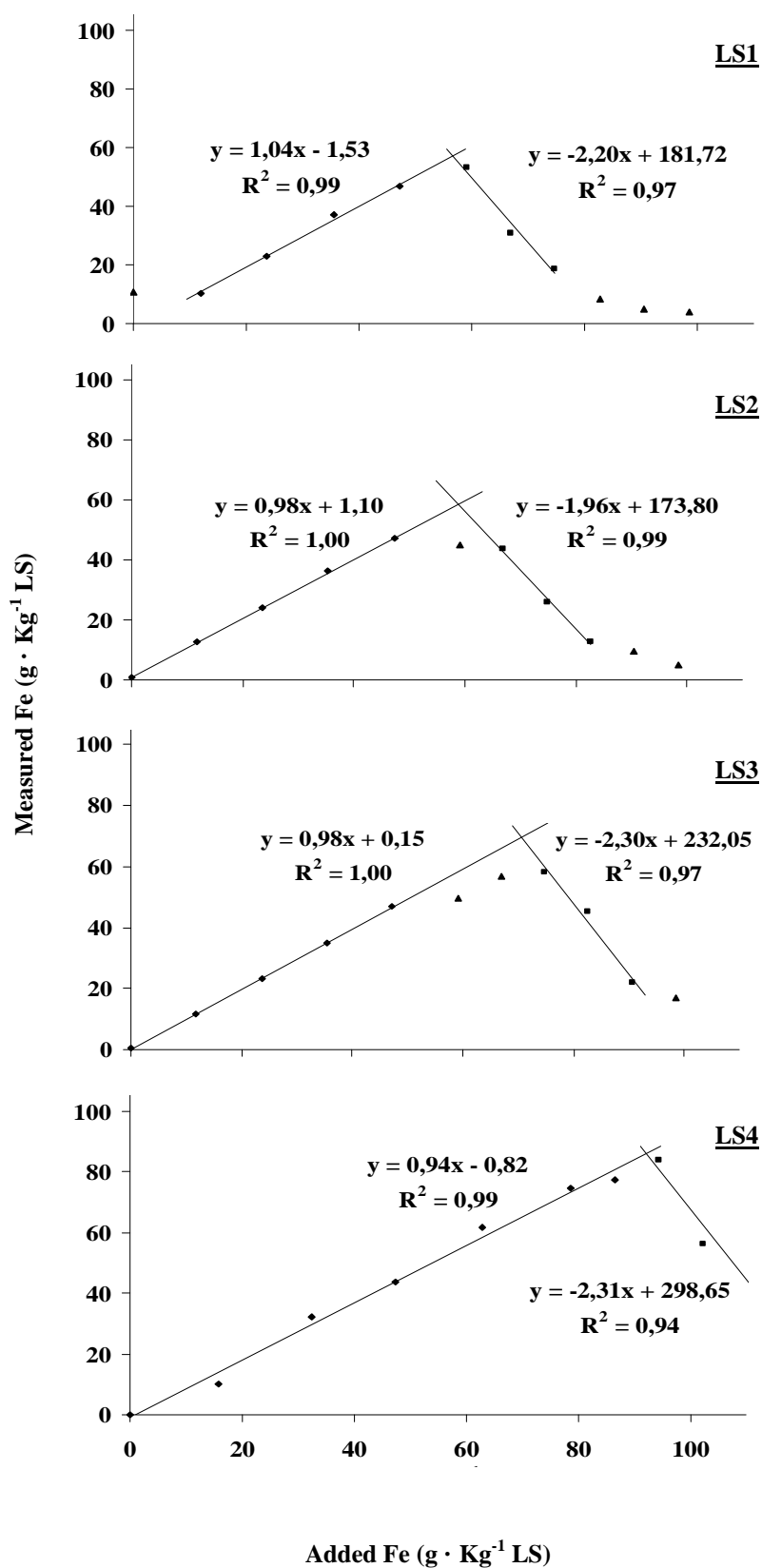


Figure 1: Fe Complexing ability of the LS tested.

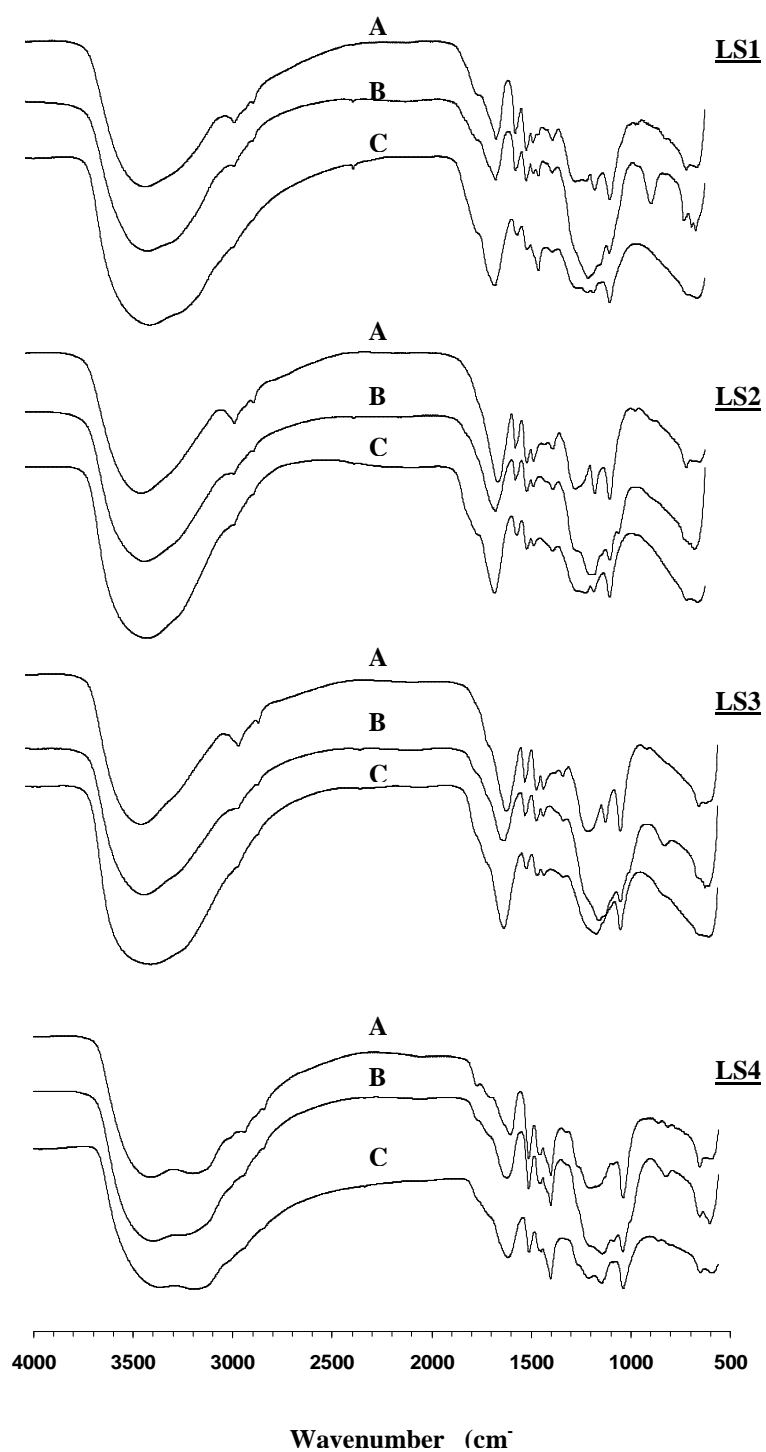
metal complexed and the percentage of complexed Fe with regard to soluble Fe were in the range established by the Spanish Regulations (REAL DECRETO 824/2005), so they can be commercialized as complexes.

Between the non modified LS tested (LS1 and LS4, derived from eucalyptus and spruce respectively) the best complexing ability corresponded to LS4. A similar behavior has been observed by Martín-Ortiz et al. (2009) when the Zn complexing ability of an eucalyptus and a spruce LS was compared. The modifications performed on LS1 (incorporation of carboxylic (LS2) and sulfonic (LS3) groups to its structure) increased the complexing ability of LS2 and LS3 until levels above to those recorded LS4. A similar behavior was observed previously by other authors (Gonçalves and Benar, 2001; Pang et al., 2008).

### **3.2 Structural characterization of the LS and the Fe-LS complexes by FTIR spectroscopy**

The main FTIR bands observed are in agreement with those reported in other works for lignins, technical lignins and LS (Boeriu et al., 2004; El Mansouri and Salvadó, 2007). The FTIR spectra are shown in Figure 2. All the LS follow a common pattern, with a broad band 3600-3300  $\text{cm}^{-1}$  corresponding hydroxyl groups in phenolic and carboxylic acids, less intense bands in the 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  region of the CH stretching in methyl and methylene, attributed to methoxyl groups, and several bands with variable intensity in the fingerprint region (1900 to 800  $\text{cm}^{-1}$ ). In this region the main features appear at 1770  $\text{cm}^{-1}$  (aromatic acetoxy groups), 1715 and 1630  $\text{cm}^{-1}$  (unconjugated carbonyl-carboxyl stretching), 1600 to 1500  $\text{cm}^{-1}$  (C=C skeletal vibrations), 1470-1460  $\text{cm}^{-1}$  (C-H deformation combined with aromatic ring vibrations), 1260  $\text{cm}^{-1}$  (C=O stretch), 1230-1215  $\text{cm}^{-1}$  (C-C, C-O and C=O stretching), 1140  $\text{cm}^{-1}$  (C-H in plane deformation), 1050  $\text{cm}^{-1}$  (complex vibration associated with the C-O, C-C stretching and C-OH bending in polysaccharides) and 840 and 810  $\text{cm}^{-1}$  (C-H out-of-plane deformations). The band appearing at 620-660  $\text{cm}^{-1}$  is assigned to the sulfonic groups (S-O stretching vibration) formed from the reaction of sodium sulfite with the secondary OH of the aliphatic side chain of lignins.

The intensity of several bands varies after the formation of the Fe complexes, indicating that structural changes occur in the molecule due to the addition of the metal.



**Figure 2:** FTIR spectra of the lignosulfonates and Fe-LS complexes (A-LS, B-LS/Fe<sup>2+</sup> complex, C-LS/Fe<sup>3+</sup> complex).

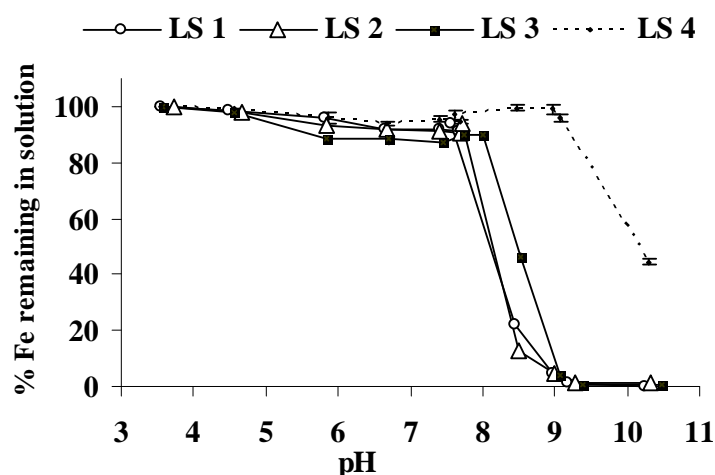
The bands at 2940, 2830, 1715, 1470, 1500 and 1050  $\text{cm}^{-1}$  were always less intense after the complexation of Fe (as  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{3+}$ ). The lower intensity of these bands, associated with CH, carbonyl and carboxyl stretching, CH deformation, aromatic ring vibrations, C=C aromatic skeletal vibrations and the vibrations of C-O, C-C and C-OH in polysaccharides, may be related to the formation of Fe phenolates and carboxylates. The vibration associated to the S-O stretching is also less intense after the addition of Fe, especially for  $\text{Fe}^{3+}$ . Some bands exhibit a higher intensity after complexation, though in this case this behavior is very dependent on the source of Fe added to the LS. An important increment is observed at 1630  $\text{cm}^{-1}$  when  $\text{Fe}^{3+}$  is added that would be ascribed to a major intensity of the unconjugated carbonyl-carboxyl stretching, maybe due to the inclusion of the metal in these structures. This new feature might indicate a higher affinity of these groups for  $\text{Fe}^{3+}$  instead of  $\text{Fe}^{2+}$ . In the case of  $\text{Fe}^{2+}$ , relevant increases in intensity appeared at 1150-1140 and 810  $\text{cm}^{-1}$ , associated to CH deformations (in plane and out of the plane, respectively) that would be favored on the presence of divalent Fe.

In general, hardwood (LS1, LS2 and LS3) and softwood (LS4) LS present a similar pattern, irrespectively of their different origins and characteristics. Various bands have a higher intensity in the case of LS4 (3600-3300, 1500 and 1140  $\text{cm}^{-1}$ ), while some bands are much less intense (2940 and 2830  $\text{cm}^{-1}$ ). Other features barely detected in the eucalyptus LS are more pronounced in this LS (the presence of aromatic acetoxy groups at 1770  $\text{cm}^{-1}$  and C=O stretch at 1260  $\text{cm}^{-1}$ ),

The modifications on LS1 to form LS2 and LS3 are reflected in the spectra at specific bands. The intensity of the bands at 2940, 1630 and 1230-1215  $\text{cm}^{-1}$  is higher for LS2 and LS3 with regard to LS1, indicating major stretching of CH, carbonyl, carboxyl, C-C, C-O and C=O groups in the modified LS. This confirms the enrichment of the molecule with groups capable to complex Fe and is in accordance with the complexing ability obtained for LS2 and LS3 (Table 1). The highest presence of sulfonic groups in LS3 is not reflected in the spectra neither of the LS nor of the complexes, supporting their negligible influence on the process of Fe complexation as observed when the complexing ability was studied.

### 3.3 Effect of pH and $\text{Ca}^{2+}$ on soluble Fe

Figure 3 shows the percentage of soluble Fe remaining in solution after the interaction of the different Fe-LS complexes with a  $10^{-2}$  M  $\text{CaCl}_2$  solution at different



**Figure 3:** Percentage of soluble Fe remaining in a  $10^{-2}$  M  $\text{CaCl}_2$  at different pH after three days of interaction. Data represent means  $\pm$  SE on three independent replicates.

pH. For all the complexes nearly 100 % of Fe remains in solution until pH 7.5. In the case of hardwood complexes (those formed with LS1, LS2 and LS3) precipitation of Fe begins around pH 8, being the percentage of soluble Fe negligible at pH above 9. LS4 (spruce LS) was the only compound capable to maintain significant amounts of soluble Fe above pH 8. The best behavior of the LS4 complexes suggests that the number of strong complexing sites is higher than in the other LS. Since LS4 has the lowest percentage of carboxylic groups and an intermediate percentage of sulfonic groups, this may indicate that although these groups promote Fe complexation (Table 1), they behave like weak complexing sites. Studying  $\text{Ca}^{2+}$  complexation by different modified LS, Pang et al. (2008) concluded that sulfonic groups had little influence on the complexing process, while the complexing ability was lower when the polymer was enriched with carboxylic groups. Our results indicated that both groups promoted complexation (LS2 and LS3), though the complexes formed were less stable than those formed by LS4 under calcareous soils conditions. Thus, other functional groups capable to complex metals must be implicated in the formation of stable complexes by LS4. According to Pang et al. (2008), this better behavior can be ascribed to the presence of

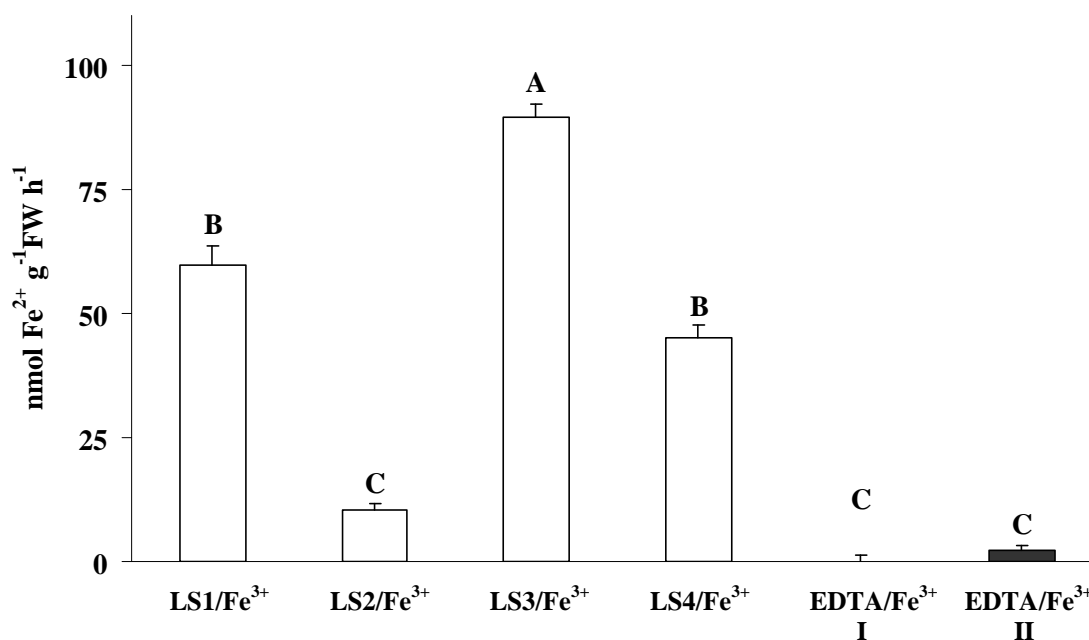
hydroxyl groups, so modifications including hydroxyl groups on LS1 should be taken into consideration to obtain complexes of higher stability.

Although the LS tested showed a good ability to maintain Fe in solution in the range of alkaline pH and in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , it has been demonstrated that the feasibility of these products to maintain Fe in a soluble form when interacting with soils is scarce (Goos and Germain, 2001; Rodríguez-Lucena et al., 2009). However, a good performance of the Fe-LS complexes is expected when applied in hydroponics systems or as foliar sprays, as it has already been observed in previous works with LS/ $^{59}\text{Fe}^{3+}$  complexes (Rodríguez-Lucena et al., 2009).

### 3.4 Biological experiments

#### 3.4.1 $\text{Fe}^{3+}$ reduction by leaf discs

The ability of leaf discs of cucumber Fe deficient plants to reduce LS/ $\text{Fe}^{3+}$  was studied (Figure 4). The highest reduction rate corresponded to LS3 complexes, followed by LS1 and LS4. When the non modified eucalyptus LS (LS1) and the spruce one (LS4)



**Figure 4:** Reduction of  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $\text{Fe} \cdot \text{L}^{-1}$  as LS/ $\text{Fe}^{3+}$  and EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  in light by leaf discs of Fe deficient cucumber plants. For reduction of EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  Fe deficient (EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  I) and Fe sufficient (EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  II) plants were compared.

Data are means  $\pm$  SE of five independent replicates. Different letters among bars denote statistical differences among the treatments at  $P \leq 0.05$ .



were compared, statistical differences were not found. Since the main difference between them is their molecular weight (Table 1), so it can be concluded that the molecular size of the complexing agent is not related with the ability of plants to reduce the Fe complexed by it. Modifications on LS1 to form LS2 and LS3 offered variable results, as LS3 and LS2 present the highest and the lowest reduction rates respectively. The relationship between these modifications and the reduction rate is not clear. Both modifications gave higher Fe complexing capacity than the LS1, but the three eucalyptus LS (LS1, LS2 and LS3) had similar stability at different pH, possibly due to the weak bonds between the metal and the carboxylic and sulfonic groups. This Fe weakly bound was expected to be a good substrate for the enzyme, but no correlation was found between them. LS2 had higher pH (pH 6.8) than the others (around 4.0), this fact might have a great influence on its chemical and physiological behavior, and may explain the reduction rates found. The swelling of the polymer may have occurred for LS1 and LS3 when their pH was increased until the one used in the leaf Fe reduction experiment (pH 6), so Fe chelating groups would be more external and more available to be reduced by the enzyme (Pang et al., 2008).

In the case of EDTA/Fe<sup>3+</sup>, the high photoreduction (Norvell, 1991) of the blanks of this chelate are the reason for the negligible (in chlorotic plants) or very low (in Fe sufficient plants) reduction rates found once the blanks were subtracted, although non statistical differences were found. The lower reduction in Fe deficient plants with regard to Fe sufficient ones is associated to the inhibition of leaf Fe<sup>3+</sup> reductase activity due to

The results of this experiment confirm, as it was already observed in previous works (Rodríguez-Lucena et al., 2009), that LS/Fe<sup>3+</sup> complexes can serve as source of Fe for leaf cells, as well as that they were a better substrate for the leaf FC-R enzyme than EDTA/Fe<sup>3+</sup>.

### *3.4.2 Foliar application of Fe-LS complexes*

#### *3.4.2.1 Effectiveness of LS/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> as foliar source of Fe for cucumber stressed plants.*

The effect of the foliar application of LS/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> to chlorotic cucumber plants was evaluated 11 days after the application of the treatments. One-way ANOVA analysis was used to elucidate if statistical differences due to the treatments appeared in plants dry

weight, SPAD Index, total Fe and concentration of  $^{57}\text{Fe}$  provided by the complex. This analysis indicated that  $^{57}\text{Fe}$  concentration in roots and non treated leaves was strongly influenced by the application of the foliar sprays (at  $P \leq 0.001$   $0.01$  respectively). The application of the treatments also influenced significantly total Fe concentration in non treated leaves (at  $P \leq 0.05$ ). For the dry weight, SPAD Index and root total Fe concentration in roots, statistical differences were not observed.

In Table 2 roots and non treated leaves dry weight, SPAD Index, total Fe concentration and concentration of  $^{57}\text{Fe}$  provided by the complex are reported. Fe concentration (as total Fe and enriched  $^{57}\text{Fe}$ ) in treated leaves and stems were also studied, but since it was not possible to ensure that the spray remaining on their surfaces was completely removed after washing, these data were not taken into consideration in the interpretation of the results. Statistical differences among the treatments were only observed for Fe concentration (as total Fe and enriched  $^{57}\text{Fe}$ ) in roots and non treated leaves, although a clear relationship between both Fe concentrations could not be elucidated with the data here reported.  $^{57}\text{Fe}$  measurements indicated that redistribution of foliar applied Fe occurred, being mostly directed to growing organs (mostly non treated leaves), in agreement with the results reported in previous works (Hüve et al., 2003; Rodríguez-Lucena et al. , 2009). The highest redistribution of enriched  $^{57}\text{Fe}$  occurred for EDTA/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$ . Among LS, translocation of  $^{57}\text{Fe}$  was only directed towards non treated leaves, and non statistical differences among them, were detected. Although none of the LS was clearly more efficient than the rest,  $^{57}\text{Fe}$  measurements indicate that the Fe applied through foliar sprays could be redistributed to non treated organs, so further research optimizing the experimental conditions is necessary. On the other hand, phytotoxicity commonly associated to leaf damage due the use of surfactants (Fernández and Eichert, 2009), was not observed for LS, while burn signs ascribed to the surface active agent could be appreciated in the plants treated with EDTA/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$ .

**Table 2:** Effect of the foliar application of the LS/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> and EDTA/<sup>57</sup>Fe<sup>3+</sup> on cucumber plants dry weight (DW), SPAD Index, total Fe and <sup>57</sup>Fe concentration supplied by the complex when one application of LS/Fe<sup>3+</sup> complexes was performed (plants were sampled 11 days after the application of the treatments).

	Dry weight (g · plant <sup>-1</sup> )		SPAD		[Fe] (µg · g <sup>-1</sup> DW)		[ <sup>57</sup> Fe] supplied as LS/ <sup>57</sup> Fe <sup>3+</sup> (µg · g <sup>-1</sup> DW)	
	Root	Non treated leaves	Non treated leaves	Root	Non treated leaves	Root	Non treated leaves	
	LS1/ <sup>57</sup> Fe <sup>3+</sup>	0.31 ± 0.05 ns	0.47 ± 0.15 ns	29.2 ± 2.3 ns	57.9 ± 3.4 ab	81.9 ± 5.8 a		0.5 ± 0.2 b
LS2/ <sup>57</sup> Fe <sup>3+</sup>	0.45 ± 0.06	0.52 ± 0.09	27.7 ± 0.2	47.0 ± 2.6 b	40.0 ± 5.4 b	0.0 b	0.2 ± 0.1 b	
LS3/ <sup>57</sup> Fe <sup>3+</sup>	0.37 ± 0.07	0.55 ± 0.19	30.0 ± 2.3	56.3 ± 3.7 ab	40.6 ± 3.5 b		0.4 ± 0.1 b	
LS4/ <sup>57</sup> Fe <sup>3+</sup>	0.33 ± 0.02	0.53 ± 0.14	30.4 ± 1.8	68.9 ± 7.4 a	42.1 ± 3.9 b		0.2 ± 0.1 b	
EDTA/ <sup>57</sup> Fe <sup>3+</sup>	0.36 ± 0.09	0.55 ± 0.15	30.5 ± 0.8	59.7 ± 2.0 ab	40.9 ± 8.7 b	1.7 ± 0.1 a	8.8 ± 2.7 a	

Data are means ± SE of three replicates and were analyzed using one-way ANOVA and means were compared with a post-hoc Duncan's contrast. Different letters within the same column denote significant differences among the treatments ( $P \leq 0.05$ ).

ns: non significant.

*3.4.2.2 Effect of the number of applications.*

A second experiment was performed to elucidate if redistribution of  $^{57}\text{Fe}$  supplied as  $\text{LS}/^{57}\text{Fe}^{3+}$  would occur in a longer assay in which two applications of the treatments were done. For that purpose, all the plants were sprayed once with the LS at the beginning of the assay, while only half of them received a second application (11 days after the first application). Whole plants were sampled 21 days after the first application of the treatments. One-way ANOVA was used to elucidate the significance of the application of the treatments (both when they were applied once or twice) on plants dry weight, total Fe concentration, concentration of  $^{57}\text{Fe}$  provided by the complex and SPAD Index. Statistical differences related to the treatments appeared for Fe concentration in roots and flowers (at  $P \leq 0.01$  in both cases), for concentration of  $^{57}\text{Fe}$  supplied by the complex in non treated leaves and flowers (at  $P \leq 0.001$  for both) and for SPAD measurements (at  $P \leq 0.01$ ).

Dry weight, total Fe concentration and concentration of  $^{57}\text{Fe}$  supplied by the complex in roots, flowers and non treated leaves, and SPAD values are reported in Table 3. Redistribution of  $^{57}\text{Fe}$  was directed to growing organs (flowers and non treated leaves).  $^{57}\text{Fe}$  measurements corresponding to the plants sprayed twice indicate that two applications favored  $^{57}\text{Fe}$  uptake and redistribution. When only one application was performed,  $^{57}\text{Fe}$  was directed to non treated leaves and flowers, while if the application was repeated  $^{57}\text{Fe}$  was also detected in roots. These results indicate that  $^{57}\text{Fe}$  was translocated to the organs with the highest demand of Fe (flowers at the phenologic stage of the plants used), but if the application was repeated and more Fe was available, this translocation was also focused in other organs demanding Fe, and agree with those obtained in the assay described above (chapter 4.2.1) and with those described in previous works (Hüve, 2003; Rodríguez-Lucena et al, 2009) for Fe redistribution. On the other hand, the highest effectiveness of the repeated sprays indicated that saturation of the routes of penetration of Fe due to the possible precipitation of sprayed Fe did not occur, even when the number of applications was increased. SPAD values indicate that the application of the treatments promoted leaf re-greening, which was more favored when the foliar sprays were applied twice.

**Table 3:** Effect of the foliar application of the LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  on cucumber plants dry weight (DW), SPAD Index, total Fe concentration and  $^{57}\text{Fe}$  concentration from  $^{57}\text{Fe}$  supplied by the complex in the experiment comparing the number of applications (plants were sampled 21 days after the first application of the treatments).

	Dry weight (g · plant <sup>-1</sup> )			SPAD			[Fe] ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW)			[ $^{57}\text{Fe}$ ] supplied as LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ DW)		
	Root	Non treated leaves	Flowers	Root	Non treated leaves	Flowers	Root	Non treated leaves	Flowers	Root	Non treated leaves	Flowers
<b>1 application</b>												
LS1/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$	0.67 ± 0.08 ns	1.43 ± 0.26 ns	24.5 ± 3.0 ab	68.2 ± 0.3 abcd	33.1 ± 0.6 a	53.2 ± 2.4 c	0.18 ± 0.01 abc			0.13 ± 0.01 b		
LS2/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$	0.73 ± 0.17	1.09 ± 0.16	21.0 ± 1.9 ab	62.9 ± 6.1 bcd	28.9 ± 2.3 ab	84.2 ± 0.5 a	0.09 ± 0.04 bc			0.15 ± 0.01 b		
LS3/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$	0.75 ± 0.10	1.22 ± 0.44	21.3 ± 1.5 ab	83.3 ± 15.6 ab	26.6 ± 1.99 ab	74.7 ± 6.9 ab	0.13 ± 0.03 abc		0.00 c	0.24 ± 0.02 b		
LS4/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$	0.52 ± 0.08	1.13 ± 0.21	19.5 ± 0.8 bc	61.9 ± 2.9 bcd	34.2 ± 3.1 a	79.8 ± 6.5 ab	0.07 ± 0.02 c			0.16 ± 0.03 b		
<b>2 applications</b>												
LS1/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$	0.62 ± 0.12	1.14 ± 0.29	19.3 ± 5.0 bc	71.2 ± 8.5 abc	32.4 ± 4.8 a	53.2 ± 3.8 c	0.02 ± 0.01 bc			0.21 ± 0.05 a		
LS2/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$	0.82 ± 0.02	1.35 ± 0.19	21.6 ± 2.2 ab	53.8 ± 6.1 cd	22.5 ± 2.9 ab	63.0 ± 3.1 bc	0.04 ± 0.01 ab			0.18 ± 0.01 abc		
LS3/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$	0.73 ± 0.15	1.27 ± 0.23	26.2 ± 0.8 a	45.6 ± 6.1 d	30.7 ± 6.9 ab	49.3 ± 1.7 c	0.06 ± 0.01 a			0.16 ± 0.01 abc		
LS4/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$	0.75 ± 0.19	1.63 ± 0.36	24.9 ± 0.9 ab	89.7 ± 2.4 a	23.5 ± 5 ab	51.3 ± 3.2 c	0.05 ± 0.03 ab			0.20 ± 0.04 ab		
Control -Fe	0.65 ± 0.21	1.02 ± 0.35	15.3 ± 0.9 c	60.3 ± 3.9 bcd	20.2 ± 0.7 b	77.6 ± 4.9 ab						

Data are means ± SE of three replicates and were analyzed using one-way ANOVA and means were compared with a post-hoc Duncan's contrast. Different letters within the same column denote significant differences among the treatments ( $P \leq 0.05$ ).  
ns: non significant.

Regarding the differences among LS, none of the complexes was clearly more efficient than the rest. According to SPAD values and enriched  $^{57}\text{Fe}$  concentration in flowers, LS3/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  and LS4/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  were slightly more effective than the rest, but solely when two applications were performed. On the other hand, leaves did not exhibit toxicity signs related to the damage of leaf surface (Fernández and Eichert, 2009), even if the number of applications was increased. Taken together, the results of the biological experiments confirm that LS/ $\text{Fe}^{3+}$  were complexes capable to provide Fe to cucumber deficient plants through foliar sprays, especially when the applications were repeated periodically. The modifications in the initial eucalyptus LS (LS1) improved the performance of this type of LS when enriched with carboxylic and sulfonic groups (LS). In any case, this efficiency was similar to that observed for the spruce non modified LS (LS4). Moreover, since LS exhibit surfactant properties toxicity signs commonly associated to the use of surface (Fernández and Eichert, 2009) active agents are not observed.

All the LS tested in this work present a good ability to complex Fe and high stability in solution under calcareous soil conditions. Since in previous works it was observed that these complexes were scarcely stable in interaction with soils irrigated with a 7.5 pH buffered nutrient solution (Rodríguez-Lucena et al, 2009) their use in hydroponic systems should be considered. Chemical modifications on original LS1 increasing carboxylic and sulfonic group concentration were useful to increase Fe complexing ability of LS2 and LS3 until the levels obtained for LS4. When applied through foliar sprays they are capable to provide Fe to cucumber mildly chlorotic plants, although in a lesser extent than EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$ , redistribution of Fe being favored when foliar applications were repeated. Eucalyptus modified LS3 (enriched with carboxylic and sulfonic groups) behaved similarly to the spruce one (LS4), while LS1 and LS2 were less efficient. Moreover, given that LS exhibit surfactant properties the use of surface active agents which can damage leaf surface and interact with the Fe solutions (Fernández and Eichert, 2009) would not be necessary. Leaf plasma membrane ferric reductase activity indicated that Fe supplied by LS/ $\text{Fe}^{3+}$  complexes could be incorporated by leaf cells. FTIR analysis revealed that structural changes due to the source of Fe used occurred in the LS molecule after Fe complexation and might influence their effectiveness, so more research to elucidate the structural characteristics of LS/ $\text{Fe}^{2+}$  and LS/ $\text{Fe}^{3+}$  complexes is advisable.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Lignotech Ibérica S.A. for providing the LS used in this work. This work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project AGL2007-63756) and by the DGUI of the Comunidad Autónoma de Madrid and the Autónoma University of Madrid (Project CCG07-UAM/AMB-1567 /07). P. Rodríguez-Lucena was supported by a Spanish Ministry of Science and Innovation “FPI” pre-doctoral contract co-financed by the European Social Fund.

## REFERENCES

- Álvarez J M, Rico M and Obrador A.** 1996. Lixiviation and extraction of zinc in a calcareous soil treated with zinc chelates fertilizar. *J Agric Food Chem.* 44:3383-3387.
- Aly S S M and Soliman S M.** 1998. Impact of some organic acids on correcting iron chlorosis in two soybean genotypes grown in calcareous soil. *Nutr Cycl Agroecosys* 51:185-191.
- Bienfait H F.** 1985. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. *J Bioenerg Biomembr.* 17:73-83.
- Boeriu C G, Bravo D, Gosselink R J A and van Dam J E G.** 2004. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Ind Crops Prod.* 20:205-218.
- Carpaena O.** 1966. Contribución al conocimiento de la clorosis férrica en Citrus. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Murcia.. 36 pp.
- Cesco S, Nikolic M, Römheld V, Varanini Z and Pinton R.** 2002. Uptake of <sup>59</sup>Fe from soluble <sup>59</sup>Fe-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant Soil* 241:121-128.
- Chaney R L, Brown J C and Tiffin L O.** 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol.* 50:208-213.
- De la Guardia M D and Alcántara E.** 1996. Ferric chelate reduction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves: influence of light, oxygen, iron-deficiency and leaf age. *J Exp Bot.* 47:669-675.
- Degryse F, Smolders E and Parker D R.** 2006. Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions. *Plant Soil.* 289:171-185.
- Demeyer A, Verloo M, Ceustermans N and Benoit F.** 2001. Use of lignosulfonates as Fe-chelates for the growth of butterhead lettuce in nutrient film technique (NFT). *Acta Hort.* 548:25-131.
- El Mansouri N E and Salvadó J.** 2007. Analytical methods for determining functional groups in various technical lignins. *Ind Crops Prod.* 26:116-124.



- Fernández V and Eichert T.** 2009. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Crit Rev Plant Sci.* 28:36-68.
- Fernández V, Río V, Abadía J and Abadía A.** 2006. Foliar iron fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): effects of iron compounds, surfactants and other adjuvants. *Plant Soil* 289:239-252.
- Foley F R and Johnson L H.** 1960. Direct determination of sulfonate and nonsulfonate sulphur in Spent Sulfite Liquor. *Anal Chem.* 32:850-852.
- Fox T C, Shaff J E, Grusak M A, Norvell W A, Chen Y, Chaney R L and Kochian L V.** 1996. Direct measurement of  $^{59}\text{Fe}$ -labeled  $\text{Fe}^{2+}$  influx in roots of pea using a chelator buffer system to control free  $\text{Fe}^{2+}$  in solution. *Plant Physiol.* 111:93–100.
- Fredheim G E, Braaten S M and Christensen B E.** 2002. Molecular weight determination of lignosulfonates by size-exclusion chromatography and multi-angle light scattering. *J Chromatography A* 942:191-199.
- Gonçalves A R and Benar P.** 2001. Hydroxymethylation and oxidation of Organosolv lignins and utilization of the products. *Bioresource Technol.* 79:103-111.
- Goos R J and Germain S.** 2001. Solubility of twelve iron fertilizer products in alkaline soils. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 32:2317-2323.
- Hüve K, Remus R, Lüttschwager D and Merbach W.** 2003. Transport of foliar applied iron ( $^{59}\text{Fe}$ ) in *Vicia faba*. *J Plant Nutr.* 26: 2231-2242.
- ISO 3696:1987.** Water for analytical laboratory use. Specification and test methods.
- Joyce C S and Kleinert T N.** 1957. Short wave-length ultraviolet absorption of various lignins and related substances. II. Lignin determination in sulfite pulping liquors. *Pulp Paper Mag Can.* 6:131-134.
- Kim A S and Guerinot M L.** 2007. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters.* 581:2273-2280.
- Kóvacs K, Kuzmann E, Fodor F, Vértes A and Kamnev A A.** 2005. Mössbauer study of iron uptake in cucumber root. *Hyperfine Interact.* 165:289-294.
- Lindsay W L and Schwab A P.** 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J Plant Nutr.* 5:821-840.

- López-Millán A F, Morales F, Gogorcena Y, Abadía A and Abadía J.** 2009. Metabolic responses in iron deficient tomato plants. *J Plant Physiol.* 166:375-384.
- Lucena J J.** 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron chlorosis. A review. *J Plant Nutr.* 23:1591-1606.
- Lucena J J.** 2006. Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants. In: *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms.* Eds. Barton L.L., Abadía J. Springer-Verlag Academic Publishers, Dordrecht. pp 103-127.
- Martín-Ortiz D, Hernández-Apaolaza L and Gárate A.** 2009. Efficiency of a zinc lignosulfonate as Zn source for wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) under hydroponic culture conditions. *J Agric Food Chem.* 57:226-231.
- Nikolic M and Römheld V.** 1999. Mechanism of Fe uptake by the leaf symplast: is Fe inactivation in leaf a cause of Fe deficiency chlorosis? *Plant Soil.* 215:229–237.
- Nikolic M, Cesco S, Römheld V, Varanini Z and Pinton R.** 2003. Uptake of iron ( $^{59}\text{Fe}$ ) complexed to water-extractable humic substances by sunflower leaves. *J Plant Nutr.* 26:2243-2252.
- Norvell, W A.** 1991. Reactions of metal chelates in soils and nutrient solutions. In *Micronutrients in Agriculture*, 2nd Ed.; Mortvedt, J.J., et al., Eds.; SSSA: Madison, WI. pp. 187–227.
- Pang Y, Qiu X, Yang D and Lou H.** 2008. Influence of oxidation, hydroxymethylation and sulfomethylation on the physicochemical properties of calcium lignosulfonate. *Colloids Surf A.* 312:154-159.
- Pestana M, Correia P J, de Varennes A, Abadía J and Araújo-Faria E.** 2001. Effectiveness of different foliar iron applications to control iron chlorosis in orange trees grown on a calcareous soil. *J Plant Nutr.* 24:613-622.
- Pobiner H.** 1983. Improved inflection points in the non-aqueous potentiometric titration of acid functionalities in lignin chemicals by using internal standardization and ion exchange. *Analytica Chimica Acta* 155:57-65.
- REAL DECRETO 824/2005**, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes y orden APA/863/2008.

- Rodríguez-Castrillón J A, Moldovan M, García Alonso J I, Lucena J J, García Tomé M L and Hernández-Apaolaza L.** 2008. Isotope pattern deconvolution as a tool to study iron metabolism in plants. *Anal Bioanal Chem.* 390:579-590.
- Rodríguez-Lucena P, Hernández-Apaolaza L and Lucena J J.** (*in press*). Comparison of iron chelates and complexes supplied as foliar sprays and in nutrient solution to correct iron chlorosis of soybean. *J Plant Nutr Soil Sci.*
- Rodríguez-Lucena P, Tomasi T, Pinton R, Hernández-Apaolaza L, Lucena J J and Cesco S.** 2009. Evaluation of  $^{59}\text{Fe}$ -lignosulfonates complexes as Fe-sources for plants. *Plant Soil.* (DOI 10.1007/s11104-009-0091-1).
- Villén M, Cartagena M C, Bravo R, García-Mina J M, Martín de la Hinojosa M I and Lucena J J.** 2007. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers and the complexing capacity of complexing agents. *J Agric Food Chem.* 55:5746-5753.



# Capítulo VI:

---

## Discusión General



## ***DISCUSIÓN GENERAL***

En este Capítulo se discuten los resultados más relevantes de los trabajos incluidos en esta memoria en relación con los objetivos específicos planteados en el Capítulo II, y que ya fueron discutidos individualmente en los Capítulos III, IV y V. Se incluye, por último, una discusión de la posible capacidad de los lignosulfonatos para favorecer la reducción del hierro en los complejos LS/Fe<sup>3+</sup>. Este fenómeno podría estar relacionado, al menos parcialmente, con la limitada eficacia de estos complejos como correctores de la clorosis férrica.

***Objetivo 1: Evaluar la eficacia, al ser aplicados por vía foliar o directamente a la disolución nutritiva, de un amplio grupo de quelatos biodegradables y complejos de hierro presentes en el mercado, o que están siendo estudiados, como correctores de la clorosis férrica en plantas desarrolladas en hidroponía pura. Asimismo se pretende evaluar la relación entre la fracción de Fe complejada/quelada con su estabilidad y efectividad.***

Aunque los quelatos férricos constituyen un medio eficaz para corregir la clorosis férrica, su elevado coste y escasa degradabilidad ha llevado a buscar productos alternativos que aplicados al suelo, a la disolución nutritiva o en rociados foliares permitan corregir este desorden nutricional.

En este sentido, recientemente se han propuesto para su uso agrícola nuevos agentes quelantes biodegradables como el IDHA y el [S,S]-EDDS (Mitschker et al., 2004; Ylivianio et al., 2004, 2006). En cuanto a los complejos, constituyen también una alternativa, más barata y ecológica, para corregir deficiencias de hierro, si bien su uso no se contempla en la legislación europea (Reglamento N° 2003/2003). La española sí autoriza la aplicación de complejos (RD 824/2005 sobre productos fertilizantes Orden APA/863/2008 y), aunque únicamente en aplicaciones foliar o en fertirrigación. El listado de agentes complejantes autorizados en España incluye ácido lignosulfónico, ácido glucónico y heptagluconico, sustancias húmicas, aminoácidos libres y ácido cítrico. El menor coste de los complejos en relación a los quelatos sintéticos los hace apropiados para su aplicación a cultivos anuales, de menor valor añadido que los frutales.

Con los experimentos presentados en el Capítulo III de esta memoria se pretendía realizar una comparación general de la eficacia de diversas formulaciones comerciales de quelatos biodegradables y complejos (naturales o derivados de actividades industriales), para determinar su eficacia en base a criterios de estabilidad. Se evaluaron quince productos (cinco formulaciones de quelatos no fenólicos y diez complejos) indicados en la Tabla 1 del Capítulo III, que fueron aplicados por vía foliar o a la disolución nutritiva de plantas de soja cloróticas desarrolladas en hidroponía pura. Los resultados de ambos ensayos fueron muy variables debido a la distinta naturaleza y, en caso de los complejos también a la procedencia, de los productos estudiados.

Cuando los productos se **aplicaron a la disolución nutritiva**, se trabajó con concentraciones de hierro bajas (5  $\mu\text{M}$ , que se aumentó a 10  $\mu\text{M}$  debido a la escasa recuperación observada, siempre calculado respecto al elemento soluble), que permitiesen observar diferencias en la eficacia de los tratamientos (García-Marco et al., 2006; Lucena y Chaney, 2006). En general, los quelatos se comportaron más eficazmente que los complejos. El aspecto visual de las plantas al final del ensayo se muestra en la Figura 1 del Anexo. Como se esperaba, el análisis estadístico indicó que existía una correlación positiva entre la fracción de Fe quelada, que se asocia con la estabilidad de los quelatos ( $\text{Log } K^{\circ}$ ) y la eficacia de los mismos.

En relación a los quelatos biodegradables estudiados, tanto el EDDS como el IDHA mostraron un comportamiento similar al EDTA1 (la formulación de EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  con mayor eficacia entre las probadas) en lo que se refiere al crecimiento de las plantas, mientras que el reverdecimiento fue claramente superior en el caso del EDDS. La buena respuesta al tratamiento con EDDS/ $\text{Fe}^{3+}$  a pesar de que su biodegradación podría haber provocado una pérdida de eficacia (el 65% de quelato se degrada en 28 días) (Nörtemann, 2005), se asoció a la renovación semanal de los tratamientos y de la disolución nutritiva. Estos resultados coinciden con los observados por otros autores (Yliviaio et al., 2004, 2006) al trabajar con plantas de lechuga tratadas con EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  o EDDS/ $\text{Fe}^{3+}$  (usando una mezcla isomérica de [S,S] (25%), [R,R] (25%) y [R,S/S,R] (50%) o únicamente el isómero [S,S]). Por otra parte, el EDDS también se ha mostrado eficaz solubilizando el Fe precipitado en la superficie de la raíz de plantas de arroz desarrolladas en hidroponía pura bajo condiciones de suelos calizos (Rahman et al., 2008). En el caso del IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$ , a pesar de su menor estabilidad y mayor reactividad



con respecto al EDDS/Fe<sup>3+</sup> y el EDTA/Fe<sup>3+</sup>, relacionada con la presencia de sólo cinco puntos de unión entre el hierro y el agente quelante, los resultados han sido positivos y coinciden con los obtenidos previamente en otros trabajos de nuestro grupo de investigación (Villén et al., 2007a; Lucena et al., 2008). El buen comportamiento de ambos quelatos biodegradables, a pesar de su menor estabilidad con respecto al EDTA/Fe<sup>3+</sup> y de su posible biodegradación en el medio (Tandy et al., 2006) los convierte en una buena alternativa al empleo del EDTA/Fe<sup>3+</sup> en condiciones de reactividad limitada (i.e. fertirrigación, hidroponía pura o fertilización foliar) siempre que se trabaje con formulaciones comerciales en las que se haya reducido la presencia de impurezas (la menor eficacia del EDTA2 y EDTA3 puede ser debida a la menor fracción de hierro quelado por la formación de subproductos durante la síntesis, tal y como indicó la media por HPLC).

En el caso de los complejos son muchas las reacciones que convergen y determinan su estabilidad (muy dependiente del pFe, pH y el ratio Fe:ligando), no observándose correlación entre la fracción de Fe complejada y su efectividad. Se aplicó el método para la determinación del elemento complejado descrito por Villén et al. (2007b) al estudio de la estabilidad de los complejos, demostrándose que productos con buena estabilidad según esta metodología (que presentan una fracción de Fe complejado muy elevada) eran escasamente eficaces.

El efecto de los complejos de hierro en la recuperación de las plantas fue bajo en la mayoría de los casos, y tan sólo las aplicaciones de polipéptidos (poliamina y transferrina) y el Lignosulfonato ofrecieron resultados positivos. Muchos factores limitan y determinan la eficacia de los complejos férricos. El estudio de la fracción de hierro complejada, realizado de acuerdo con la metodología propuesta por Villén et al. (2007b) y asociada a la estabilidad de los complejos a pH 9, indicó que para muchos de los productos evaluados esta fracción era muy baja. Este hecho condicionaría la viabilidad del uso de estos complejos, si bien la eficacia de ciertos productos con una elevada fracción de hierro complejado (citrato y humatos) también se ha sido escasa. Por otra parte, incluso los tratamientos más efectivos (poliamina, lignosulfonatos y transferrina) fueron en general menos eficientes que los quelatos sintéticos. A pesar de todas estas limitaciones, para muchos de estos tratamientos aparecieron diferencias significativas con el control -Fe, sugiriendo que su aplicación tuvo efectos positivos en la planta y que con

otras condiciones experimentales (mayor concentración o mayor frecuencia en las aplicaciones) su eficacia podría haber sido mayor. En todo caso, su capacidad para aportar hierro a la planta, intermedia entre el control –Fe y los quelatos sintéticos, está en la línea de los resultados obtenidos previamente por otros autores, que observaron que el uso de complejos de hierro con humatos, ácidos orgánicos y aminoácidos mejoraba parámetros nutricionales como el Índice SPAD, la concentración de clorofilas, el peso seco (en raíz y/o hoja) y la concentración foliar de hierro en plantas cloróticas, tanto anuales como cítricos, desarrolladas en campo o en condiciones controladas de cámara de cultivo o invernadero (Aly et al., 1998; Cesco et al., 2000; Sánchez-Sánchez et al., 2006; Delgado et al., 2007; Morikawa et al., 2008).

En el caso de la **aplicación foliar de complejos y quelatos de hierro**, los resultados fueron mucho más variables que en las aplicaciones a la disolución nutritiva. No se observaron diferencias significativas entre los quelatos y los complejos, si bien parece que el comportamiento de los quelatos sintéticos fue ligeramente mejor. El aspecto de las plantas al final del experimento se muestra en la Figura 2 del Anexo. La aplicación de hierro se realizó exclusivamente por vía foliar para evitar que el aporte de hierro a través de la raíz dificultase la interpretación de los resultados. Sin embargo, bajo estas condiciones el desarrollo de las plantas fue escaso, lo que pudo afectar a la eficacia de los productos. Se escogió una concentración de hierro en el intervalo de aquellas encontradas en la bibliografía en los rociados foliares (5 mM), y se añadió un surfactante no iónico para aumentar la mojabilidad de la superficie foliar y asegurar un correcto contacto entre ésta y la disolución de hierro aplicada (Fernández y Eichert, 2009). El gran número de variables que condicionan la eficacia de los rociados foliares, asociadas a factores relacionados con el ambiente, con las características de la superficie de la hoja y la planta en general y con la disolución aplicada, limitan el éxito de este tipo de aplicaciones (Fernández et al., 2009). En el experimento descrito en el Capítulo III, estas se realizaron tanto en la cara adaxial como en la abaxial, a primera hora de la mañana para aprovechar la apertura de estomas y la activación de la FC-R en la hoja en presencia de luz, que se relaciona con la utilización del hierro por parte de la hoja (de la Guardia y Alcántara, 1996; Larbi et al., 2001; Kim y Guerinot, 2007). A pesar de ello, las aplicaciones foliares se mostraron poco efectivas mejorando el estado nutricional de las plantas.

Si bien ciertos productos favorecieron el reverdecimiento de las hojas, en algunos casos de manera muy significativa (por ejemplo el EDDS), ninguno se mostró eficaz aumentando la biomasa de las plantas. La concentración de hierro en hoja presentaba valores anormalmente elevados y no se consideró en el análisis e los datos resultados obtenidos, ya que posiblemente una fracción del Fe aplicado por vía foliar permanecía adherida a la superficie tras el lavado de las hojas. Por ello se estudió la redistribución a raíz, que LS era significativa. A la vista de estos datos no es posible determinar que mecanismos favorecieron la redistribución en el caso del LS, si bien probablemente estén asociados a una mayor absorción del hierro aportado en este tratamiento. No obstante la mayor redistribución no mejoró el estado general de las plantas, tal y como se aprecia visualmente en la Figura 2 del Anexo.

**Objetivo 2: Evaluar la eficacia del quelato biodegradable IDHA/Fe<sup>3+</sup> para corregir la clorosis férrica en plantas desarrolladas en hidroponía pura y con distintos grados de deficiencia de Fe al ser aplicado mediante rociados foliares, estudiando la influencia del tipo de adyuvante usado y de la presencia de una fuente adicional de Fe.**

Entre los quelatos biodegradables estudiados en el Capítulo III, en la actualidad la inclusión del IDHA en la lista de agentes quelantes autorizados en agricultura por la UE está en proceso de evaluación. En trabajos previos de nuestro grupo investigador se estudió la eficacia del IDHA/Fe<sup>3+</sup> para suministrar Fe a distintos cultivos (soja, judía verde y tomate). Los experimentos se realizaron en hidroponía y en condiciones de campo, concluyéndose que el IDHA/Fe<sup>3+</sup> era una alternativa al uso del EDTA/Fe<sup>3+</sup> al ser aplicado en hidroponía y fertirrigación, mientras que su gran reactividad con los materiales edáficos desaconseja su aplicación a suelos (Villén et al., 2007a, Lucena et al., 2008). Estos resultados coinciden además con los obtenidos por Rahman et al. (2008), quienes concluyeron que el agente quelante IDHA era poco eficaz solubilizando el Fe precipitado en la superficie de la raíz de plantas de arroz desarrolladas en hidroponía pura en condiciones de suelos calizos.

Por ello, en los experimentos presentados en el Capítulo IV de esta memoria nos propusimos estudiar la eficacia del IDHA/Fe<sup>3+</sup> al ser aplicado mediante rociados foliares a plantas de soja cloróticas desarrolladas en hidroponía pura, evaluando la influencia de un aporte adicional de hierro a través de la raíz y del tipo de adyuvante empleado en la

capacidad de este quelato para corregir la clorosis férrica. En ensayos realizados en campo, la aplicación foliar de IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  a frutales (melocotoneros) con clorosis moderada mostró un comportamiento similar al EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  si el adyuvante añadido era el adecuado (Fernández et al. 2006, 2008a).

A partir de los resultados de nuestros experimentos (Capítulo IV, Tablas 3 y 4) se concluyó que el IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  presentaba una eficacia similar o superior al EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  incrementando el índice SPAD y la concentración de hierro, tanto si el hierro se aportaba únicamente por la vía foliar (Experimento I), como cuando la aplicación foliar era un complemento de la nutrición férrica a través de la disolución nutritiva (Experimento II). Esto indicaría que para ambos quelatos su absorción por la hoja y posterior utilización era similar. Por otra parte, las concentraciones de hierro en raíz en el Experimento I sugieren que existió una redistribución parcial del hierro aplicado por vía foliar incluso si la clorosis de las plantas, que presentaban defoliación y escaso desarrollo radicular, era muy acusada. La aplicación simultánea por vía foliar y radicular (Experimento II) favoreció el desarrollo de las plantas, observándose mayores valores de índice SPAD y concentraciones de Fe más elevadas en las plantas nutridas por ambas vías.

La adición de adyuvantes, especialmente de surfactantes, a las disoluciones usadas como fertilizantes foliares es un requisito necesario en la mayoría de los productos para asegurar el éxito de los rociados foliares. Estos compuestos generalmente reducen la tensión superficial de las disoluciones, aumentan su dispersión y retención en la superficie de la hoja, e incrementan la permeabilidad de la misma. Los surfactantes constituyen un grupo concreto de adyuvantes que modifica directamente las propiedades de las formulaciones aplicadas para de este modo aumentar su eficacia (Schönherr et al., 2005; Fernández y Eichert, 2009). A pesar de los beneficios asociados a su uso, la interacción entre el fertilizante, en nuestro caso el quelato férrico, y el adyuvante pueden dañar la hoja y disminuir la eficacia del quelato. Este efecto puede minimizarse empleando surfactantes no iónicos. En los experimentos presentados en el Capítulo IV comparamos dos surfactantes no iónicos, uno aniónico (basado en glicina) un adyuvante derivado de urea, al aplicarlos en combinación con IDHA/ $\text{Fe}^{3+}$ . Con el fin de minimizar los efectos negativos derivados del uso de surfactantes, se escogieron dos surfactantes no iónicos en los que la fracción hidrofílica estaba constituida por óxidos de etileno (un

alquil poliglucósido y un surfactante a base de ésteres de sorbitol), que presentan normalmente baja fitotoxicidad. También se evaluó la eficacia de un surfactante basado en glicina, ya que este aminoácido es capaz de penetrar la superficie de la hoja y redistribuirse en la planta (Espasa-mansera, 1983). Respecto al empleo de un adyuvante derivado de urea, se ha comprobado ésta favorece la absorción foliar de Fe al aumentar la permeabilidad de las membranas (Swietlik y Faust, 1984). Posee además propiedades surfactantes y constituye un aporte extra de nitrógeno para la planta (Orbovic et al., 2001). Todos los productos probados son biodegradables y presentan escasa o nula toxicidad si son aplicados a concentraciones adecuadas.

Al ser aplicados junto con el IDHA/Fe<sup>3+</sup>, excepto en el caso de la urea siempre se observaron quemaduras en la superficie que podrían asociarse a la interacción entre el surfactante y el quelato (Figura 3 del Anexo). Aunque los surfactantes basados en alquilpoliglucósidos han sido descritos anteriormente como no fitotóxicos (Fernández et al., 2008a), nuestros experimentos indican la existencia de algún tipo de interacción entre el quelato y el surfactante. En este sentido se ha demostrado recientemente que la adición de un surfactante no iónico organosiliconado a una disolución de EDTA/Fe<sup>3+</sup> modificaba el espectro de masas del surfactante (Fernández et al., 2009). El pico característico del EDTA/Fe<sup>3+</sup> continuaba observándose en el valor m/z 344,0 pero además aparecían una serie de moléculas cargadas negativamente en el intervalo m/z comprendido entre 550 y 1000, asociados a la ionización del surfactante en presencia del EDTA/Fe<sup>3+</sup>. Por tanto, no es posible descartar que un fenómeno similar ocurriese en nuestros experimentos y, al menos a nivel superficial, produjese daños en la hoja.

**Objetivo 3: Evaluar la capacidad de extractos de alperujo modificados y de distintos lignosulfonatos para mejorar la nutrición férrica de plantas desarrolladas en hidroponía pura y afectadas por deficiencias de Fe, al ser aplicados a la disolución nutritiva o mediante rociados foliares. Se pretende además evaluar los procesos de absorción y redistribución del Fe aportado por los complejos Fe-LS, mediante el empleo de isótopos (<sup>59</sup>Fe y <sup>57</sup>Fe).**

Además de los quelatos sintéticos, el mercado de fertilizantes incluye un buen número de complejos de hierro y otros nutrientes empleados comúnmente en agricultura para corregir la clorosis férrica y otras deficiencias. La importancia de este tipo de productos, que sólo en España constituye el 30% de los correctores de carencias de

micronutrientes y calcio (Villén, 2007), así como la necesidad de disponer de un conocimiento exhaustivo de su comportamiento y efectividad con el fin de disponer de información detallada para la creación de una listado de agentes complejantes hasta ahora inexistente a nivel europeo, nos llevó a evaluar la viabilidad de un extracto de alperujo modificado y de distintos lignosulfonatos como agentes correctores carencias nutricionales, centrándonos principalmente en las deficiencias de hierro. Los resultados se presentan en los trabajos del Capítulo V (V.1, V.2 y V.3) de esta memoria.

Los alperujos son subproductos derivados de la producción de aceite de oliva. Unos cuatro millones de toneladas de este subproducto, muy rico en ciertos nutrientes como potasio y con gran potencial para complejar metales, se generan anualmente en nuestro país. Su empleo directo como agente complejante no es viable por su difícil manejo, debido a su elevado contenido en agua y a la presencia de restos sólidos procedentes de la aceituna, así como a su contenido en ciertas sustancias que los convierte en fitotóxicos (polifenoles y grasas principalmente). Se han propuesto distintos procesos para modificar las características de los alperujos y con el fin de hallar posibles usos a este subproducto. Entre ellas, las modificaciones propuestas por Canet-Benavent (2006) optimizan las propiedades del alperujo hasta obtener un nuevo producto apto para su uso directo en agricultura como agente complejante. Este extracto de alperujo modificado se denomina “modified olive mill waste” y se cita mediante las siglas OMWm en el Capítulo V.1 de esta memoria.

Respecto a los lignosulfonatos, constituyen desde hace años la familia de complejos de calcio y micronutrientes más numerosa en el mercado español (el 42 % del total), a pesar de que sus características son muy dependientes de la madera original a partir de la cual se producen, así como del tratamiento al que son sometidos tras la separación de la lignina y la celulosa. Estas propiedades determinarán la eficacia de los productos empleados en agricultura, por lo que resulta necesario analizar el comportamiento del complejo en distintas condiciones y su efectividad frente a la planta, relacionándolo con las características del agente complejante inicial. De este modo se podría sistematizar el comportamiento de este tipo de productos. Con este fin se ha estudiado el comportamiento de cuatro lignosulfonatos, tres de ellos procedentes de madera de eucalipto (madera blanda) típica del mercado español de pasta de papel, que se enriquecieron en grupos funcionales capaces de complejar metales (Lignosulfonatos 1,

2 y 3), y uno procedente de madera de abeto (madera dura) tradicionalmente empleada en los países nórdicos en la extracción de pasta de celulosa en los países del norte de Europa (Lignosulfonato 4).

En primer lugar se intentaron dilucidar las principales **características estructurales** del extracto de alperujo modificado y de los lignosulfonatos mediante espectroscopía FTIR. Para el extracto de alperujo modificado, los espectros indicaron que presentaban una estructura similar a la fracción húmica de alperujos sin modificar tras las primeras etapas de compostaje (Ait Baddi et al., 2004), así como la presencia de carboxilos y fenoles capaces de complejar metales. Por otra parte, los espectros de masas del alperujo modificado (Figuras 4 y 5 del Anexo) indicaron que trataba de un polímero constituido por moléculas de bajo peso molecular, que podrían corresponderse con ácidos orgánicos y otros compuestos capaces de complejar metales.

En el caso de los lignosulfonatos no sólo se determinaron las características de los lignosulfonatos originales y sus modificaciones, sino también las de éstos tras complejar el hierro (LS/Fe<sup>2+</sup> y LS/Fe<sup>3+</sup>). La interpretación de los espectros obtenidos indicó que las principales bandas observadas coincidían con aquellas encontradas por otros autores en ligninas obtenidas durante el proceso de producción de pasta de papel y lignosulfonatos (Boeriu et al., 2004; El Mansouri y Salvadó, 2007). Los espectros de infrarrojos confirmaron que en los lignosulfonatos eran abundantes los grupos funcionales capaces de formar complejos metálicos (carboxilatos y fenolatos principalmente). El enriquecimiento en estos grupos se vio además reflejado en los espectros del Lignosulfonato 2 y el Lignosulfonato 3. La formación de los complejos también provocó cambios en los espectros obtenidos. Se observa una disminución en la intensidad de ciertas bandas tras la complejación que se asocia a la formación de fenolatos y carboxilatos de hierro, y que no depende de la fuente de hierro (Fe<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup>) empleada. No obstante, otras bandas aumentaron su intensidad dependiendo de la fuente de hierro. Para el Fe<sup>2+</sup> la mayor intensidad a 1630 cm<sup>-1</sup> se relacionó con el estiramiento asimétrico de carbonilos y carboxilos, que se veía favorecido tras la inclusión del metal. En cuanto a los complejos con Fe<sup>3+</sup>, su formación favoreció las deformaciones de los enlaces C-H, probablemente de las cadenas alifáticas. Por lo demás, las similitudes entre los espectros de los LS/Fe<sup>2+</sup> y LS/Fe<sup>3+</sup> podrían indicar que ambos complejos se encontraban en un estado intermedio de oxidación, habiéndose

reducido parcialmente el  $\text{Fe}^{3+}$  tras la formación de los complejos o habiendo ocurrido la oxidación natural de los complejos con  $\text{Fe}^{2+}$ . En cuanto a las diferencias entre los lignosulfonatos debido a la madera de origen, el lignosulfonato de eucalipto sin modificar (Lignosulfonato 1) seguía un patrón similar al de abeto (Lignosulfonato 4).

El estudio de la capacidad de complejación de micronutrientes metálicos (únicamente con Fe para los lignosulfonatos y con Fe, Zn, Mn y Cu para el extracto de alperujo modificado) se realizó siguiendo la metodología propuesta por Villén et al. (2007b). Ambos agentes complejantes mostraron una buena habilidad para complejar hierro, especialmente en el caso de los lignosulfonatos, si bien las curvas de complejación indican que, tanto para los lignosulfonatos como para el extracto de alperujo modificado, se produjo la coagulación de los complejos y la precipitación de los óxidos e hidróxidos metálicos. Para el extracto de alperujo modificado la capacidad de complejación de hierro era menor que para los lignosulfonatos (Tabla 2 del Capítulo V.1 y Tabla 1 del Capítulo V.3, respectivamente), pero se mantiene tanto para este metal como para el resto de micronutrientes dentro de los límites legales establecidos por el RD 824/2005 y la orden APA/863/2008, por lo cual los complejos Metal-Alperujo aquí presentados podrían comercializarse.

En el caso de los lignosulfonatos, los cuatro productos estudiados diferían en la concentración de grupos funcionales capaces de complejar hierro (Tabla 1 del Capítulo V.3), habiéndose producido el Lignosulfonato 2 y Lignosulfonato 3 a partir de modificaciones del Lignosulfonato 1 (obtenido de madera de eucalipto, normalmente empleada en el mercado español de pasta de papel). El Lignosulfonato 2 presentaba mayor concentración de carboxilos y menos grupos sulfónicos que el Lignosulfonato 1, mientras que en el Lignosulfonato 3 la concentración de azufre orgánico se incrementó ligeramente. En el caso del Lignosulfonato 4 (derivado de madera de abeto) la principal diferencia radicaba en su mayor peso molecular y en la menor concentración de carboxilos respecto a los productos derivados de madera de eucalipto. Al comparar los lignosulfonatos iniciales (Lignosulfonato 1 y Lignosulfonato 4) se concluyó que el lignosulfonato de abeto (Lignosulfonato 4) presentaba una mayor capacidad complejante de hierro, como ya observaron previamente otros autores al comparar lignosulfonatos de distintas procedencias (Martín-Ortiz et al., 2009). Sin embargo, el incremento en grupos



funcionales del lignosulfonato elevó la complejación de hierro hasta niveles superiores a los del Lignosulfonato 4.

Tanto en los complejos como en los quelatos, además de la capacidad de complejación de metales son necesarios estudios de **estabilidad** para determinar la viabilidad del uso de los productos y las condiciones en las que pueden ser aplicados. Frente al buen comportamiento exhibido habitualmente por los quelatos (Goos y Germain, 2001; Álvarez-Fernández et al., 2002), los complejos son el general muy reactivos y poco capaces de mantener el hierro en disolución durante períodos de tiempo prolongados en condiciones de suelos calizos (Goos y Germain, 2001; Villén, 2007). Goos y Germain (2001) estudiaron la estabilidad de diversos complejos y quelatos férricos en ensayos de incubación con suelos calizos (pH 8 - 8.5), concluyendo que para los lignosulfonatos comerciales probados la fracción de hierro soluble encontrada en disolución era insignificante tras un día de interacción. La escasa estabilidad de lignosulfonatos y humatos comerciales a distintos pH y frente a suelos y materiales edáficos, así como en el tiempo, fue corroborada en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Villén, 2007). Para los lignosulfonatos estudiados la fracción de hierro soluble recuperada a pH superiores a 6 descendía de manera importante (60 % a pH 7 y sólo 20 % a pH 9) a los tres días del comienzo de la interacción, y menos del 1 % del hierro aportado permanecía en disolución a los tres días de interacción con suelos calizos. Algo similar ocurrió con el humato comercial estudiado, que siguió las mismas pautas en los ensayos de estabilidad frente a suelos, siendo además escasamente estables en el intervalo de pH de suelos calizos cuando se estudió su estabilidad en disolución en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cesco et al. (2000) también observaron la alta reactividad de la fracción soluble de una sustancia húmica al interaccionar con un suelo calizo. La baja estabilidad de este tipo de productos hace que la legislación española no contemple su comercialización como productos directamente aplicables a suelos, sino tan sólo en fertirrigación o mediante rociados foliares (orden ministerial APA/863/2008).

Al estudiar la estabilidad de los complejos de micronutrientes con extractos de alperujo modificados, ésta fue menor de lo esperada a partir de los datos de complejación. Para los complejos con  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  la fracción de hierro soluble en el ensayo de estabilidad a distintos pH era prácticamente nula a pH alcalinos, mientras que sí se recuperaba hierro soluble cuando los complejos interaccionaban con suelos calizos.

Los complejos con Cu, Mn y Zn presentaban una buena capacidad para mantener en metal en una forma disponible, incluso al pH de suelos calizos, pero eran poco estables en interacción con este tipo de suelos, indicando que el metal podía ser desplazado del complejo y precipitar o quedar adsorbido en el suelo. En todo caso, a partir de los resultados obtenidos en estos experimentos no es posible dilucidar que factores han favorecido la estabilidad de los complejos, ni los fenómenos que han tenido lugar (desplazamiento del metal en el complejo y precipitación, coagulación del complejo, adsorción del complejo y/o del metal). Por ello, para determinar los procesos que han llevado a obtener estos resultados es necesario emplear técnicas como la Fluorescencia o la Espectroscopía Mössbauer, que permitan dilucidar las reacciones que ocurren en el complejo, así como entre el complejo y el suelo.

En el caso de los lignosulfonatos, la estabilidad de los complejos LS/Fe<sup>2+</sup> formados con los cuatro lignosulfonatos modificados se evaluó en función del pH y en presencia de Ca<sup>2+</sup>. Todos se mostraron muy estables hasta pH 7.5. Por encima de este pH sólo el Lignosulfonato 4 era capaz de mantener el hierro en disolución. Estos resultados indicaron que los lignosulfonatos evaluados formaban complejos de mayor estabilidad que los comerciales estudiados por Villén (2007), sugiriendo que es posible obtener complejos de hierro estables si el material original se seleccione cuidadosamente. No obstante, los mismos complejos mostraron una movilidad muy reducida en una columna de suelo a pH 6 saturada con disolución nutritiva a pH 7.5, sugiriendo que la adsorción y/o precipitación del hierro ocurría tras la interacción con dicho suelo. Ninguno de los lignosulfonatos se comportó claramente mejor que el resto. El Lignosulfonato 4 era más estable en los ensayos de pH, mientras que el Lignosulfonato 2 presentaba mayor movilidad que el resto a través del suelo. En todo caso, todo indica que aunque la mayor presencia de grupos carboxílicos y sulfónicos favorecía la formación de complejos, la estabilidad de los complejos formados era baja. Estos resultados están en la línea de los obtenidos por Pang et al. (2008) para complejos LS/Ca<sup>2+</sup>, que indicaban que la capacidad de complejación del lignosulfonato amónico que estudiaron no aumentaba al incrementar la concentración de grupos carboxílicos y sulfónicos. Estos autores concluyeron que eran los radicales hidroxilo de los grupos fenólicos los que favorecerían la formación de complejos estables.

Una vez conocida la capacidad potencial de este tipo de complejos para aportar hierro a las plantas en condiciones de baja reactividad, se evaluó la capacidad de los mismos para servir como **sustrato para la enzima FC-R**, tanto en raíz como en hoja.

La reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  es un requisito necesario para que el hierro pueda ser tomado por la raíz (Chaney et al., 1972, Maschner y Römheld, 1995), y se midió en plantas de tomate desarrolladas en condiciones de deficiencia de hierro (Capítulo V.2, Tabla 4). Todos los complejos LS/ $\text{Fe}^{3+}$  sirvieron como sustrato para la FC-R, si bien la reducción fue mucho menor que al usar *o,o*-EDDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  como sustrato.

Un sistema de reducción similar al observado en raíz tiene lugar en hoja para que el hierro pueda ser asimilado por la célula vegetal (de la Guardia y Alcántara, 1996; Kosegarten et al., 1999; Nikolic y Römheld, 1999; Larbi et al., 2001). Este mecanismo aparece directamente asociado a la fotosíntesis, estando favorecido en presencia de luz, así como en condiciones de suficiencia de hierro (por la mayor producción de NAD(P)H y por tanto la mayor actividad fotosintética en plantas sin deficiencias).

La reducción en hoja se ensayó tanto en oscuridad como con luz. Puesto que la aplicación de rociados foliares tiene lugar habitualmente en plantas con deficiencias de hierro, los ensayos se realizaron con plantas de tomate y de pepino cloróticas. A diferencia de lo observado al medir la reducción en raíz, en hoja los quelatos sintéticos no mostraron un comportamiento claramente más eficaz que los complejos. En oscuridad y a concentraciones de sustrato bajas (10  $\mu\text{M}$ , próximas a las de Fe-citrato en el apoplasto de la hoja) se observó un comportamiento distinto para el tomate y el pepino. La reducción fue mayor en el caso del tomate, lo cual podría asociarse con la distinta eficacia entre ambas especies frente a la deficiencia de Fe. El tomate es menos eficiente que el pepino, y la reducción en hoja podría estar favorecida para contrarrestar la menor adquisición de Fe a través de la raíz. El Lignosulfonato 4 fue el lignosulfonato más eficaz.

La reducción en presencia de luz en plantas de pepino cloróticas se midió usando concentraciones de sustrato mayores (100  $\mu\text{M}$ ), más parecidas a las encontradas en la bibliografía (de la Guardia y Alcántara, 1996; Nikolic y Römheld, 1999). En este caso tuvo lugar la fotorreducción del EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$ , mientras que los mejores resultados correspondieron al Lignosulfonato 3. En conjunto, estos experimentos revelaron que los

lignosulfonatos pueden servir como sustrato para la FC-R en raíz y hoja, si bien ninguno de los cuatro productos evaluados sobresalía claramente entre los demás, y no era posible determinar cuáles de sus características habían favorecido o dificultado la reducción.

Tras comprobar la habilidad potencial de los complejos del extracto de alperujo modificado y de los lignosulfonatos para complejar hierro y aportárselo a la planta, así como la reducida estabilidad de los mismos en condiciones de suelos calizos, se estudió su capacidad para **proporcionar hierro a plantas desarrolladas en hidroponía** pura al ser aplicados a la **disolución nutritiva** o mediante **rociados foliares**.

Para el extracto de alperujo modificado, se estudió el aporte de hierro a plantas de soja cloróticas, comparándolo con el EDTA/Fe<sup>3+</sup> y un complejo LS/Fe<sup>3+</sup> comercial. Al ser aplicados a la disolución nutritiva el extracto de alperujo modificado era más eficaz que un lignosulfonato comercial, pero menos que el EDTA/Fe<sup>3+</sup>. En todo caso, demostró una buena capacidad para proporcionar hierro a la planta. Dada la baja estabilidad de estos complejos al pH de suelos calizos, es probable que una mayor frecuencia en las aplicaciones y el empleo de dosis más elevadas hubiese favorecido la efectividad de los productos. En el caso de las aplicaciones foliares la eficacia era menor, y solo aparecieron diferencias significativas con el control-Fe en cuanto al índice SPAD, sugiriendo que la aplicación foliar de los complejos favoreció el reverdecimiento de las hojas cloróticas. Por tanto, se concluyó que estos extractos modificados podrían constituir una fuente de hierro al ser aplicados en hidroponía, o mediante rociados foliares.

Desde hace décadas el uso de isótopos de hierro como trazadores ha permitido evaluar la adquisición de hierro por la planta y su distribución en los diversos órganos vegetales, así como estudiar diversos procesos metabólicos en los que interviene este micronutriente en el interior de la planta. El hierro tiene cuatro isótopos estables en la naturaleza (<sup>54</sup>Fe, <sup>56</sup>Fe, <sup>57</sup>Fe y <sup>58</sup>Fe). Sin embargo, los estudios de trazabilidad se han realizado tradicionalmente con isótopos radiactivos (<sup>55</sup>Fe y <sup>59</sup>Fe principalmente) debido a la ausencia de materiales enriquecidos con isótopos estables, a su elevado coste y a limitaciones analíticas que dificultaban la medida de los mismos (Álvarez-Fernández, 2006). Sin embargo, el abaratamiento de estos isótopos en los últimos años, junto al desarrollo de técnicas analíticas que permiten su medida, normalmente basadas en ICP-

MS (Rodríguez-Castrillón et al., 2008), ha favorecido el uso de isótopos estables. El uso de isótopos radiactivos requiere personal especializado en su manejo, e implica el riesgo intrínseco derivado de la manipulación de material radiactivo. Además, no son apropiados para estudios prolongados puesto que su actividad va disminuyendo con el tiempo (por ejemplo, en el caso del  $^{59}\text{Fe}$  su vida media son 45 días), y no es posible simultanear el uso de distintos debido al solapamiento de la energía emitida por cada uno de ellos. Los isótopos estables no presentan estas desventajas, y su manejo en laboratorio no requiere personal especializado ni material específico, siendo únicamente necesario desarrollar protocolos para la preparación de las muestras, que normalmente deben enriquecerse con el metal marcado.

Debido a las numerosas lagunas existentes en torno a la eficacia de las aplicaciones foliares de quelatos y complejos férricos, relacionadas tanto con la adquisición del hierro como con la naturaleza de las disoluciones aplicadas y de los distintos compuestos usados, el uso de isótopos constituye una herramienta muy eficaz para evaluar este tipo de aplicaciones. Por ello, en dos de los trabajos incluidos en el Capítulo V (Capítulos V.2 y V.3) de esta memoria estudiamos esta redistribución mediante distintos enfoques empleando  $^{59}\text{Fe}$  y  $^{57}\text{Fe}$ , y dos especies con distinta eficacia frente a la deficiencia de hierro: tomate y pepino.

Empleando  $^{59}\text{Fe}$  como trazador analizamos el efecto de las aplicaciones foliares de  $\text{LS}/^{59}\text{Fe}^{3+}$  a plantas de tomate y pepino (Capítulo V.2). Aunque únicamente se presentan los resultados correspondientes plantas cloróticas, las aplicaciones se realizaron también a plantas sin deficiencia de hierro (Tablas 1 y 2 del Anexo). Los complejos de lignosulfonato se formaron con los cuatro lignosulfonatos previamente descritos (Capítulo V.3, Tabla 1), cuya capacidad de complejación se había determinado según la metodología descrita por Villén et al. (2007b). Los resultados obtenidos indicaron que todos los lignosulfonatos, independientemente de su origen y de sus características eran capaces de suministrar Fe a las plantas tratadas, aunque ninguno era claramente más eficaz que el resto, y siempre en menor medida que el  $\text{EDTA}/^{59}\text{Fe}^{3+}$ . Respecto a las especies estudiadas, la absorción fue mayor en las plantas de pepino que en las de tomate, aunque la redistribución del hierro absorbido era mayor en estas últimas.

Las diferencias entre absorción y redistribución no aparecían asociadas al estado nutricional de las plantas en el momento de las aplicaciones (desarrolladas con o sin

deficiencia de hierro). Las diferencias en redistribución entre ambas especies indican un comportamiento distinto en cuanto a la utilización del hierro aplicado por vía foliar, y podría asociarse a la eficacia de ambas para sobreponerse a la deficiencia de hierro. El tomate es una especie menos eficiente que el pepino, por lo que podría verse favorecida la redistribución del hierro aplicado por vía foliar, al igual que la actividad FC-R en hoja era mayor en esta especie. En el pepino la mayor la mayor activación de la enzima FC-R en raíz y del resto de mecanismos asociados a las plantas eficientes permitiría absorber una mayor cantidad del hierro presente en la disolución nutritiva y dirigirlo hacia los órganos en crecimiento, reduciendo la necesidad de redistribuir el hierro aportado por vía foliar. El uso simultáneo de dos isótopos estables, uno de ellos aplicado a la disolución nutritiva y otro suministrado por la vía foliar, permitiría evaluar estas hipótesis.

Por otra parte, la translocación desde la hoja tratada a otros órganos vegetales ocurre vía floema, mediante la formación de complejos entre el hierro y distintas proteínas. Si bien gran parte de los complejos, mecanismos y transportadores implicados en la redistribución a través del floema se desconocen, se sabe que este transporte ocurre principalmente en forma de complejos de  $\text{Fe}^{2+}$  con nicotiamina ( $\text{NA}/\text{Fe}^{2+}$ ) y de  $\text{Fe}^{3+}$  otras proteínas transportadoras de hierro ( $\text{ITP}/\text{Fe}^{3+}$ ) (Kim y Guerinot, 2007; Briat et al., 2007; López-Millán et al., 2009). La escasa redistribución del hierro a través del floema, a pesar de la existencia de mecanismos específicos para su complejación y transporte, se asocia a la limitada síntesis de NA, ya que la concentración de hierro en la hoja suele ser suficiente (Hell et al., 2003). La limitada producción de NA, independiente de la concentración de hierro en la hoja, ayudaría a explicar la menor redistribución de hierro en las plantas de pepino, que sin embargo absorbieron más  $^{59}\text{Fe}$ .

Ninguno de los lignosulfonatos sobresalió sobre el resto, mientras que el mejor comportamiento del  $\text{EDTA}/\text{Fe}^{3+}$  se atribuyó principalmente a su fotorreducción. La fotorreducción de los quelatos ha sido señalada como uno de los factores que podría favorecer la eficacia de la aplicación foliar de quelatos férricos reactivos frente a la luz, como el  $\text{EDTA}/\text{Fe}^{3+}$  (Bityuskii, 1994; Nikolic et al., 2003). Este proceso favorecería la absorción del hierro por la célula vegetal, y explicaría la mayor eficacia de los rociados con  $\text{EDTA}/\text{Fe}^{3+}$  a pesar de los resultados obtenidos al medir la actividad FC-R en hoja. El  $\text{EDTA}/\text{Fe}^{3+}$  se reduciría sin necesidad de la intervención de la enzima, y podría ser

asimilado por la célula vegetal directamente. El peso molecular es otro de los factores que se ha considerado habitualmente para explicar la eficacia de los productos aplicados por vía foliar, pero trabajos recientes indican que no existe correlación entre el peso molecular y la tasa de penetración (Schönherr et al., 2005; Fernández et al., 2006; Fernández et al., 2008a).

Si bien el empleo de  $^{59}\text{Fe}$  nos permitió dilucidar el comportamiento de los lignosulfonatos que estaban siendo evaluados, la utilización de un isótopo radiactivo impedía evaluar ciertos factores de importancia en este trabajo, como el estudio de la redistribución en períodos de tiempo más prolongados, el uso de concentraciones más elevadas o la aplicación de los productos mediante rociados foliares (en lugar sumergir la hoja en la disolución del complejo). Por ello, en dos nuevos ensayos (Capítulo V.3) se evaluó el comportamiento de los cuatro complejos LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  (concentración de Fe 5 mM) al ser aplicados mediante rociados foliares a plantas de pepino desarrolladas en hidroponía pura con baja concentración de hierro (5  $\mu\text{M}$ ). Además, puesto que los lignosulfonatos presentan propiedades tensoactivas no se añadió ningún tipo de surfactante, algo que sí se hizo en el caso del  $^{59}\text{Fe}$ .

En un primer ensayo (Capítulo V.3, Tabla 2) la eficacia de los cuatro complejos LS/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  se comparó con la del EDTA/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$ , y se observó que ninguno de los lignosulfonatos fue capaz de aportar  $^{57}\text{Fe}$  a la planta a niveles comparables a los del EDTA/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$ . La redistribución en el caso de los lignosulfonatos se dirigía exclusivamente a hojas no tratadas debido a la escasa absorción foliar de hierro, mientras que para el EDTA/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  se encontró en raíz, tallo y hojas no tratadas.

Los resultados de este primer experimento se corresponden con los obtenidos en los trabajos con  $^{59}\text{Fe}$ , e indicaban que los lignosulfonatos pueden servir como fuente de hierro por vía foliar, sin ser necesario emplear surfactantes en la aplicación de estos complejos. Sin embargo, su menor eficacia con respecto al EDTA/ $^{57}\text{Fe}^{3+}$  nos llevó a intentar optimizar las condiciones en las cuales se realizaron las aplicaciones foliares. Para ello en un ensayo similar al descrito previamente se estudió la influencia del número de aplicaciones. Se realizaron dos rociados foliares; en el primero se rociaron todas las plantas, mientras que en el segundo (realizado once días después de la primera aplicación), tan sólo se trataron la mitad de las plantas.

La repetición de los rociados foliares favoreció la absorción y redistribución de hierro a órganos no tratados (Capítulo V.3, Tabla 3). Realizando una única aplicación el  $^{57}\text{Fe}$  tan sólo se detectó en las flores y las hojas no tratadas, mientras que cuando la aplicación se repitió también se encontró en las raíces. Ambas observaciones confirman que el hierro aportado en los complejos con lignosulfonatos podía ser utilizado por la planta, y que cuando éste se aporta en cantidad suficiente se redistribuye entre los diferentes órganos en crecimiento que lo demandan. La disminución de la tasa de absorción al realizar aplicaciones sucesivas, que se asocia a la saturación de las vías de entrada (cuticular o estomática) del soluto o a la deshidratación de los poros por la aplicación de los productos (Liu, 2004; Schönherr et al., 2005) era otro de los factores a considerar en este ensayo. Nuestros resultados indicaron que el empleo de concentraciones elevadas (5 mM, frente a 1 mM empleado al trabajar con  $^{59}\text{Fe}$ ) no dañó ni dificultó la entrada de metal, así como que la repetición de las aplicaciones favoreció la absorción y redistribución de  $^{57}\text{Fe}$ . No obstante, las limitaciones asociadas a la absorción foliar de Fe y a su transporte en el floema hacen que este aporte sea siempre escaso.

Aunque los experimentos con  $^{57}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  indicaron que los complejos Fe-LS eran capaces de aportar hierro por vía foliar a las plantas tratadas con rociados foliares, no se encontraron diferencias en la eficacia de los distintos lignosulfonatos. Las modificaciones del Lignosulfonato 1 (obteniéndose los Lignosulfonatos 2 y 3) incrementaron su capacidad complejante de hierro, pero esto no derivó en una mayor eficacia de los nuevos agentes complejantes. Estos resultados, junto con los de la actividad FC-R en hoja, indican que no existe una relación directa entre el buen comportamiento de estos complejos como sustratos para la FC-R en hoja y su eficacia como fertilizantes foliares. Lo mismo se ha observado previamente al estudiar un humato férrico con EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  (Nikolic et al., 2003). Si bien la fotorreducción del EDTA/ $\text{Fe}^{3+}$  hizo que no fuese un buen sustrato para la FC-R en hoja, este hecho pareció facilitar su absorción a través de la superficie de la hoja y su entrada en la célula vegetal (sin necesidad de ser reducido por la misma).

En su conjunto, de los resultados obtenidos en los experimentos con complejos férricos se deduce que este tipo de productos puede ser una alternativa al uso de quelatos sintéticos en hidroponía pura y en aplicaciones por vía foliar, si bien deben aportarse con mayor frecuencia y a concentraciones más elevadas que en el caso de los quelatos. De



este modo sin embargo el uso de complejos deja de ser una alternativa más económica que los quelatos sintéticos, ya que su precio medio es de 2-4 € kg<sup>-1</sup> y 6-12 € kg<sup>-1</sup> respectivamente. No obstante, de este modo es posible aprovechar subproductos derivados de diversas actividades industriales.

### **Aplicación de la espectroscopía de Mössbauer a la determinación del estado de oxidación y el entorno del hierro en los complejos Fe-LS.**

Los resultados presentados en esta memoria y los expuestos previamente por otros autores al estudiar la fertilización foliar con quelatos y complejos de Fe sugieren que la mayor eficacia mostrada por quelatos como el EDTA/Fe<sup>3+</sup> se relaciona con la fotorreducción de este quelato, que aportaría así el Fe en forma divalente a la planta, que de este modo lo asimilaría con mayor facilidad.

Por otra parte, se ha señalado anteriormente que una fracción del Fe<sup>3+</sup> aportado para formar los complejos LS/Fe<sup>3+</sup> era reducida al añadirla al LS, obteniéndose por tanto complejos sólo parcialmente oxidados. Un comportamiento parecido ha sido descrito para la materia orgánica (Skogerboe y Wilson, 1981; Struyk y Sposito, 2001) que en su proceso espontáneo de oxidación utiliza el Fe<sup>3+</sup> y el Mn<sup>4+</sup> complejados como aceptores de electrones. Este fenómeno está favorecido en presencia de ciertos microorganismos. Se ha observado además su dependencia de la composición del material original (contenido en carbohidratos, fenoles, etc.) y del pH al cual se encuentra, estando especialmente favorecida a pH ácido (Chen et al., 2003).

En experimentos adicionales a los expuestos en esta memoria se ha empleado la espectroscopía Mössbauer para estudiar el estado de oxidación y el entorno del Fe tras la formación de complejos LS/Fe<sup>3+</sup>. Los resultados más relevantes indican que el Fe<sup>3+</sup> es parcialmente reducido por los diferentes LS estudiados, especialmente cuando los complejos se forman a pH 4 (el Fe<sup>2+</sup> constituye entre el 20% y el 40% del Fe total, dependiendo del tipo de LS), mientras que a pH 7 la reducción fue menor (entre el 4% y el 16%). Respecto a la forma en la cual del Fe se uniría al LS, el Fe<sup>3+</sup> y el LS se asocian formando ferrihidrita, indicando por la formación de una estructura con cierto grado de cristalización en la cual, por tanto, el Fe estaría en una forma poco disponible. Todo lo contrario ocurría con la fracción de Fe<sup>3+</sup> reducida, ya que para el Fe<sup>2+</sup> no parece formarse ningún tipo de estructura cristalina, sino complejos LS/Fe<sup>2+</sup>. Sería por ello una forma de

Fe más disponible para la planta, que al estar ya reducida debería ser además más eficaz aportando Fe a la célula vegetal. Por tanto, es importante considerar cuidadosamente la fuente de Fe empleada al formar los complejos Fe-LS, estando justificado el empleo de  $\text{Fe}^{2+}$  en dicho proceso.

Estos resultados constituyen el primer paso de una nueva línea de investigación, intentando relacionar la influencia del estado de oxidación y del entorno del hierro en los complejos Fe-Lignosulfonato en la eficacia de los mismos.

## Capítulo VII:

---





## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta memoria confirman que el empleo de quelatos biodegradables y complejos de Fe puede ser una alternativa viable a los quelatos férricos de escasa biodegradabilidad que han sido tradicionalmente empleados en agricultura. Las principales conclusiones que extraen de los resultados de este trabajo y de su discusión son:

1. En general, los quelatos mostraron mayor eficacia que los complejos para mejorar el estado nutricional de plantas de soja cloróticas desarrolladas en hidroponía pura, ya fuese al ser aplicados a la disolución nutritiva o mediante rociados foliares.
2. La aplicación mediante rociados foliares o directamente a la disolución nutritiva de los quelatos biodegradables IDHA/Fe<sup>3+</sup> y [S,S]-EDDS/Fe<sup>3+</sup> estudiados parecen ser una alternativa eficaz al EDTA/Fe<sup>3+</sup> en plantas de soja cloróticas desarrolladas en hidroponía.
3. Los complejos de Fe con extractos de alperujo modificados y en mayor medida los lignosulfonatos (de abeto y de eucalipto) han contribuido a mejorar el estado nutricional de distintas especies de plantas desarrolladas en hidroponía pura. Los lignosulfonatos de eucalipto presentaron menor capacidad para complejar Fe que los de abeto, aunque ésta mejoró al incrementar su contenido en de grupos carboxílicos y fenólicos igualándose la capacidad de complejación de ambos. No obstante, al ser aplicados a plantas cloróticas ninguno de los lignosulfonatos estudiados mostró una eficacia claramente superior al resto.
4. El empleo de isótopos demostró que, aunque a niveles inferiores a los observados para el EDTA/Fe<sup>3+</sup>, el Fe aportado por los complejos LS/Fe<sup>3+</sup> era absorbido y redistribuido desde las hojas tratadas hasta los órganos en crecimiento, estando ambos fenómenos favorecidos por el incremento en el número de aplicaciones realizadas. No obstante, las tasas de absorción y redistribución fueron bajas y muy variables entre especies.

## CONCLUSIONS

The results reported in this dissertation confirm that the use of biodegradable Fe chelates and complexes can be an alternative to the application of the scarcely biodegradable chelates commonly used in agriculture. The main conclusions obtained are:

1. In general synthetic chelates were more efficient than complexes overcoming Fe deficiencies in soybean chlorotic plants grown in hydroponics, both when applied as foliar sprays or to nutrient solution.
2. When applied through foliar sprays or to the nutrient solution of soybean chlorotic plants grown in hydroponics, the biodegradable chelates IDHA/Fe<sup>3+</sup> y [S,S]-EDDS/Fe<sup>3+</sup> behaved similarly to EDTA/Fe<sup>3+</sup>, so their use in this type of applications instead of this recalcitrant chelate should be taken into consideration.
3. Fe complexes formed with modified olive mill wastes and lignosulfonates (derived from spruce and eucalyptus wood) contributed to improve the nutritional status of different plant species grown in hydroponics, especially in the case of lignosulfonate complexes. Among these complexes, the eucalyptus lignosulfonates exhibited less ability to complex Fe than spruce one, although the enrichment of the non modified eucalyptus lignosulfonate with carboxylic and sulfonic groups increased this capacity until the levels recorded for the spruce product. In spite of this, all the lignosulfonates tested showed a similar ability to overcome Fe deficiencies in chlorotic plants.
4. The use of Fe isotopes indicated that, although at rates lower than those observed for EDTA/Fe<sup>3+</sup>, Fe supplied by LS/Fe<sup>3+</sup> complexes was absorbed by leaves and redistributed from them to growing non treated organs, both processes being favored when the number of foliar applications performed was increased. In any case, uptake and redistribution rates were low for all the LS/Fe<sup>3+</sup> and for EDTA/Fe<sup>3+</sup>.

---

**Bibliografía de Introducción**  
**y**  
**Discusión General**





**BIBLIOGRAFÍA DE INTRODUCCIÓN Y DISCUSIÓN****GENERAL**

- Abadía J.** 1992. Leaf responses to Fe deficiency: a review. *J. Plant Nutr.* 15:1699-1713.
- Abadía J y Abadía A.** 1993. Iron and plant pigments. pp: 327-343. En: Iron chelation in plants and soils microorganisms. Barton L L y Hemming B C, eds.; Academic press: New York, USA.
- Abadía J, Álvarez-Fernández A, Morales F, Sanz M y Abadía A.** 2002. Correction of iron chlorosis by foliar sprays. *Acta Hort.* 594:115-122.
- Abbott A J.** 1967. Physiological effects on micronutrient deficiencies in isolated roots of *Lycopersicon esculentum*. *New Phytol.* 66:419-437.
- Aiken G R, McKnight D M, Wershaw R L y MacCarthy P.** 1985. Introductory remarks. pp. 1-12. En: Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Aiken G R. McKnight D M, Wershaw R L y MacCarthy P. eds.; Wiley: New York, USA.
- Ait Baddi G A, Hadifi M, Cegarra J, Albuquerque J A, González J, Gilard V y Revel J.** 2004. Characterization of fulvic acids by elemental and spectroscopic (FTIR and <sup>13</sup>C-NMR) analyses during composting of olive mill wastes plus straw. *Bioresour. Technol.* 93:285-290.
- Alcántara E, de la Guardia M D y Romera F J.** 1991. Plasmalemma redox activity and H<sup>+</sup> extrusion in roots of Fe-deficient cucumber plants. *Plant Physiol.* 96:1034-1037.
- Alcántara E, Romera F J, Cañete M y de la Guardia M D.** 1994. Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *J. Exp. Bot.* 45:1893-1898.
- Alhendawi R A, Römheld V, Kirkby E A y Marschner H.** 1997. Influence of increasing bicarbonate concentrations on plant growth, organic acid accumulation in roots and iron uptake by barley, sorghum and maize. *J. Plant Nutr.* 20:1731-1753.
- Alva A K y Obreza T A.** 1998. By-product iron-humate increases tree growth and fruit production of orange and grape fruit. *HortScience.* 33:71-74.
- Álvarez J M, Rico M y Obrador A.** 1996. Lixiviation and extraction of zinc in a calcareous soil treated with zinc chelates fertilizer. *J. Agric. Food Chem.* 44:3383-3387.
- Álvarez J M y González D.** 2006. Zn transformations in neutral soil and Zn efficiency in maize fertilization. *J. Agric. Food Chem.* 54:9488-9495.
- Álvarez-Fernández A, Sierra M A y Lucena J J.** 2002. Reactivity of synthetic Fe chelates with soils and soil components. *Plant Soil.* 241:129-137.

- Álvarez-Fernández A, Paniagua P y Abadía J.** 2003a. Effect of Fe-deficiency chlorosis on fruit quality in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J. Agric. Food Chem.* 51:5738-5744.
- Álvarez-Fernández A, Abadía A, Abadía J y Lucena J J.** 2003b. Diagnóstico y corrección de la clorosis férrica. pp.: 158-166. En: I Congreso Iberoamericano de Nutrición Vegetal- Agro Latino, Tomo 2. Nutri-Fitos.
- Álvarez-Fernández A, García-Laviña P, Fidalgo J, Abadía J y Abadía A.** 2004. Foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Plant Soil.* 263:5-15.
- Álvarez-Fernández A, García-Marco S y Lucena J J.** 2005. Evaluation of synthetic iron(III)-chelates (EDDHA/Fe<sup>3+</sup>, EDDHMA/Fe<sup>3+</sup> y EDDHSA/Fe<sup>3+</sup>). *Europ. J Agron.* 22:119-130.
- Álvarez-Fernández A.** 2006. Application of stable isotopes in plant iron research. pp.: 437-448. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms. Barton L L y Abadía J, eds.; Springer-Verlag Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Aly S S M y Soliman S M.** 1998. Impact of some organic acids on correcting iron chlorosis in two soybean genotypes grown in calcareous soil. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 51:185-191.
- Anderson W B.** 1982. Diagnosis and correction of iron deficiency in field crops-An overview. *J. Plant. Nutr.* 5:785-795.
- Andrews N C, Fleming M D y Gunshin H.** 1999. Iron transport across biologic membranes. *Nutr. Rev.* 57:114-123.
- Ashmead H D.** 1986. The absorption mechanism of amino acids chelates by plant cells. pp. 219-235. En: Foliar Feeding of Plants with Amino Acid Chelates. Ashmead H D, Ashmead H H, Miller G W y Hsu H H, eds. Noyes Publications: New Jersey, USA.
- Astolfi S, Zucchi S, Passera C y Cesco S.** 2003. Does the sulfur assimilation pathway play a role in the response to Fe deficiency in maize (*Zea mays* L.) plants?. *J Plant Nutr.* 26:2111-2121.
- Award F, Römheld V y Marschner H.** 1988. Mobilization of ferric iron chlorosis in calcareous soil by plant-borne chelators (phytosiderophores). *J. Plant Nutr.* 11:701-713.
- Bar-Ness E y Chen Y.** 1991. Manure and peat based iron-organo complexes. 1. Characterization and enrichment. *Plant Soil* 130:35-43.
- Barton L L, Johnson G V, O'nan A G y Wagener B M.** 2000. Inhibition of ferric chelate reductase in alfalfa roots by cobalt, nickel, chromium, and copper. *J. Plant Nutr.* 23:1833-1845.

- Basiouny F M y Biggs R H.** 1971. Uptake and distribution of iron in citrus. Proc. Florida State Hort. Soc. 84:17-22.
- Bauer P, Thiel T, Klatte M, Berezcky Z, Brumbarova T, Hell R y Grosse I.** 2004. Analysis of sequence, map position and gene expression reveals conserved essential genes for iron uptake in Arabidopsis and tomato. Plant Physiol. 136:4169-4183.
- Bauer P y Hell R.** 2005. Translocation of iron in plant tissues. pp.: 279-288. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plant and Microbes. Barton L L y Abadía J, eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Baver L D.** 1963. The effect of organic matter on soil structure. Pontif. Acad. Sci. Scr. Varia 32:383-413.
- Bertoni G M, Pissaloux A, Morard P y Sayag D R.** 1992. Bicarbonate-pH relationship with iron chlorosis in white lupins. J. Plant Nutr. 15:1509-1518.
- Bienfait H F.** 1985. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. J. Bioenerg. Biomembr. 17:73-83.
- Bienfait H F.** 1988a. Mechanism in Fe-efficiency reactions of higher plants. J. Plant Nutr. 11:605-629.
- Bienfait H F.** 1988b. Proteins under control of the gene for Fe efficiency in tomato. Plant Physiol. 88:785-787.
- Bienfait H F y Scheffers M R.** 1992. Some properties of ferric citrate relevant to the iron nutrition of plants. Plant Soil. 143:141-144.
- Bityutskii N P.** 1995. Effect of carboxylic and phosphoric Fe-chelates on root and foliar plant nutrition. Russ. J. Plant Physl. 4:444-453.
- Boeriu C G, Bravo D, Gosselink R J A y van Dam J E G.** 2004. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. Ind. Crops Prod. 20:205-218.
- Breteler H y Arnozis P A.** 1985. Effect of amino compounds on nitrate utilization by roots of dwarf bean. Phytochemistry 24:653-657.
- Briat J F.** 1996. Roles of ferritin in plants. J. Plant Nutr. 19:1331-1342.
- Briat J F y Lobréaux S.** 1997. Iron transport and storage in plants. Trends Plant Sci. 2:187-193.
- Briat J F, Curie C y Gaymard F.** 2007. Iron utilization and metabolism in plants. Plant Biol. 10:276-282.
- Brown J C.** 1963. Iron chlorosis in soybeans as related to the genotype of rootstock. Soil Sci. 96:387-394.

- Brown J C.** 1966. Fe and Ca uptake as related to root-sap and stem-exudate citrate in soybeans. *Physiol. Plant.* 19:968-976.
- Brown J C y Ambler J E.** 1974. Iron-stress response in tomato. I. Sites of the Fe reduction, absorption and transport. *Physiol. Plant.* 31:221-224.
- Brüggemann W, Maas-Kantel K y Moog P R.** 1993. Iron uptake by leaf mesophyll cells: The role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. *Planta* 190:151-155.
- Buckhout T J, Bell P F, Luster D G y Chaney R L.** 1989. Iron-stress induced redox activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is localized on the plasma membrane. *Plant Physiol.* 90:151-156.
- Bughio N, Takahashi M, Yoshimura E, Nishizawa N K y Mori S.** 1997a. Light-dependent iron transport into isolated barley chloroplasts. *Plant Cell. Physiol.* 38:101-105.
- Bughio N, Takahashi M, Yoshimura E, Nishizawa N K y Mori S.** 1997b. Characteristics of light-regulated iron transport system in barley chloroplasts. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43:959-963.
- Bullock R M, Benson N R y Tsai B K W.** 1952. Absorption of urea sprays on peach trees. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 60:71-74.
- Burke E.** 1932. Chlorosis of trees. *Plant Physiol.* 7:329-334.
- Canet-Benavent M.** 2006. Method for the industrialised production of olive mill by-products and product thus obtained. Patent WO/2006/ 058938 A3.
- Carpena O, Ortuño A y Llorente S.** 1965. Nuevas orientaciones en los tratamientos curativos de la deficiencia de Fe. *Anal. Edafol. Agrobiol.* XXIV:3-4.
- Cataldo D A, McFadden K M, Garland T R y Wildung R E.** 1988. Organic constituents and complexation of nickel(II), iron(III), cadmium(II), and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiol.* 50:208-213.
- Cesco S, Römheld V, Varanini Z y Pinton R.** 2000. Solubilization of iron by water-extractable humic-substances. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163:285-290.
- Cesco S, Nikolic M, Römheld V, Varanini Z y Pinton R.** 2002. Uptake of <sup>59</sup>Fe from soluble <sup>59</sup>Fe-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant Soil* 241:121-128.
- Chamel A y Simiand J.** 1970. Pénétration et migration d'éléments minéraux appliqués sur les feuilles en présence de diméthylsulfoxyde. *Physiol. Plant.* 23:728-738.
- Chamel A.** 1988. Foliar uptake of chemicals studied with whole plants and isolated cuticles. pp. 27-48. En: *Plant Growth and Leaf-applied Chemicals*. Neumann P M, ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.

- Chaney R L, Brown J C y Tiffin L O.** 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol.* 50:208-213.
- Chaney R L.** 1984. Diagnostic practices to identify iron-deficiency in higher plants. *J. Plant Nutr.* 7:47-67.
- Chaney R L.** 1989. Translocation of iron roots to shoots. En: 5<sup>th</sup> International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants, Jerusalem, Israel.
- Chang Y C, Zouari M, Gogorcena Y, Lucena J J y Abadía J.** 2003. Effects of cadmium and lead on ferric chelate reductase activities in sugar beet roots. *Plant Physiol. Biochem.* 41:999-1005.
- Charlson D V, Cianzio S R y Shoemaker R C.** 2003. Associating SSR markers with soybean resistance to iron deficiency chlorosis. *J. Plant Nutr.* 26:2267-2276.
- Chen Y y Aviad T.** 1990. Effects of humic substances on plant growth. En: Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings. McCarthy P, Clapp C E, Malcom R L y Bloom P R, eds.; American Society of Agronomy, Inc. Soil Science of America, Inc.: Madison, Wisconsin, USA.
- Chen Y.** 1997. Remedy of iron deficiency - present and future. pp.: 111. En: Abstracts 9<sup>th</sup> International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants, Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Chen J, Baohua G, Royer R A y Burgos W D.** 2003. The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron. *The science of the total environment* 307:167-178.
- Cihacek L J.** 1984. Economic soil treatment of iron chlorosis in grain sorghum grown on a gypsum affected soil. *J. Plant Nutr.* 7: 329-340.
- Clark R B.** 1983. Plant genotype differences in the uptake, translocation, accumulation and use of mineral elements required for plant growth. *Plant Soil* 72:175-196.
- Cohen C K, Norwell W A y Kochian L V.** 1997. Induction of the root cell plasma membrane ferric reductase. An exclusive role for Fe and Cu. *Plant Physiol.* 114:1061-1069.
- Cohen C K, Fox T C, Garvin D F y Kochian L V.** 1998. The role of Fe-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* 116:1063-1072.
- Cohen C K, Garvin D F y Kochian L V.** 2004. Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* L. indicate a primary function in Fe uptake from the soil. *Planta* 218:784-792.
- Connolly E L, Fett J P y Guerinot M L.** 2002. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the level of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14:1347-1357.

- Connolly E L, Campbell N H, Grotz N, Prichard C L y Guerinot M L.** 2003. Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiol.* 133:1102-1110.
- Cook J A y Boyton D.** 1952. Some factors affecting the absorption of urea by McIntosh apple leaves. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 59:82-90.
- Cook J A.** 1957. Field trials with foliar sprays of Zn-EDTA to control zinc deficiency in California vineyards. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 72:158-164.
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta S L, Briat J F y Walker E L.** 2001. Maize yellow stripe 1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409:346-349.
- Currier H B y Dybing C D.** 1959. Foliar penetration of herbicides. Review and present status. *Weeds* 7:195-213.
- De la Guardia M D y Alcántara E.** 1996. Ferric chelate reduction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves: influence of light, oxygen, iron-deficiency and leaf age. *J. Exp. Bot.* 47:669-675.
- De Santiago A y Delgado A.** 2007. Effect of humic substances on iron nutrition of Lupin. *Biol. Fertil. Soils.* 43:829-836.
- Díaz-Zorita M, Fernández-Canigia M V y Grosso G A.** 2001. Applications of foliar fertilizers containing glycinebetaine improve wheat yields. *J. Agron. Crop Sci.* 186:209-215.
- Eichert T y Goldbach H E.** 2008. Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces-further evidence for a stomatal pathway. *Physiol. Plant.* 132:491-502.
- Eichert T, Kurtz A, Steiner U y Goldbach H E.** 2008. Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiol. Plant.* 134:151-160.
- Eide D, Broderius M, Fett J y Guerinot M L.** 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:5624-8.
- El Mansouri N E y Salvadó J.** 2007. Analytical methods for determining functional groups in various technical lignins. *Ind. Crops Prod.* 26:116-124.
- Embleton T W, Wallihan E F y Goodall G E.** 1964. Effect of soil vs. foliar applied zinc, and of foliar applied manganese on California lemons. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 86:253-259.
- Espasa-Manresa R.** 1983. La fertilización foliar con aminoácidos. *Horticultura* 2:33-35.

- Fernández V.** 2004. Investigations on Foliar Iron Application to Plants - a New Approach. Tesis Doctoral. Shaker Verlag, Aachen, Alemania.
- Fernández V, Winkelmann G y Ebert G.** 2004. Iron supply to tobacco plants through foliar application of iron citrate and ferric dimerum acid. *Physiol. Plant.* 122:380-385.
- Fernández V y Ebert G.** 2005. Foliar iron fertilisation: a critical review. *J. Plant Nutr.* 28:2113-2124.
- Fernández V, del Río V, Abadía J y Abadía A.** 2006. Foliar Iron Fertilization of Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): Effects of Iron Compounds, Surfactants and Other Adjuvants. *Plant Soil.* 289: 239-252.
- Fernández V, del Río V, Pumariño L, Igartua E, Abadía J y Abadía A.** 2008a. Foliar fertilization of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) with different iron formulations: Effects on re-greening, iron concentration and mineral composition in treated and untreated leaf surfaces. *Sci. Hortic.* 117:241-248.
- Fernández V, Eichert T, del Río V, López-Casado G, Heredia-Guerrero J A, Abadía A, Heredia A y Abadía J.** 2008b. Leaf structural changes associated with iron deficiency chlorosis in field-grown pear and peach: physiological implications. *Plant Soil* 311:161-172.
- Fernández V y Eichert T.** 2009. Uptake of Hydrophilic Solutes Through Plant Leaves: Current State of Knowledge and Perspectives of Foliar Fertilization. *Critical Reviews in Plant Science.* 28:36-68.
- Fernández V, Orera I, Abadía J y Abadía A.** 2009. Foliar iron-fertilisation of fruit trees: present knowledge and future perspectives - a review. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 84:1-6.
- Fournier J M, Alcántara E, de la Guardia M D.** 1992. Organic acid accumulation in roots of two sunflower lines with a different response to iron deficiency. *J. Plant Nutr.* 15:1747-1755.
- Foy C D, Farina M P W y Oakes A J.** 1998. Iron-manganese interactions among clones of nilegrass. *J. Plant Nutr.* 21:987-1009.
- Gamble D S, Schnitzer M y Hoffman I.** 1970.  $\text{Cu}^{2+}$ -fulvic acid chelation equilibrium in 0.1M KCl at 25.0 °C. *Canadian Journal of Chemistry,* 48:3197-3204.
- García-Marco S.** 2005. Contribuciones científicas al marco legal de fertilizantes de quelatos férricos: Análisis cromatográfico; eficacia agronómica de *o,p*-EDDHA/ $\text{Fe}^{3+}$ . Tesis Doctoral. Departamento de Química Agrícola, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
- García-Marco S, Martínez N, Yunta F, Hernández-Apaolaza L y Lucena J J.** 2006. Effectiveness of Ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N'(p-hydroxyphenylacetic) acid (*o,p*-EDDHA) to supply iron to plants. *Plant Soil.* 279:31-40.

- Geelhoed J S, Hiemstra T y Van Riemsdijk W H.** 1998. Competitive interaction between phosphate and citrate on goethite. *Environ. Sci. Tech.* 32:2119-2123.
- González-Vallejo E B, Susín S, Abadía A y Abadía J.** 1998. Changes in sugar beet leaf plasma membrane Fe(III)-chelate reductase activities mediated by Fe-deficiency, assay buffer composition, anaerobiosis and the presence of flavins. *Protoplasma* 250:163-168.
- González-Vallejo E B, González-Reyes J A, Abadía A, López-Millán A F, Yunta F, Lucena J J y Abadía J.** 1999. Reduction of ferric chelates by leaf plasma membrane preparations from Fe-deficient and Fe-sufficient sugar beet. *Aust. J. Plant Physiol.* 26:601-611.
- Goos R J, Johnson B E y Thiollet M.** 2000. A comparison of the availability of three zinc sources to maize (*Zea mays* L.) under greenhouse conditions. *Biol Fertil Soils* 31:343-347.
- Goos R J y Germain S.** 2001. Solubility of twelve iron fertilizer products in alkaline soils. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 32:2317-2323.
- Grafe M, Eick M J, Grossl P R y Sanders A M.** 2002. Adsorption of arsenate and arsenite on ferrihydrite in the presence and absence of dissolved organic carbon. *J. Environ. Qual.* 31:1115-1123.
- Greenland D J, Lindstrom G R y Quirk J P.** 1961. Role of polysaccharides in stabilization of natural soil aggregates. *Nature* 191:1283-1284.
- Greenland D J, Lindstrom G R y Quirk J P.** 1962. Organic materials which stabilize natural soil aggregates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 26:366-371.
- Grusak M A.** 1995. Whole-root iron(III)-reductase activity throughout the life cycle of iron-grown *Pisum sativum* L. (*Fabaceae*):relevance to the iron nutrition of developing seeds. *Plant* 197:111-117.
- Grusak M A y Pezeshgi S.** 1996. Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the *dgl* mutant of pea. *Plant Physiol.* 110:329-334.
- Guerinot M L y Yi Y.** 1994. Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* 104:815-820.
- Guest P L y Chapman H D.** 1949. Investigations on the use of iron sprays, dusts, and soil applications to control iron chlorosis of citrus. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 54:11-21.
- Hamilton J M, Palmiter D H y Anderson L C.** 1942. Preliminary tests with Uramon in foliage sprays as a means of regulating nitrogen supply of apple trees. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 42:123-126.



- Hansen N C, Jolley V D, Berg W A, Hodges M E y Krenzer E G.** 1996. Phytosiderophore release related to susceptibility of wheat to iron deficiency. *Crop Sci.* 36:1473-1476.
- Hansen N C, Hopkins B G, Ellsworth J W y Jolley V D.** 2005. Iron nutrition in field crops. pp. 23-58. En.: *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plants and Microbes.* Barton L L y Abadía J., eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Harley C P y Linder R C.** 1945. Observed responses of apple and pear trees to some irrigation Waters of north central Washington. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 46:35-44.
- Hazen J L.** 2000. Adjuvants-Terminology, classification, and chemistry. *Weed Tech.* 14:773-784.
- Hell R y Stephan U W.** 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216:541-551.
- Herbik A, Giritch A, Horstmann C, Becker R, Balzer H J, Bäumlein H y Stephan U W.** 1996. Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotiamine-free mutant *chloronerva*. *Plant Physiol.* 111:533-540.
- Hether N H, Olsen R A y Jackson L L.** 1984. Chemical identification of iron reductants exuded by plant roots. *J. Plant Nutr.* 7:667-676.
- Hilgeman R H.** 1969. Correction of iron chlorosis with iron chelates in Arizona. Citograph. Universidad de Arizona.
- Hill J.** 1980. The remobilization of nutrients from leaves. *J. Plant Nutr.* 2:407-444.
- Holden M J, Luster D G, Chaney R L, Buckhout T J y Robinson C.** 1991. Fe<sup>3+</sup>-chelate reductase activity of plasma membranes isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. Comparison of enzymes from Fe-deficient and Fe-sufficient roots. *Plant Physiol.* 97:537-544.
- Jaeger B, Goldbach H y Sommer K.** 2000. Release from lime induced iron chlorosis by CULTAN in fruit trees and its characterisation by analysis. *Acta Hort.* 531:107-113.
- Jansen L L, Gentner W A y Shaw W C.** 1961. Effects of surfactants on the herbicidal activity of several herbicides in aqueous spray systems. *Weeds* 9:381-405.
- Jolley V D y Brown J C.** 1985. Iron stress response in tomato affected by potassium and renewing nutrient solutions. *J. Plant Nutr.* 8:527-541.
- Jolley V D, Brown J C, Pushnik J C y Miller G W.** 1987. Influences of ultraviolet(uv)-blue light radiation on the growth of cotton. I. Effect on iron nutrition and iron stress response. *J. Plant Nutr.* 10:333-351.

- Jones D L, Darrah P R, Kochian L V.** 1996. Critical-evaluation of organic-acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake. *Plant Soil.* 180:57-66.
- Jones D L.** 1998. Organic acids in the rhizosphere- a critical review. *Plant Soil.* 205:25-44.
- Jyung W H y Wittwer S H.** 1964. Foliar absorption-an active process. *Amer. J. Bot.* 51:437-444.
- Kaplan J.** 2002. Strategy and tactics in the evolution of iron acquisition. *Sem. Hematol.* 39:219-226.
- Kashirad A y Marschner H.** 1974. Effect of pH and phosphate on iron nutrition of sunflower and corn plants. *Agrochimia* 6:497-508.
- Kawai S, Takagi S I y Sato Y.** 1988. Mugineic acid-family phytosiderophores in root-secretions of barley, corn and shorgum varieties. *J. Plant Nutr.* 11:633-642.
- Kawai S y Alam S.** 2005. Iron stress response and composition of xylem sap of strategy II plants. pp.: 289-309. En: *Iron Nutrition in Plant and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plants and Microbes.* Barton L L y Abadía J, eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Kerstiens G.** 2006. Water transport in plant cuticles: an update. *J. Exp. Bot.* 57:2493-2499.
- Kevers C, Soteras G, Baccou J C y Gaspar T.** 1999. Lignosulfonates: novel promoting additives for plant tissue cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant,* 35:413-416.
- Kim A S y Guerinot M L.** 2007. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters.* 581: 2273-2280.
- Koch K, Neinhuis C, Ensikat H J y Barthlott W.** 2004. Self assembly of epicuticular waxes on living plant surfaces imaged by atomic force microscopy (AFM). *J. Exp. Bot.* 55:711-718.
- Kolesch H, Höfner W y Schaller K.** 1987a. Effect of bicarbonate and phosphate on iron chlorosis of grape-vines with special regard to the susceptibility of the rootstocks. I. Field experiments. *J. Plant Nutr.* 10:207-230.
- Kolesch H, Höfner W y Schaller K.** 1987b. Effect of bicarbonate and phosphate on iron chlorosis of grape-vines with special regard to the susceptibility of the rootstocks. II. Pot experiments. *J. Plant Nutr.* 10:207-230.
- Kosegarten H, Wilson G h y Esch A.** 1998. The effect of nitrate nutrition on iron chlorosis and leaf growth in sunflower (*Helianthus Annuus* L.). *Eur. J. Agron.* 8:283-293.

- Kosegarten H, Hoffmann B and Mengel K.** 1999. Apoplastic pH and Fe<sup>3+</sup> reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiol.* 121:1069-1079.
- Krafczyk I, Trolldenier G y Beringer H.** 1984. Soluble roots exudates of maize: influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 16: 315-322.
- Kushnir S, Babychuck E, Storozhenko S, Davey M, Papenbrock J, de Rycke R R, Engler G, Stephan U, Lange H, Kispal G, Lill R y Van Montagu M.** 2001. A mutation of the mitochondrial ABC transporter *Sta1* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *Plant Cell* 13:89-100.
- Labanauskas C K y Puffer R E.** 1964. Effects of foliar applications of manganese, zinc, and urea on Valencia orange yield and foliage composition. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 84:158-164.
- Labanauskas C K, Jones W W y Embleton T W.** 1963. Effects of foliar applications of manganese, zinc, and urea on yield and fruit quality of Valencia oranges and nutrient concentrations in leaves, peel and juice. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 82:142-153.
- Landsberg E C.** 1981. Organic acid synthesis and release of hydrogen ions in response to Fe deficiency stress of mono and dicotyledoneous plant species. *J. Plant Nutr.* 3:579-591.
- Landsberg E C.** 1986. Function of rhizodermal transfer cells in the Fe stress response mechanism of *Capsicum annuum* L. *Plant Physiol.* 82:511-517.
- Landsberg E C.** 1994. Transfer cell formation in sugar beet roots induced by latent Fe deficiency. *Plant Soil.* 165:197-205.
- Larbi A, Morales F, López-Millán A F, Gorgocena Y, Abadía A, Moog P R y Abadía J.** 2001. Technical advance: reduction of Fe(III)-chelates by mesophyll disk of sugar beet. Multicomponent origin and effects of Fe deficiency. *Plant Cell Physiol.* 42:94-105.
- Lehman D.** 1963. Some principles of chelation chemistry. pp.:167-170. En: *Proc. Symp. Chelates in Soils.* *Soil Sci. Soc.*
- Leonard C D.** 1967. Use of dimethyl sulfoxide as a carrier for iron in nutritional foliar sprays applied to citrus. *Annals of New York Academy of Science* 141:148-158.
- Leyden R F y Toth S J.** 1960. Behavior of zinc sulphate as foliar applications and as soil applications in some New Jersey soils. *Soil Sci.* 89:223-228.
- Li L H, Cheng X D y Ling H Q.** 2004. Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene *LeFRO1* in tomato. *Plant Mol. Biol.* 54:125-136.
- Lindsay W L.** 1979. *Chemical Equilibria in Soils.* John Wiley & Sons. New York, USA.

- Lindsay W L y Schwab A P.** 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr.* 5:821-840.
- Lindsay W L.** 1984. Soil and plant relationships associated with iron deficiency with emphasis on nutrient interactions. *J. Plant nutr.* 7:489-500.
- Liu Z.** 2004. Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides-a complex scenario. *Colloids Surfac. B: Biointerfaces* 35:149-153.
- Lobartini J C y Orioli G A.** 1988. Absorption of iron Fe-humate in nutrient solutions by plants. *Plant Soil* 106:153-157.
- Loeppert R H.** 1986. Reactions of iron and carbonates in calcareous soils. *J. Plant Nutr.* 9:195-215.
- López-Millán A F.** 2000. Adquisición y transporte de hierro en plantas. Tesis Doctoral. Estación Experimental de Aula Dei. CSIC. Zaragoza, España.
- López-Millán A F, Morales F, Abadía A y Abadía J.** 2001. Iron deficiency-associated changes in the composition of the leaf apoplastic fluid from field-grown pear (*Pyrus communis* L.) trees. *J. Exp. Bot.* 52:1489-1498.
- López-Millán A F, Morales F, Gogorcena Y, Abadía A y Abadía J.** 2009. Metabolic responses in iron deficient tomato plants. *J. Plant Physiol.* 166:375-384.
- López-Valdivia L M, Fernández M D, Obrador A y Álvarez J M.** 2002. Zn transformations in acidic soil and zinc efficiency on maize by adding six organic zinc complex. *J. Agric. Food Chem.* 50:1455-1460.
- Lucena J J.** 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron chlorosis. A review. *J. Plant Nutr.* 23:1591-1606.
- Lucena C, Montilla I, Romera F J y Alcántara E.** 2003. Effects of several metals on both Fe(III)- and Cu(II)-reduction by roots of Fe-deficient cucumber plants. *J. plant Nutr.* 26:2069-2079.
- Lucena J J y Chaney R.** 2006. Synthetic iron chelates as substrates of root ferric chelate reductase (FC-R) in green stressed cucumber plants. *J Plant Nutr.* 29:423-439.
- Lucena J J, Sentís J A, Villén M, Lao T y Pérez-Sáez M.** 2008. IDHA chelates as a micronutrient source for green bean and tomato in fertigation and hydroponics. *Agron J.* 100:813-818.
- Luque P, Bruque S y Heredia A.** 1995. Water permeability of isolated cuticular membranes: a structural analysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 317:417-422.
- Marschner H, Römheld V y Kissel M.** 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9:695-713.

- Marschner H, Römheld V y Kissel M.** 1987. Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots. *Physiol. Plant.* 71:157-162.
- Marschner H.** 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Marschner H y Römheld V.** 1995. Strategies of plants for acquisition of iron. pp.: 375-378. En: Iron Nutrition in Soils and Plants. Abadía J, ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Martell A E y Smith R M.** 1976-1989. Critical stability constants, vol 6. Plenum Press: New York, USA.
- Martín-Ortiz D, Hernández-Apaolaza L y Gárate A.** 2009. Efficiency of a zinc lignosulfonate as Zn source for wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) under hydroponic culture conditions. *J. Agric. Food Chem.* 57:226-231.
- McClung A C.** 1954. The occurrence and correction of zinc deficiency in North Carolina peach orchards. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 64:75-80.
- McMullan P M.** 2000. Utility adjuvants. *Weed Tech.* 14:792-797.
- Mench M y Martin E.** 1991. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by roots exudates of *Zea mays* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. *Plant Soil* 132:187-196.
- Mengel K.** 1994. Iron availability in plant tissues – iron chlorosis on calcareous soils. *Plant Soil* 165:275-283.
- Mengel K y Kirkby E.** 2001. Principles of Plant Nutrition. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Middleton L J y Sanderson J.** 1965. The uptake of inorganic ions by plant leaves. *J. Exp. Bot.* 16:197-215.
- Miller G W, Pushnik J C y Welkie G W.** 1984. Iron chlorosis, a world wide problem. The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *J. Plant Nutr.* 7:1-22.
- Miller G W, Shigematsu A, Welkie G W, Motoji N y Szlek M.** 1990. Potassium effect on iron stress in tomato II. The effects on root carbon dioxide fixation and organic acid formation. *J. Plant nutr.* 13:1355-1370.
- Mitschker A, Moritz R J y Nawrocki A.** 2004. Chelated plant micronutrients (Bayer Chemicals A.-G., Germany; Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Consultingowe Adob). *Eur. Pat. Appl.* 7. pp.CODEN: EPXXDW EP 1411037 A1 20040421.
- Moog P R y Brüggemann W.** 1994. Iron reductase systems on the plant plasma-membrane- A review. *Plant Soil* 165:214-260.

- Moral R, Gómez I, Navarro Pedreño J y Mataix J.** 1994. Effects of cadmium on nutrient distribution, yield, and growth of tomato grown in soilless culture. *J. Plant Nutr.* 17:953-962.
- Morales F, Grasa R, Abadía A y Abadía J.** 1998. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *J. Plant Nutr.* 21:815-825.
- Mori S y Nishizawa N.** 1987. Methionine as dominant precursor of phytosiderophores in *Graminaceae* plants. *Plant Cell Physiol.* 28:1081-1092.
- Mori S.** 1998. Iron transport in graminaceous plants. pp.: 215-238. En: Metal ions in biological systems. Siegel A y Siegel H, eds.; Basel, Switzerland.
- Morikawa C K y Saigusa M.** 2008. Recycling coffee and tea wastes to increase plant available Fe in alkaline soils. *Plant Soil.* 304:249-255.
- Naik G R.** 1984. Inactive iron sugarcane leaves and its influence on enzymatic reactionant chloroplast metabolism. *J. Plant Nutr.* 7:785-798.
- Negishi T, Nakanishi H, Yazaki J, Kishimoto N, Fujii F, Shimbo K, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T, Kikuchi S, Mori S y Nishizawa N K.** 2002. cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggest that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J.* 30:83-94.
- Nikolic M y Römheld V.** 1999. Mechanism of Fe uptake by the leaf symplast: is Fe inactivation in leaf a cause of Fe deficiency chlorosis? *Plant Soil.* 215:229-237.
- Nikolic M y Römheld V.** 2002. Does high bicarbonate supply to roots change availability of iron in the leaf apoplast?. *Plant Soil* 241:67-74.
- Nikolic M, Cesco S, Römheld V, Varanini Z, Pinton R.** 2003. Uptake of iron (<sup>59</sup>Fe) complexed to water-extractable humic substances by sunflower leaves. *J. Plant Nutr.* 26:2243-2252.
- Nörtemann B.** 2005. Biodegradation of Chelating Agents: EDTA, DTPA, PDTA, NTA, and EDDS. pp. 150-170. En: Biogeochemistry of Chelating Agents. Nowack B y VanBriesen J M, eds.; ACS Divisions of Environmental Chemistry, Inc. and Geochemistry, Inc.: Washington, USA.
- Olsen R A, Bennett J H, Blume D y Brown J C.** 1981. Chemical aspects of the iron stress response mechanism in tomatoes. *J. Plant Nutr.* 3:905-921.
- Orbovic V, Jifon J L y Syvertsen J P.** 2001. Foliar-applied surfactants and urea temporally reduce carbon assimilation of grapefruit leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:486-490.
- ORDEN APA/863/2008** por la que se modifican los anexos I, II, III, y VI del Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. BOE nº 79 de 1 de abril de 2008.

- Ouyang X, Qiu X y Chen P.** 2006. Physicochemical characterization of calcium lignosulfonate-A potential useful water reducer. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 282-283/489-497.
- Pang Y, Qiu X, Yang D y Lou H.** 2008. Influence of oxidation, hydroxymethylation and sulfomethylation on the physicochemical properties of calcium lignosulfonate. *Colloids Surf. A.* 312:154-159.
- Parker D R, Chaney R L y Norvell W A.** 1995. Chemical equilibria models: Applications to plant research. pp. 163-200. En: Chemical equilibria and reaction models, Special Publications 42. Loeppert R H, Schwab A P and Goldberg S., eds.; SSSA-ASA, Madison, Wisconsin, USA.
- Penner D.** 2000. Activator adjuvants. *Weed Tech.* 14:785-791.
- Pérez-Sanz A.** 1998. Caracterización y aplicación agronómica de humatos férricos procedentes de ambientes acuáticos. Tesis Doctoral. Departamento de Química Agrícola, Geología y Geoquímica, Universidad Autónoma de Madrid.
- Pérez-Sanz A, Álvarez-Fernández A, Casero T, Legaz F y Lucena J.J.** 2002. Fe enriched biosolids as fertilizers for orange and peach trees grown in field conditions. *Plant Soil* 176:263-271.
- Pestana M, Correia P J, de Varennes A, Abadía J y Araújo Faria E.** 2001. Effectiveness of different foliar iron applications to control iron chlorosis in orange trees grown on a calcareous soil. *J Plant Nutr.* 24:613-622.
- Pitch A, Hillmer S, Manteuffel R y Scholz G.** 1997. Nicotianamine-regulator in plant iron metabolism. Putative molecular-biological aspects. *J. Exp. Bot.* 48:759-767.
- Plessner O E, Chen Y, Shenker M y Tel-Or E.** 1998. Iron enriched azolla as a slow-release biofertilizer for cucumber plants grown in a hydroponic system. *J. Plant Nutr.* 21:2357-2367.
- Price L.** 1968. Iron compounds and plant nutrition. *Annu. Rev. Plant Phys.* 19:239-248.
- Rabotti G y Zocchi G.** 1994. Plasma membrane-bound H<sup>+</sup>-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiol. Plant.* 90:779-785.
- Raese J T y Staiff D C.** 1988. Chlorosis of "Anjou" pear trees reduced with foliar sprays of iron compounds. *J. Plant Nutr.* 11:1379-1385.
- Rahman M A, Hasegawa H, Ueda K, Maki T y Rahman M M.** 2008. Influence of chelating ligands on arsenic uptake by hydroponically grown rice seedlings (*Oryza sativa* L.): A preliminary study. *Clean* 36:521-527.
- Ramsey R J L, Stephenson G R y Hall J C.** 2005. A review of the effects of humidity, humectants, and surfactant composition on the absorption and efficacy of highly water-soluble herbicides. *Pesticide Biochem. Physiol.* 82:162-175.

**REAL DECRETO 824/2005**, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes. BOE nº 171 de 19 de julio de 2005.

**Reglamento CE Nº 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 2003 relativo a abonos** D.O.U.E. (Diario Oficial de la Unión Europea, Nº L 304/1, del 21 de noviembre de 2003).

**Robinson N, Procter C, Connolly E, Guerinot M L.** 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397:694-697.

**Rombolà A D, Brüggemann W, Tagliavini M, Marangoni B y Moog P R.** 2000. Iron source affects iron reduction and re-greening of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves. *J. Plant Nutr.* 23:1751-1765.

**Rombolà A D y Tagliavini M.** 2006. Iron nutrition of fruit tree crops. pp.: 61-83. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms. Barton L L y Abadía J, eds.; Springer-Verlag Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.

**Romera F J y de la Guardia M D.** 1991. La nutrición férrica de las plantas. Grupo Gestión Editorial, Córdoba. España

**Romera F J, Alcántara E y de la Guardia M D.** 1992. Role of roots and shoots in the regulation of the Fe efficiency responses in sunflower and cucumber. *Physiol. Plant.* 85:141-146.

**Romera F J, Lucena C y Alcántara E.** 2006. Plant hormones influencing iron uptake in plants. pp.: 103-127. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms. Barton L L y Abadía J, eds.; Springer-Verlag Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.

**Römheld V, Müller C y Marscher H.** 1984. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiol.* 76:603-606.

**Römheld V y Marschner H.** 1986. Mobilization of iron in the rizhosphere of different plant species. pp.: 155-204. En: Advances in plant nutrition. Vol. 2. Tinker B y Läuchli A, eds.; Praeger Scientific: New York, USA.

**Römheld V.** 2000. The chlorosis paradox: Fe inactivation in leaves as a secondary event in Fe deficiency chlorosis. *J. Plant Nutr.* 23:1629-1643.

**Salardini A A y Murphy L S.** 1978. Grain sorghum (*Sorghum bicolor* Pers.) responses to organic iron on calcareous soils. *Plant Soil.* 49:57-70.

**Sánchez-Sánchez A, Sánchez-Andreu J, Juárez M, Jordá J y Bermúdez D.** 2002. Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate FeEDDHA in lemon trees. *J. Plant Nutr.* 25:2433-2442.

**Sánchez-Sánchez A, Sánchez-Abreu J, Juárez M, Jordá J y Bermúdez D.** 2006. Improvement of iron uptake in table grape by addition of humic substances. *J. Plant Nutr.* 29:259-272



- Sargent J A y Blackman G E.** 1962. Studies on foliar penetration. I. Factors controlling the entry of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Exp. Biol.* 13:348-368.
- Sattelmacher B.** 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol.* 149:167-192.
- Schaller G.** 1987. pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering of soils. *Plant Soil* 97:439-444.
- Schlegel T, Schönherr J y Schreiber L.** 2006. Rates of foliar penetration of chelated Fe(III): role of light, stomata, species, and leaf age. *J. Agric. Food Chem.* 54:6809-6813.
- Schmidt W, Bartels M, Tittel J y Fuhner C.** 1997. Physiological effects of copper on iron acquisition processes in *plantago*. *New Phytol.* 135:659-666.
- Schmidt W.** 1999. Review: Mechanism and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytol.* 141:1-26.
- Schmidt W.** 2005. Iron stress responses in roots of strategy I plants. pp.: 229-250. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plant and Microbes. Barton L L y Abadía J, eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Schnitzer M.** 1969. Reactions between fulvic acid, a soil humic compound and inorganic soil constituents. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 33:75-81.
- Schnitzer M y Kahn S U.** 1972. Humic Substances in the Environment. Marcel Dekker: New York, USA.
- Scholz G R, Becker U W, Stephan A, Rudolph A y Pich A.** 1988. The regulation of iron uptake and possible functions of nicotianamine in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 183:257-269.
- Schönherr J y Bukovac M J.** 1972. Penetration of stomata by liquids. Dependence on surface tension, wettability, and stomatal morphology. *Plant Physiol.* 49:813-819.
- Schönherr J.** 1976. Water permeability of isolated cuticular membranes: The effect of cuticular waxes on diffusion of water. *Planta* 131:159-164.
- Schönherr J y Huber R.** 1977. Plant cuticles are polyelectrolytes with isoelectric points around three. *Plant Physiol.* 59:145-150.
- Schönherr J.** 2001. Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions, and adjuvants. *J. Plant Nutrit. Soil Sci.* 164:225-231.
- Schönherr J, Fernández V y Schreiber L.** 2005. Rates of cuticular penetration of chelated Fe(III): Role of humidity, concentration, adjuvants, temperature, and type of chelate. *J. Agric. Food Chem.* 53:4484-4492.

- Schönherr J.** 2006. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *J. Exp. Bot.* 57:2471-2491.
- Schowaneck D, Feijtel T C J, Perkins C M, Hartman F A, Federle T W y Larson R J.** 1997. Biodegradation of [S,S], [R,R] and mixed stereoisomers of ethylene diamine disuccinic acid (EDDS), a transition metal chelator. *Chemosphere* 34:2375–2391.
- Schwertmann U.** 1991. Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant Soil* 130:1-25.
- Sjöström E.** 1993. The Structure of wood. *En: Wood Chemistry. Fundamentals and Applications.* Sjöström E, ed.; Academic Press Inc.: San Diego, California.
- Skogerboe R K y Wilson S A.** 1981. Reduction of ionic species by fulvic acid. *Anal. Chem.* 53:228-232.
- Smith B.** 1984. Iron in higher plants: storage and metabolic role. *J. Plant Nutr.* 7:759-766.
- Stevenson F J.** 1994. Humus chemistry: Genesis, composition, reaction. John Wiley & Sons: New York, USA.
- Struyk Z y Sposito G.** 2001. Redox properties of standard humic acids. *Geoderma* 102:329-346.
- Susín S, Abian J, Peleato M L, Sánchez-Baeza J, Abadía A, Gelpí E y Abadía J.** 1994. Flavin excretion from roots of iron-deficient sugar-beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* 193:514-519.
- Susín S, Abadía A, González-Reyes J A, Lucena J J y Abadía J.** 1996. The pH requirement for in vivo activity of the iron-deficiency-induced “Turbo” ferric chelate reductase. A comparison of the iron-deficiency-induced iron reductase activities of intact plants and isolated plasma membrane fractions in sugar beet. *Plant Physiol.* 110:111-123.
- Swietlik D y Faust M.** 1984. Foliar nutrition of fruit crops. *Hort. Rev.* 6:287–356.
- Szabó-Nagi A y Erdei L.** 1993. The effects of iron deficiency on the ATPase and ferricyanide reductase activities of plasma membrane purified by phase partitioning from sunflower roots. *J. Plant Nutr.* 142:579-584.
- Tagliavini M y Rombolà A D.** 2001. Iron deficiency and iron chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Europ. J. Agronomy* 15:71-92.
- Takagi S.** 1976. Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washing. *Soil Sci. Plant Nutr.* 22:423-433.
- Tamura H, Knoche M, Hayasi Y y Bukovac M J.** 2001. Selective solubilisation of tomato fruit epicuticular wax constituents by Triton X-100 surfactant. *J. Pest. Sci.* 26: 16–20.

- Tan K H.** 1993. Colloidal chemistry of organic soil constituents. En: Principles in soil chemistry. Dekker M, ed.; New York: USA.
- Tandy S, Bossart K, Mueller R, Ritschel J, Hauser L, Schulin R y Nowack B.** 2004. Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 38:937-944.
- Tandy S, Amman A, Schulin R y Nowack B.** 2006. Biodegradation and speciation of residual SS-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) in soil solution left after soil washing. *Environ. Pollut.* 142:191-19.
- Terry N y Low G.** 1982. Leaf chlorophyll content and its relation to the intracellular localization of iron. *J. Plant Nutr.* 5:301-310.
- Terry N y Abadía J.** 1986. Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr.* 9:609-646.
- Tiffin L O y Brown J C.** 1962. Iron chelates in soybean exudate. *Science* 19:466-480.
- Tiffin L O.** 1966a. Iron translocation I. Plant culture, exudate sampling, iron-citrate analysis. *Plant Physiol.* 41:510-514.
- Tiffin L O.** 1966b. Iron translocation II. Citrate/Iron ratios in plant stem exudates. *Plant Physiol.* 41:515-518.
- Toulon V, Sentenac H, Thibaud J B, Davidian J C, Moulineau C y Grignon C.** 1992. Role of apoplast acidification by the H<sup>+</sup> pump. Effect on the sensitivity to pH and CO<sub>2</sub> of iron reduction by roots of *Brassica napus* L. *Planta* 186:212-218.
- Tukey H B, Wittwer S H y Bukovac M J.** 1961. Absorption of radionucleotides by aboveground plant parts and movement within the plant. *Ag. Food Chem.* 9:106-112.
- Udoh D J y Nelson L E.** 1986. Trifluralin-induced Fe chlorosis in soybeans (*Glycine Max* (L.) *Mrr.*) grown on clayey, high pH soils. *Plant Soil.* 96:175-184.
- Uren N C.** 1984. Forms, reactions and availability of iron in soils. *J. Plant Nutr.* 7:165-176.
- Valenti V, Scalorbi M y Guerrini F.** 1991. Induction of plasma membrane NADH-ferricyanide reductase following iron stress in tomato roots. *Plant Physiol. Biochem.* 29:249-255.
- Van Dijk H.** 1971. Cation binding of humic acids. *Geoderma* 5:53-67.
- Vandevivere P C, Saveyn H, Verstrete W, Fejtel T C y Schowanek D R.** 2001. Biodegradation of metal-(S,S)-EDDS complexes. *Environ. Sci. Technol.* 35:1765-1770.
- Varanini Z y Pinton R.** 2006. Plant-soil relationship: role of humic substances in iron nutrition. pp. 153-168. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric

- Microorganisms. Barton L L y Abadía J, eds.; Springer-Verlag Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Vert G A, Briat J F y Curie C.** 2003. Dual regulation of the *Arabidopsis* high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol.* 132:796-804.
- Villén Gómez M.** 2007. Correctores biodegradables de carencias de Ca y micronutrientes: Determinación del elemento complejado, reactividad y efectividad.
- Villén M, García-Arsuaga A y Lucena J J.** 2007a. Potential use of biodegradable chelate N-(1,2-Dicarboxyethyl)-D,L-aspartic acid/Fe<sup>3+</sup> as an Fe fertilizer J. *Agric. Food Chem.* 55:402-407.
- Villén M, Cartagena M C, Bravo R, García-Mina J M, Martín de la Hinojosa M I y Lucena J J.** 2007b. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers and the complexing capacity of complexing agents. *J. Agric. Food Chem.* 55:5746-5753.
- Wagner V y Moog P R.** 1997. Biochemical characterization of plasma membrane-bound ferric chelate reductase activity isolated from spinach leaves. pp.: 68. En: Abstracts 9<sup>th</sup> International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Wallace A.** 1982. Historical landmark in progress relating to iron chlorosis in plants. *J. Plant Nutr.* 5:277-288.
- Wallace T.** 1928. Investigations on chlorosis of fruit trees. IV. The control of lime-induced chlorosis on the field. *J. Pomol. Hort. Sci.* 7:251-268.
- Wallihan E F y Heymann-Herschberg L.** 1956. Some factors affecting absorption and translocation of zinc in citrus plants. *Plant Physiol.* 31:294-299.
- Wallihan E F, Embleton T W y Sharpless R G.** 1964. Response of chlorotic citrus leaves to iron sprays in relation to surfactants and stomatal apertures. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 85:210-217.
- Wang C J y Liu Z Q.** 2007. Foliar uptake of pesticides - present status and future challenge. *Pestic. Biochem. Physiol.* 87:1-8.
- Waters B M, Blevins D G y Eide D J.** 2002. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol.* 129:85-94.
- Weinbaum S A y Neumann P M.** 1977. Uptake and metabolism of <sup>15</sup>N-labelled potassium nitrate by French prune (*Prunus domestica* L.) leaves and the effects of two surfactants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102:601-604.
- Weinbaum S A.** 1996. Foliar nutrition of fruit trees. pp. 81-100. En: *Plant Growth and Leaf Applied Chemicals.* Neumann P M, ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.

- Weinberger J H, Prince V E y Havis L.** 1949. Test on foliar fertilisation of peach trees with urea. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 53:26-28.
- Welkie G W y Miller G W.** 1993. Plant iron uptake physiology by nonsiderophore system. pp.: 345-369. En: Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms. Academic Press: San Diego, CA, USA.
- Welkie G W.** 1996. Iron-deficiency stress response of a chlorosis-susceptible and chlorosis-resistant cultivar of muskmelon as related to root riboflavin excretion. J. Plant Nutr. 19:1157-1169.
- Wójcik P.** 2004. Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization (Review). J. Fruit Ornam. Plant Res. 12:201-218.
- Xie R J, Meier J, Fyles J W, Mackenzie A F, O'Halloran I P y Russel, E.** 1993. Effects of calcium lignosulfonates on urea hydrolysis and nitrification in soil. Canadian Soil Science. 156:278-285.
- Yang X, Römheld V y Marscher H.** 1994. Effect of bicarbonate on root growth and accumulation of organic acids in Zn-inefficient and Zn-efficient rice cultivars *Oryza sativa* L. Plant Soil. 164:1-7.
- Yao H L y Yeh H H.** 1996. Fumarate, maleate, and succinate adsorption on hydrous  $\delta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . 1. Comparison of the adsorption maxima and their significance. Langmuir 12: 2981-2988.
- Yen P, Inskeep W y Westerman R.** 1988. Effects of soil moisture and phosphorus fertilization on iron chlorosis of sorghum. J. Plant Nutr. 11:1517-1531.
- Ylivainio K, Jaakkola A y Aksela R.** 2004. Effects of Fe compounds on nutrient uptake by plants grown in sand media with different pH. J. Plant Nutr. Soil Sci. 167:602-608.
- Ylivainio K, Jaakkola A y Aksela R.** 2006. Impact of liming on utilization of  $^{59}\text{Fe}$ -chelates by lettuce (*Lactuca sativa* L.). I Plant Nutr. Soil Sci. 169:523-528.







**Universidad Autónoma de Madrid**  
Departamento de Química Agrícola

