



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad Nacional de La Pampa

Tesina presentada para obtener  
el grado académico de  
LICENCIADO EN QUÍMICA

Efectos del Boro sobre la simbiosis  
*Medicago sativa* - *Sinorhizobium meliloti*.  
Aplicaciones en fitorremediación.

BRUN JOSEFINA



FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y NATURALES

## **PREFACIO**

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad ni en otra institución académica. Se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Química de La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales durante el período comprendido entre el 27 de Julio de 2012 y 9 de Mayo de 2013, bajo la dirección de la Dra. Mónica Bellozas Reinhard, y bajo la codirección de la Dra. Patricia García.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Pampa y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por darme la posibilidad de realizar este trabajo.

A mi directora la Dra. Mónica Bellozas por su infinita paciencia, por sus palabras justas en el momento justo, por sus aportes, sugerencias y consejos. A mi co-directora la Dra. Patricia García por su gran predisposición, por aportar siempre su tranquilidad y sabias sugerencias. Además le agradezco a ambas por esas charlas compartidas, sinceras y del corazón que se quedarán conmigo para siempre.

A la Dra. Alicia Grassano le debo un gran agradecimiento por su paciencia y por toda la ayuda desinteresada brindada a lo largo del desarrollo de esta tesina.

Al Dr. José Camiña por su asesoramiento en la realización del análisis estadístico de los resultados.

A toda la gente del Departamento de Química, personal docente y no docente por su colaboración permanente; especialmente a Mari y Marcelo por ayudarme y bancarme siempre.

Al Ing. Alfredo Bono y a la Lic. Nanci Kloster por sus valiosos aportes, tanto en la parte humana como académica; por recibirme y hacerme sentir una más en el INTA-Anguil, muchas gracias!!.

A mis mujeres preferidas Jime, Fer, Magui, Anto, Nati, Yesi, Tami, Yani, Flor y Fer por su buena onda, por su compañía y por estar siempre; feliz de haberlas conocido!. A mis amigas de toda la vida: Meli, Gaby, Vicky y Abi por acompañarme y darme su apoyo incondicional aún a la distancia. Gracias por ser parte de mi vida, las quiero!

A toda mi gran familia por su amor, paciencia, contención, apoyo incondicional y por brindarme su cariño y bellos consejos. A mis padres en especial, gracias por confiar en mí y darme la posibilidad de desarrollarme como persona y profesional.

A Mauro, por su paciencia, por haber compartido conmigo todos estos años y por estar a mi lado en todos los momentos importantes de mi vida.

Y a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a la realización de esta tesina. Gracias de corazón!

## RESUMEN

Las pasturas perennes componen la base forrajera en la cual se sustenta la producción de carne en nuestro país, dentro de ellas la alfalfa (*Medicago sativa* L.) constituye uno de los recursos forrajeros más importantes. El boro es esencial para el crecimiento de la alfalfa, específicamente en el mantenimiento de la estructura de la pared celular y de las membranas, en la actividad meristemática, división celular y en la nodulación. La necesidad de altos requerimientos de este micronutriente en el correcto desarrollo de la alfalfa, podría ser utilizada como una propiedad en el uso de la leguminosa como un cultivo para recuperar suelos contaminados con B. El objetivo es comprobar que la alfalfa en simbiosis con *Sinorhizobium meliloti* puede ejercer un efecto fitorremediador, en suelos con niveles de B superiores a los definidos por las normativas vigentes para suelos agrícolas. En este trabajo, se llevaron a cabo ensayos en invernadero con plántulas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti*, en ausencia de B y con concentraciones crecientes del elemento. Se cuantificó la concentración de B en el sustrato al comienzo y al finalizar este ensayo mediante el método de la Azomethina-H; también se determinó el contenido de B foliar y rendimiento por peso seco del vegetal, proteínas y nitrógeno total. Los resultados de este trabajo indican que *M. sativa* en simbiosis es tolerante a altas concentraciones de este elemento; por lo cual podría considerarse prometedora en la remediación de suelos con concentraciones de B de hasta 20 ppm, ya que produjo una reducción del elemento en el sustrato de entre 29 y 100%.

## ABSTRACT

Perennial pastures are the forage basis which supports the production of meat in our country, among them alfalfa (*Medicago sativa L.*) is one of the most important forage resources. Boron is essential to the growth of alfalfa, especially in maintaining cells wall and membrane structure; and in meristematic activity, cell division and nodulation. The need for high requirements of this micronutrient in the proper alfalfa development could be used as a property in the use of this legume as a crop to recover boron-contaminated soils. The aim of this work is to probe that alfalfa in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* can exert a phytoremedial effect in soils with higher levels of this element to those defined by current standards for agricultural soils. In this study, trials were performed in the greenhouse with alfalfa seedlings inoculated with *S. meliloti*, in the absence of B and with increasing concentrations of the element. The concentration of B in the substrate was determined at the beginning and in the end of this test by the method of the Azomethine-H. It was also determined the content of B in the leaves and the yield by dry weight, total nitrogen and proteins. The results of this study indicate that *M. sativa* is tolerant to high concentrations of this element, thus it could be considered promising in the recovery of soils with concentrations of up to 20 ppm B, since the element reduction in the substrate was between 29 and 100%.

# INDICE

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. El cultivo de la alfalfa en Argentina	1
1.1.1. Requerimientos edáficos, hídricos y climáticos	2
1.1.2. Requerimientos nutricionales	3
1.1.3. Asociación con microorganismos fijadores de nitrógeno	5
1.1.3.1 Desarrollo de la simbiosis rizobio-leguminosa	6
1.2. Boro	9
1.2.1. Química del Boro	9
1.2.1.1. Disponibilidad de Boro	11
1.2.2. Desempeño Funcional del Boro en las plantas	12
1.2.3. Requerimientos de Boro	14
1.2.4. La deficiencia de Boro	16
1.2.5. Toxicidad de Boro	20
1.3. Fitorremediación	21
<b>2. Hipótesis y Objetivo</b> .....	23
2.1. Hipótesis	23
2.2. Objetivo	23
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	24
3.1. Ensayo <i>in vitro</i> : Crecimiento y supervivencia de <i>S.meliloti</i> en concentraciones crecientes de Boro	24
3.2. Ensayo de Invernadero	24
3.2.1. Ensayo Preliminar o Screening	24
3.2.2. Ensayo Final	25
3.3. Extracción y Determinación de B en perlita	26
3.3.1. Procedimiento de Extracción de B con Acetato de Amonio 1 N	26
3.3.2. Cuantificación de Boro	27
3.4. Extracción y Determinación de B foliar	28
3.5. Parámetros de Crecimiento y Rendimiento Vegetal	28
3.5.1. Recuento de Nódulos	28
3.5.2. Determinación de Volumen Radicular	28
3.5.3. Determinación de Peso Seco de Parte Aérea y Raíces	29

3.5.4. Determinación de Nitrógeno Total y Proteínas	29
3.6. Análisis Estadístico	29
<b>4. Resultados</b> .....	<b>30</b>
4.1. Ensayo <i>in vitro</i> : crecimiento y supervivencia de <i>S. meliloti</i> en concentraciones crecientes de Boro	30
4.2. Calibración Método Azometina-H	31
4.3. Ensayo Preliminar de Invernadero	32
4.4. Ensayo Final	33
4.4.1. Características Cualitativas del Ensayo	33
4.4.2. Parámetros de Crecimiento y Rendimiento Vegetal	34
4.4.2.1. Recuento de Nódulos	34
4.4.2.1.1. Plantas de alfalfa inoculadas con <i>S. meliloti</i> B399	34
4.4.2.2. Volumen Radicular	36
4.4.2.2.1. Plantas de alfalfa inoculadas con <i>S. meliloti</i> B399	36
4.4.2.2.2. Plantas de alfalfa fertilizadas con KNO <sub>3</sub>	36
4.4.2.3. Peso Seco Parte Aérea	37
4.4.2.3.1. Plantas de alfalfa inoculadas con <i>S. meliloti</i> B399	37
4.4.2.3.2. Plantas de alfalfa fertilizadas con KNO <sub>3</sub>	38
4.4.2.4. Peso Seco Raíces	38
4.4.2.4.1. Plantas de alfalfa inoculadas con <i>S. meliloti</i> B399	38
4.4.2.4.2. Plantas de alfalfa fertilizadas con KNO <sub>3</sub>	39
4.4.2.5. Contenido de Nitrógeno	40
4.4.2.5.1. Ensayo Completo	40
4.4.2.5.2. Plantas de alfalfa inoculadas con <i>S. meliloti</i> B399	40
4.4.2.5.3. Plantas de alfalfa fertilizadas con KNO <sub>3</sub>	41
4.4.3. Determinación de Boro	41
4.4.3.1. B en el Sustrato	41
4.4.3.1.1. Ensayo Completo	41
4.4.3.1.2. Plantas de alfalfa inoculadas con <i>S. meliloti</i> B399	43
4.4.3.1.3. Plantas de alfalfa fertilizadas con KNO <sub>3</sub>	43
4.4.3.2. Concentración de Boro Foliar	44
<b>5. Discusión</b> .....	<b>45</b>
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>50</b>
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>51</b>
<b>8. Anexo</b> .....	<b>66</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 El cultivo de la alfalfa en Argentina

La alfalfa (*Medicago sativa*) es la principal especie forrajera del país y la base de la producción de carne y leche en la Región Pampeana. La difusión del cultivo se apoya en sus altos rendimientos de materia seca por hectárea, su excelente calidad forrajera y su gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (suelo, clima y manejo). Por otro lado, su capacidad para la fijación del nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis con *Sinorhizobium meliloti* la convierte también en un importante componente de la sustentabilidad de los sistemas productivos (Basigalup & Rosanigo, 2007). Por ello, mejorar su producción ha sido y es un objetivo tanto de los productores como de los científicos.

Este cultivo se adapta en casi todo el país, a excepción de los suelos lateríticos de la Mesopotamia y las áreas donde la precipitación anual es inferior al mínimo requerido para la supervivencia de la especie. Las principales áreas de producción se localizan en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, La Pampa, Santa Fe y Entre Ríos. Esta región (ubicada entre los paralelos 30-40°S y los meridianos 58-65°W) representa más del 90% de la superficie con alfalfa de la Argentina.

Se establece sola o con cultivos anuales acompañantes, entre los cuales pueden citarse avena, trigo y centeno. La provincia de Córdoba es la principal productora de alfalfa pura, en tanto que Buenos Aires es la mayor productora de alfalfa asociada con gramíneas anuales o perennes tales como festuca (*Festuca arundinacea*), pasto ovillo (*Dactylis glomerata*), cebadilla (*Bromus unioloides*), falaris (*Phalaris aquatica*) y agropiro (*Agropyron elongatum*). Como especie pura o consociada, la alfalfa integra el 58% del total de las forrajeras de la Región Pampeana (INDEC, 2003).

En la Región Semiárida Pampeana, la alfalfa se cultiva casi exclusivamente en condiciones de secano y predominantemente en otoño. Los rendimientos promedio en forraje obtenidos en parcelas de cultivos puros, correspondientes a la red de evaluación de cultivares del INTA, fluctuaron entre 8 tn MS/ha.año en Anguil y 20,5 tn MS/ha.año en Marcos Juárez (Spada, 1995, 1998, 2000 y 2001). Esta variabilidad en la producción del forraje, independientemente del tipo de suelo, se puede atribuir en gran medida a la variación en la disponibilidad de agua, radiación y temperatura. Por lo tanto, la producción del forraje estará condicionada principalmente por la captura de agua y radiación solar, y por las condiciones de temperatura, que pueden ejercer algún grado de limitación en la eficiencia de uso de los recursos anteriormente nombrados.



### 1.1.1 Requerimientos edáficos, hídricos y climáticos

Por ser una especie de gran plasticidad, la alfalfa se adapta a un amplio rango de condiciones climáticas y tiene una considerable tolerancia a la sequía, al frío y a cierto grado de salinidad (Marble & col., 1986) por lo que puede prosperar en regiones semiáridas, subhúmedas y húmedas. Para una alta producción de forraje, la alfalfa requiere suelos profundos (mayores a 1,2 m), bien aireados, de reacción más bien neutra (pH 6,5 a 7,5), con bajo contenido de álcalis y sales solubles, y buena fertilidad, especialmente fósforo. A medida que las condiciones reales se alejen de este marco ideal, el cultivo disminuye su rendimiento y su persistencia (Basigalup & Rosanigo, 2007).

Superada la implantación, etapa en la cual la disponibilidad de humedad es fundamental, la alfalfa está morfológica y fisiológicamente adaptada para tolerar períodos de deficiencia hídrica de cierta duración. De no existir impedimentos en el perfil (piso de arado, capa de tosca, horizontes muy densificados, etc.), sus raíces pueden extraer humedad desde los 2 metros de profundidad a los 2 años y desde los 4 metros a los tres años de vida (Kiesselbach & col., 1929). No obstante, para mantener altas producciones de forraje, la especie requiere de una apreciable cantidad de humedad (Heichel, 1983).

Los requerimientos hídricos, como en todas las plantas, dependen de la pérdida por evaporación, que está regulada por factores ambientales (temperatura, velocidad del viento y humedad relativa) y morfológicos (número y tamaño de estomas, área foliar, estructura del canopeo y resistencia al movimiento del agua dentro de la planta). Estos factores generan diferencias de comportamiento entre variedades y entre distintos estados de desarrollo fenológico (Peoples & Kock, 1978; Setter & col., 1978).

Un aumento en la cantidad de nutrientes genera, a una misma disponibilidad de agua, mayor producción de materia seca sin afectar la demanda evaporativa. La eficiencia en el uso del agua se ve incrementada por mejores condiciones nutricionales (Romero & col., 1977).

Así como la alfalfa es tolerante a la sequía, es muy sensible al anegamiento del suelo. La falta de drenaje y el exceso de humedad en el perfil son considerados factores adversos para la producción de semilla, dado que no sólo favorecen el excesivo desarrollo vegetativo, sino que también pueden producir la muerte de plantas por asfixia radicular y/o desarrollo de enfermedades de raíz (Cabral & col., 1985). El encharcamiento de los lotes produce la falta de oxigenación de las raíces, lo que puede llevar a la muerte rápida de las plantas. Además, las condiciones de alta humedad favorecen el desarrollo de agentes patógenos que también pueden afectar gran cantidad de plantas. La magnitud de los daños por anegamiento es variable según el estado fisiológico del cultivo y la temperatura ambiente; en este sentido, la tolerancia es mayor en plantas adultas y con temperaturas moderadas (Romero & col., 1995).

## Introducción

Las condiciones climáticas que favorecen la producción de semilla de alfalfa son: a) un período de crecimiento de por lo menos 150 días de duración; b) temperaturas promedio de 24-25 °C durante el día y mayores a 18°C durante la noche a lo largo del período de floración; c) aire relativamente seco ( $HR < 50\%$ ), tanto en el día como en la noche, durante el momento de floración; d) alta heliofanía y ausencia de vientos fuertes durante la floración, con un mínimo de días nublados y frescos; e) días largos, con un mínimo de 14 horas de luz, y f) distribución de lluvias o riegos que provea de la adecuada humedad del suelo para promover un crecimiento vegetativo temprano y una reducción gradual de la humedad edáfica a partir del nacimiento de la floración. (Moschetti & col., 2007).

Estas características, rigen la producción en regiones áridas y semiáridas, donde se alcanzan los rendimientos promedio más altos. Si bien la alfalfa es una especie de día largo, no es completamente sensible al fotoperíodo, existiendo considerables diferencias entre genotipos. La respuesta a la longitud del día también está influenciada por la radiación y la temperatura (Fick & col., 1988).

### 1.1.2 Requerimientos nutricionales

Las pasturas de alfalfa bien implantadas y adecuadamente manejadas convierten diariamente la energía solar en materia seca, acercándose a los niveles de productividad potencial propios de cada ambiente. Los nutrientes provistos por el suelo, la fertilización y otros procesos biológicos tienen un papel preponderante en el rendimiento productivo del cultivo, dependiendo del ambiente en el cual se desarrolla y el manejo empleado.

La alfalfa, así como todos los cultivos, requiere de agua y de macro y microelementos para la conversión de energía solar (radiación) en materia seca. De los nutrientes que consume, el N (nitrógeno), P (fósforo), y con menos frecuencia el B (boro) y S (azufre), son los más limitantes en ausencia de otras restricciones tales como hídricas, salinas, etc. De la misma manera, la alfalfa requiere de otros nutrientes como Ca (calcio), Mg (magnesio), Fe (hierro), Co (cobalto), Mo (molibdeno), que por más que no son limitantes en la mayoría de los suelos, es menester conocer cuantitativamente su presencia ya que cumplen un papel importante en el metabolismo de la planta. (Bruno & Romero, 1997). Los requerimientos nutricionales se resumen en las **Tablas 1.1 y 1.2**.

Requerimientos Nutricionales Alfalfa			
MACRONUTRIENTES	kg/tn	MICRONUTRIENTES	kg/tn
<b>Nitrógeno</b>	28,0 *	<b>Boro</b>	0,0027
<b>Potasio</b>	22,0	<b>Manganeso</b>	0,0025
<b>Calcio</b>	12,0	<b>Zinc</b>	0,0015
<b>Azufre</b>	3,8	<b>Cobre</b>	0,0007
<b>Magnesio</b>	3,0	<b>Molibdeno</b>	0,0005
<b>Fósforo</b>	2,8		

\*Requerimientos mayormente provistos por la fijación biológica del N atmosférico.

**Tabla 1.1:** Requerimientos nutricionales de macro y micronutrientes para la producción de materia seca de alfalfa. Adaptado de Díaz Zorita & Gambaudo, 2007.

	Deficiente	Suficiente		Deficiente	Suficiente
Macronutriente	kg/tn		Micronutriente	kg/tn	
<b>Nitrógeno</b>	< 40,0	46,0-70,0	<b>Manganeso</b>	<0,02	0,026-0,25
<b>Fósforo</b>	<2,0	2,6-7,0	<b>Hierro</b>	<0,02	0,031-0,30
<b>Potasio</b>	<17,5	20,0-40,0	<b>Boro</b>	<0,01	0,029-0,08
<b>Calcio</b>	<2,5	5,1-30,0	<b>Cobre</b>	<0,006	0,01-0,03
<b>Magnesio</b>	<2,0	2,6-10,0	<b>Molibdeno</b>	<0,0005	0,0011-0,004
<b>Azufre</b>	<2,0	2,6-5,0	<b>Zinc</b>	<0,01	0,021-0,07

**Tabla 1.2:** Clasificación del estado nutricional de la alfalfa sobre la base de rangos de concentración de nutrientes en hojas. Adaptado de Díaz Zorita & Gambaudo, 2007.

Los requerimientos nutricionales de la alfalfa son variables según el nivel de producción (**Tabla 1.3**) y el manejo a que es sometida. La intensidad de ésta demanda cambia con las condiciones ambientales, época del año y el estadio fenológico del cultivo. Además, el aprovechamiento de los nutrientes está determinado tanto por factores edáficos, como por la capacidad de la planta para tomarlos y utilizarlos. Con una fertilización equilibrada, se obtendrán no solo pasturas de excelente calidad, sino también un aumento de la productividad.

tn/ha	kg/ha							
alfalfa	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu
Hasta 9	227	25	205	99	17	18	0,22	0,06
9-11,2	253	32	270	121	21	22	0,28	0,07
11,2-13,4	351	38	315	148	27	28	0,34	0,08
13,4-15,7	418	45	379	162	29	32	0,37	0,09
15,7-17,9	480	53	451	187	34	38	0,41	0,1
>17,9	559	61	524	226	39	47	0,48	0,12

**Tabla 1.3:** Requerimientos de macro y micronutrientes en función de la producción de alfalfa. Adaptado de Moreno Sastre, 2007.

### 1.1.3 Asociación con microorganismos fijadores de nitrógeno

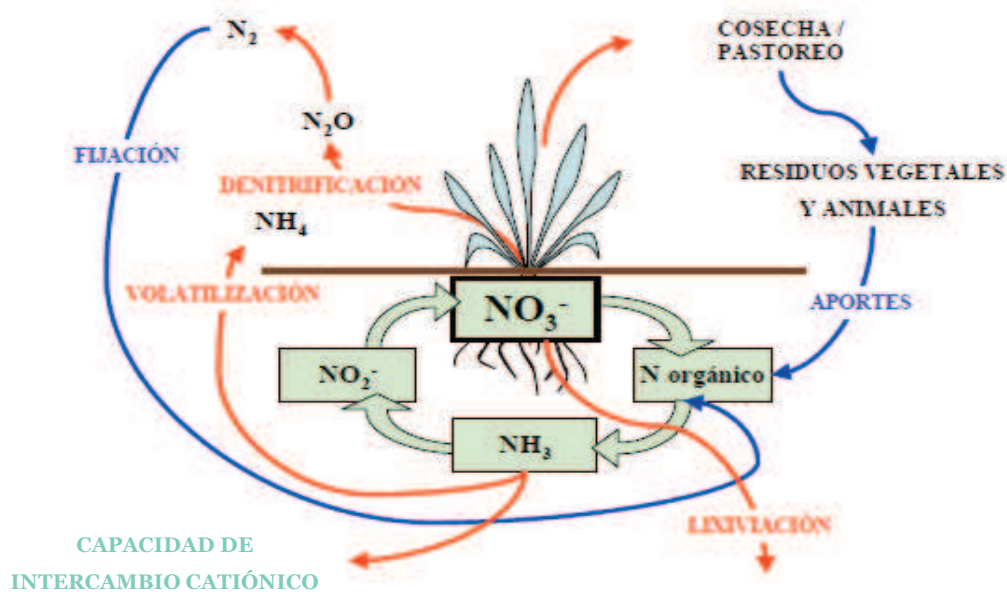
La alfalfa depende del nitrógeno del aire para abastecerse de este elemento, a través de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) gracias a la asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* (Vance & Lamb, 2001). Estas bacterias pueden encontrarse naturalmente en el suelo o ser incorporadas junto a la semilla en el proceso de inoculación (Date, 2001). Para un adecuado suministro de nitrógeno del nódulo a la planta durante su ciclo de crecimiento, es fundamental lograr una excelente nodulación y una eficiente actividad fijadora de nitrógeno (Grassano & col., 2002). Estos dos objetivos están ligados íntimamente a la nutrición (O'Hara, 2001).

Heichel y col. (1983) estimaron que la alfalfa puede obtener de la FBN entre 43 y 64% de sus requerimientos totales de N. Se ha determinado, que el cultivo puede fijar entre 50 y 740 kg de N<sub>2</sub> por hectárea por año, con un promedio de aproximadamente 200 kg de N<sub>2</sub>/ ha.año (Heichel & col., 1983; Da & Deng, 2003; Vance, 1978). Este amplio rango en las estimaciones de N<sub>2</sub> fijado, está condicionado por una serie de factores, entre los que se incluyen la cepa del rizobio y su interacción con el genotipo de la planta, las condiciones ambientales (pH, contenido de nutrientes del suelo, disponibilidad de agua, radiación, temperatura, etc.) y las alternativas de manejo del cultivo (Vance & col., 1988).

El establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno, es el resultado de una compleja serie de eventos coordinados de comunicación, reconocimiento y diferenciación entre la planta de alfalfa y su bacteria específica. Cuando estos pasos se cumplen, la manifestación de la simbiosis es la formación de un nuevo órgano vegetal: el nódulo. Este último, está habitado por las bacterias simbióticas que, transformadas en bacteroides, son capaces de cumplir con el proceso de reducción del N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> (Hirsch & col., 2001).

### 1.1.3.1 Desarrollo de la simbiosis rizobio-leguminosa

El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es el componente mayoritario en la atmósfera de nuestro planeta, constituyendo aproximadamente el 80% de la misma. Es además, parte esencial de componentes biológicos como proteínas y ácidos nucleicos, indispensables para el mantenimiento de la vida. Sin embargo, la mayor parte de los organismos vivos, como es el caso de las plantas, no poseen la capacidad de incorporarlo directamente de la atmósfera, sino que lo incorporan principalmente en forma de nitratos ( $NO_3^-$ ) o amonio ( $NH_4^+$ ) desde el sistema edáfico. Además, teniendo en cuenta que el nitrógeno es el factor limitante más importante en el desarrollo de las plantas, su aporte al medio edáfico suele llevarse a cabo por adición de fertilizantes químicos comerciales.



**Figura 1.1:** Ciclo BioGeoQuímico del Nitrógeno (Capene & col. 2006)

La Fijación de Nitrógeno, es la etapa más importante del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (**Fig. 1.1**), considerado especialmente complejo debido a la mayoritaria existencia del elemento formando parte de moléculas estables. La fijación de nitrógeno conlleva la reducción inicial del nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ), que puede efectuarse abiótica o bióticamente, y supone en todo caso el consumo de una elevadísima cantidad de energía debido a la estabilidad de la molécula por la presencia de un triple enlace que une a los dos átomos de nitrógeno. De forma biótica, además de las cianobacterias en sistemas acuáticos, sólo ciertos microorganismos edáficos, todos ellos procarióticos, tienen la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo en amonio, que puede ser utilizado por la planta.

La FBN ofrece una serie de ventajas entre las que destaca la elevada eficiencia en la utilización del nitrógeno por parte de la planta, cercana al 100%, lejos de lo que viene a ocurrir con la aplicación de fertilizantes nitrogenados al suelo, debido a su baja eficiencia por la actuación de procesos como la

## Introducción

volatilización (o pérdida en forma gaseosa) o la lixiviación (o pérdida en forma soluble).

Dicha capacidad para fijar biológicamente el N<sub>2</sub>, reside en la presencia de un sistema enzimático conocido como nitrogenasa, que cataliza la conversión del nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) a la forma reducida (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), que es una de las formas biodisponibles del nitrógeno, y tiene lugar de acuerdo con la siguiente reacción:



La nitrogenasa, está constituida por dos metaloproteínas, la ferroproteína o nitrogenasa reductasa, y la ferromolibdoproteína o nitrogenasa (Zehr & col., 1998). La actividad de dicho complejo enzimático requiere grandes cantidades de energía y poder reductor, y una fina regulación del contenido en oxígeno, pues dicho sistema es extremadamente sensible a la presencia del mismo.

Dentro del grupo de organismos fijadores de nitrógeno, los hay que realizan la fijación en vida libre y otros que lo hacen estableciendo una relación simbiótica, como la de los rizobios con leguminosas (Vance & Lamb, 2001).

Los rizobios, que incluyen géneros como *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, son un grupo de bacterias edáficas capaces de interactuar simbióticamente con plantas leguminosas (pertenecientes a la familia Fabaceae), siempre y cuando el contenido de nitrógeno en el medio sea bajo, y dar lugar a una nueva estructura denominada nódulo, generalmente radicular, donde tiene lugar la fijación de nitrógeno (Brewin, 1991). En la simbiosis rizobio-leguminosa, la estructura del nódulo va a crear el ambiente microaerobio adecuado, y la acción de la leghemoglobina facilita el transporte de oxígeno al bacteroide (forma endofítica del rizobio) para que soporte el metabolismo aerobio requerido en la obtención de energía necesaria para la reducción del N<sub>2</sub>.

Este proceso de interacción entre la planta y el microorganismo, está precedido por la actuación de distintos componentes desencadenantes de la cascada de señalización, que culmina con el desarrollo del nódulo, donde tendrá lugar el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico y que, para su estudio, puede dividirse en varias fases o etapas (Brewin, 1991; Brewin & col., 2000; Ridge & Rolfe, 1985).

Para que se establezca la relación simbiótica deben ocurrir las siguientes etapas, tal como se muestran en la **Figura 1.2**:

- 1- Multiplicación de las bacterias en la rizosfera.
- 2- Colonización de la rizosfera.
- 3- Reconocimiento específico planta – rizobio mediante señales bioquímicas.
- 4- Adherencia de los rizobios a los pelos absorbentes.

## Introducción

5- Enroscamiento de los pelos absorbentes.

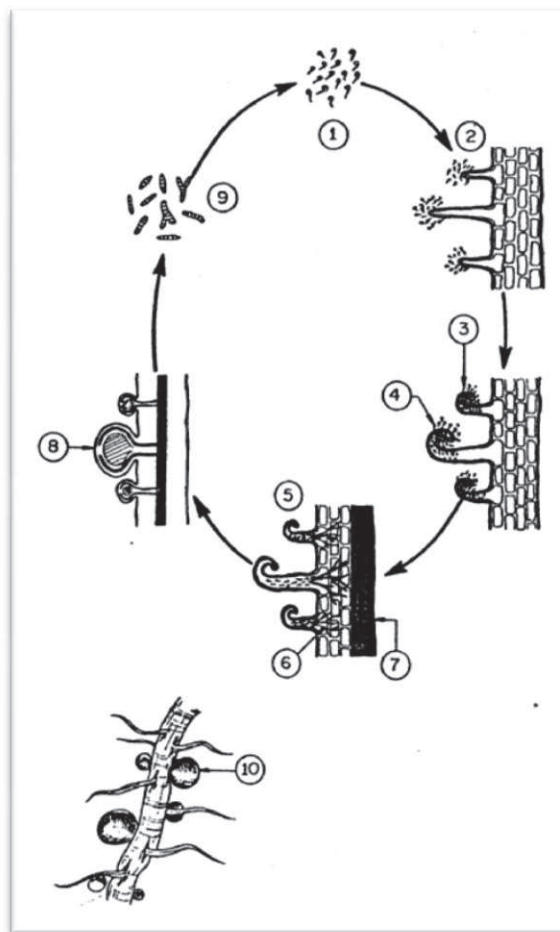
6- Invasión del pelo radical y formación de los hilos o zonas intercelulares de infección.

7- Crecimiento del hilo de infección hacia las células corticales o invasión directa de las mismas.

8- Ingreso de las bacterias a las células de la raíz

9- Diferenciación de los bacteroides dentro del nódulo.

10- Establecimiento del nódulo funcional maduro.



**Figura 1.2:** Etapas de la nodulación. (Sánchez-Yáñez, 1997).

La simbiosis es un proceso de interacción y comunicación específico entre los organismos implicados. Así pues, la elevada especificidad de interacción entre la planta y el microorganismo nos lleva a pensar en la importancia del papel que juegan los componentes aportados por ambos actores en la misma. De hecho, el proceso simbiótico ha sido considerado a veces, por parte de la literatura científica, como un fenómeno de características similares a las que presentan los procesos simbióticos y patogénicos (Rolfe & Gresshoff, 1988).

## Introducción

El establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio tiene lugar gracias a una cascada de señalización, que ha de estar finamente regulada con el fin de evitar la existencia de una respuesta de defensa por parte de la planta. Desde este punto de vista, parece que el rizobio es capaz de bloquear el proceso de defensa desencadenado típicamente en la planta ante la interacción con patógenos.

Es sabido que para favorecer y lograr una excelente nodulación, es esencial la presencia de B; por lo que puede afirmarse que en el proceso de simbiosis resulta de vital importancia (Bolaños & col., 2002; Bonilla & col., 2002).

### 1.2 Boro

El conocimiento acerca de la presencia de B en plantas se adquirió a principios del siglo XX con los estudios de Agulhon (1910) al demostrar la influencia beneficiosa de la adición de fertilizantes boratados sobre ciertos cultivos. Sin embargo, fueron los estudios de Warington (1923) los que probaron la esencialidad del B en plantas, concretamente en leguminosas, y la necesidad de un aporte continuo de boratos a los cultivos para un crecimiento óptimo. Las cantidades necesarias de B para los seres vivos, del orden de  $\mu\text{M}$ , lo colocan en el grado de micronutriente. Hoy en día se sabe que el B es esencial para plantas superiores (Gauch & Dugger, 1954; Hewitt, 1963; Parr & Loughman, 1983; Lovatt & Dugger, 1984), diatomeas (Smyth & Dugger, 1981), cianobacterias con heterocistos (Mateo & col., 1986; Bonilla & col., 1990) y bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  del género *Frankia* (Bolaños & col., 2002); mientras que no es aparentemente requerido por hongos (Shkol'nik & Maevskaya, 1977), algas verdes (Gerloff, 1968), cianobacterias sin heterocistos (Martínez & col., 1986) o las bacterias rizobiáceas en vida libre, aunque si es esencial en el sistema simbiótico rizobio-leguminosas (Bolaños & col., 1994).

#### 1.2.1 Química del Boro

El B es un elemento de número atómico 5, que pertenece a la familia de los metaloides, con lo cual posee características intermedias entre los metales y los no metales. Constituye el elemento de mayor diversidad química, por detrás del carbono, gracias a su particular disposición electrónica con electrones desapareados en el último orbital; por ello presenta una elevada electroafinidad, de modo que sus compuestos se comportan a menudo como ácidos de Lewis, reaccionando con rapidez con sustancias ricas en electrones. Tal es el caso de su asociación con el hidrógeno formando boranos (compuestos de síntesis), con los que establece un triple enlace covalente, quedando carente del par de electrones que completaría su orbital (Power & Woods, 1997; Greenwood & Earnshaw, 1997; Rodgers, 1995; Malavé Acuña, 2005).

En la naturaleza, el B se puede encontrar mayoritariamente asociado al oxígeno formando boratos, que suelen formar parte de depósitos evaporíticos, dando lugar a formaciones minerales de bórax (borato de sodio,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) y, en menor proporción, de colemanita (borato de calcio,  $\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). El B,



## Introducción

aunque en menor proporción, también precipita como ácido bórico  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , formando el mineral conocido como sassolita, asociado a actividad volcánica. Por otro lado, se pueden encontrar menas de B naturales en depósitos de pegmatitas, rocas formadas a partir de la solidificación de magmas silicatados y, en raras ocasiones, se encuentra unido al flúor formando el  $\text{BF}_4^-$  (Power & Woods, 1997).

Este elemento posee dos isótopos estables de masa 10 (19,9%) y 11 (80,1%), respectivamente.

Su estado de oxidación más habitual es +3, pero, dado el elevado requerimiento energético, no se encuentra en estado iónico en solución, lo que explica su carácter covalente.

El ácido bórico se comporta en una solución acuosa como un ácido de Lewis débil ( $K_a = 6 \times 10^{-10}$ ,  $\text{p}K_a = 9.25$ ) según la siguiente ecuación:

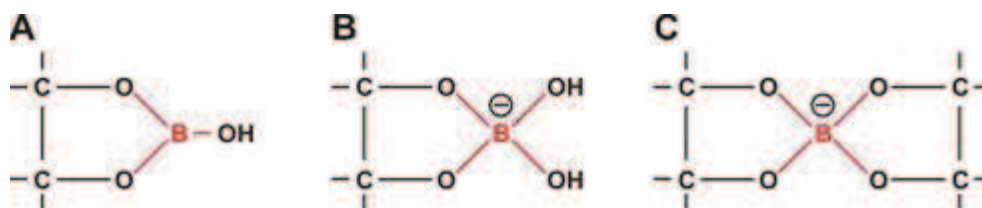


Esta reacción revela que a bajas concentraciones ( $\leq 0,02 \text{ M}$ ), únicamente estarán presentes las dos formas mononucleares del B, es decir,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y  $\text{B}(\text{OH})_4^-$ , mientras que, a altas concentraciones o bien por incremento del pH, comienzan a surgir iones polinucleares como el anión bórax ( $\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})^{2-}_4$ ).

Al pH fisiológico ( $\text{pH}=7.5$ ) el equilibrio está desplazado hacia la forma  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (98%). Por otro lado, este ácido puede formar enlaces éster con alcoholes de acuerdo a la siguiente ecuación:



Esta capacidad, también aplicable a polioles, le permite servir como puente de unión entre distintas moléculas hidroxiladas, como polisacáridos, dioles e hidroxiácidos, presentes en estructuras biológicas (**Fig. 1.3**).



**Figura 1.3:** Modelos esquemáticos de las distintas interacciones del ácido bórico con grupos cis diol. A) éster cis-diol monoborato; B) complejo monoborato; c) complejo bis(diol) borato. Extraído de Power & Woods, 1997.

Dentro de estas interacciones, y de acuerdo con lo establecido por Mazurek y Perlin (1963), los ésteres de borato más estables son los que mantienen enlaces cis-diol con un anillo de furano, cuya estructura presenta analogía con la furanosa. Así, en componentes de los seres vivos, únicamente la apiosa y la ribosa cumplen estas características, y precisamente, la apiosa forma parte de uno de los elementos de la fracción pectínica de la pared, el ramnogalacturonano II (RG-II), que se

encuentra formando dímeros gracias a la acción del B como elemento de anclaje entre las dos cadenas de RG-II a través de los residuos de apiosa (Kobayashi & col., 1996; O'Neill & col, 1996), lo que constituye hasta ahora la única función primaria demostrada del B en eucariotas.

### 1.2.1.1. Disponibilidad de Boro

El B presente en los suelos comúnmente se divide en tres categorías, que son: B total, B soluble en ácido y B soluble en agua, siendo éste último el indicador más confiable del contenido de B disponible en el suelo para las plantas. Una clasificación más detallada corresponde a cinco tipos:

1. Boro fácilmente soluble;
2. Boro específicamente adsorbido;
3. Boro enlazado a óxidos;
4. Boro enlazado orgánicamente y
5. Boro ocluido o residual. (Badr-Uz-Zaman & Salim, 1999; Hou & col., 1994)

Este elemento, cuyas necesidades en plantas son del orden  $\mu\text{M}$ , es absorbido por las plantas como  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Hu & Brown, 1997) y su biodisponibilidad va a ser dependiente de varios factores, que se detallarán a continuación (Goldberg, 1997):

- El **pH** del suelo. A medida que se incrementa el pH, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la forma aniónica,  $\text{B}(\text{OH})_4^-$  (predomina a pH mayor a 10), que además de no ser disponible para la planta, puede ser retenida por fenómenos de adsorción en los distintos materiales edáficos, favoreciendo la inmovilización del nutriente en el suelo.

Este fenómeno de adsorción y desorción en los suelos es dependiente de otro de los factores, la textura.

- La **textura** del suelo es un factor clave en la biodisponibilidad del nutriente. El tipo de constituyentes del suelo, fundamentalmente arcillas, óxidos y materia orgánica, ejercen una acción que dificulta la disponibilidad del nutriente al adsorberlo fuertemente, aunque al mismo tiempo, esta retención podría evitar la pérdida del micronutriente por lixiviación, de acuerdo al equilibrio establecido con el resto de factores. Por ejemplo, en suelos ricos en materia orgánica, la formación de coloides que contienen B puede favorecer la disponibilidad del mismo al evitar pérdidas por lixiviación; por el contrario, en suelos arcillosos, la retención del ácido bórico reduce su disponibilidad para la planta.

- La **humedad** es otro condicionante de la biodisponibilidad del B. En general, en suelos donde la humedad es baja, existen problemas de disponibilidad al verse afectado el transporte por flujo de masas del ácido bórico hacia el interior de la planta. Por otro lado, la existencia de condiciones climáticas con abundantes precipitaciones, pueden provocar la lixiviación del ácido bórico, con alta solubilidad, y consiguientemente, la pérdida del nutriente.

- La **temperatura** y su efecto sobre la disponibilidad del nutriente va a depender del tipo de suelo, que condiciona la adsorción del micronutriente. Se ha establecido, que en suelos con predominancia de minerales cristalinos el descenso de temperatura favorece la adsorción del ácido bórico; mientras que en suelos con predominancia de minerales amorfos, será el aumento de temperatura el que provoque el incremento de su adsorción.

- Otro de los factores a considerar a la hora de analizar la biodisponibilidad del B en el suelo, es el efecto que produce la **presencia de otros nutrientes**. Además de las interacciones físico-químicas que se puedan establecer y que pueden condicionar su disponibilidad, un punto clave a considerar es la proporción entre los nutrientes existentes en el sistema edáfico, pues la existencia de concentraciones elevadas de N, Ca o P, que suelen ir aparejadas a la adición de fertilizantes, puede convertir al B en limitante del crecimiento de la planta.

### 1.2.2 Desempeño funcional del Boro en las plantas

El B parece tener un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura de la pared celular y de las membranas. Es un elemento poco móvil en el floema, por ello los síntomas de deficiencia suelen aparecer en las hojas jóvenes y los de toxicidad en las hojas maduras. Un exceso de B es perjudicial para algunas plantas poco tolerantes al B, pudiendo actuar en sus nervaduras debilitándolas (Bolaños & col., 2004). Es esencial en la actividad meristemática y división celular, de ahí que una falta de este elemento produzca daños en los meristemas apicales y muerte de los ápices y brotes laterales.

Esta función en la división celular, explica la irregularidad en la expansión de los entrenudos y en la pobre expansión radicular. Es también determinante para el desarrollo de semillas y frutos. Si bien, el B es uno de los micronutrientes esenciales más importantes para las plantas, los rangos de concentraciones de suficiencia y toxicidad son muy estrechos y variables entre las distintas especies vegetales.

Este elemento es altamente soluble y depende del movimiento del flujo de agua del suelo. De ahí que, suelos arenosos con buen drenaje sean más propensos a tener deficiencias de este micronutriente, sobre todo en cultivos sensibles a la deficiencia del mismo como alfalfa.

Para favorecer y lograr una excelente nodulación, es esencial la presencia de calcio y boro. En lo que concierne a la simbiosis rizobio-leguminosa, en la relación B-Ca; el  $\text{Ca}^{2+}$  juega un papel preponderante en los procesos de iniciación del nódulo, pero, una vez en el ambiente endofítico, el B adquiere una especial importancia en la diferenciación del simbiosoma, así como en el mantenimiento de la estructura y la funcionalidad del nódulo (Redondo-Nieto & col., 2003).

En el proceso de simbiosis, el B se mostró esencial, al detectarse una disminución en la nodulación cuando se utilizaron como inóculo cultivos crecidos

## Introducción

en ausencia de B, y tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno (Bolaños & col., 2002; Bonilla & col., 2002).

Más recientemente, se comprobó que en los nódulos se producía una acumulación elevada de B en comparación con el resto de los tejidos de la planta, indicando un alto requerimiento en la estabilización de la estructura para un correcto funcionamiento del nódulo. Este hecho vino refrendado por un aumento en la sensibilidad a la deficiencia en B en plantas inoculadas respecto a aquellas plantas crecidas en presencia de  $\text{NO}_3^-$  (Gárate & col., 1993). Por lo tanto, en ausencia de B, de algún modo, no se ensamblan correctamente las proteínas de la pared originando las alteraciones observadas en la misma. También, en deficiencia de B se produce un descenso en la concentración de pectinas de la pared (Bonilla & col., 1997b), contribuyendo aún más a la desestabilización de la misma.

Este elemento, tiene un importante efecto sobre la fijación biológica. Nódulos deficientes en B, desarrollan estructuras infectivas anormales, con pérdida de bacteroides dentro de las células. La actividad de la enzima nitrogenasa disminuye y por consiguiente, también lo hace la cantidad de  $\text{N}_2$  fijado (Bolaños & col., 1994; Bolaños & col., 1996).

La fijación biológica del nitrógeno es una reacción basada en la acción de la enzima nitrogenasa, la cual es altamente sensible al oxígeno, por lo que el mantenimiento de las estructuras que la protegen de este elemento es crucial para el proceso. Aunque el B no es esencial para el funcionamiento de la nitrogenasa, se ha comprobado que es necesario para la realización del proceso de fijación en determinados sistemas por su participación en estructuras protectoras contra el oxígeno. En condiciones de deficiencia de B, tanto en nódulos indeterminados de guisante (*Pisum sativum*) (Bolaños & col., 1994) como en nódulos determinados de judía (*Phaseolus vulgaris*) (Bonilla & col., 1997a), se producen graves alteraciones en la pared celular, en la membrana plasmática y en la membrana peribacteroidea. Dichas alteraciones reducen la capacidad de resistencia a la difusión del  $\text{O}_2$ , dejando expuesta a la nitrogenasa y, por lo tanto, se produce una inactivación de la misma.

El B juega un papel muy importante en las relaciones que establece el rizobio con la planta dentro de la misma, y que controlan la transición de la bacteria por el tejido vegetal y su diferenciación a bacteroide. Experimentos in vitro han mostrado que la presencia de B inhibe la asociación de la matriz glucoproteica del canal de infección con la bacteria y promueve la interacción con la membrana vegetal (Bolaños & col., 1996). Por lo tanto, en ausencia de B, los componentes de la matriz se unen a la bacteria dificultando su progresión (Wisniewski & col., 2000) y su asociación a la membrana plasmática vegetal para su posterior endocitosis.

Además, las bacterias que en deficiencia de B logran invadir una célula, presentan una membrana peribacteroidea degenerada así como una estructura anómala del bacteroide (Bolaños & col., 1994).

## Introducción

El B tiene, además, un efecto beneficioso indirecto al favorecer la proliferación de micorrizas, aumentando la absorción de minerales de baja movilidad como P, Zn y Cu. La deficiencia en B disminuye la absorción de fósforo en forma directa.

Estudios de microscopía de plantas crecidas en deficiencia de B mostraron una desorganización de las paredes celulares vegetales (Hirsch & Torrey, 1980) así como un aumento en el tamaño del poro de la pared (Fleischer & col., 1999), efectos que desaparecían con la adición de B al medio de cultivo. Estos estudios mostraron una relación directa entre la estabilización de la pared y el B aunque no la forma en que se llevaba a cabo.

La otra función primaria del B de la que se tiene constancia, es su presencia en el complejo autoinductor 2 (AI2), que constituye una molécula señal en el proceso de comunicación bacteriana quorum sensing, mediante el cual, las bacterias llevan a cabo una regulación conjunta y coordinada de la expresión de genes, que resulta de vital importancia para su supervivencia en rizosfera y en fenómenos de interacción con otros organismos (fenómenos de interacción simbiótica o patogénica). Este autoinductor, a diferencia de otros que son característicos de la estirpe bacteriana, parece común a diversas especies microbianas y se ha propuesto como señal de comunicación entre especies (Chen & col., 2002). Es sintetizado por las bacterias a partir del compuesto S-adenosilmetionina, que de por sí, puede formar complejos estables in vitro con el B a alto pH (Hunt, 2002), y para su activación parece imprescindible la unión con furanosil diéster borato (Chen & col., 2002).

El conocimiento del papel que juega el B junto con el del resto de nutrientes en el desarrollo de los seres vivos, y en particular en las plantas, así como las relaciones que éstos mantienen entre sí, de acuerdo con las condiciones edafoclimáticas dadas, en la dinámica de la rizosfera y en las interacciones simbióticas o patogénicas que se establecen en ella, resultan de especial importancia para entender las necesidades reales de los cultivos, y todo en base a minimizar las pérdidas de productividad por malas prácticas agrícolas.

### 1.2.3 Requerimientos de Boro

No todas las plantas muestran la misma sensibilidad a la deficiencia en B, de hecho las concentraciones que para algunas especies son tóxicas, pueden ser insuficientes para otras (**Tabla 1.4**). De esta manera, se pueden clasificar a las plantas en tres grupos, de acuerdo a sus necesidades de B (Blevins & Lukaszewski, 1998):

- **Plantas con bajos requerimientos de B:** gramíneas. En ellas, es complicado reproducir condiciones de deficiencia de B. El contenido de B en hoja está comprendido entre 2 y 5 mg/kg.

- **Plantas con necesidades intermedias de B:** el resto de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Su contenido de B en hoja comprende el

## Introducción

intervalo de 20 a 80 mg/kg. En este grupo se ubica la alfalfa, con una tolerancia a elevadas concentraciones de B.

- **Plantas con necesidades elevadas de B:** como las plantas productoras de látex. Su contenido de B en hoja supera los 80 mg/kg.

El rango entre la deficiencia y la toxicidad de este nutriente es muy estrecho, y dependiendo de la especie vegetal, los requerimientos de B en plantas están comprendidos en un rango de 10 a 100 ppm (mg/kg), de aquí la importancia del control en su adición al medio.

Tolerant (4.0 mg B·L <sup>-1</sup> )	Semitolerant (2.0 mg B·L <sup>-1</sup> )	Sensitive (1.0 mg B·L <sup>-1</sup> )
Athel ( <i>Tamarix aphylla</i> )	Sunflower, native ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	Pecan ( <i>Carva illinoensis</i> (Wang.) R. Koch)
Asparagus ( <i>Asparagus officinalis</i> L.)	Potato ( <i>Solanum tuberosum</i> L.)	Walnut, Black and Persian or English ( <i>Juglans</i> spp.)
Palm ( <i>Phoenix canariensis</i> )	Cotton, Acala and Pima ( <i>Gossypium</i> sp.)	Jerusalem artichoke ( <i>Helianthus tuberosus</i> L.)
Date palm ( <i>P. dactylifera</i> L.)	Tomato ( <i>Lycopersicon esculentum</i> Mi.)	Navy bean ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)
Sugarbeet ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	Sweetpea ( <i>Lathyrus odoratus</i> L.)	American elm ( <i>Ulmus americana</i> L.)
Mangel ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	Radish ( <i>Raphanus sativus</i> L.)	Plum ( <i>Prunus domestica</i> L.)
Garden Beet ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	Field pea ( <i>Pisum sativum</i> L.)	Pear ( <i>Pyrus communis</i> L.)
Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> L.)	Ragged-robin rose ( <i>Rosa</i> sp.)	Apple ( <i>Malus sylvestris</i> Mill.)
Gladiolus ( <i>Gladiolus</i> sp.)	Olive ( <i>Olea europaea</i> L.)	Grape (Sultanina and Malaga) ( <i>Vitis</i> sp.)
Broadbean ( <i>Vicia faba</i> L.)	Barley ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	Kadota fig ( <i>Ficus carica</i> L.)
Onion ( <i>Allium cepa</i> L.)	Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Persimmon ( <i>Diospyros virginiana</i> L.)
Turnip ( <i>Brassica napá</i> L.)	Corn ( <i>Zea mays</i> L.)	Cherry ( <i>Prunus</i> sp.)
Cabbage ( <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)	Milo ( <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench)	Peach ( <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch)
Lettuce ( <i>Lactuca scariola</i> L.)	Oat ( <i>Avena sativa</i> L.)	Apricot ( <i>Prunus armeniaca</i> L.)
Carrot ( <i>Daucus carota</i> L.)	Zinnia ( <i>Zinnia elegans</i> Jacq.)	Thornless blackberry ( <i>Rubus</i> sp.)
	Pumpkin ( <i>Cucurbita</i> spp.)	Orange ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck)
	Bell pepper ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	Avocado ( <i>Persea americana</i> Mill.)
	Sweet potato ( <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.)	Grapefruit ( <i>Citrus paradisi</i> Macfad.)
	Lima bean ( <i>Phaseolus lunatus</i> L.)	Lemon ( <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.)
2.0 mg B·L <sup>-1</sup>	1.0 mg B·L <sup>-1</sup>	0.4 mg B·L <sup>-1</sup>

La tolerancia relativa se basa en las concentraciones de B en el agua de riego a las cuales se observaron los síntomas de toxicidad cuando las plantas fueron cultivadas en arena. No necesariamente implica una reducción del rendimiento.

**Tabla 1.4:** Tolerancia relativa de cultivos y ornamentales al B (la tolerancia disminuye en orden descendente en cada columna). Ayers & Westcot, 1976.

En este sentido, es interesante relacionar el control genético que se ejerce en el transporte de dicho elemento, que está directamente relacionado con la posible

reducción de la problemática que su deficiencia y toxicidad generan en las plantas. El B es absorbido por influjo hídrico a través de las raíces y es transportado por el xilema, siendo móvil por vía floemática en todas las especies que utilizan polioles (azúcares simples) como un metabolito fotosintético primario. En estas especies, un complejo poliol-B-poliol se forma en los tejidos fotosintéticos y es transportado en el floema hacia zonas de acumulación activa, como los meristemas vegetativos o reproductivos. En cambio, en especies que no producen cantidades significativas de polioles, el B, una vez transportado hasta la hoja a través del flujo transpiratorio, no puede reentrar en el floema, dando como resultado una completa inmovilidad de este elemento en la hoja. En ellas, el B se acumula en las partes terminales de las venas de las hojas (Brown & Hu, 1996; Brown & Barry, 1997).

### 1.2.4 La deficiencia de Boro en las plantas

Fenotípicamente, cuando se produce la deficiencia en B, uno de los primeros efectos se manifiesta en una ralentización en la elongación del ápice de la raíz y un ulterior necrosamiento de los tejidos radiculares. Posteriormente, la parte aérea manifiesta la deficiencia en B de la siguiente manera (Marschner, 1995):

- 1) Las hojas jóvenes, dada la baja movilidad del oligoelemento, se ven rápidamente afectadas y aparecen deformadas, quebradizas y pequeñas. Aunque raramente exhiben clorosis, sí se puede encontrar una coloración verde oscura o necrótica en los casos severos.
- 2) Los tallos son acortados por inhibición en su crecimiento apical y en las plantas muy afectadas son muy quebradizos.
- 3) Las yemas y puntos de crecimiento meristemáticos enferman y mueren.
- 4) La floración es irregular y la flor puede presentar deformaciones. En las deficiencias muy severas puede llegar a no existir floración.
- 5) A consecuencia del punto anterior, la fructificación resulta también irregular y los frutos están muy disminuidos en cantidad y calidad, máxime cuando la formación del tubo polínico es muy sensible a la ausencia de B, inhibiéndose en esos casos.

Como síntomas específicos de falta de B en alfalfa, se observa que los tejidos terminales dejan de crecer formando una roseta, se tornan amarillentos y finalmente mueren. La sintomatología observable se resume en la **Figura 1.4**.



**Fig. 1.4:** A), B) y C) Los márgenes y puntas cloróticos amarillos y rojizos de las hojas de las plantas de alfalfa son los síntomas más visibles de la deficiencia de B (Meyer & col., 2007).

## Introducción

La deficiencia en B afecta a los organismos en múltiples procesos fisiológicos en los que se ha demostrado que el B juega un papel importante, resumidos en la **Tabla 1.5**:

<b>Procesos fisiológicos y bioquímicos implicados</b>	<b>Autores</b>
<b>Transporte de azúcares</b>	Gauch y Dugger (1953) Turnowska y Starck (1960)
<b>Lignificación</b>	McIlrath y Skok (1964) Parish (1969)
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>	Dugger y Humphreys (1980) Lughman (1961) Lee y Aronoff (1967)
<b>Metabolismo de ARN</b>	Shkol'nik y Kositsyn (1962) Chapman y Jackson (1974) Birnbaum, Dugger y Beasley (1977)
<b>Respiración</b>	Maevskaya y Alekseeva (1966) Robertson y Loughman (1974a)
<b>Metabolismo de IAA</b>	Robertson y Loughman (1974b) Rajaratman y Lowry (1974) Bohnsack y Albert (1977)
<b>Metabolismo de fenoles</b>	Lee y Aronoff (1967) Shkol'nik (1974)
<b>Síntesis de la pared celular</b>	Wilson (1961) Starck y Whittington (1964) Dugger y Palmer (1980)
<b>Estructura de la pared celular</b>	Kouchi y Kumazawa (1976)
<b>Membranas</b>	Tanada (1974) Pollard, Parr y Loughman (1977) Hirsch y Torrey (1980)
<b>Fijación de N<sub>2</sub></b>	Bonilla y col (1990) Bolaños y col (1994) Bolaños y col (2002)
<b>Control de poblaciones bacterianas (“quórum-sensing”)</b>	Chen y col (2002)

**Tabla 1.5:** Procesos fisiológicos y bioquímicos en los cuales está implicado el boro (Parr & Loughman, 1983; Blevins & Lukaszewski, 1998).

En general, y teniendo en cuenta que la deficiencia de B va a provocar una cascada de efectos en el metabolismo celular, participando en el crecimiento y desarrollo de la planta (Marschner, 1995), se puede establecer, que el papel estructural del B parece insuficiente para dar cabida al conjunto de fenómenos que su deficiencia produce.

Sin duda, una de las funciones más estudiadas del B en plantas es su papel como integrante de la pared celular. Ésta constituye la única función primaria del B demostrada en eucariotas. En plantas no vasculares (Briofitas), la cantidad de Ramnogalacturonano II (RG-II, componente principal de la fracción pectínica de la pared) constituye, aproximadamente, el 1% de la cantidad total de pectina que se encuentra en plantas vasculares. Su contenido, y consecuentemente también el de



## Introducción

B, aumenta de acuerdo con el grado de complejidad evolutiva, lo que denota su importancia en la formación de la estructura de pared (Matsunaga & col., 2004).

Además, las consecuencias de la alteración de la pared por deficiencia de B, también afectan al anclaje de otros componentes de la misma, como proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) (Bonilla & col., 1997a), especialmente importantes en ciertos tejidos de la planta.

En sí, este efecto estructural de la deficiencia, explicaría alteraciones como la reducción en la elasticidad de pared (Findeklee & Goldbach, 1996), la alteración en la porosidad (Fleischer & col., 1999) y en general, la desorganización de la pared celular (O'Neill & col., 2004) que se observa en dichas condiciones.

El papel del B en membrana celular, cubre un amplio espectro de implicaciones que van desde el funcionamiento de enzimas, al transporte o la integridad de la misma (Cakmak & Römheld, 1997; Goldbach & col., 2001; Brown & col., 2002). Por ejemplo, en deficiencia de B, el sistema enzimático Fe-reductasa parece afectado (Ferrol & Donaire, 1992). También se inhiben la actividad de la NADH-reductasa (Barr & col., 1993) y el gradiente de  $H^+$ , relacionado con una disminución de actividad de la ATPasa y con un incremento de la conductancia pasiva, que explicarían el aumento de la rigidez en membranas desarrolladas bajo condiciones de deficiencia de B (Ferrol & col., 1993). En este sentido, el efecto sobre el metabolismo de nitratos parece relacionado precisamente con la disminución de la actividad de la  $H^+$ -ATPasa, necesaria para el cotransporte de nitrato hacia el interior celular, que se vería mermado en deficiencia (Camacho-Cristóbal & González-Fontes, 2007). Así mismo, los niveles de nitratos parecen acumularse por fallo en la actividad nitrato-reductasa (Bonilla & col., 1980). El B parece intervenir además en la fluidez e hidratación de la bicapa lipídica que conforma la membrana (Verstraeten & col., 2005) y en la permeabilidad del  $K^+$  y azúcares (Wang & col., 1999; Cakmak & col., 1995) así como en el incremento de los niveles de  $Ca^{2+}$  en el apoplasto (Mühling & col., 1998). Muchos de estos efectos descritos a nivel de membrana no han sido fehacientemente establecidos como efectos directos del B, de hecho, algunos, como es el caso de la afección a la permeabilidad de  $K^+$ , parecen en mayor medida consecuencia de un efecto secundario de la deficiencia (Goldbach, 1997).

Se ha de tener en cuenta que todos los efectos descritos en membranas, bien debido a la acción directa o indirecta del micronutriente como se ha comentado, apuntan a una posible interacción del B con componentes glicoproteicos o glicolipídicos, como papel primario y fundamental del mismo.

En cuanto al efecto del cese del crecimiento meristemático bajo deficiencia de B, podría estar relacionado con el metabolismo del ácido indol acético (IAA), representante más generalizado de las auxinas, y son varios los trabajos que han realizado aportes en el conocimiento del papel del B en su metabolismo y transporte, no sin revelar las numerosas contradicciones existentes. Dada la similitud de algunos de los cambios morfológicos que se producen bajo deficiencia

## Introducción

de B con los producidos por el incremento en IAA, muchos autores han propuesto la existencia de un aumento de los niveles endógenos del ácido en zonas apicales por inactivación de la enzima IAA oxidasa (Coke & Whittington, 1968; Jaweed & Scott, 1967), debido a la concentración de fenoles que acontecería bajo deficiencia de B como consecuencia de la activación del sistema enzimático fenilalanina amonio liasa (PAL) (Shkol'nik, 1974; Ruiz & col., 1998). Sin embargo, otros muchos autores abogan por la pérdida de este componente en condiciones deficientes (Li & col., 2001) o, tal y como se recoge en el trabajo de Hirsch y Torrey (1980), se establece que no existen diferencias en los niveles endógenos de IAA bajo deficiencia. También queda clara la discrepancia en la determinación de la actividad de la enzima IAA oxidasa, puesto que algunos autores defienden su inducción en condiciones deficientes (Bohnsack & Albert, 1977) mientras que otros defienden su inactivación (Coke & Whittington, 1968). Se ha de tener en cuenta que la falta de unanimidad en cuanto a resultados obtenidos probablemente esté relacionada con las diferencias que se encuentran en los procesos de regulación entre distintas especies, o entre la sensibilidad de los distintos tejidos vegetales e incluso, por influencia del diferente estado de deficiencia que haya alcanzado la planta.

Otro de los aspectos relacionados con el metabolismo del IAA estudiado bajo deficiencia de B, ha sido su transporte. Tang y de la Fuente (1986) determinaron el efecto sinérgico que el B y el Ca ejercían en el transporte polar del IAA. En estudios recientes, se ha determinado la reducción del transporte del IAA en el tallo, lo que explicaría la reducción del crecimiento y de la dominancia apical (Li & col. 2001; Wang & col., 2006). Un efecto sobre los transportadores de auxinas relacionaría también al B con el funcionamiento de la membrana celular, pero en cualquier caso, no existen suficientes evidencias aún para establecer de qué manera concreta influye el B en el proceso de transporte del IAA.

También es importante destacar el efecto de la deficiencia de B en la regulación de los niveles de otras hormonas como las citoquininas, así como en la regulación de las proporciones entre ellas, que en muchas ocasiones condicionan los distintos procesos celulares en mayor medida que la presencia independiente de cada una de ellas (Shimizu-Sato & Mori, 2001). Tal es el caso de la relación auxina/citoquinina, que está implicada en la regulación del ciclo celular al incidir sobre la expresión de las ciclinas (cyc) y sobre las quinasas dependientes de ciclinas (cdk) (Stals H. & col., 2000).

Los efectos descritos de manera generalizada en membrana, pueden ser extensibles a otros sistemas de membranas integrantes de orgánulos celulares, como los cloroplastos.

La implicancia del B en fotosíntesis se ha descrito en varios trabajos en los que se hace alusión a su efecto en el daño oxidativo a tilacoides, a la disminución de ácidos grasos en los mismos y a una inhibición en la transferencia de electrones junto con un declive en la actividad del fotosistema II (El-Shintinawy, 1999), pero ninguno de ellos determina la función primaria del B en el proceso, e incluso todos

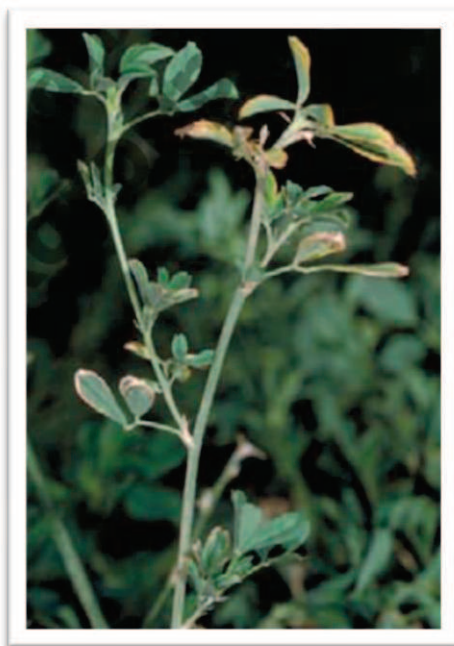
ellos podrían ser atribuibles a un efecto secundario de la deficiencia al verse inhibidos el crecimiento de raíz y tallo. Es interesante destacar que el contenido de B en cloroplastos se ha demostrado elevado, lo que podría estar relacionado con su asociación a glicolípidos y glicoproteínas, potencialmente susceptibles de interactuar con B. Uno de los trabajos recientes relativos al B y su afección al proceso fotosintético (Han & col., 2008), describe, en hojas de naranja tratadas bajo deficiencia de B, la existencia de una reducción en la asimilación de carbono junto con un incremento de glucosa, fructosa y almidón, que podría vincularse al efecto del aumento de la actividad del ciclo de las pentosas fosfato en deficiencia y, consiguientemente, el aumento en la actividad del ciclo, explicaría además la acumulación de polifenoles bajo dichas condiciones (Lee & Aronoff, 1967; Cakmak & Römheld, 1997).

### 1.2.5 Toxicidad producida por Boro en las plantas

La toxicidad producida por B es un trastorno importante que puede limitar el crecimiento y rendimiento de plantas en suelos de ambientes áridos y semiáridos alrededor del mundo. Altas concentraciones de B pueden encontrarse naturalmente en suelos o en aguas subterráneas, o bien pueden ser incorporadas al suelo a partir de la minería, fertilizantes o agua de irrigación.

Los síntomas de toxicidad consisten en una necrosis progresiva de las hojas, que empieza por un amarilleamiento de las extremidades y los bordes de las mismas, que progresa con quemaduras entre los nervios laterales hacia la nervadura central y evoluciona con un oscurecimiento y posterior necrosis, cayendo las hojas prematuramente (Alarcón Vera, 2001).

Entre la amplia variedad de especies vegetales, el típico síntoma visible de la toxicidad al B es hojas quemadas o cloróticas y/o porciones necróticas, generalmente en los márgenes y puntas de las hojas más viejas (Bennett, 1993; Bergmann, 1992; Eaton, 1944). Estos síntomas reflejan la distribución del B en la



mayoría de las especies, con una acumulación del mismo en el final de la corriente transpiratoria. Los parches cloróticos/necróticos poseen concentraciones de B enormemente elevadas comparadas con los tejidos circundantes de la hoja (Oertli & Roth, 1969) y algunas especies (por ejemplo la cebada) muestran patrones característicos para distintos genotipos. En la siguiente **Figura 1.5** se pueden observar la sintomatología más visible en la alfalfa.

**Fig. 1.5:** Puntas amarillas consecuentes de exceso de B en alfalfa (Meyer & col., 2007).

Síntomas visibles de toxicidad al B no parecen desarrollarse en las raíces. Como la concentración de B en las raíces permanece relativamente baja comparada con aquella de las hojas, incluso a niveles muy altos de suministro de B (Nable, 1988; Oertli & Roth, 1969), tal vez no se producen concentraciones tóxicas en los tejidos radiculares.

En definitiva, independientemente de la especie, el exceso de B ejerce efectos en procesos muy diversos en las plantas vasculares, tales como metabolismo alterado, retraso del desarrollo, disminuida división celular de la raíz, menores contenidos de clorofila en la raíz y menores tasas fotosintéticas, y niveles de lignina y suberina disminuídos, entre otros (Nable & col. 1997; Reid, 2007). Consecuentemente, un crecimiento reducido de brotes y raíces es típico de plantas expuestas a altos niveles de B; así como también se observa una reducción del número, tamaño y peso de los frutos (Nable & col., 1990).

Aunque la base fisiológica para describir la toxicidad por B no es lo suficientemente clara, Reid & col (2004) han propuesto tres causas principales, teniendo en cuenta nuestros conocimientos sobre la química de éste elemento, esto es, la capacidad de los compuestos de B para unirse con dos grupos hidroxilo en la configuración cis: (1) alteración de la estructura de la pared celular, (2) alteración metabólica mediante la unión a los restos de ribosa de moléculas tales como ATP, NADPH o NADH, y (3) interrupción de la división celular y el desarrollo mediante la unión a la ribosa, ya sea como el azúcar libre o dentro del ARN.

### 1.3 Fitorremediación

Aunque de menor prevalencia que los suelos con deficiencia de B, los suelos ricos en este elemento son importantes, causando toxicidad en el campo y la disminución de las cosechas en las diferentes regiones del mundo. Las mayores concentraciones naturales de B en suelo se encuentran en suelos derivados de evaporitas marinas y sedimentos arcillosos marinos. Además, diversas fuentes antropogénicas de exceso de B pueden aumentar su contenido en el suelo a niveles tóxicos para las plantas. La fuente más importante es el agua de riego, pero otros incluyen los desechos de la minería de superficie, cenizas volátiles y los productos químicos industriales como por ejemplo, el uso excesivo de fertilizantes boratados (Nable & col., 1997). Recuperar suelos con alta concentración de éste microelemento es extremadamente difícil.

Un método comúnmente utilizado para la recuperación de suelos con alto contenido de B es un lavado intensivo con grandes cantidades de agua baja en éste elemento. Aunque es utilizado con éxito, la lixiviación presenta varios inconvenientes: puede no ser una solución permanente y causa dificultades en la eliminación de los lixiviados; se requieren grandes cantidades de agua con baja concentración de B; el lavado con abundante agua puede acarrear la pérdida de otros nutrientes esenciales y afectar a la productividad del suelo. Otros métodos incluyen la siembra de genotipos de plantas que son tolerantes a altas concentraciones de B externas y el mejoramiento del uso de enmiendas (por

## Introducción

ejemplo, cal, yeso), pero solamente son útiles a corto plazo y no tienen la misma eficacia en todos los tipos de suelo (Nable & col., 1997).

La Ley Nacional 24.051 considera al B como un residuo peligroso, estableciendo un valor límite de 2 ppm para suelos de uso agrícola. Por lo tanto, el estudio y la experimentación acerca de las posibles formas de contrarrestar este impacto constituyen una prioridad.

Se conoce desde hace tiempo que algunas especies vegetales pueden ser usadas en la recuperación de suelos contaminados. La fitorremediación se basa en la capacidad de algunas especies de absorber, transformar, secuestrar o degradar directa o indirectamente algunos contaminantes que se encuentran en la zona radicular (Cunningham & Ow, 1996; Raskin, 1996; EPA, 2000). Algunas ventajas de la fitorremediación comparada con otras técnicas, es que restituye las propiedades funcionales y estructurales del suelo, promueve la actividad de microorganismos de la rizósfera y es de menor costo comparativo (Trapp & Karlson, 2001).

La alfalfa es el cultivo extensivo de mayor exigencia de B de los producidos en la Pradera Pampeana. Estudios realizados en 1989 en ésta misma zona, concluyeron que este elemento es limitante para la producción de este cultivo (Vivas, 2001). La concentración mínima de B en la solución del suelo, requerida por la alfalfa para óptimo rendimiento se encuentra entre 0,5 y 1 mg/kg (ppm); mientras que el rango de concentración por encima del cual se puede identificar reducción del rendimiento y/o aparición de síntomas de fitotoxicidad es de 15 ppm, por lo que la alfalfa se encontraría dentro del grupo de cultivos tolerantes a altas concentraciones de éste elemento (Bono & col., 2003).

La necesidad de altos requerimientos de este micronutriente, para el correcto desarrollo del cultivo de la alfalfa, podría ser utilizada como una propiedad en el uso de la leguminosa como un cultivo para recuperar suelos contaminados con B. Se conocen trabajos donde se han evaluado las propiedades de germinación, rendimiento y persistencia de alfalfa en altas concentraciones de B. Los resultados obtenidos indican que, de las especies comerciales probadas, *M. sativa* sobrevivió en 30 ppm de B y en estos sustratos se produjo la mayor reducción en la concentración de B al final del experimento (de Viana & Albarracín, 2008).

Se ha descrito la relación entre la deficiencia de B y las distintas etapas involucradas en la nodulación y fijación de nitrógeno, esto es en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno, (Bolaños & col., 1994, Bolaños, & col., 1996, Redondo-Nieto & col., 2003). Sin embargo, no existen evidencias del efecto de distintas concentraciones de este nutriente sobre la simbiosis *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* y rendimiento del cultivo.

## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO

### 2.1 Hipótesis

La alfalfa, al ser tolerante a altas concentraciones de B, en simbiosis con *Sinorhizobium meliloti* puede actuar como fitoremediadora de suelos.

### 2.2 Objetivo

Comprobar que tanto la alfalfa (*Medicago sativa*) como su simbiote, *Sinorhizobium meliloti*, son tolerantes a altas concentraciones de B y constatar hasta qué valores de ppm de B no se altera la simbiosis para así poder ejercer un efecto fitorremediador.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ensayo *in vitro*: crecimiento y supervivencia de *S. meliloti* en concentraciones crecientes de Boro

Inicialmente, se desarrolló el inóculo de *Sinorhizobium meliloti* a partir de tubos con medio LMA inclinado (Vincent, 1970) con la cepa B399 (recomendada por IMYZA-INTA Castelar).

A partir del mismo, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento y supervivencia de la bacteria en medio sólido LMA, adaptado en nuestro laboratorio, adicionados con las siguientes concentraciones de B 5; 10; 15; 20 y 30 ppm; agregado al medio como ácido bórico. En la **Fig. 3.1** observamos una placa de petri con el medio LMA sólido y la bacteria desarrollándose en el mismo.



**Fig. 3.1.** Crecimiento de *S. meliloti* B399 en medio LMA sólido suplementado con 5 ppm.

#### 3.2 Ensayo de Invernadero

##### 3.2.1 Ensayo Preliminar o Screening

Se llevó a cabo con un diseño de 8 tratamientos con 6 repeticiones sembrando 3 plántulas de alfalfa en cada maceta, utilizando perlita (cuya composición se detalla en la **Tabla 3.1**) como sustrato, impregnada con una solución de  $H_3BO_3$  tal que las concentraciones finales fueron de: 0,6 (recomendada por bibliografía); 5; 10; 15; 20 y 30 ppm de B, junto con un testigo sin B.

Las semillas (*Medicago sativa* Palaversich BAR MS-9242) estériles se pregerminaron y luego fueron transferidas a macetas de plástico, dentro de un ambiente controlado: temperatura de 24°C y un fotoperíodo de 12-12 hs. Las plántulas fueron regadas con solución nutritiva Fahraeus (1957) sin B, 1 vez por semana y fertilizadas con N con la misma frecuencia, excepto el tratamiento Testigo sin suplemento de B y N. El diseño experimental se aprecia en la **Figura 3.2**.

Composición de la Perlita (expresada como %)	<b>76 SiO<sub>2</sub></b> <b>17 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> <b>4,6 K<sub>2</sub>O</b> <b>2 Na<sub>2</sub>O</b> <b>0,44 CaO</b> <b>0,3 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b> <b>0,04 MgO</b> <b>1,06 x 10<sup>-4</sup> (1,06 ppm) B *</b>
---	---

\* Determinado en este trabajo

**Tabla 3.1:** Composición de la Perlita utilizada como sustrato en los ensayos de invernadero (Ronchi & col., 1997).



**Figura 3.2:** Ensayo de invernadero con plántulas de alfalfa con concentraciones de B crecientes (Testigo; 0; 0,6; 5; 10; 15; 20 y 30 ppm).

Luego de 11 semanas, se levantó el ensayo para llevar a cabo las determinaciones que se mencionan más adelante.

Tanto este ensayo preliminar de invernadero como el de supervivencia de *S. meliloti*, sirvieron para definir las concentraciones de B en ppm a utilizar en el ensayo final con las plántulas inoculadas.

### 3.2.2 Ensayo Final

Para realizar este ensayo se utilizaron semillas estériles de alfalfa (*Medicago sativa* Palaversich BAR MS-9242) pre-germinadas. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a macetas de plástico dentro de un ambiente controlado: temperatura de 24°C y un fotoperíodo de 12-12 hs. Durante todo el experimento se regaron con solución nutritiva Fahraeus sin B.

El diseño experimental consistió en dos bloques; cada uno estaba conformado por 5 macetas rellenas con perlita impregnada, antes de iniciar el ensayo, con una solución de ácido bórico tal que las concentraciones finales fueron 0,6; 10 y 20 ppm de B, junto con un tratamiento sin B adicionado; conteniendo todas ellas 5 plantas por maceta.



El primer bloque se inoculó con *Sinorhizobium meliloti* B399, con una concentración celular de aproximadamente  $1 \times 10^9$  cel/ml; mientras que el segundo se fertilizó con  $\text{KNO}_3$  8 mM desde el inicio del ensayo y se reforzó con esta solución una vez por semana. El ensayo de invernadero completo se observa en la **Figura 3.3**.



**Fig. 3.3:** Ensayo definitivo con plántulas de alfalfa con concentraciones crecientes de B, en el bloque superior están los tratamientos de las plantas inoculadas con *S. meliloti* B399 y en el inferior las fertilizadas con  $\text{KNO}_3$  8 mM.

A los 66 días de desarrollo se descalzaron las plantas y con los materiales recogidos (parte aérea y raíces de las plantas por un lado, y la perlita por el otro) se hicieron las determinaciones descriptas a continuación.

### 3.3 Extracción y Determinación de B en perlita

Una vez levantado el ensayo, se dejó secar la perlita en bandejas de plástico a temperatura ambiente. Luego de eliminada la humedad del sustrato, se procedió a la extracción del B disponible, remanente al finalizar el ensayo, con acetato de amonio 1N, pH 4,8 (Berger & Truog, 1939; Gupta & Stewart, 1975; adaptado y modificado en nuestro laboratorio). Posteriormente se procedió a la cuantificación del mismo con el método de la Azometina-H (Bingham, 1982; adaptada y modificada en nuestro laboratorio).

#### 3.3.1 Procedimiento de Extracción de B con Acetato de Amonio 1N

Se pesaron 5 g de perlita seca en un recipiente de plástico, al cual se le adicionó 50 ml de acetato de amonio 1 N pH 4,8 y se procedió a la agitación en agitador mecánico vaivén (Vicking ® Modelo Dubnoff) a aproximadamente 65 gpm por 30 min; transcurrido este tiempo los extractos fueron filtrados con papel de filtro SS Banda Azul o similar. El filtrado se recogió en recipientes de plástico para su posterior análisis. El detalle de la composición de las soluciones empleadas se encuentra en el Anexo.

### 3.3.2 Cuantificación de Boro

Una vez obtenidos los extractos, se prepararon las soluciones para la posterior lectura en el espectrofotómetro UV – Visible Metrolab ® 1700, para lo cual se tomaron 15 ml de extracto (o menos cuando se debía realizar diluciones) y se colocaron en matraces de 25 ml, adicionados posteriormente con 3 ml de solución Buffer (Ácido acético-Acetato pH 5,5) y 5 ml de la solución de Azometina-H; finalmente se enrasaron con agua bidestilada. Los detalles de éstas y todas las soluciones empleadas en el trabajo, se presentan en el Anexo. También se prepararon: un blanco con 15 ml de solución extractiva y demás reactivos para restar el color desarrollado por la Azometina-H; y otro blanco sin Azometina-H y con el resto de los reactivos.

Todos los matraces se dejaron reposar por 40-60 min, para que desarrollen el color amarillento característico y se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 420 nm.

Simultáneamente se prepara la curva estándar (**Fig. 3.4**) en el rango de 0,3 a 1,8 mg B/L, para lo cual se colocan los siguientes volúmenes de solución estándar de 15 ppm de B en matraces de 25 ml, para lograr las concentraciones finales indicadas en la **Tabla 3.2**.

Patrón N°	Vol. (ml) sc 15 ppm B	Conc. B: mg B/L (ppm)
<b>Blanco sin Azometina-H</b>	0	0
<b>Blanco con Azometina-H</b>	0	0
<b>1</b>	0,5	0,3
<b>2</b>	1	0,6
<b>3</b>	1,5	0,9
<b>4</b>	2	1,2
<b>5</b>	2,5	1,5
<b>6</b>	3	1,8

**Tabla 3.2:** Concentraciones de B de los patrones de la curva de calibración para el método Azometina-H.



**Fig. 3.4:** Curva de calibración para la cuantificación del B extraído, con el Método de la Azometina-H.

### 3.4 Extracción y Determinación de B Foliar

La extracción y determinación de B foliar se realizó aplicando el método descrito en Sadzawka & col. (2004).

Las hojas recogidas de las plántulas de alfalfa se secaron dentro de bolsas de papel en la estufa a 70°C por 48 hs. Una vez secas, fueron molidas y tamizadas a 1 mm.

Luego, 1 g de la muestra de tejido vegetal homogeneizada, seca y molida se calcinó en mufla a 500°C, por aproximadamente 4-5 horas, hasta cenizas blancas.

Una vez a temperatura ambiente, a los crisoles con las cenizas se les adicionó 10 ml de HCl 2 M y se hirvieron en una plancha calefactora. Posteriormente, una vez fríos, fueron filtrados a través de papel de filtro sobre matraces aforados de 50 ml. El filtro se lavó 3 veces con agua bidestilada, y finalmente los matraces se enrasaron con agua bidestilada para luego proceder a la determinación colorimétrica de B por el método de la Azometina-H descrito anteriormente.

### 3.5 Parámetros de Crecimiento y Rendimiento Vegetal

#### 3.5.1 Recuento de Nódulos

El recuento de nódulos se realizó visualmente sobre las raíces limpias y libres de perlita.

#### 3.5.2 Determinación de Volumen Radicular



El volumen radicular (Harrington & col., 1994) fue determinado utilizando una probeta de 50 ml; la misma se llenó hasta un volumen perfectamente enrasado con agua destilada, en el cual luego fueron sumergidas las raíces. Se constató el cambio de volumen de agua y éste fue interpretado como equivalente al volumen radicular (**Fig. 3.6**).

**Fig. 3.6:** Determinación del volumen radicular.

### **3.5.3 Determinación de Peso Seco Parte Aérea y Raíces**

Para cuantificar el rendimiento en materia seca tanto de la parte aérea de la planta como de las raíces, se procedió a secarlas en la estufa a 65-70°C hasta peso constante, determinado con balanza analítica de precisión.

### **3.5.4 Determinación de Nitrógeno Total y Proteínas**

La cuantificación de N total se llevó a cabo aplicando el método Kjeldahl (Bremner, 1960) en equipo automatizado, Tekator ® KJELTEC AUTO 1030 Analyzer; una vez obtenido el valor de N total contenido en la muestra y, mediante la multiplicación por el factor 6,25, luego es posible calcular también la cantidad de proteína cruda.

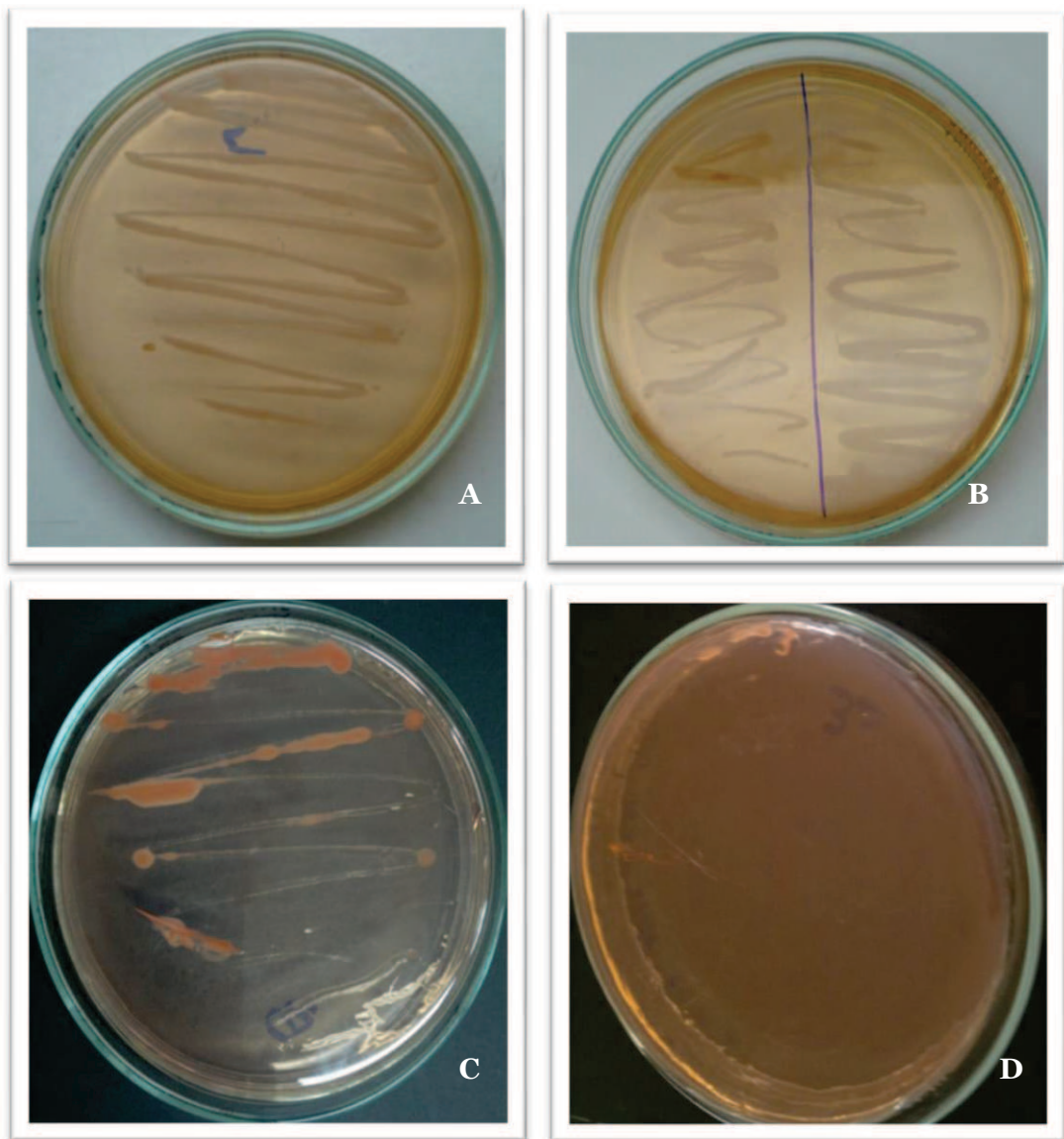
## **3.6 Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos de cada una de las determinaciones realizadas, se analizaron mediante las pruebas estadísticas ANOVA y test Fisher, utilizando los programas estadísticos Rego e InfoStat.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ensayo *in vitro*: crecimiento y supervivencia de *S. meliloti* en concentraciones crecientes de Boro

En el ensayo *in vitro* se observó crecimiento de la bacteria a los 2 días de la siembra hasta la concentración de 15 ppm de B en el medio de cultivo. Registrándose desarrollo de biomasa recién a los 5 días para la concentración de 20 ppm de B; mientras que no hubo crecimiento apreciable para la concentración de 30 ppm, como puede observarse en la **Figura 4.1**.



**Fig. 4.1:** Ensayo *in vitro* de supervivencia y crecimiento de *S. Meliloti* B399 en medio LMA sólido con concentraciones crecientes de B. En las fotografías se aprecia el crecimiento en **A)** 5 ppm (2 días de crecimiento), **B)** 10 y 15 ppm (2 días de crecimiento), **C)** 20 ppm (5 días de crecimiento) y **D)** 30 ppm (5 días de crecimiento).

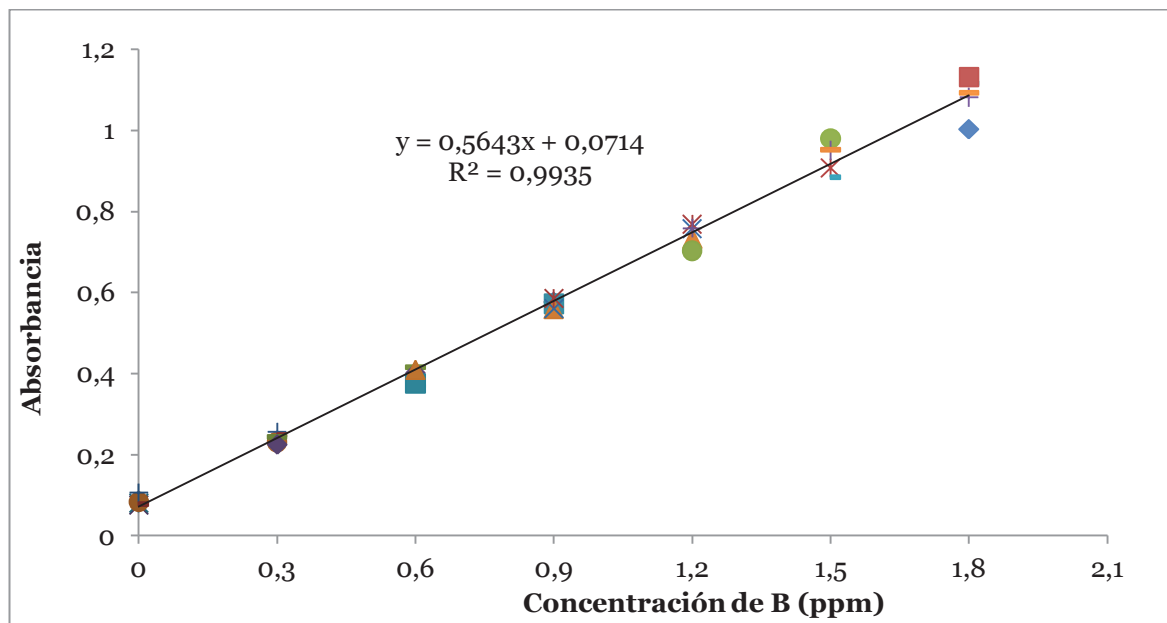
## 4.2 Calibración Método Azometina-H

Previo a la medición de los patrones de la curva de calibración, se llevó a cabo un barrido espectral para determinar la longitud de onda a la cual la absorbancia es máxima para el método de la Azometina-H, establecida como 420 nm.

El método puede validarse estadísticamente aplicando los análisis estadísticos de regresión y correlación para la curva de calibración, utilizando el programa "Rego". Los resultados obtenidos de las cinco curvas de calibrado se presentan en la **Tabla 4.1**, cuya gráfica se presenta en el **Gráfico 4.1**. Luego, se observa la recta ajustada por regresión en el **Gráfico 4.2** con la cual se realizan los cálculos para obtener los valores de LOD y LOQ.

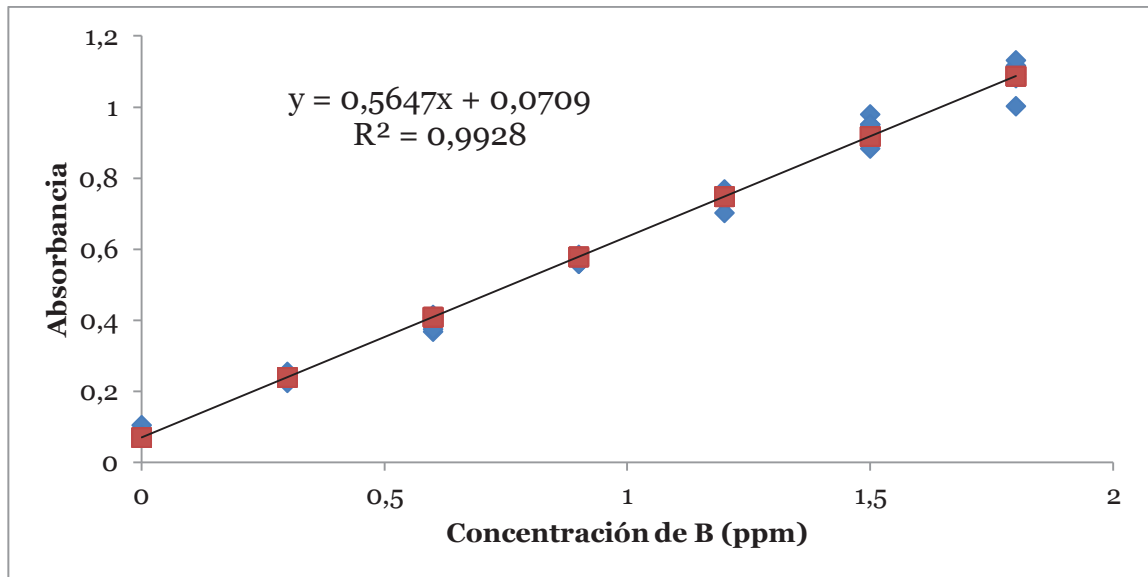
B (ppm)	0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8
Curva I	0,076	0,231	0,369	0,577	0,733	0,907	1,082
Curva II	0,08	0,256	0,416	0,572	0,758	0,98	1,117
Curva III	0,083	0,248	0,402	0,56	0,769	0,951	1,093
Curva IV	0,106	0,244	0,376	0,56	0,703	0,884	1,003
Curva V	0,078	0,225	0,409	0,585	0,759	0,952	1,132

**Tabla 4.1:** Valores de absorbancia a 420 nm de la curva de calibración del Método Azometina-H.



**Gráfico 4.1:** Recta de Calibrado del Método Azometina-H obtenida en el programa estadístico Rego.

## Resultados



**Gráfico 4.2:** Recta de calibración ajustada por regresión lineal.

Siendo el LOD el límite de detección, para esta curva resulta:

$$S_b = 0,0286 \rightarrow Y_0 = 3,3 * S_b = 0,09438 \rightarrow X_0 = \boxed{\text{LOD} = 0,0416 \text{ ppm}}$$

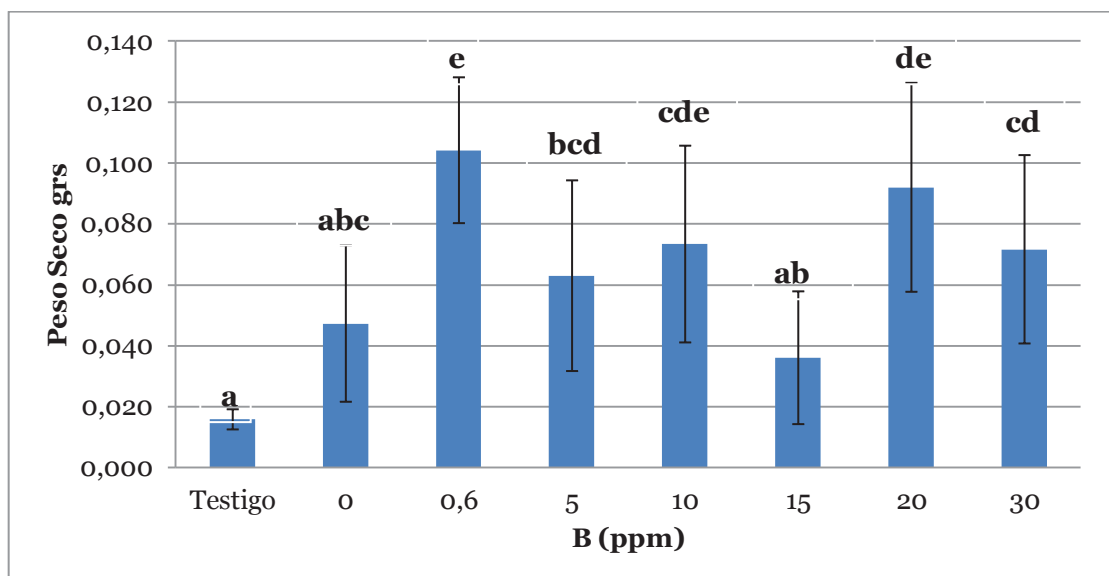
El LOQ (límite de cuantificación) resulta:

$$Y_0 = 10 * S_b = 0,286 \rightarrow X_0 = \boxed{\text{LOQ} = 0,3809 \text{ ppm}}$$

(Las ecuaciones detalladas del LOD y LOQ se encuentran en el Anexo)

### 4.3 Ensayo Preliminar de Invernadero

En **Gráfico 4.3** se observan los valores promedios y desvíos estándar correspondientes de los pesos secos obtenidos en el ensayo.



**Gráfico 4.3:** Peso seco de parte aérea de plantas de alfalfa del ensayo de invernadero preliminar en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## Resultados

En el ensayo de invernadero preliminar se pudo observar que las plántulas de alfalfa sobrevivieron incluso hasta 30 ppm de B, y que el mejor rendimiento se obtuvo a una concentración de 0,6 ppm de B, coincidiendo con la concentración recomendada por bibliografía (Fahraeus, 1957; Bonilla & col., 2004; Carpena & col., 2000; El-Hamdaoui & col., 2003; Redondo Nieto & col., 2003). A través del análisis estadístico se obtuvieron diferencias significativas entre el testigo y el tratamiento sin B con el resto.

### 4.4 Ensayo Final

#### 4.4.1 Características Cualitativas del Ensayo

La siguiente serie de fotografías muestra el estado de desarrollo de los distintos tratamientos al momento de finalizar el ensayo de invernadero. En las mismas se observa el crecimiento diferenciado de las plántulas de alfalfa entre los tratamientos inoculados y los fertilizados (**Fig. 4.2, 4.3 y 4.4**). No se aprecian síntomas visibles de toxicidad, descritos por la bibliografía, en las plantas cosechadas (Alarcón Vera, 2001; Bennett, 1993; Bergmann, 1992; Eaton, 1944).



**Fig. 4.2:** Ensayo completo, en el bloque de la izquierda se observan los tratamientos inoculados y en el de la derecha los fertilizados.





**Fig. 4.3:** Tratamientos inoculados con *S. meliloti* B399; concentraciones de B crecientes de izquierda a derecha (0; 0,6; 10 y 20 ppm).



**Fig. 4.4:** Tratamientos fertilizados con  $\text{KNO}_3$  8 mM; concentraciones de B crecientes de izquierda a derecha (0; 0,6; 10 y 20 ppm).

#### 4.4.2 Parámetros de Crecimiento y Rendimiento Vegetal

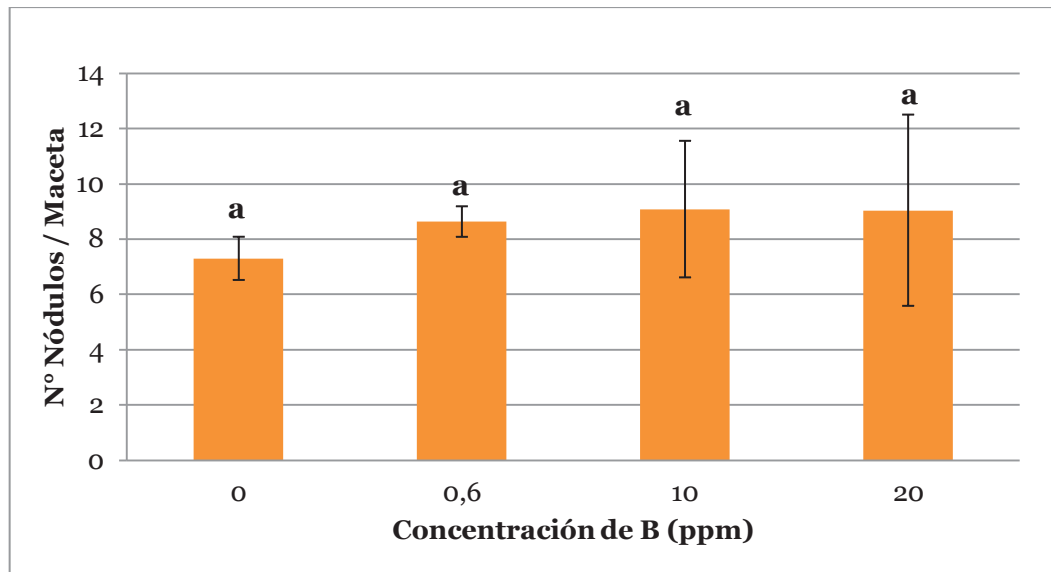
##### 4.4.2.1 Recuento de Nódulos

###### 4.4.2.1.1 Plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* B399

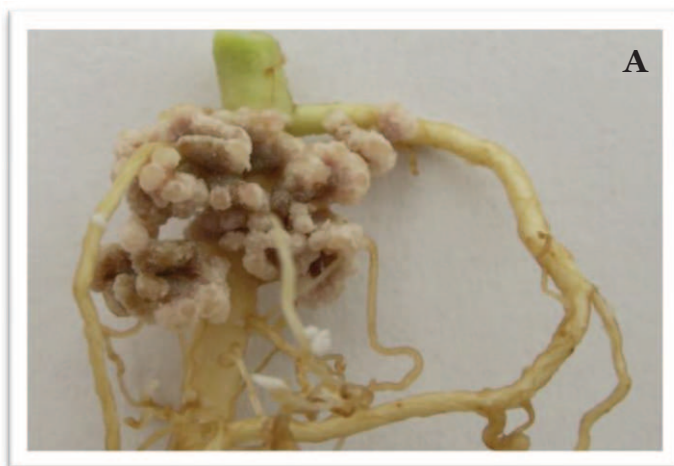
Sobre las raíces de las plantas de alfalfa del bloque inoculado se realizó el recuento visual de los nódulos presentes en las mismas. Los resultados de los promedios y correspondientes desvíos estándar para cada tratamiento se

## Resultados

presentan en el **Gráfico 4.4**. En las **Figuras 4.5 A, B y C** se aprecian algunos nódulos presentes en las raíces de los distintos tratamientos inoculados.



**Gráfico 4.4:** Número de nódulos en raíces de plantas de alfalfa (inoculadas con *S. meliloti* B399) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.



**Fig. 4.5 A, B y C:** Fotografías de los nódulos hallados en las raíces de las plantas de alfalfa para los distintos tratamientos de B en el bloque inoculado con *S. meliloti* B399.

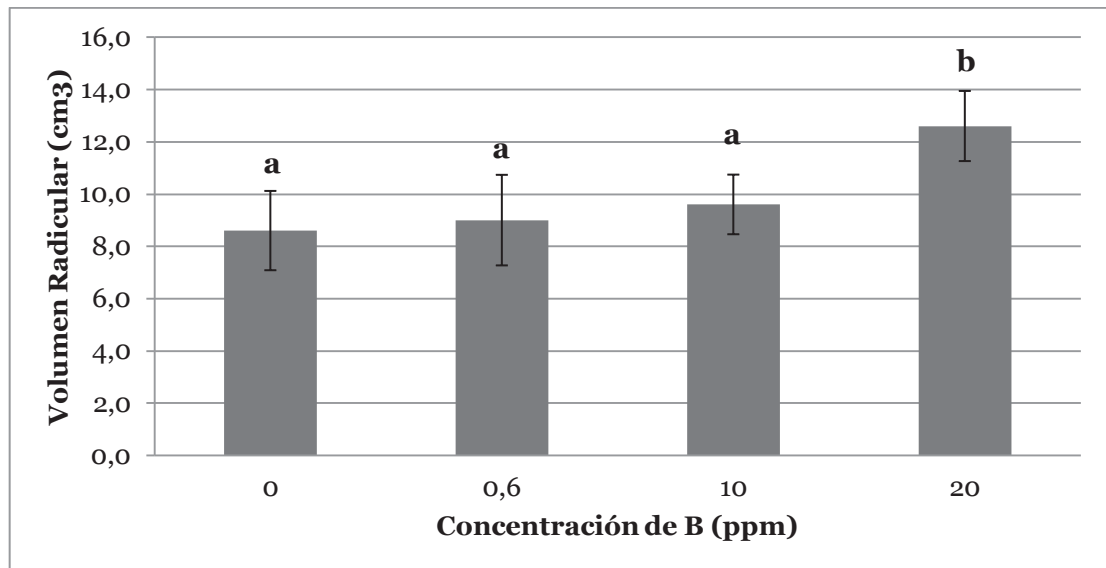
## Resultados

Dentro del ensayo inoculado, se determinó que no hay diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos respecto del número de nódulos por planta.

### 4.4.2.2 Volumen Radicular

#### 4.4.2.2.1 Plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* B399

Como puede observarse, en el **Gráfico 4.5** se muestran los promedios y desvíos estándar de los volúmenes radiculares que corresponden a cada concentración de B adicionado dentro del bloque inoculado con *S. meliloti* B399.



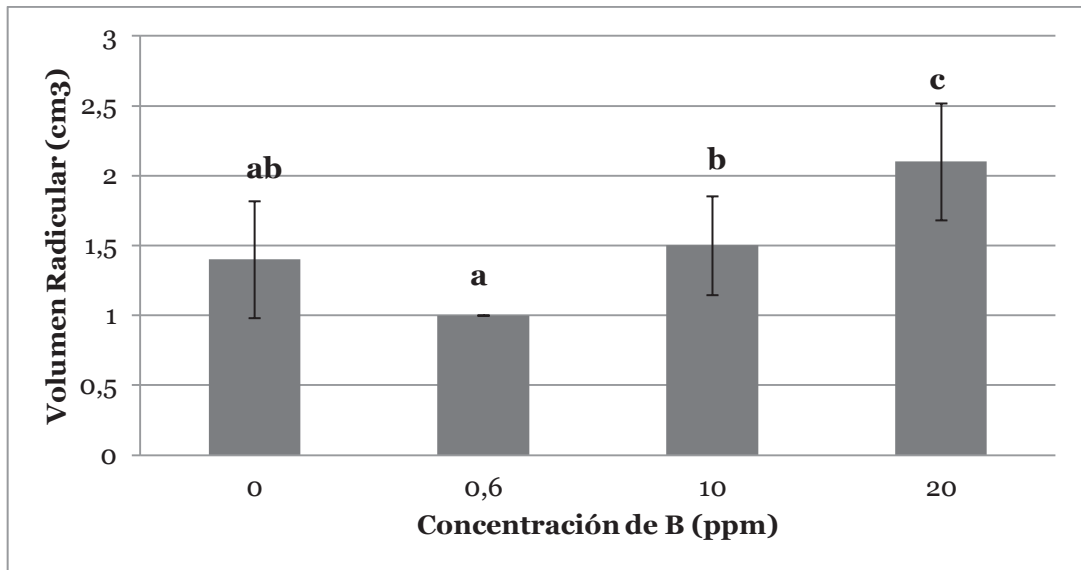
**Gráfico 4.5:** Volumen radicular de raíces de plantas de alfalfa (inoculadas con *S. meliloti* B399) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Dentro del ensayo inoculado, se determinó que hay diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos, específicamente entre las concentraciones de B agregado de 0, 0,6 y 10 ppm con respecto de la de 20 ppm.

#### 4.4.2.2.2 Plantas de alfalfa fertilizadas con $KNO_3$

En el **Gráfico 4.6** se muestran los promedios y desvíos estándar de los volúmenes radiculares correspondientes a cada concentración de B dentro del bloque fertilizado con  $KNO_3$ .

## Resultados



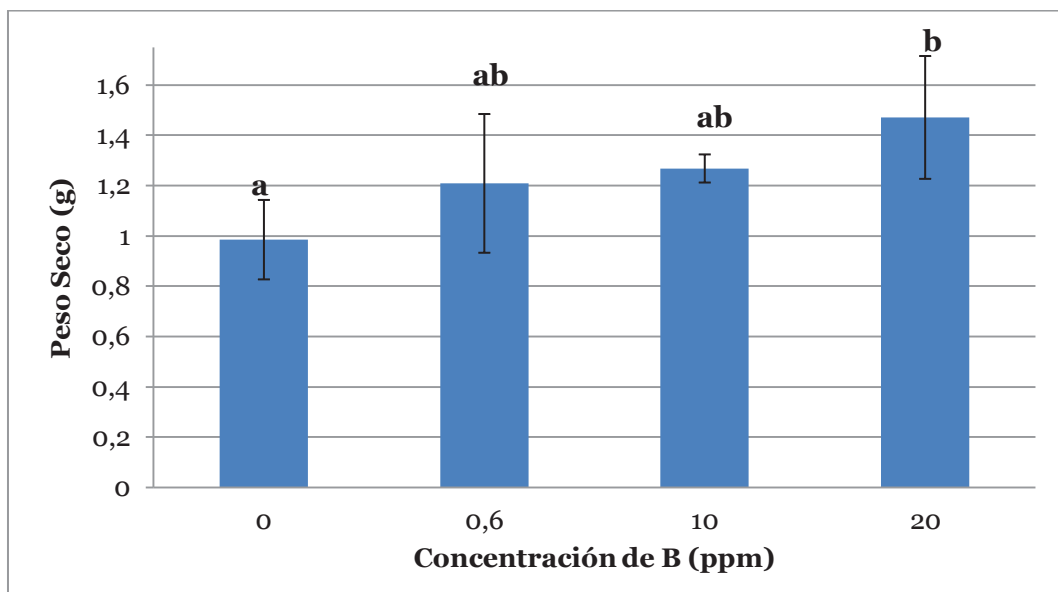
**Gráfico 4.6:** Volumen radicular de raíces de plantas de alfalfa (fertilizadas con KNO<sub>3</sub>) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores corresponden a las medias ± DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Dentro de los distintos tratamientos del ensayo fertilizado se puede destacar las diferencias significativas entre los tratamientos de 0,6; 10 y 20 ppm.

### 4.4.2.3 Peso Seco Parte Aérea

#### 4.4.2.3.1 Plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* B399

En el **Gráfico 4.7** se muestran los promedios y desvíos estándar de los pesos secos de la parte aérea correspondientes a cada concentración de B dentro del bloque inoculado con *S. meliloti* B399.



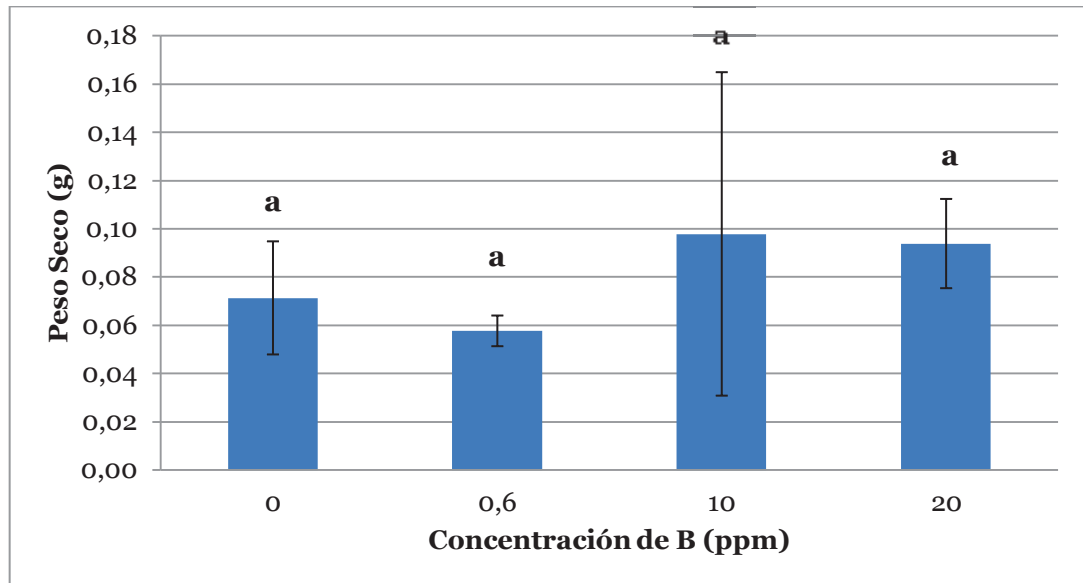
**Gráfico 4.7:** Peso seco de parte aérea de plantas de alfalfa (inoculadas con *S. meliloti* B399) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores representan las medias ± DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## Resultados

Dentro del ensayo inoculado, se determinó que hay diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos, específicamente entre las concentraciones de 0 y 20 ppm.

### 4.4.2.3.2 Plantas de alfalfa fertilizadas con $KNO_3$

Como puede observarse, en el **Gráfico 4.8** se presentan los promedios y desvíos estándar de los pesos secos de la parte aérea correspondientes a cada concentración de B dentro del bloque fertilizado con  $KNO_3$ .



**Gráfico 4.8:** Peso seco de parte aérea de plantas de alfalfa (fertilizadas con  $KNO_3$ ) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores representan las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

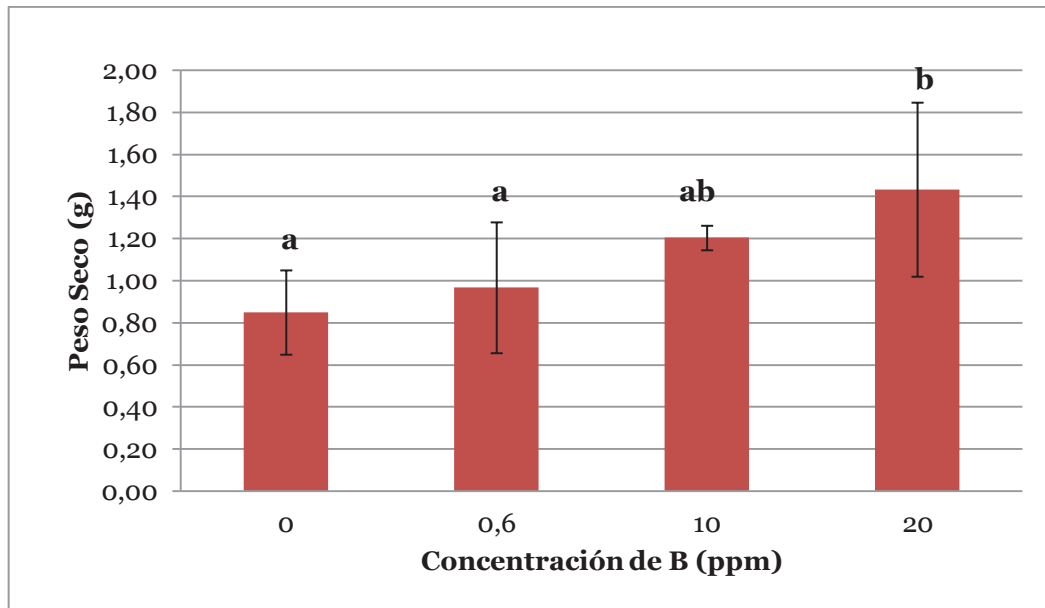
Dentro de los distintos tratamientos del ensayo fertilizado no se observó ninguna diferencia significativa.

### 4.4.2.4 Peso Seco Raíces

#### 4.4.2.4.1 Plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* B399

En el **Gráfico 4.9** se muestran los promedios y desvíos estándar de los pesos secos de las raíces correspondientes a cada concentración de B dentro del bloque inoculado con *S. meliloti* B399.

## Resultados

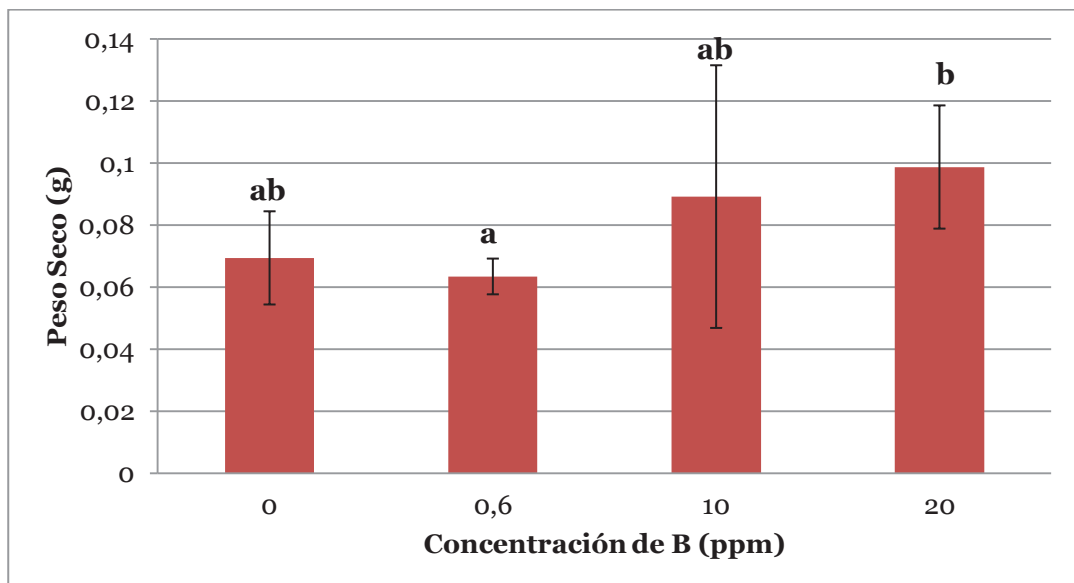


**Gráfico 4.9:** Peso seco de raíces de plantas de alfalfa (inoculadas con *S. meliloti* B399) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores representan las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Dentro del ensayo inoculado, se determinó que hay diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos, específicamente entre las concentraciones de B adicionadas de 0 y 0,6 con respecto a la de 20 ppm.

### 4.4.2.4.2 Plantas de alfalfa fertilizadas con $KNO_3$

Los promedios y desvíos estándar de los pesos secos de las raíces se muestran en el **Gráfico 4.10**, correspondientes a cada concentración de B dentro del bloque fertilizado con  $KNO_3$ .



**Gráfico 4.10:** Peso seco de raíces de plantas de alfalfa (fertilizadas con  $KNO_3$ ) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores representan las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## Resultados

Dentro de los distintos tratamientos del ensayo fertilizado se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de 0,6 y 20 ppm de B adicionado.

### 4.4.2.5 Contenido de Nitrógeno

#### 4.4.2.5.1 Ensayo Completo

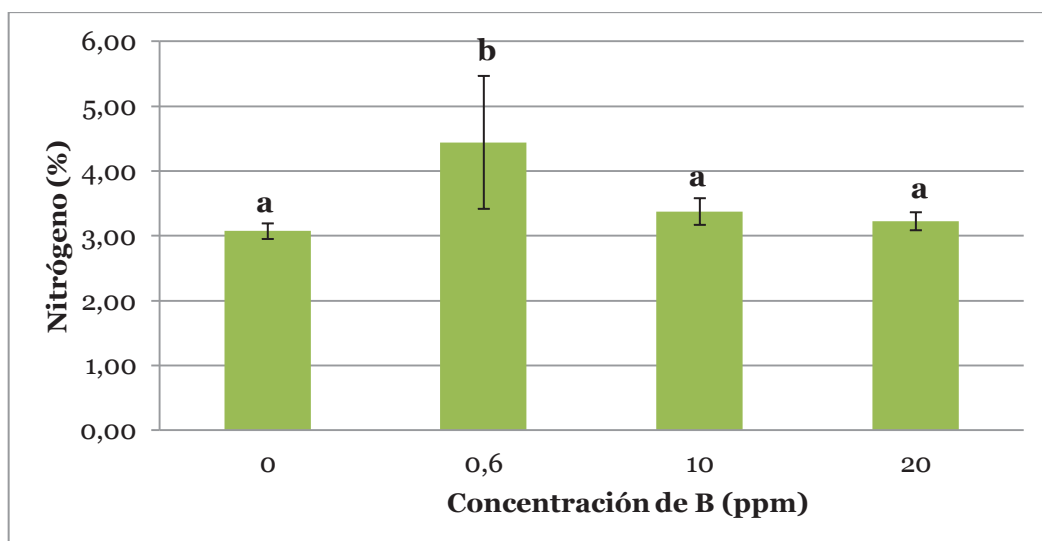
En la siguiente **Tabla 4.3** se presentan los resultados promedio obtenidos en la determinación de N y también se presentan los valores de proteína cruda, obtenidos al multiplicar el % N por 6,25.

Tratamiento	B adicionado (ppm)	N Promedio (%)	Proteína Cruda Promedio
Fertilizadas	0	1,36	8,5
	0,6	1,35	8,44
	10	2,04	12,75
	20	1,34	8,38
Inoculadas	0	3,07	19,21
	0,6	4,44	27,77
	10	3,38	21,10
	20	3,23	20,17

**Tabla 4.3:** Valores promedio de porcentaje de Nitrógeno para los dos bloques experimentales con sus respectivos valores de proteína cruda.

#### 4.4.2.5.2 Plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* B399

En el **Gráfico 4.11** se muestran los promedios y desvíos estándar de los % de N correspondientes a cada concentración de B adicionado dentro del bloque inoculado con *S. meliloti* B399.



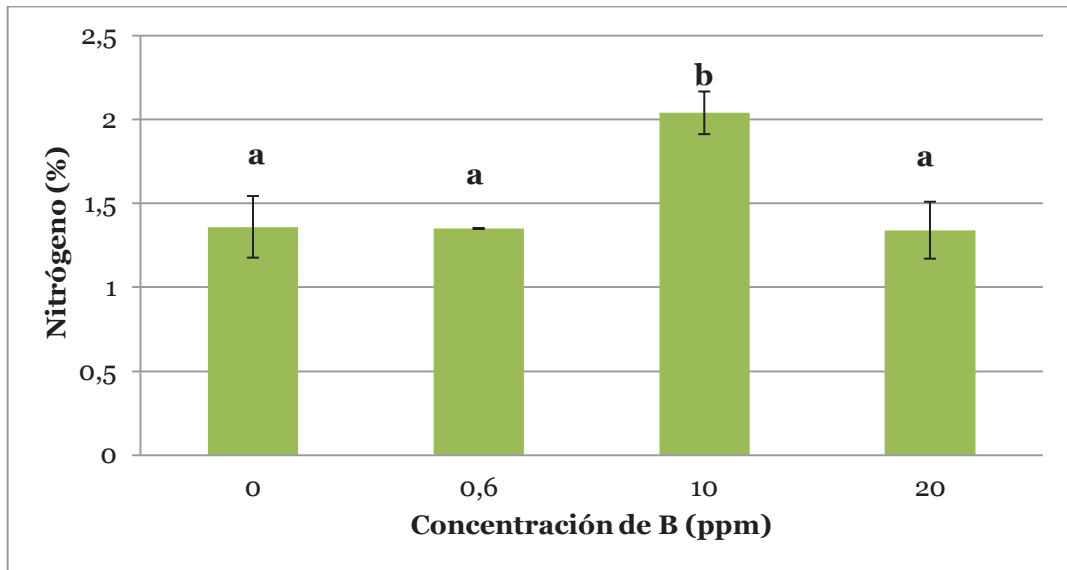
**Gráfico 4.11:** Porcentaje de nitrógeno de parte aérea de plantas de alfalfa (inoculadas con *S. meliloti* B399) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores representan las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

## Resultados

Dentro del ensayo inoculado, se determinó que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos correspondientes a las concentraciones de 0, 10 y 20 con respecto de la de 0,6 ppm.

### 4.4.2.5.3 Plantas de alfalfa fertilizadas con $KNO_3$

En el **Gráfico 4.12** se muestran los promedios y desvíos estándar de los porcentajes de N correspondientes a cada concentración de B adicionado dentro del bloque fertilizado con  $KNO_3$ .



**Gráfico 4.12:** Porcentaje de nitrógeno de parte aérea de plantas de alfalfa (fertilizadas con  $KNO_3$ ) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores representan las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Dentro de los distintos tratamientos del ensayo fertilizado se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de 0; 0,6 y 20 ppm de B adicionado con respecto al ensayo de 10 ppm de B agregado.

## 4.4.3 Determinación de Boro

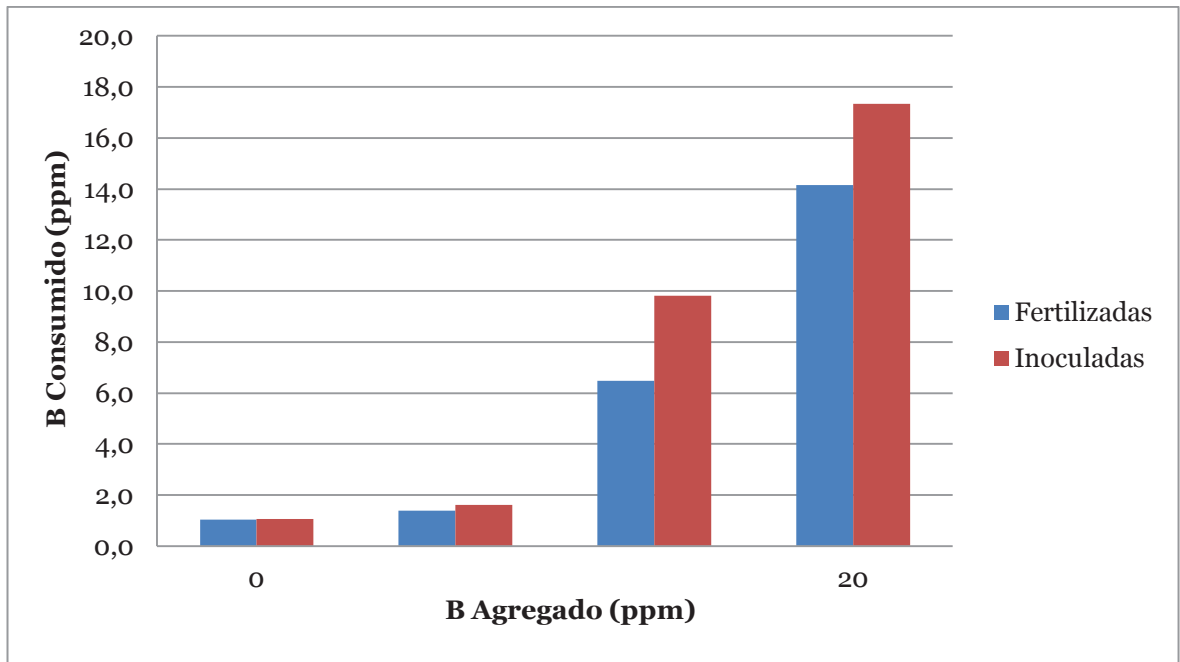
### 4.4.3.1 Contenido de Boro en la perlita utilizada como sustrato

#### 4.4.3.1.1 Ensayo Completo

Se determinó la cantidad de B remanente en la perlita utilizada como sustrato para el crecimiento de las plantas de alfalfa. Con el mismo método, previo al ensayo, se determinó el contenido de B inicial en cada maceta. A partir de la diferencia entre la concentración de B inicial y la concentración remanente al finalizar el ensayo, se obtuvieron los valores de B consumido para cada tratamiento. En el **Gráfico 4.13** se presentan los resultados obtenidos en la determinación.



## Resultados



**Gráfico 4.13:** Concentración de B (ppm) consumida para los dos bloques experimentales del ensayo de invernadero final en función de los ppm de B adicionado. Los valores corresponden a los promedios de cada tratamiento.

En la **Tabla 4.4** se aprecian los valores de porcentaje de reducción de B en el sustrato, calculado como la diferencia entre el B inicial y el B remanente en el sustrato.

Tratamiento	Concentración de B adicionado (ppm)	% Reducción de B en sustrato (promedio)
<b>Fertilizadas</b>	0 ppm	97,16%
	0,6 ppm	83,48%
	10 ppm	58,54%
	20 ppm	67,22%
<b>Inoculadas</b>	0 ppm	99,39%
	0,6 ppm	96,73%
	10 ppm	88,83%
	20 ppm	82,37%

**Tabla 4.4:** Valores de B remanente para los distintos tratamientos de ambos bloques experimentales del ensayo de invernadero final.

En la **tabla 4.4** se puede apreciar que en todos los casos el porcentaje de reducción de B en la perlita fue mayor al 50% y en el bloque inoculado resultó siempre superior al 80%.

Se determinó que hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos de 10 y 20 ppm de los dos ensayos. No existen diferencias

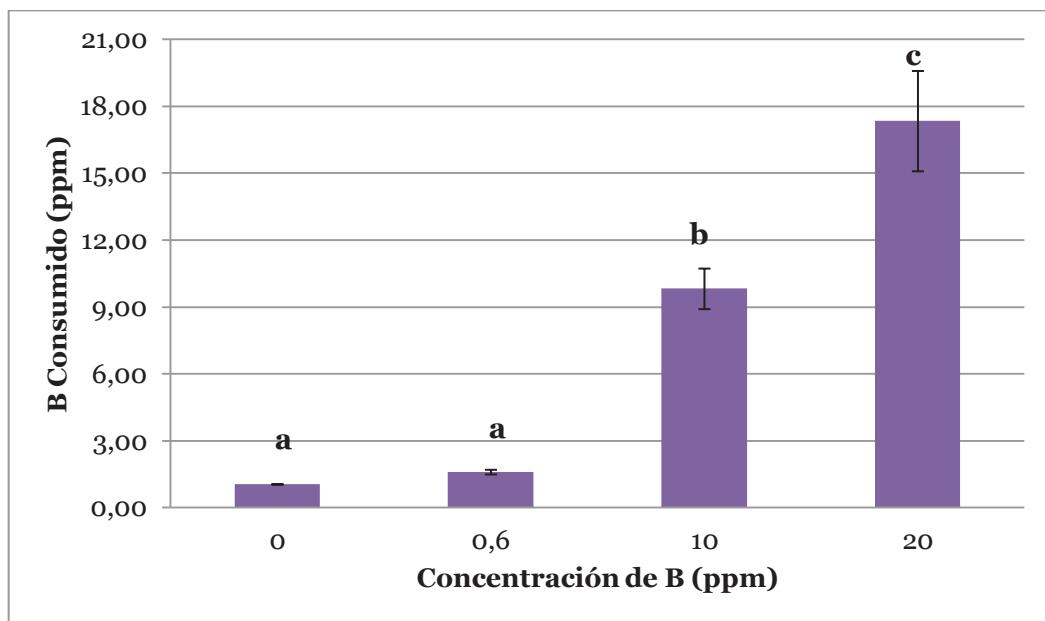
## Resultados

significativas entre las medias de los tratamientos de 0 y 0,6 ppm de B adicionado de los dos bloques.

Para los tratamientos de 0,6; 10 y 20 ppm de B adicionado resultó que las medias de cada tratamiento del ensayo inoculado son significativamente mayores a las del ensayo fertilizado. En el caso del ensayo de 0 ppm, no se observaron diferencias significativas entre las medias.

### 4.4.3.1.2 Plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* B399

En el **Gráfico 4.14** se muestran los promedios y desvíos estándar de las concentraciones de B remanentes en cada maceta correspondientes a cada tratamiento dentro del bloque inoculado con *S. meliloti* B399.



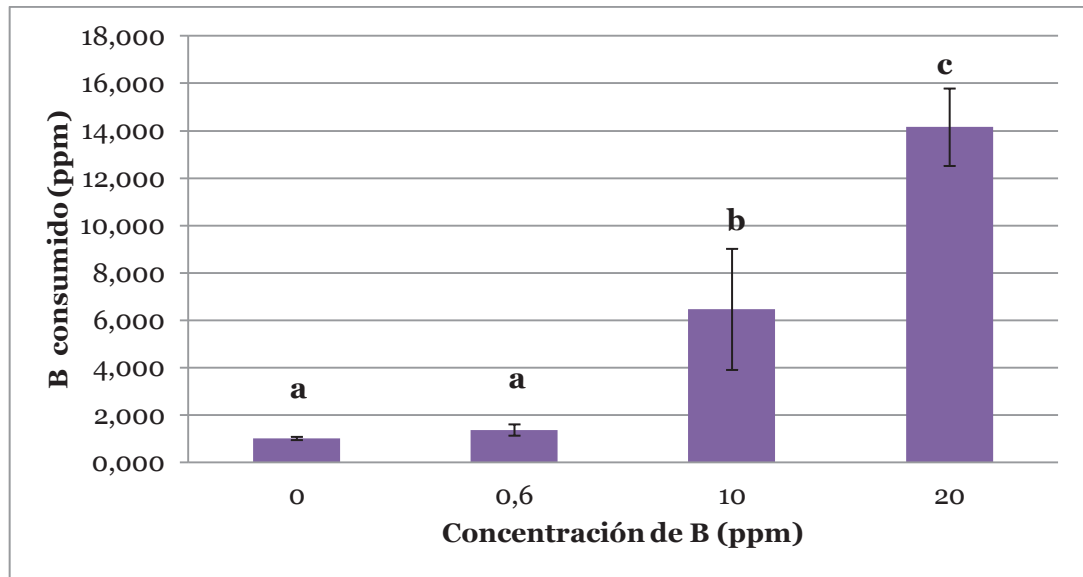
**Gráfico 4.14:** Concentración de boro consumido en el sustrato de las macetas de plantas de alfalfa (inoculadas con *S. meliloti* B399) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores representan las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Se determinó que hay diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos del bloque inoculado, siendo iguales las medias de los tratamientos de 0 y 0,6 ppm de B adicionado.

### 4.4.3.1.3 Plantas de alfalfa fertilizadas con $KNO_3$

En el **Gráfico 4.15** se muestran los promedios y desvíos estándar de las concentraciones de B remanentes en cada maceta correspondientes a cada tratamiento dentro del bloque fertilizado con  $KNO_3$ .

## Resultados



**Gráfico 4.15:** Concentración de boro consumido en el sustrato de las macetas de plantas de alfalfa (fertilizadas con  $\text{KNO}_3$ ) del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes. Los valores representan las medias  $\pm$  DS. Las distintas letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Se determinó que existen diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos del bloque fertilizado, siendo iguales las medias de los tratamientos de 0 y 0,6 ppm de B agregado.

### 4.4.3.2 Concentración de Boro Foliar

Se obtuvieron los valores de B foliar para los 4 tratamientos del bloque inoculado; debido a la falta de muestra, la determinación no se pudo llevar a cabo para los tratamientos fertilizados. En la **Tabla 4.5** se presentan los resultados obtenidos en la determinación.

Muestra Foliar del Bloque Inoculado	mg B / kg de hoja
Tratamiento 0 ppm	10,42
Tratamiento 0,6 ppm	10,58
Tratamiento 10 ppm	19,42
Tratamiento 20 ppm	32,2

**Tabla 4.5:** Concentración de B foliar en ppm para cada uno de los tratamientos del bloque inoculado del ensayo de invernadero final en función de las concentraciones de B crecientes.

Se puede observar que el contenido de B foliar aumenta a medida que aumenta la concentración de B en el sustrato.

## 5 DISCUSIÓN

La fitorremediación es una opción atractiva para remover metales de suelos contaminados dado que es un procedimiento simple, de bajo costo y amigable con el medio ambiente. El término fitorremediación generalmente se refiere a la fitoestabilización y a la fitoextracción. En la fitoestabilización, se usan enmiendas de suelo y plantas para modificar el estado químico y físico de los metales pesados contaminantes en el suelo. En la fitoextracción, las plantas se usan para eliminar los contaminantes del suelo y luego son cosechadas para su procesamiento (Karenlampi & col., 2000).

La fitoextracción es una metodología se desarrolló en el marco de una investigación intensa para obtener técnicas más eficientes, más baratas y menos peligrosas para remediar los suelos contaminados. Consiste en la eliminación de metales por medio de las plantas a través de la absorción y la acumulación en biomasa (Nascimento & Xing, 2006).

Las concentraciones de B empleadas en este trabajo superan ampliamente los límites establecidos en la Ley Nacional de Argentina 24.051 de Residuos Peligrosos (2 ppm para suelos agrícolas). Este microelemento puede ser extremadamente tóxico para algunas plantas a concentraciones ligeramente por encima del nivel óptimo para otras (Gupta, 1993). Es sabido que el B ejerce un efecto tóxico en la mayoría de las especies cuando está presente en el agua y/o suelo en niveles que superen los 4 ppm (Eaton, 1944; Nable & col., 1997; Reid, 2007). A pesar de que el requerimiento de B para las plantas es pequeño, el rango de concentraciones entre la deficiencia y la toxicidad es estrecho. En zonas áridas y semi-áridas, la toxicidad de B resulta de altos niveles de este elemento en suelos y por adiciones de éste al suelo a través de agua de riego (Akar, 2007; Gemici & Tarcan, 2002; Ryan & col., 1998).

Las especies hiperacumuladoras se definen convencionalmente como aquellas capaces de acumular metales a niveles 100 veces mayores a aquellos normalmente medidos en plantas comunes no acumuladoras. Recientemente, Babaoglu & col. (2004) informaron que la especie *Gypsophila sphaerocephala* Fenzi ex Tchihat var. *G. sphaerocephala* contenía concentraciones considerablemente más altas de B en sus partes aéreas (2093 mg/kg en semillas; 3345 mg/kg, en hojas). A diferencia con la mayoría de los metales pesados, en cuanto a la hiperacumulación de B, aún no se ha establecido una concentración target. Sin embargo, se considera hiperacumuladora cuando una planta tiene más de 800 mg de B/kg en base a peso seco (Marins & Oron, 2007; Robinson & col., 2007).

Para decontaminar suelos aplicando la fitorremediación, que emplea plantas y microorganismos asociados, el primer paso es detectar y demostrar cuál o cuáles son las especies vegetales tolerantes, lo que constituye el objetivo de este trabajo. Si bien son escasos los trabajos publicados de tolerancia al B, resultados

## Discusión

similares fueron obtenidos por Bañuelos & col. (1999), quienes emplearon dos germoplasmas de tomate, maíz y alfalfa, obteniendo porcentajes de germinación superiores al 60% en 20 y 40 ppm de B, y por Albarracín Franco & col. (2007) con *Aspidosperma* quebracho blanco y *Lolium multiflorum* con una supervivencia superior al 70% en 50 ppm de B de suelo extraído de la planta Baradero, Salta y diluido con arena hasta llegar a la concentración mencionada.

El valor de concentración objetivo de B removido del suelo, para evaluar el potencial de fitoextracción de la alfalfa, fue establecido en el 50% del contenido del elemento disponible en el suelo basado en los resultados obtenidos en esta tesina.

Los resultados de este trabajo indican que *M. sativa* podría considerarse promisorio en la remediación de suelos con concentraciones de B de hasta 20 ppm, ya que produjo una reducción del B en el sustrato de entre 58,54 y 99,39 %. Además, la supervivencia de las plantas prácticamente no se vio afectada por las concentraciones de B probadas en el experimento. También indican que la especie comercial probada, *Medicago sativa* Palaversich BAR MS-9242, sobrevivió hasta 30 ppm de B y en el sustrato con 20 ppm se produjo la mayor reducción en la concentración de B al final del experimento cuando estaba en simbiosis con la cepa B399 de *Sinorhizobium meliloti*.

Los valores de B foliar obtenidos no llegan a niveles tóxicos, sino por lo contrario, el más alto (32,2 ppm) coincide con los valores normales para las plantas de alfalfa cuando se encuentran bajo un suministro adecuado de B (Alarcón Vera, 2001). Por lo tanto, en base a esos valores, podría afirmarse que no se trata de una especie hiperacumuladora. Teniendo en cuenta que el principal destino de la alfalfa es ser utilizada como forraje, se puede decir que es un aspecto ventajoso que contenga niveles de B normales, dado que en el caso contrario no podría ser utilizada con tal fin.

Uno de los mecanismos por el cual las plantas pueden tolerar altas concentraciones de B es la inmovilización del elemento por adsorción radicular. En algunas especies, este mecanismo impide la traslocación del B desde las raíces hacia los brotes, funcionando como una barrera de defensa y disminuyendo la fitoextracción potencial de tales especies, dado que solo una pequeña parte de los iones asociados a las raíces son efectivamente absorbidos (Lasat, 2000). La inmovilización de elementos por adsorción radicular no es rara cuando las plantas no son hiperacumuladoras y se refleja por la eficiencia de transferencia de metales pesados desde las raíces hasta los brotes.

Los resultados del ensayo sugieren que la alfalfa, tanto en simbiosis con la cepa B399 de *S. meliloti* como en ausencia de la bacteria, puede desarrollarse y crecer en concentraciones de B de hasta 20 ppm sin manifestar efectos negativos sobre su crecimiento. Teniendo en cuenta tanto la reducción del B en el sustrato como la supervivencia, podemos inferir que *M. sativa* en simbiosis con *S. meliloti* podría ser empleada en remediación de sustratos con altas concentraciones de B. Estas plantas tienen características ecológicas que son de importancia a la hora de

## Discusión

seleccionar especies tolerantes para remediación *in situ*, ya que son de amplia distribución, de rápido crecimiento, las raíces se extienden en profundidad y horizontalmente y son longevas, por lo que podrían secuestrar y mantener el contaminante en su biomasa, por un período de tiempo interesante (Raskin, 1996). Además, la combinación con las especies comerciales de ciclos de vida más cortos y extensión más superficial de las raíces, podría tener efectos sinérgicos en la absorción del contaminante.

El rendimiento (expresado como peso seco, volumen radicular y porcentaje de nitrógeno) del bloque inoculado resultó, en todos los casos, significativamente mayor al del fertilizado; esto se debió a que la fertilización nitrogenada del segundo bloque resultó insuficiente, por lo que no pueden atribuirse estas diferencias al efecto del B, sino más bien a una falta de N en el sustrato indispensable para el crecimiento de las plantas de alfalfa (Díaz Zorita & Gambaudo, 2007).

En el presente estudio, el rendimiento en peso seco de parte aérea y raíces aumentó proporcionalmente con la concentración de B adicionado dentro del bloque inoculado; se comprobó que las diferencias significativas de peso seco se encuentran entre el ensayo sin B respecto del de 20 ppm de B adicionado, siendo éste último significativamente mayor. En el bloque fertilizado no se obtuvieron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea entre los tratamientos; y respecto de los pesos secos radiculares se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento de 0,6 ppm respecto del de 20 ppm, resultando éste mayor que el primero. Piland & col. (1994) descubrieron que el tratamiento con B aumentaba el rendimiento de las semillas de alfalfa por un 60%, respecto de plantas deficientes en B. Este elemento, afecta el rendimiento de frutos, vegetales y granos así como la calidad de cultivos cosechados (Blevins & Lukaszewski, 1998). El B juega un importante papel en la fertilización de las plantas, teniendo necesidades particularmente elevadas cuando el crecimiento en peso de las hojas es más alto y durante la floración y el cuajado de los frutos.

Los resultados del contenido de nitrógeno para el bloque inoculado, indican diferencias significativas entre todos los tratamientos respecto del de 0,6 ppm, resultando éste el mayor a pesar de no presentar un peso seco más alto que los otros tratamientos. En el caso del bloque fertilizado las diferencias significativas se encuentran entre el tratamiento de 10 ppm respecto del resto, y al igual que en el caso anterior, no presentó un peso seco superior a los demás tratamientos.

Ya se ha establecido que el B tiene un importante efecto sobre la fijación biológica. Nódulos deficientes en B, desarrollan estructuras infectivas anormales, con pérdida de bacteroides dentro de las células. La actividad de la enzima nitrogenasa disminuye, debido a la falta de estructuras protectoras contra el oxígeno, y por consiguiente, también lo hace la cantidad de N<sub>2</sub> fijado (Bolaños & col., 1994; Bolaños & col., 1996).

## Discusión

En cuanto al número los nódulos dentro del bloque inoculado no se observaron diferencias entre las distintas concentraciones de B.

Es sabido que para favorecer y lograr una excelente nodulación es esencial la presencia de calcio y B, ya que el B adquiere una especial importancia en la diferenciación del simbiosoma, así como en el mantenimiento de la estructura y la funcionalidad del nódulo (Redondo-Nieto & col., 2003). En el proceso de simbiosis, el B es esencial al detectarse una disminución en la nodulación cuando se utilizan como inóculo cultivos crecidos en ausencia de B; en la estabilización de la estructura para un correcto funcionamiento del nódulo ya que sin este microelemento, no se ensamblan correctamente las proteínas de la pared originando las alteraciones observadas en la misma (Bolaños & col., 2002; Bonilla & col., 2002). También, en deficiencia de B se produce un descenso en la concentración de pectinas de la pared (Bonilla & col., 1997b), contribuyendo aún más a la desestabilización de la misma. En condiciones de deficiencia de B las bacterias que logran invadir una célula radical, presentan una membrana peribacteroidea degenerada así como una estructura anómala del bacteroide (Bolaños & col., 1994).

Los resultados obtenidos a partir de la medición del volumen radicular indican que, dentro del bloque inoculado, el tratamiento de 20 ppm resultó ser significativamente mayor al resto; mientras que dentro del bloque fertilizado existen diferencias significativas entre los tratamientos de 0,6; 10 y 20 ppm de B adicionado.

El volumen radicular de las plantas está positivamente correlacionado con la longitud y diámetro del tallo, y la biomasa total de las plantas (Rose & col., 1991a; Rose & col., 1991b; Haase & col., 1993). Varios autores han sugerido incluir el tamaño del sistema radicular de las plantas como un criterio para estimar su calidad (Carlson, 1986; Rose & col., 1991b; Rose & col., 1997). El volumen radicular de las plantas es un atractivo criterio para estimar la calidad de las plantas y predecir su comportamiento en terreno una vez plantadas, ya que puede ser medido en plantas producidas a raíz desnuda y raíz cubierta a través de métodos no destructivos (Harrington & col., 1994; Racey, 1985).

En este ensayo se puede constatar que las plantas que crecieron en la mayor concentración de B adicionada al sustrato (20 ppm) presentaron el mayor volumen radicular y el mayor peso seco, tanto de parte aérea como radicular, en ambos bloques, confirmando que esta determinación puede correlacionarse positivamente con la biomasa de las plantas.

Puede decirse, en forma general, que a medida que se aumentó la concentración de B adicionada al sustrato, aumentó el rendimiento, ya sea como peso seco o como volumen radicular. Todo esto confirmaría que resulta fundamental la presencia del B para una correcta nodulación y la consiguiente fijación de nitrógeno.

## Discusión

Cabe destacar que en ningún caso se observaron síntomas de toxicidad producidos por exceso de B, como ser necrosis progresiva de las hojas que comienza con un amarillamiento de los bordes de las hojas, continúa entre los nervios laterales hacia la nervadura central y termina con oscurecimiento y posterior necrosis.



## 6 CONCLUSIONES

Analizando los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que:

- Las plantas de alfalfa evaluadas demostraron ser tolerantes al B en las condiciones evaluadas, con una alta producción de peso seco y sin sintomatologías visibles de toxicidad.
- Los mejores rendimientos (expresados como peso seco, contenido de nitrógeno y porcentaje de proteínas) se obtuvieron para las mayores concentraciones de B para cuando la alfalfa estaba inoculada con *S. meliloti* B399.
- Los porcentajes de reducción de B en el sustrato indican que la planta de alfalfa en simbiosis con *S. meliloti* podría ser una buena fitorremediadora, pero dado los valores de concentración de B foliar, no puede caracterizarse como una hiperacumuladora. Sin embargo, la implantación de alfalfa tolerante a altas concentraciones de B en un suelo contaminado con este elemento no garantiza que se elimine completamente del sustrato; sino que implica que, al disminuir su concentración en el mismo, podrán cultivarse especies vegetales que sean sensibles a altas concentraciones de B.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Sería de importancia extender la escala temporal de los experimentos y además, trasladarlos al sustrato suelo para comprobar que también puede ejercer un efecto fitorremediador en un ambiente natural. Se espera poder transferir los resultados de estos ensayos al sector productivo.

## 7 BIBLIOGRAFÍA

**Agulhon, H. 1910.** *Présence et utilité du bore chez les végétaux.* Annales De L'institut Pasteur, 24: 321-329.

**Akar, D. 2007.** *Potential boron pollution in surface water, crop and soil in the lower Buyuk Menderes Basin.* Environmental Engineering Science 24: 1273-1279.

**Alarcón Vera, A.L. 2001.** *El Boro como nutriente esencial.* En: Ediciones de Horticultura, N° 155, Septiembre 2001. pp. 1-11.

**Albarracín Franco, S., M.L. de Viana & H. Flores. 2007.** *Germinación y supervivencia de dos especies vegetales en altas concentraciones de boro.* Avances en Energías Renovables y Ambiente. Vol 11: 49-56.

**Ayers, R.S. & Westcor, D.W. 1976.** *Water quality for irrigation.* Irrigation and drainage paper 29. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

**Babaoglu, M.; Gerzin, S.; Topal, A.; Sade, B. & Dural, H. 2004.** *Gypsophila sphaerocephala Fenzl ex Tchihat.: a boron hyperaccumulator plant species that may phytoremediate soils with toxic B levels.* Turkish Journal of Botany 28: 273-278.

**Badr-Uz-Zaman, R. & M. Salim. 1999.** *Plant utilization and release of boron distributed in different fractions in calcareous soils.* Arid Soil Res. Rehabil, 13(3): 293-303.

**Bañuelos, G.S., H.A. Ajwa, L. Caceres & D. Dyer. 1999.** *Germination responses and boron accumulation in germplasm from Chile and United States grown with boron-enriched water.* Ecotoxicol. Env. Safety 43:62-67.

**Barr, R., Böttger M. & Crane F. L. 1993.** *The effect of boron on plasma membrane electron transport and associated proton secretion by cultured carrot cells.* Biochem. Mol. Biol. Intern.31:31-39.

**Basigalup, D. & R. Rosanigo. 2007.** *Panorama actual de la alfalfa en la Argentina.* En El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina Ed. D.H. Basigalup. Ediciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Cap. 1 pp 15-24.

## Bibliografía

**Bennett, W. F. 1993.** *Nutrient Deficiencies and Toxicities in Crop Plants*. APS Press, St Paul, MN, USA.

**Berger, K.C., Truog, E. 1939.** *Boron Determination in Soil and Plants*. Ind. Engng. Chem. Analyt. Edn. 11, 540- 545.

**Bergmann, W. 1992.** *Colour Atlas: Nutritional Disorders of Plants*. pp 204–239. Gustav Fischer, New York.

**Bingham FT. 1982.** *Boron*. In AL Page (ed.) *Methods of Soils Analysis, Part. 2. Chemical and Microbiological Properties*. Agronomy Monograph, 2nd ed. ASA-SSSA, 677 S. Segoe Rd.,Madison, WI 53711, USA. 9: 431-447.

**Blevins D.G. & Lukaszewski K.M. 1998.** *Boron in plant structure and function*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 481-500.

**Bohnsack C. W. & Albert L. S. 1977.** *Early Effects of Boron Deficiency on Indoleacetic Acid Oxidase Levels of Squash Root Tips*. *Plant Physiol.* 59: 1047-1050.

**Bolaños L., Esteban E., de Lorenzo C., Fernández-Pascual M., de Felipe M.R., Gárate A. & Bonilla I. 1994.** *Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*)-*Rhizobium nodules**. *Plant Physiology*, 104: 85-90.

**Bolaños L., Brewin N.J. & Bonilla I. 1996.** *Effects of boron on *Rhizobium-legume cell-surface interactions and nodule development**. *Plant Physiology*, 110:1249-1256.

**Bolaños L., Redondo-Nieto M., Bonilla I. & Wall L.G. 2002.** *Boron requirement in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* symbiotic relationship. Its essentiality for *Frankia BCU110501* growth and nitrogen fixation*. *Physiologia Plantarum*, **115**: 563-570.

**Bolaños, L., K. Lukaszewski, I. Bonilla & D. Blevins. 2004.** *Why boron?*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 907–912

**Bonilla I., Cadahía C., Carpena O. & Hernando V. 1980.** *Effects of boron on nitrogen metabolism and sugar levels of sugar beet*. *Plant and Soil*. 57(1):3-9.

## Bibliografía

**Bonilla I., García-González M. & Mateo P. 1990.** *Boron requirement in Cyanobacteria. It's possible role in the early evolution of photosynthetic organisms.* Plant Physiology, 94: 1554-1560.

**Bonilla I., Mergold-Villaseñor C., Campos M.E., Sánchez N., Pérez H., López L., Castrejón L., Sánchez F. & Cassab G.I. 1997a.** *The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyprolin-/proline-rich proteins.* Plant Physiology, 115: 1329-1340.

**Bonilla I., Pérez H., Cassab G., Lara M. & Sánchez F. 1997b.** *The effect of boron deficiency on development in determinate nodules: changes in cell wall pectin contents and nodule polypeptide expression.* En: R.W. Bell, B. Rerkasem, eds. Boron in soils and plants. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp 213-220.

**Bonilla I., Redondo-Nieto M., El-Hamdaoui A., Wall L.G. & Bolaños L. 2002.** *Essentiality of Boron for Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes and Actinorhizal Plants.* En: H. Goldbach, B. Rerkasem, M.A. Wimmer, P.H. Brown, M. Thellier y R.W. Bell, eds. Boron in Plant and Animal Nutrition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 255-260.

**Bonilla I., A. El-Hamdaoui & L. Bolaños. 2004.** *Boron and calcium increase Pisum sativum seed germination and seedling development under salt stress.* Plant and Soil, 267: 97-107.

**Bono A.A., J.C. Montoya, M. Barraco & M. Díaz-Zorita. 2003.** *Boro, un nutriente que crea incertidumbre: experiencias de fertilización en la región pampeana.* Informe técnico. EEA Anguil, INTA.

**Bremner J.M. 1960.** *Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method.* J. Agr.Sci. 55:1-23.

**Brewin, N.J. 1991.** *Development of the legume root nodule.* Ann. Rev. Cell Biol. 7:191-226.

**Brewin N. J., Rathbun E. A. & Wisniewski J.-P. 2000.** *Structure and development of infection threads.* Pages 381-382 in: Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity. F. E. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yates, and W. E. Newton, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

## Bibliografía

- Brown, P.H. & H. Hu. 1996.** *Phloem mobility of boron in species dependent: Evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species.* Annals of Botany, v.77, pp. 497-505.
- Brown, P.H. & S.J. Barry. 1997.** *Boron mobility in plants.* Plant and soil v. 193, pp. 85-101.
- Brown P. H., Bellaloui, N., Wimmer M. A., Bassil E. S., Ruiz, J., Hu H., Pfeffer H., Dannel F. & Römheld V. 2002.** *Boron in plant biology.* Plant Biol. 4:205–223.
- Bruno, O. & Romero L. 1997.** Evaluación de cultivares de alfalfa bajo cortes. INTA EEA Pergamino. Pp.1-12.
- Cabral, D.R., J.A. Pereyra & M.A. Ochoa. 1985.** *Alfalfa. Producción de Semillas.* INTA – Dirección Regional Mendoza (Argentina). Folleto N° 78, 24 p.
- Cakmak I., Kurz H. & Marschner H. 1995.** *Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower.* Physiol. Plant. 95:11–18.
- Cakmak I. & Römheld V. 1997.** *Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants.* Plant and Soil . 193( 1-2):71-83.
- Camacho-Cristóbal J. J. & González-Fontes A. 2007.** *Boron deficiency decreases plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase expression and nitrate uptake, and promotes ammonium assimilation into asparagine in tobacco roots.* Planta. 226(2):443-451.
- Capene, D.G., Popa, R., Flood, B., & Nealson, K. H. 2006.** *Geochemistry. Follow the nitrogen.* Science 312(5774), 708-709.
- Carlson, W. 1986.** *Root system considerations in the quality of loblolly pine seedlings.* Southern Journal of Applied Forestry. N° 10, p. 87-92.
- Carpaena R.O, E. Esteban, M.J. Sarro, J. Peñalosa, A. Gárate, J.J. Lucena & P. Zornoza. 2000.** *Boron and calcium distribution in nitrogen-fixing pea plants.* Plant Science 151: 163–170.

## Bibliografía

- Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczer I., Bassler B. L. & Hughson F. M. 2002.** *Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron.* Nature. 415(6871):545-9.
- Coke L. & Whittington W.J. 1968.** *The role of boron in plant growth, IV. Interrelationships between boron and indol-3-yl acetic acid in the metabolism of bean radicles.* Journal of Experimental Botany, 19: 295-308.
- Cunningham, S.D. & D.W. Ow. 1996.** *Promises and prospects of phytoremediation.* Plant Physiology 110:715-719.
- Da, H.N. & S.P. Deng. 2003.** *Survival and persistence of genetically modified Sinorhizobium meliloti in soil.* Applied Soil Ecology 22: 1-14.
- Date R.A. 2001.** *Advances in inoculant technology: a brief review.* Australian Journal of Experimental Agriculture. 41: 321-325.
- de Viana, M.L. & S. Albarracín Franco. 2008.** *Tolerancia experimental de las especies vegetales Nicotiana glauca, Jacaranda mimosifolia, Tecoma stans, Medicago sativa y Spinacea oleracea al boro, en Argentina.* Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 56 (3): 1053-1061.
- Díaz Zorita, M. & S. Gambaudo. 2007.** *Fertilización y encalado en alfalfa.* En El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina Ed. D.H. Basigalup. Ediciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Cap. 11 pp 227-246.
- Eaton, F. M. 1944.** *Deficiency, toxicity and accumulation of boron in plants.* J. Agric. Res. 69, 237-277.
- El-Hamdaoui A., M. Redondo-Nieto, B. Torralba, R. Rivilla, I. Bonilla & L. Bolaños. 2003.** *Influence of boron and calcium on the tolerance to salinity of nitrogen-fixing pea plants.* Plant and Soil 251: 93-103.
- El-Shintinawy. 1999.** *Structural and functional damage caused by boron deficiency in sunflower leaves.* 36(4). Photosynthetica. 93(2):565-573.
- Fahraeus, G. 1957.** *The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass technique.* J. Gen. Microbiol. 16,374-381.
- Ferrol N. & Donaire J. P. 1992.** *Effect of boron on plasma membrane proton extrusion and redox activity in sunflower cells.* Plant Sci. 86: 41-47.

## Bibliografía

- Ferrol N., Belver A., Roldan M., Rodriguez-Rosales, M. P. & J. P. Donaire. 1993.** *Effects of Boron on Proton Transport and Membrane Properties of Sunflower (Helianthus annuus L.) Cell Microsomes.* Plant Physiol. 103(3): 763–7.
- Fick, G.W., D.A. Holt & D.G. Lugg. 1988.** *Environmental physiology and crop growth.* In: Hanson, A.A., D.K. Barnes and R.R. Hill (Ed). Alfalfa and Alfalfa Improvement. ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI, USA. Agronomy Series N° 29, Cap. 5, pp. 163-194.
- Findelee P. & Goldbach H. E. 1996.** *Rapid effects of boron deficiency on cell wall elasticity modulus in Cucurbita pepo roots.* Bot. Acta 109:463–465.
- Fleischer A., O'Neill M. A. & Ehwald R. 1999.** *The pore size of nongraminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II.* Plant Physiol. 121: 829–838.
- Gárate A., Esteban E., Lucena J.J., Carpena R.O. & Bonilla I. 1993.** *Effect of different boron levels on nodulated and non-nodulated pea plants.* En: N.J. Barrow, ed. Plant nutrition from genetic engineering to field practice. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 417-420.
- Gauch H.G. & Dugger W.M.Jr. 1954.** *The physiological action of boron in higher plants: a review and interpretation.* Univ. of Maryland Agr. Exp. Stat Bulletin A-80 (Technical) 1-43.
- Gemici, U. & Tarcan, G. 2002.** *Distribution of boron in thermal waters of western Anatolia, Turkey, and examples of their environmental impacts.* Environmental Geology 43:87-98.
- Gerloff G.C. 1968.** *The comparative boron nutrition of several green and blue-green algae.* Physiologia Plantarum, **21**: 369-377.
- Goldbach H.E. 1997.** *A critical review of current hypotheses concerning the role of boron in higher plants. Suggestion for further research and its methodological requirements.* Journal of Trace Microprobe Technology, 15: 51-92.

## Bibliografía

- Goldbach H.E., Yu Q., Wingender R., Schulz M., Wimmer M., Findeklee P. & Baluk F. 2001.** *Rapid response reactions of roots to boron deprivation.* Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 164(2): 173 – 181.
- Goldberg S. 1997.** *Reactions of boron with soils.* Plant and Soil, 193: 35-48.
- Grassano A., Ronchi A.L., Balatti A.P. & Scarone J.G. 2002.** *Caracterización de cepas nativas de sinorhizobium meliloti y su evaluación en la inoculación de alfalfa.* Agrochimica. Vol. XLVI.: 1-9. Pisa. Italia.
- Greenwood, N. & A. Earnshaw. 1997.** *Chemistry of the elements.* Second Edition, Pergamon Press, New York. p. 139-213.
- Gupta, S.K., Stewart, J.W.B. 1975.** *The Extraction and Determination of Plant Available Boron in Soils.* Schweizerische Landwirtschaftliche Forschung.
- Gupta, U. 1993.** *Boron and Its Role in Crop Production.* CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Han S., Chen L. S., Jiang H. X., Smith B.R., Yang L. T. & Xie C.Y. 2008.** *Boron deficiency decreases growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedlings.* J Plant Physiol. 165(13):1331-41.
- Harrington, J., J. Mexal & J. Fisher. 1994.** *Volume displacement provides a quick and accurate way to quantify new root production.* Tree Planter's Notes. N°3, p. 121-124.
- Haase, D., R. Rose. 1993.** *Soil moisture stress induces transplant shock in stored and unstored 2+0 Douglas-fir seedlings of varying root volumes.* Forest Science. N° 2, p. 275-294.
- Heichel, G.H. 1983.** *Alfalfa.* In: I.D. Teare & M.M. Peet (ed) Crop Water Relations. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, pp. 127-155.
- Heichel, G.H., C.P. Vance & D.K. Barnes. 1983.** *Symbiotic nitrogen fixation of alfalfa, birdsfoot trefoil and red clover.* In: J.A. Smith and V.W. Hays (eds.) Proc. 14<sup>th</sup> Int. Grassl. Congr. Westview Press, Boulder, CO, USA, pp. 336-339.
- Hewitt E.J. 1963.** *The essential nutrient elements: Requirements and interactions in plants.* En: A. Treatise, F.C. Stewart, eds. Plant Physiology Vol III. Academic Press, New York-London, pp 137-360.



## Bibliografía

**Hirsch A.M. & Torrey J.G. 1980.** *Ultrastructural changes in sunflower root cells in relation to boron deficiency and added auxin.* Canadian Journal of Botany, 58: 856-866.

**Hirsch, A.M., M.R. Lum & J.A. Downie. 2001.** *What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special?* Plant Physiology. 127: 1484-1492.

**Hou, J., L. Evans & G. Spiers. 1994.** *Boron fractionation in soils.* Comm. Soil Sci. Plant Anal., 25(11-12): 1841-1853.

**Hu H. & P. Brown. 1997.** *Absorption of boron by plant roots.* Plant Soil. 193(1-2): 49-58.

**Hunt, C.D. 2002.** *Boron-binding biomolecules: A key to understanding the beneficial physiological effects of dietary boron from prokaryotes to humans.* En: Goldbach, H. E., & col.: Boron in plant and animal nutrition. Kluwer Academic/Plenum Publ. 21-36.

**Jaweed M.M. & Scott E.G. 1967.** *Effect of boron on ribonucleic acid and indoleacetic acid metabolism in the apical meristems of sunflower plants.* Proc W Va Acad Sci 39: 186-193.

**Karenlampi S, Schat H, Vangronsveld J, Verkleij JAC, Van der Lelie D, Mergeay M & Tervahauta AI .2000.** *Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils.* Environmental Pollution 107: 225-231.

**Kiesselbach, T.A.; J.A. Russely & J.A. Anderson. 1929.** *The significance of subsoil moisture in alfalfa production.* Journal of American Society of Agronomy 21(3): 241-268

**Kobayashi M., Matoh T. & Azuma J. 1996.** *Two chains of Rhamnogalacturonano II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls.* Plant Physiology, 110: 1017-1020.

**Lasat, M.M. 2000.** *Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues.* Journal of Hazardous Substance Research 2: 1-25.

**Lee S. & Aronoff S. 1967.** *Boron in Plants: A Biochemical Role.* Science 158(3802):798-799.

## Bibliografía

- Li C. J., Pfeffer H., Dannel F., Roßmheld V. & Bangerth F. 2001.** *Effects of boron starvation on boron compartmentation, and possibly hormone-mediated elongation growth and apical dominance of pea (*Pisum sativum*) plants.* *Physiol Plant.* 111:212-9.
- Lovatt C.J., Dugger W.M. 1984.** *Boron.* En: E. Frieden, ed. *Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements Vol 3.* Plenum Press, New York-London, pp 389-421.
- Malavé Acuña, A. 2005.** *Los suelos como fuente de boro para las plantas.* *Rev. Científ. UDO Agríc.,* 5 (1): 10-26.
- Marble, V.L., L.H. Ochoa & C.J. Moschetti. 1986.** *Producción de semilla de alfalfa.* In: C. Bariggi, C.D. Itria, V.L. Marble y J.M. Brun (eds) *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa.* INTA, Buenos Aires. Colección Científica. Cap. 11, pp. 371-442.
- Marins, C.M.D.C. & Oron, G. 2007.** *Boron Removal by duckweed *Lemna gibba*: a potential method for the remediation of boron polluted water.* *Water Research* 41: 4579-4584.
- Marschner, H. 1995.** *Mineral Nutrition of Higher Plants (2<sup>nd</sup> Edn).* Academic Press, San Diego, pp. 379-396.
- Martínez F., Mateo P., Bonilla I., Fernández-Valiente E. & Gárate A. 1986.** *Growth of *Anacystis nidulans* in relation to boron supply.* *Israel Journal of Botany,* 35: 17-21.
- Mateo P., Bonilla I., Fernández-Valiente E. & Sánchez-Maeso E. 1986.** *Essentiality of boron for dinitrogen fixation in *Anabaena* sp. PCC 7119.* *Plant Physiology,* 81: 17-21.
- Matsunaga T., Ishii T., Matsumoto S., Higuchi M., Darvill A., Albersheim P. & O'Neill M. A. 2004.** *Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants.* *Plant Physiol.* 134: 339-351.

## Bibliografía

**Mazurek M. & Perlin A. S.1963.** *Borate complexing by five-membered-ring vic-diols vapor pressure equilibrium and N.M.R. spectral observations.* Canadian Journal of Chemistry.41(10):2403-2411.

**Meyer, R.D., S.B. Orloff, J.L. Schmlerer. 2007.** *Alfalfa fertilization strategies.* In: C.G. Summer and D.H. Putnam, eds., Irrigated alfalfa management for Mediterranean and Desert zones. Chapter 6. Oakland: University of California Agriculture and Natural Resources Publication 8292.

**Moreno Sastre, G. 2007.** *Funciones de los nutrientes en la planta de alfalfa.* En: Cuadernillo Clásico de Forrajeras, Agromercado, N° 135, pp. 25-28.

**Moscheti, C.J., E.M. Martínez, E.M. Echeverría & L.M. Ávalos. 2007.** *Producción de semilla de alfalfa.* En El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina Ed. D.H. Basigalup. Ediciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Cap. 18 pp 405-448.

**Mühling K.H., Wimmer M. & Goldbach H.E.1998.** *Apoplasmic and membrane-associated Ca<sup>2+</sup> in leaves and roots as affected by boron deficiency.* Physiologia Plantarum, 102: 179-184.

**Nable, R.O. 1988.** *Resistance to boron toxicity amongst several barley and wheat cultivars: a preliminary examination of the resistance mechanism.* Plant and Soil 112, 45-57.

**Nable R.O., Cartwright B. & Lance R.C. 1990.** *Genotypic differences in boron accumulation in barley: Relative susceptibilities to boron deficiency and toxicity.* In: El Bassam N, Dambroth M, Loughman B, eds. Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 243-251.

**Nable R.O., Bañuelos G.S. & Paull J.G. 1997.** *Boron toxicity.* Plant and Soil 193, 181-198.

**Nascimento, C.W.A. & Xing, B. 2006.** *Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation.* Scientia Agricola 63: 299-311.

## Bibliografía

- O'Hara G.W. 2001.** *Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review.* Australian Journal of Experimental Agriculture. **41**: 417-433.
- Oertli, J. J. & Roth, J. A. 1969.** *Boron nutrition of sugar beet, cotton, and soybean.* Agronomy Journal. 61, 191–95.
- O'Neill M. A., Warrenfeltz D., Kates. K; Pellerin, P., Doco T., Darvill A. G. & Albersheim P. 1996.** *Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester.* Journal of Biological Chemistry. 271:22923–22930.
- O'Neill, M. A., Ishii T., Albersheim P. & Darvill A. G. 2004.** *Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide.* Annual Review in Plant Biology. 55:109–139.
- Parr A.J. & Loughman B.C. 1983.** *Boron and membrane function in plants.* En: D.A.M. Robb, W.S. Pierpoint, eds. Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants. Academic Press, London, pp 87-107.
- Peoples, T.R & D.W. Kock. 1978.** *Physiological response of three alfalfa cultivars to one chilling night.* Crop Science 18(2):255-258.
- Piland, J.R., C.F. Ireland & H.M. Reisenauer. 1944.** *The importance of borax to legume seed production in the south.* Soil Sci. 57: 75–84.
- Power P.P. & Woods W.G. 1997.** *The chemistry of boron and its speciation in plants.* Plant and Soil, 193: 1-13.
- Racey, G. 1985.** *A comparison of planting stock characterization with root area index, volume and dry weight.* Forestry Chronicl. N° 61, p. 64-70.
- Raskin, I. 1996.** *Plant genetic engineering may help with environmental cleanup.* Proceed. Nat. Acad. Sci. 93:3164-3166.
- Redondo Nieto M., A.R. Wilmot, A. El-Hamdaoui, I. Bonilla & L. Bolaños. 2003.** *Relationship between boron and calcium in the N<sub>2</sub>-fixing legume-rhizobia symbiosis.* Plant, Cell and Environment 26, 1905-1915.

## Bibliografía

**Reid R.J., Hayes J.E., Post A., Stangoulis J.C.R. & Graham R.D. 2004.** *A critical analysis of the causes of boron toxicity in plants.* Plant Cell Environ. 25, 1405-1414.

**Reid R. 2007.** *Update on boron toxicity and tolerance in plants.* In: Xu F, Goldbach HE, Brown PH, Bell RW, Fujiwara T, Hunt CD, Goldberg S, Shi L, eds. *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition.* Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 83-90.

**Ridge, R. W. & Rolfe B. G. 1985.** *Rizobium sp. degradation of legume root hair cell wall at the site of infection thread origin.* Appl. Environ. Microbiol. 50:717-720.

**Robinson, B.H.; Crem, S.R.; Chancerel, B.& Mill, T.M. 2007.** *Poplar for the phytomanagement of boron contaminate soils.* Environmental Pollution 150: 225-2233.

**Rodgers, G. 1995.** *Química Inorgánica.* McGrawHill/Interamericana España. 415 p.

**Rolfe B. G & Gresshoff P. M. 1988.** *Genetic analysis of legume nodulation initiation.* Annual Review of Physiology and Plant Molecular Biology 39:297-319.

**Romero, N.A., C. Bariggi & G. Schenkel. 1977.** *Exploración de deficiencias nutritivas para la alfalfa en suelos pampeanos mediante ensayos de campo.* INTA-E.E.A. Anguil (Argentina). Proyecto FAO-INTA Argentina 75/006. Documento de Trabajo N° 3. 76 p.

**Romero, N.A., N.A. Juan & L.A. Romero. 1995.** *Establecimiento de la alfalfa en la Región Pampeana.* In: H. Hijano y A. Navarro (ed). *La alfalfa en la Argentina.* INTA, Subprograma Alfalfa. Enciclopedia Agro de Cuyo Manuales 11, Capítulo 2, pp. 21-36.

**Ronchi, A.L., A. Grassano, A.P. Balatti. 1997.** *Pertite as a carrier for legume inoculants.* Agrochimica Vol. XLI. Nro. 5. pag 186-195.

**Rose, R., J. Gleason, M. Atkinson, T. Sabin. 1991a.** *Grading ponderosa pine seedlings for outplanting according to their root volume.* Western Journal of Applied Forestry. N° 6, p. 11-15.

## Bibliografía

- Rose, R., M. Atkinson, J. Gleason, T. Sabin. 1991b.** *Root volume as a grading criterion to improve field performance of Douglas-fir seedlings.* New Forests. N° 5, p. 195-209.
- Rose, R., D. Haase, F. Kroiher, T. Sabin. 1997.** *Root volume and growth of ponderosa pine and Douglas-fir seedlings: a summary of eight growing seasons.* Western Journal of Applied Forestry. N° 12, p. 69-73.
- Ruiz J., Bretones G., Baghour M., Belakbir A., Romero L. 1998.** *Relationship between boron and phenolic metabolism in tobacco leaves.* Phytochem. 48: 2-272.
- Ryan, J.; Singh, M.; Yau, S.K. 1998.** *Spatial variability of soluble boron in Syrian soils.* Soil Tillage Research 45: 407-417.
- Sadzawka, A.R., Z.R. Grez, M.A.R. Carrasco & M.L.G Mora. 2004.** *Métodos de Análisis de Tejidos Vegetales.* Comisión de Normalización y Acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Métodos 2 y 9: 7,8; 34-36.
- Sánchez-Yáñez, J.M. 1997.** *Producción de inoculantes para leguminosas y gramíneas. Coordinación de la Investigación Científica.* Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Proyecto 2.7. Reporte técnico.
- Setter, T.L., L.E. Scharaker & E.T. Singham. 1978.** *Carbon dioxide exchange rates, transpiration and leaf characters genetically equivalent ploidy levels of alfalfa.* Crop Sci. 18 (2): 327-334.
- Shimizu-Sato S., Mori H. 2001.** *Control of outgrowth and dormancy in axillary buds.* Plant Physiol. 127:1405-13.
- Shkol'nik, M.Y. 1974.** *General conception of the physiological role of boron in plants.* Fiziolog Rast 21: 174-186.
- Shkol'nik M.Y. & Maevskaya A.N. 1977.** *Differences insensitivity of various plant taxa to boron deficiency and their causes.* Both Zh, **10**: 1528-1540.
- Smyth D.A. & Dugger W.M. 1981.** *Cellular changes during boron deficient culture of the diatom *Cylindrotheca fusiformis*.* Plant Physiology, **51**: 111-117.

## Bibliografía

**Spada, M. del C. 1995.** *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi – INTA. Año 5 N° 5, 39 p.

**Spada, M. del C. 1998.** *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi – INTA. Año 8 N° 8, 78 p.

**Spada, M. del C. 2000.** *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi – INTA. Año 10 N° 10, 64 p.

**Spada, M. del C. 2001.** *Avances en Alfalfa*. Ensayos territoriales. EEA Manfredi – INTA. Año 11 N° 11, 36 p.

**Stals H., Casteels P., Van Montagu M. y Inzé D. 2000.** *Regulation of cyclin-dependent kinases in Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 43: 583-593.

**Tang P. M., de la Fuente RK. 1986.** *The Transport of Indole-3-Acetic Acid in Boron- and Calcium-Deficient Sunflower Hypocotyl Segments*. *Plant Physiol.* 81(2):646-650.

**Trapp, S. & U. Karlson. 2001.** *Aspects of phytoremediation of organic pollutants*. *Soil & Sediments* 1: 37-43.

**Vance, C.P. 1978.** *Nitrogen fixation in alfalfa: an overview*. In: Proc. 8<sup>th</sup> Annu. Alfalfa Symp., pp 34-41.

**Vance, C.P., G.G. Heichel & D. Phillips. 1988.** *Nodulation and Symbiotic Dinitrogen Fixation*. In: A.A. Hanson, D.K. Barnes and R.R. Hill, Jr (eds.) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. Agronomy Series N° 29, Cap. 7. ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI, USA, pp. 229-257.

**Vance, C. P. & Lamb J. F. S. 2001.** *Application of biochemical studies to improving nitrogen fixation*. *Aust. J. Exp. Agric.* 41: 403-416.

**Verstraeten S. V., Lanoue L., Keen C. L. & Oteiza P. I. 2005.** *Relevance of lipid polar headgroups on boron-mediated changes in membrane physical properties*. *Arch. Biochem. Biophys.* 438:103–110.

**Vincent, J.M. 1970.** *A manual for the practical study of the root nodule bacteria*. IBP handbook N° 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

## Bibliografía

**Vivas H. 2001.** *Fertilización de alfalfa con azufre y Boro en el area centro-este de Santa Fe.* Revista Argentina de Producción Animal 21: 111-115.

**Wang Z.Y., Tang Y. L., Zhang F. S. & Wang H. 1999.** *Effect of boron and low temperature on membrane integrity of cucumber leaves.* J. Plant Nutr. 22:543–550.

**Wang G., Römheld V., Lia C. & Bangerth F. 2006.** *Involvement of auxin and CKs in boron deficiency induced changes in apical dominance of pea plants (*Pisum sativum L.*).* Journal of Plant Physiology 163: 591–600.

**Warington K. 1923.** *The effect of boric acid an borax on the broad bean and certain other plants.* Annals of Botany, 37: 629-672.

**Wisniewski J.P., Rathbun E.A., Knox J.P. & Brewin N.J. 2000.** *Involvement of diamine oxidase and peroxidase in insolubilization of the extracellular matrix: implications for pea nodule initiation by *Rhizobium leguminosarum*.* Molecular Plant-Microbe Interactions, 13: 413-420.

**Zehr J.P., Mellon M.T. & Zani S. 1998.** *New Nitrogen-Fixing Microorganisms Detected in Oligotrophic Oceans by Amplification of Nitrogenase (*nifH*) Genes.* Applied and Environmental Microbiology. 64(9): 3444-3450.

### -Referencias de Internet

**EPA (Environmental Protection Agency). 2000.** *Introduction to Phytoremediation.* EPA-report EPA/600/R-99/107. May 2003. (Consultado: 20 abril 2008; <http://clu-in.org/techpubs.htm>)

**INDEC. 2003.** Datos del sector agropecuario, agricultura, forrajes. <http://www.indec.gov.ar> (Fecha de consulta: 21/11/2004)



## 8 ANEXO

**SOLUCIONES EMPLEADAS EN LAS DISTINTAS DETERMINACIONES  
DESCRITAS EN MATERIALES Y MÉTODOS**

Soluciones	Reactivos
Solución Fahraeus (Fahraeus, 1957) para Riego	CaCl <sub>2</sub> 0,68 mM MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,68 mM Fe-EDTA 50 μM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 9,3 μM MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 10,6 μM ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,7 μM CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 3,2 μM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 1 μM
Fertilización nitrogenada	KNO <sub>3</sub> 8 mM
Soluciones para la extracción y cuantificación de B en perlita y en las hojas de alfalfa	Solución extractiva de Acetato de Amonio 1 N pH 4,8 Solución Estándar de Boro I (1000 ppm= 1000 mg B/L) Solución Estándar de Boro II (15 ppm B= 15 mg B/L) Solución Buffer-EDTA Solución de Azometina-H HCl 2 M
Medio de cultivo LMA para S. Meliloti (Mantenimiento, Inóculo y Proceso)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> NaCl KNO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> FeCl <sub>3</sub> Sacarosa Extracto de Levadura Rojo Congo Agar
Determinación de Nitrógeno Total	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 98 %, δ= 1,84 g/cm <sup>3</sup> Catalizador mixto NaOH 40% H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 10% HCl 0,1 N Indicadores

**Tabla 1:** Composición de las Soluciones utilizadas en las distintas determinaciones.

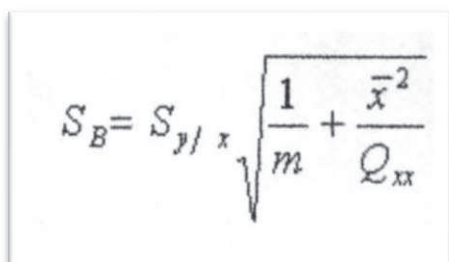
## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE BORO POR EL MÉTODO DE LA AZOMETINA-H

- **Solución extractiva de Acetato de Amonio 1 N pH 4,8:** Disolver 77 g de acetato de amonio en aproximadamente 750 ml de agua bidestilada. Ajustar el pH con ácido acético glacial y enrasar a 1 L.
- **Solución Estándar de Boro I (1000 ppm= 1000 mg B/L):** Disolver 5,722 g de ácido bórico en agua bidestilada y llevar a un litro.
- **Solución Estándar de Boro II (15 ppm B= 15 mg B/L):** Transferir 15 ml de solución estándar I a un matraz aforado de 100 ml y completar hasta enrase con agua bidestilada.
- **Solución Buffer-EDTA:** Disolver 250 g de acetato de amonio en 500 ml de agua bidestilada. Ajustar el pH a 5,5 mediante la adición lenta de aprox. 100 ml de ácido acético glacial con agitación constante. Luego adicionar 15 g de EDTA-disódico (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético), si es necesario calentar suavemente hasta que se disuelva completamente.
- **Solución de Azometina-H:** disolver 0,5 g de Azomethina-H en aprox. 10 ml de agua bidestilada con calentamiento suave. Una vez disuelta, adicionar 1 g de ácido ascórbico y mezclar hasta disolver. Llevar a un volumen final de 100 ml con agua bidestilada. Si la solución no fuera translúcida, recalentar nuevamente hasta que se disuelva. ESTA SOLUCIÓN SE PUEDE GUARDAR REFRIGERADA HASTA 15 DÍAS.

### -ECUACIONES LOD Y LOQ

El **límite de detección (LOD)** es la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica. Se calcula en función del desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco ( $S_b$ ).

#### Referencias



$$S_B = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}}$$

$S_{y/x}$  = Desvío estándar de los residuos de la regresión.

$m$  = Número de patrones de la curva de calibración.

$\bar{x}^2$  = Valor medio de las concentraciones de los patrones de calibración.

$Q_{xx}$  = Sumatoria de cuadrados de las concentraciones de los patrones de calibración

Una vez que se obtiene el valor de  $S_b$ , en la práctica se utiliza una ecuación aproximada para el límite de detección:  $Y_0 = 3,3 * S_b$ . Luego ese  $Y_0$  se reemplaza en la ecuación de la recta ajustada por regresión, y obtenemos un  $X_0$  que es igual al LOD.

El **límite de cuantificación (LOQ)** es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Este parámetro se toma como la concentración correspondiente a 10 veces el desvío estándar (en unidades de concentración) del blanco, con lo cual  $Y_0 = 10 * S_b$ . Luego ese  $Y_0$  se reemplaza en la ecuación de la recta ajustada por regresión y obtenemos un  $X_0$  que es igual al LOQ.

### ENSAYO PRELIMINAR

En la **Tabla 2** se observan los resultados obtenidos para el test Fisher, en el cual se agrupan los distintos tratamientos de acuerdo a las diferencias significativas entre las medias del ensayo de invernadero preliminar.

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas (p<=0,05)			
Testigo	0,02	6	A			
15	0,04	6	A	B		
0	0,05	6	A	B	C	
5	0,06	6	B		C	D
30	0,07	6	C			D
10	0,07	6	C		D	E
20	0,09	6	D			E
0,6	0,1	6	E			

- **Tabla 2:** Resultados del test Fisher para el ensayo de invernadero preliminar; los distintos tratamientos aparecen agrupados de acuerdo a la similitudes y diferencias significativas entre las medias.

### ENSAYO FINAL

En las siguientes tablas, se encuentran detallados los resultados obtenidos con el test de Fisher para las determinaciones llevadas a cabo al finalizar el ensayo de invernadero definitivo con el bloque inoculado con *S. meliloti* y el fertilizado con  $KNO_3$ .

#### - RECUENTO DE NÓDULOS

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas
0.00	7.30	5	A
0.60	8.63	5	A
20.00	9.04	5	A
10.00	9.08	5	A

- **Tabla 3:** Resultados del test Fisher para el recuento de nódulos del bloque inoculado.

**-VOLUMEN RADICULAR**

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas
0.00	8.60	5	A
0.60	9.00	5	A
10.00	9.60	5	A
20.00	12.60	5	B

- **Tabla 4:** Resultados del test Fisher para los volúmenes radiculares del bloque inoculado.

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas
0.60	1.00	5	A
0.00	1.40	5	A B
10.00	1.50	5	B
20.00	2.10	5	C

- **Tabla 5:** Resultados del test Fisher para los volúmenes radiculares del bloque fertilizado.

**-PESO SECO PARTE AÉREA**

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas
0.00	1.05	5	A
0.60	1.21	5	A B
10.00	1.27	5	A B
20.00	1.47	5	B

- **Tabla 6:** Resultados del test Fisher para los pesos secos de parte aérea del bloque inoculado.

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas
0.60	0.06	5	A
0.00	0.07	5	A
20.00	0.09	5	A
10.00	0.10	5	A

- **Tabla 7:** Resultados del test Fisher para los pesos secos de parte aérea del bloque fertilizado.

**-PESO SECO RAÍCES**

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas
0.00	0.85	5	A
0.60	0.97	5	A
10.00	1.20	5	A B
20.00	1.43	5	B

- **Tabla 8:** Resultados del test Fisher para los pesos secos de las raíces del bloque inoculado

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas	
0.60	0.06	5	A	
0.00	0.07	5	A	B
10.00	0.09	5	A	
20.00	0.10	5	B	

- **Tabla 9:** Resultados del test Fisher para los pesos secos de las raíces del bloque fertilizado.

### -PORCENTAJE DE NITRÓGENO

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas	
0.00	3.07	3	A	
20.00	3.23	3	A	
10.00	3.38	3	A	
0.60	4.44	3	B	

- **Tabla 10:** Resultados del test Fisher para los % de N del bloque inoculado.

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas	
20.00	1.34	2	A	
0.60	1.35	2	A	
0.00	1.36	2	A	
10.00	2.04	2	B	

- **Tabla 11:** Resultados del test Fisher para los % de N del bloque fertilizado.

### - BORO CONSUMIDO

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas	
0.00	1.05	5	A	
0.60	1.61	5	A	
10.00	9.83	5	B	
20.00	17.35	5	C	

- **Tabla 12:** Resultados del test Fisher para la determinación de la concentración de boro consumido del bloque inoculado.

B (ppm)	Medias	n	Letras diferentes indican diferencias significativas	
0.00	1.03	5	A	
0.60	1.39	5	A	
10.00	6.47	5	B	
20.00	14.16	5	C	

- **Tabla 13:** Resultados del test Fisher para la determinación de la concentración de boro consumido del bloque fertilizado.