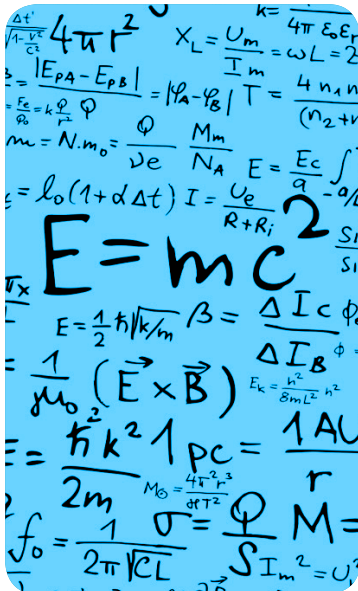
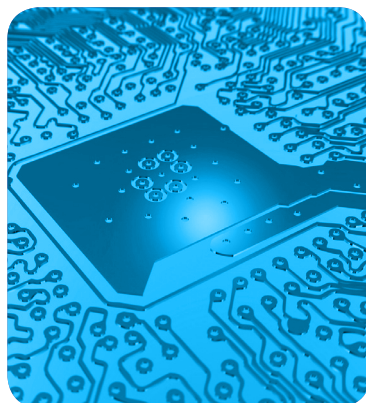
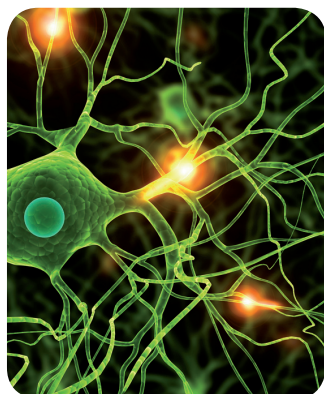




MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /13-14

Máster en Química
Agrícola y Nuevos
Alimentos



Aplicación de distintas dosis de Lignosulfonatos de Zinc marcados isotópicamente a un suelo calizo en un cultivo de judía (*Phaseolus vulgaris* L c.v. Negro Polo). Comparación con quelatos sintéticos.

María Teresa Cieschi



AGRADECIMIENTOS

Hace casi tres años que vivo en Madrid y mucha agua ha pasado bajo el puente. Hace más de tres años que emprendí esta locura, como otras tantas, de cruzar el charco y sinceramente no me arrepiento. Siento que he aprendido mucho y sigo aprendiendo a cada paso y en cada intento.

Si llegué hasta acá y estoy escribiendo estas palabras, es porque hay muchas personas compañeras de camino. Cada una a su modo, a su ritmo, con sus gestos pero todos y todas alentándome y apoyándome.

Desde hace un tiempo el Departamento de Química Agrícola se convirtió en mi familia española y perdón si no pongo todos los nombres pero como en toda familia, hay personas más cercanas que otras. Ante todo quiero agradecer a Juanjo por contestar aquel mail en 2010, ofreciéndome la posibilidad de realizar este trabajo fin de máster. Eso fue un antes y un después para mi vida. Gracias por confiar en mí, por la paciencia con mis argentinadas y por la pasión con la que me transmites lo que sabes.

Otro gracias es para Lourdes por todo el acompañamiento en las buenas y en las malas, por preguntarme cómo estoy donde sea que nos crucemos y estar siempre a la mano.

Obviamente Clara, Virginia y Sheila han puesto mucho de ellas para que este trabajo vea hoy la luz. Gracias no sólo por la ayuda que me han dado con todas las cosas prácticas del día a día cuando la vida apremiaba con otras urgencias y dolores, sino también por los momentos de escucha, de risas, de quejas, de discusiones que hicieron que extrañara un poco menos y me integrara un poco más.

Como representante de todas las amigas y amigos, Javi se lleva las gracias por su compañía sincera, su ternura y su generoso tiempo.

Aunque el charco lo salté, los amores vinieron conmigo, por eso agradezco a mi mamá, a María Rosa, a José Luis y a mis sobrinos porque siempre me acompañan en todo incondicionalmente. Son el lugar del mundo al que siempre puedo regresar, sin preguntas, sin reproches, con cariño y mucho respeto por mis opciones.

Pero sin duda el sentido más hondo de esta página es darle las gracias a Isa, el amor de mi vida. Las cosas no fueron como las soñamos pero las atravesamos lo mejor que pudimos y muchas veces con una sonrisa. Brindo por todo lo que nos atrevimos y crecimos juntas. Gracias por ser la alegría de mis pasos, mi eterna compañera, la certeza que llena mis días de esperanza.

RESUMEN

Actualmente la agricultura busca nuevas tecnologías cuya aplicabilidad no solamente sea eficaz sino a la vez amigable con el medio ambiente. Dada la problemática de la deficiencia de zinc en suelos calcáreos y el coste económico y medioambiental que implica la aplicación de quelatos sintéticos, surgen como propuesta alternativa complejos como los lignosulfonatos de zinc. Es por eso que en este trabajo nos propusimos evaluar la eficacia de los lignosulfonatos de zinc aplicados a un suelo calizo frente a la del ZnEDTA marcado isotópicamente en un cultivo de judía (*Phaseolus vulgaris* c.v. Negro Polo).

Para ello se utilizaron lignosulfonatos de zinc procedentes de maderas de abeto y eucalipto. Se utilizó ^{67}Zn como isótopo trazador que fue determinado por ICP-MS y la aplicación de deconvolución matemática de las abundancias isotópicas permitió discriminar entre el zinc aportado por el fertilizante (Zn_{Fer}) y el zinc procedente de fuentes naturales (Zn_{Nat}).

El tratamiento que más zinc proporcionó a la planta fue el Zn-EDTA debido a que no sólo aportó el Zn_{Fer} sino que por efecto de recarga y/o por un mecanismo de intercambio isotópico suministró Zn_{Nat} del suelo a la planta. Además, el lignosulfonato de eucalipto (LSE) resultó ser el que más eficazmente proporcionó Zn_{Fer} a la planta, movilizándolo hacia las hojas. Es posible que incrementando su dosis se puedan obtener efectos similares a la aplicación con ZnEDTA. En relación a la menor estabilidad de los lignosulfonatos, no se observó ni el efecto de recarga ni el efecto de intercambio isotópico en suelos.

ABSTRACT

Agriculture currently looks for new technologies which applicability is not only be effective but also be friendly with the environment. Lignosulfonates are byproducts from the paper industry and were proposed to replace synthetic chelates as correctors of zinc deficiency in calcareous soils. Synthetic chelates are more expensive than lignosulfonates and can leach into groundwater. So, in this paper, three doses of zinc lignosulfonates were applied to a bean crop (*Phaseolus vulgaris* cv Negro Polo) in calcareous soil to evaluate their effectiveness. Lignosulfonates used were from eucalyptus and spruce wood and were compared with ZnEDTA chelate to evaluate their effectiveness.

^{67}Zn was used as a tracer isotope and samples were analyzed by ICP-MS. After that, isotopic pattern deconvolution was applied to the results and so was possible to discriminate between the zinc from the fertilizer (Zn_{Fer}) and zinc from natural sources (Zn_{Nat}).

Zn-EDTA was the treatment best provide total zinc to plants. This chelate not only supplied Zn_{Fer} but also Zn_{Nat} by charging effect and/or by an isotopic exchange mechanism. In addition, eucalyptus lignosulfonate (LSE) proved to be the most effective to provide Zn_{Fer} to the plant, especially moved it to the leaves. Probably, increasing lignosulfonate dose could achieve similar effects to ZnEDTA applications. No isotopic exchange effect or recharge effect was observed due to lower stability of lignosulfonates.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.	1
1.1 El zinc en el suelo.	1
1.2 El zinc en las plantas.	3
1.3 Deficiencia de zinc.	3
1.4 Corrección de zinc, uso de lignosulfonatos:	4
1.5 Uso de isótopos estables en la evaluación de eficacia de fertilizantes de Zn.	9
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	11
3.1 Propiedades del suelo y la arena.	11
3.2 Preparación de los tratamientos con ^{67}Zn .	12
3.3 Desarrollo del cultivo.	13
3.4 Aplicación de los tratamientos.	15
3.5 Muestreo del material vegetal.	15
3.6 Muestreo del suelo con y sin cultivo.	16
3.7 Procesado de las muestras vegetales.	16
3.8 Determinaciones analíticas.	17
3.9 Procedimiento matemático para el cálculo de las fracciones molares del Zn_{Fer} y Zn_{Nat} .	17
3.10 Tratamiento estadístico de los datos.	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	22
4.1 Efectos sobre el cultivo.	22
4.1.1 Aspecto visual.	22
4.1.2 Peso seco.	24
4.1.3 Índice de clorofila (SPAD)	25
4.1.4 Determinación de Zn total y su distribución en la planta.	26
4.1.5 Contenido de micronutrientes en los tejidos vegetales.	29
4.1.6 Evaluación del antagonismo zinc-fósforo.	31
4.2 Efectos sobre el suelo	32
4.2.1 Determinación de Zn_{Total} y su distribución en el suelo	32
4.2.2 Distribución del Zn_{Fer} .	36
4.2.3 Contenido de micronutrientes en las fracciones del suelo.	39
4.3 Discusión final.	40
5 CONCLUSIONES	42
6 BIBLIOGRAFÍA:	47
Referencias utilizadas en Internet:	50
7 ANEXO	51

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN.

El zinc es uno de los ocho micronutrientes esenciales para el crecimiento saludable y la reproducción de plantas. Es también esencial en animales y seres humanos. Su deficiencia es uno de los problemas más importantes que afronta la producción de alimentos a nivel mundial (Alloway, 2008). De acuerdo con el informe de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2004), la deficiencia de zinc ocupa el 11º puesto en las causas de muerte en la población de los países desarrollados y el 5º en países en vías de desarrollo. En el Consenso de Copenhague del año 2008 (www.copenhaguenconsensus.com), la deficiencia de zinc se identificó como una prioridad mundial junto con la deficiencia de vitamina A. La mitad de las explotaciones agropecuarias mundiales productoras de cereales se cultivan en suelos con cantidades insuficientes de zinc, afectando tanto en las cosechas como en la calidad nutricional del grano recolectado. Esto, a su vez, se traduce en un aumento en problemas nutricionales de la población, especialmente en aquellos países donde estos cultivos son la base de su nutrición. Dietas con contenidos bajos en zinc pueden dar lugar a deficiencias de tipo físico, inmunológico y cerebral, que sólo se remedian con la ingesta de este elemento (Cakmak, 2009).

1.1 El zinc en el suelo.

El contenido total de zinc en un suelo depende en gran medida de la composición geoquímica y de la erosión de la roca madre en la que el suelo se ha desarrollado. Sin embargo, en algunos casos, la contaminación del medio ambiente o la aplicación de materiales agrícolas ricos en zinc (estiércoles, fertilizantes, compost, etc.) pueden enmascarar la contribución de zinc procedente del material original. El intervalo de concentraciones de zinc total en los suelos reportados en la literatura tiende a mostrar una concentración media total de 64 mg Kg^{-1} (Benton Storey, 2007), mientras que el contenido promedio de zinc en la litósfera se estima en 78 mg Kg^{-1} .

La fuente más importante de zinc es la esfalerita y la wurzita (minerales de ZnS). Otros minerales de menor importancia incluyen: smithsonita (ZnCO_3), zincita (ZnO), zincosita (ZnSO_4), franklinita (ZnFe_2O_4) y hopeita ($\text{Zn}_3[\text{PO}_4]_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Wedepohl, 1978).

La cantidad de zinc disponible para las plantas corresponde a las fracciones soluble e intercambiable (Álvarez et al, 2010). Kabata-Pendias y Pendias (1992), han estimado la concentración de Zn en la solución del suelo entre 4 y $270 \mu\text{g L}^{-1}$.

El zinc en el suelo se presenta en las siguientes formas:

- Iones libres (Zn^{2+} y ZnOH^+) y complejados orgánicamente en solución.
- Zinc intercambiable adsorbido sobre la superficie de la fracción coloidal en el suelo, comprendiendo: arcillas, sustancias húmicas y óxidos hidratados de hierro y aluminio.

- Minerales secundarios y complejos insolubles en la fase sólida del suelo.

La distribución de Zn entre estas formas se encuentra gobernada por las constantes de equilibrio de las correspondientes reacciones en las cuales se encuentra involucrado el zinc. Las reacciones son:

- Precipitación y disolución.
- Complejación y descomplejación.
- Adsorción y desorción.

Barber (1995); puso de manifiesto que los factores que más afectan a la disponibilidad de este elemento para los cultivos son:

- El contenido total de zinc.
- El pH: en general la disponibilidad de zinc decrece al aumentar el pH del suelo, debido a una menor solubilidad de los minerales de zinc y al incremento de la adsorción del metal en los coloides con carga negativa del suelo.
- El contenido de materia orgánica: la materia orgánica añadida a los suelos puede aumentar la solubilidad del zinc debido a la formación de complejos solubles que lo movilizan. De igual manera, suelos con alto contenido de materia orgánica muy evolucionada pueden disminuir la disponibilidad del elemento por la formación de complejos de alta estabilidad, inmovilizando el zinc y disminuyendo su disponibilidad.
- Antagonismo zinc-fósforo: Es uno de los índices más conocidos en la química del suelo y está basado en reacciones entre ambos elementos en la rizosfera. Lindsay (1979) considera que en algunos suelos es el fósforo el que controla la solubilidad del zinc, debido a que el fósforo es un componente mayoritario en el suelo. Por lo tanto, la disponibilidad del zinc en el suelo se verá reducida por un aporte excesivo de fósforo. Además, la adición de fósforo en exceso se asocia con la reducción del crecimiento de las raíces y de la simbiosis con micorrizas, influyendo ambos factores negativamente en la absorción de zinc (Marschner, 2012).
- Otras interacciones que pueden afectar a la disponibilidad del zinc, son las del zinc con hierro y manganeso bajo condiciones muy reductoras dado que los iones Fe^{2+} y Mn^{2+} quedan liberados a la solución del suelo a partir de los hidróxidos que los constituyen y compiten con el Zn^{2+} por los sitios de absorción en las raíces. Además, cuando el cobre se encuentra presente en altas concentraciones en la solución del suelo también compite con el zinc por los mismos sitios de absorción en la raíz. Cuando el nitrógeno es aplicado como nitrato de amonio o sulfato de amonio, acidifica el suelo provocando la desorción del zinc y aumentando la disponibilidad del mismo.

1.2 El zinc en las plantas.

El zinc es considerado como un micronutriente esencial para las plantas desde 1932 (Benton Storey, 2007). Es un catión de movilidad intermedia y es absorbido por la planta como Zn^{2+} principalmente por la raíz, aunque existe cierta controversia acerca del mecanismo de transporte utilizado. El Zn^{2+} es tomado por las raíces e ingresa al xilema vía apoplasto y simplasto. Se han detectado altos niveles de Zn^{2+} en el floema, demostrando que este elemento es transportado tanto por xilema como por floema (Tsonev and Lidon, 2012). A pH elevado, puede ser absorbido como catión monovalente ZnOH^+ (Marschner, 2012).

Dentro de la planta el zinc se encuentra como Zn (II). Se acumula principalmente en los tejidos de las raíces debido a su relativa baja movilidad pero es transportado a las hojas cuando es necesario, además puede ser parcialmente transportado desde las hojas viejas a las jóvenes (Marschner, 2012). El contenido en planta varía según la especie y la edad de la planta, siendo mayor en las plantas jóvenes que las adultas, aunque normalmente oscila entre 20 y 100 mg Kg^{-1} en peso seco (Navarro y Navarro, 2003). En plantas de judía la toxicidad de zinc inhibe varios pasos de la fotosíntesis y a través de diferentes mecanismos. Los niveles críticos de toxicidad en hoja van de 100 a 300 mg Kg^{-1} en peso seco, siendo este último valor el más típico (Marschner, 2012).

Las funciones metabólicas del zinc están relacionadas con la tendencia de este elemento a formar complejos tetraédricos con ligandos que presentan grupos donadores de nitrógeno, oxígeno y en particular, con el azufre (Marschner, 2012). El zinc participa en el metabolismo de dos formas: como constituyente de enzimas ó como catalizador de reacciones metabólicas.

Algunas de las funciones fisiológicas en las que participa son:

- Metabolismo de carbohidratos y proteínas.
- Mantenimiento de la integridad de las membranas.
- Síntesis de auxinas (responsables del crecimiento de las plantas).

1.3 Deficiencia de zinc.

La deficiencia de zinc se asocia principalmente a aquellas plantas cultivadas en suelos de tipo calcáreo, donde el pH elevado y la presencia de caliza activa produce la insolubilidad del Zn^{2+} debido a la precipitación de $\text{Zn}(\text{OH})_2$, ZnCO_3 o la formación de ferritas y fosfatos de zinc.

La deficiencia de zinc también se puede manifestar en suelos ácidos muy degradados o lixiviados ya que en ellos el zinc se encuentra en forma soluble y puede perderse por lavado (Marschner, 2012). Además, la deficiencia de zinc también puede deberse a altos niveles de fosfatos en el suelo. Aunque el mecanismo de este antagonismo no está completamente claro, se sabe que afecta tanto a la absorción de

zinc por las raíces quedando precipitado sobre ellas, como a la traslocación del zinc en la planta, ya que a altas concentraciones de fósforo, el zinc precipita en el xilema o el floema (Alloway, 2008).

La deficiencia de zinc afecta a un gran número de cultivos, siendo especialmente importante en cultivos como el maíz (Martín Ortiz et al, 2009), la soja, y los árboles frutales (Escobar, 2007). Con respecto a la judía (*Phaseolus vulgaris* L.), el cultivo ha demostrado ser sensible a la deficiencia de zinc, observándose no sólo una disminución en la cosecha sino también en el contenido de zinc en las semillas y retrasando la madurez del cultivo (Armour et al, 1990; Álvarez et al, 2010).

Adriano (2001) estableció el nivel crítico de zinc para la judía entre 17 y 20 mg Kg⁻¹ en hoja joven completamente desarrollada.

Ratto y Miguez (2006) recomiendan que el contenido de zinc disponible en el suelo sea superior a 0,5 mg Kg⁻¹ de suelo seco para una adecuada nutrición.

Brown and Legget (1967), definieron los síntomas concretos de la deficiencia de zinc en judía. Éstos suelen aparecer en el segundo piso de hojas trifoliadas, volviéndose las mismas de color verde claro y moteado. Además, las hojas pueden aparecer deformes, pequeñas y arrugadas (Marschner, 2012). A medida que la deficiencia progresa, la zona intervenal se vuelve de color amarillo al igual que en la zona cerca de la punta y los bordes exteriores de las hojas. En caso de deficiencia severa, aparecen síntomas en las hojas más viejas que se vuelven de color gris o marrón y mueren. Por lo tanto, para diagnosticar la deficiencia de zinc es más útil observar los tejidos jóvenes de las plantas (Armour et al, 1990). Por otro lado, el crecimiento de la planta se ve reducido, debido a un acortamiento de los entrenudos ya que la deficiencia de zinc afecta a la síntesis de triptófano, precursor de la hormona de crecimiento, la auxina (Marschner, 2012). En general, la deficiencia de zinc retrasa la madurez de la cosecha y disminuye su rendimiento. Es importante señalar que todas las plantas deficientes en zinc presentan en sus hojas altos contenidos de hierro, manganeso, nitratos, fosfatos y bajos contenidos de almidón (Navarro y Navarro, 2003).

1.4 Corrección de zinc, uso de lignosulfonatos:

Los productos generalmente empleados en corrección de carencias de zinc de los cultivos son sales inorgánicas como por ejemplo el ZnSO₄ y quelatos sintéticos como el ZnEDTA. Las sales inorgánicas, tienen el inconveniente de no ser eficaces en suelos alcalinos, donde el zinc queda poco disponible para los cultivos ya que precipita formando sales insolubles. Los quelatos sintéticos presentan una gran estabilidad y mayor eficacia como fertilizantes de zinc (Broadley et al, 2007), siendo capaces de mantener el Zn²⁺ en disolución en un intervalo de pH entre 6,5 y 7,5 (Cadahía et al, 2005) debido a que permiten que el ión metálico quede salvaguardado del entorno

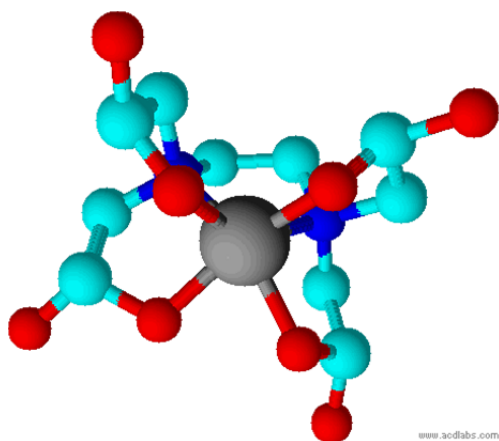


Figura 1: Estructura química del Zn-EDTA

que favorecería su precipitación en forma de hidróxido insoluble y no disponible para la planta (Lucena, 2009). Su elevado coste hace que solo se empleen en cultivos de alto valor añadido. Otro problema de estos productos, como por ejemplo el Zn-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, ver figura 1), es que su alta estabilidad puede contribuir al movimiento del zinc y otros metales a través del perfil del suelo, aumentando la probabilidad de que puedan ser lixiviados a acuíferos

subterráneos, produciendo la contaminación de los mismos. En aguas subterráneas suizas se encontraron concentraciones de EDTA entre 0,1 y 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Bucheli-Witschel and Egli, 2000).

La eficacia de un quelato depende de su reactividad en el medio en que se aplique y de la capacidad de la planta en tomar el elemento aportado. Las aplicaciones foliares de quelatos son en general poco efectivas y no se ha descrito una relación clara entre la composición química del quelato y su efectividad.

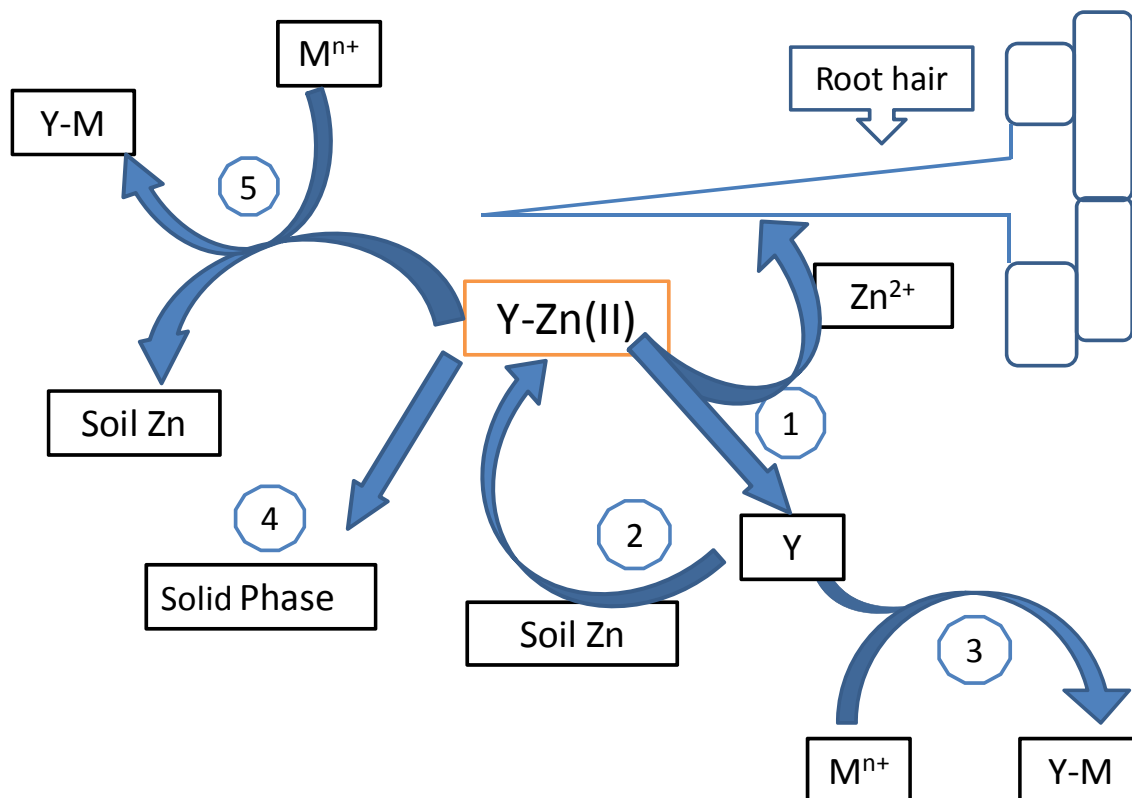


Figura 2: Representación gráfica de las reacciones de un quelato de zinc en el suelo (Modificado de Gárate y Lucena 2010)

En la Figura 2 se representa gráficamente las reacciones que se producen al aplicar un quelato de zinc. Una vez adicionado el quelato al suelo, se libera el agente quelante y el Zn^{2+} , que es absorbido por las raíces (1). Luego el agente quelante puede tomar Zn nativo, quelarlo y por difusión llevarlo a la raíz donde se reiniciaría el proceso (2). Esto se conoce como el efecto de recarga. Además, el agente quelante puede quelar otros cationes presentes en el suelo como Ca^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} (3) o puede quedarse retenido en la estructura del suelo (4). También puede reaccionar con las superficies de intercambio extrayendo más Zn nativo. Los procesos 3 y 5 pueden ser estudiados con modelos teóricos de especiación (Lindsay, 1979) mientras que otros procesos más complejos (4 y 2) en suelos son más convenientemente evaluados mediante estudios de interacción de quelatos con suelos o materiales del suelo (García-Mina et al, 2003). Para la absorción vegetal (1) se requiere de experimentos vegetales en hidroponía y suelo.

Actualmente, se están planteando nuevas vías para la corrección de deficiencias de zinc que respondan también a la necesidad de una agricultura respetuosa con el medioambiente. Una de ellas es el uso de agentes complejantes orgánicos naturales, basados en subproductos de diferentes industrias, con baja estabilidad pero también con menor movilidad y riesgo de contaminación que los quelatos.

Los complejos son moléculas formadas por un ión metálico, aceptor de electrones y por una sustancia orgánica o inorgánica capaz de compartir electrones con el metal. La diferencia entre un quelato y un complejo reside en la estabilidad de los compuestos formados, derivado de la geometría de sus enlaces y en su origen, siendo la estabilidad del quelato superior a la del complejo.

La utilización de estos compuestos proporciona productos biodegradables que solucionan los problemas de carencias nutricionales en los cultivos y permiten una reutilización de residuos en las empresas productoras. Además, estos agentes complejantes son más baratos que los quelatos sintéticos con lo que la corrección de una posible carencia sería viable en cultivos extensivos. De este modo, las ventajas que aportaría la aplicación de estos complejos como fertilizantes de zinc serían de bajo costo y bajo impacto ambiental (Martín-Ortiz et al, 2009).

La eficacia de un complejo para corregir la deficiencia de zinc dependerá de su capacidad de complejación y de la capacidad de la planta para tomar dicho zinc. A su vez, también dependerá del tipo de aplicación del fertilizante (suelo, foliar o fertirrigación).

Respecto a la capacidad de complejación, Villén et al (2007) propusieron y desarrollaron un método basado en la precipitación del elemento no complejado a pH 9 que se puede utilizar como índice de la cantidad de micronutriente complejado en los productos comerciales. El desarrollo del método ha permitido incluir en la legislación española de Fertilizantes, por primera vez, una serie de agentes

complejantes como correctores de carencias de micronutrientes aplicados en forma foliar y por fertirrigación (Real Decreto 824/2005). Además ha sido adoptado por el Comité Europeo de Normalización como norma Europea (EN: 15962).

Entre los distintos complejantes presentes en el mercado se encuentran los lignosulfonatos, los cuales son definidos como polímeros aniónicos de alto peso molecular que se obtienen principalmente como subproductos en la separación de la celulosa y la lignina de la madera, en la industria papelera (Ekeberg et al, 2006). Sólo en Canadá se producen 200.000 millones de toneladas anuales de este subproducto, del cual en su mayoría regresa sin tratar al medioambiente (Singh et al, 1986).

Los lignosulfonatos se obtienen empleando bisulfito sódico para promover la separación de la lignina de las fibras celulósicas y la sulfonación de las moléculas de la lignina generando ácidos lignosulfónicos más hidrofílicos y con nuevos grupos fenólicos (Lucena, 2009). Por lo tanto, su fórmula química está basada en una estructura de fenil-propano, compuesta por tres unidades estructurales básicas: guayacil propano, siringil propano y *p*-hidroxifenil propano. (Zhor et al, 2005), es decir, poseen una amplia variedad de grupos funcionales en su composición, entre ellos: grupos sulfónicos, fenólicos, carboxílicos e hidroxílicos (Ma y Pawlik, 2007). La cantidad de estos grupos funcionales depende de la madera de origen y del procedimiento utilizado para obtener la pulpa del papel, así como del procesamiento posterior del licor negro (residuo generado durante el proceso de cocción química de la madera, para la obtención de pulpa de celulosa, compuesto de sulfuro de sodio, sosa, ligninas y hemicelulosas). De estos grupos, son los grupos sulfónicos los que dotan al lignosulfonato de una elevada solubilidad en agua, variando el grado de sulfonación entre 0,4 – 0,7 grupos sulfato por unidad de fenil propano (Ekeberg et al, 2006). En la Figura 3 se expone la estructura química de una unidad de lignosulfonato de sodio (Nº CAS 8061-51-6) perteneciente a la página de la Compañía Sigma – Aldrich (www.sigmaaldrich.com).

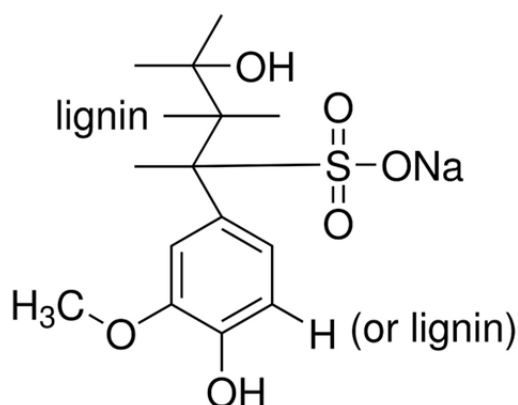


Figura 3: Estructura de una unidad de lignosulfonato de sodio

Cuando los lignosulfonatos están disueltos, se distribuyen de forma esférica y con carga negativa (Xie et al, 1994), siendo esta característica la que otorga a las moléculas

de lignosulfonato la capacidad de complejar metales en su estructura, aumentando la disponibilidad de éstos para las plantas y es por esto que son utilizadas como correctores de carencias de micronutrientes (Alkanani y MacKenzie, 1996). Se encuentran disponibles comercialmente como sales de amonio, calcio, sodio o potasio (Ma y Pawlik, 2007).

Con respecto a la estabilidad de los lignosulfonatos en la disolución del suelo, Villén et al (2007) observaron que los lignosulfonatos de Zn eran más estables que los de Fe, incluso hasta pH 9. El contenido de Zn en la disolución del suelo a pH superior a 7,5 es del 90 al 100%, mientras a pH 9 es del 80%. En la figura 4 se presenta el porcentaje de Zn que permanece en disolución respecto al pH para varios complejos.

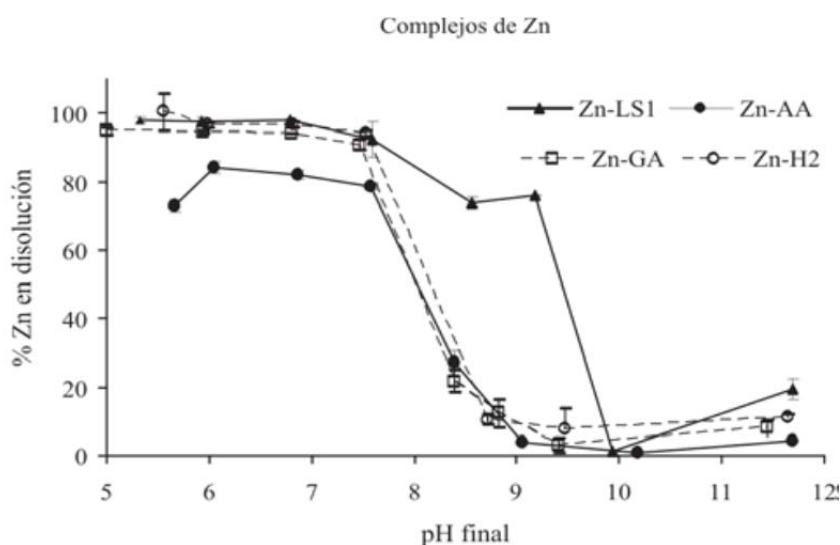


Figura 4: Efecto del pH final en el porcentaje de Zn que permanece en disolución respecto la cantidad de elemento añadida con los complejos comerciales a los 3 días de interacción en disolución. LS: Lignosulfonato, AA: aminoácidos, GA: ácido glucónico. H2: Humato de Zn. Datos de Villén et al (2007).

Debido a esta elevada estabilidad a altos pH su uso es recomendable en sistemas acuosos como hidroponía y aplicación foliar, como es el caso de Villén et al (2007) donde la aplicación foliar de lignosulfonatos de Zn posibilitaron la recuperación de plantas de pepino deficientes cultivadas en hidroponía.

Existen algunos estudios donde se evalúa la efectividad de los lignosulfonatos de zinc como fuentes del elemento en aplicaciones a distintos tipos de suelos (Álvarez et al, 1996, 2001, 2003, 2007 y 2009; Rico et al, 1996; Goos et al, 2000; Gangloff et al, 2006; Martín-Ortiz et al, 2009 y 2010). En suelos ácidos, los lignosulfonatos de zinc producen un aumento de zinc en maíz con respecto al tratamiento control y presentan una efectividad similar a los quelatos de zinc (López-Valdivia et al, 2002). Álvarez et al, (1996) estudiaron la movilidad relativa del lignosulfonato de Zn y Zn-EDTA en suelos calizos. Observaron que para el lignosulfonato de Zn se producía una baja migración del producto, mientras que el ZnEDTA migraba a lo largo de la columna, perdiéndose alrededor del 50% del zinc por lixiviación, lo cual fue corroborado por Martín-Ortiz et al (2009). No obstante ha de tenerse en cuenta que con la aplicación directa del zinc

sobre el suelo, pueden ocasionarse pérdidas debidas a su adsorción sobre la superficie del suelo y también por un paso del zinc a formas más estables, disminuyéndose así la cantidad de zinc en la fracción soluble (Benedicto et al, 2009; Álvarez et al, 2009). Además, se debe considerar que la movilidad del fertilizante de Zn en el perfil del suelo depende del tipo de las características del fertilizante y del suelo (Álvarez et al, 2007).

En ensayos de campo con cultivos extensivos se han encontrado muy buena respuesta a la incorporación de complejos de lignosulfonato de Zn a los fertilizantes NPK para evitar la reducción de producción que implica la baja disponibilidad de este elemento en el suelo (Martín-Ortiz et al 2009). En ensayos con adición de bajas concentraciones de lignosulfonatos de zinc en suelo para un cultivo de judía se observó que la eficacia de los complejos bajo condiciones calcáreas era baja pero se sugirió que la misma se podría mejorar incrementando las dosis y frecuencias de aplicación (Santos, 2011).

1.5 Uso de isótopos estables en la evaluación de eficacia de fertilizantes de Zn.

Los ensayos tradicionales de fertilizantes no son eficientes a la hora de distinguir entre el zinc aplicado con el fertilizante y el zinc natural que proviene de las semillas e incluso del suelo. El ^{67}Zn se emplea en la actualidad como herramienta para evaluar la absorción y translocación del zinc en la planta. La incorporación de un isótopo trazador de zinc permite un conocimiento detallado del consumo, transporte y acumulación del elemento en las plantas. El uso de un isótopo estable en la naturaleza, como el ^{67}Zn , cuya abundancia en la naturaleza es del 4,1%, proporciona una alta flexibilidad en los diseños experimentales porque no se requiere de medidas de seguridad especiales ni de personal capacitado, a diferencia de un radioisótopo donde además se generarían desechos radioactivos. Además, la alta precisión y los bajos límites de detección que se alcanzan con la espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado por inducción (ICP-MS) permiten detectar diferencias que con las técnicas analíticas tradicionales no serían observables (Benedicto et al, 2011). A fin de diferenciar y cuantificar el aporte de las diferentes fuentes de Zn a la nutrición del cultivo se utiliza la deconvolución matemática de las abundancias isotópicas como herramienta de cálculo.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.

La deficiencia de zinc en los suelos calizos es una problemática ampliamente difundida y caracterizada. Constituye una importante preocupación a nivel mundial, dado que los cultivos que crecen bajo estas condiciones, tienen menor productividad y carecen del valor nutricional adecuado para la alimentación, lo cual deriva en graves consecuencias para la salud y el desarrollo poblacional.

Una de las formas más eficaces de combatir la deficiencia de zinc, principalmente cuando está inmovilizado en suelos calizos, es adicionando quelatos sintéticos al suelo. El alto costo de estos productos para cultivos extensivos y la posibilidad de su lixiviación hacia aguas subterráneas hacen que se busquen nuevas alternativas más económicas y amigables con el medio ambiente. Desde hace años los lignosulfonatos se utilizan como correctores de deficiencia de zinc con demostrada eficiencia, pero bajo aplicación foliar.

Es por eso que en este trabajo nos propusimos:

- Evaluar la eficacia de dos tipos de lignosulfonatos de zinc aplicados a un suelo calizo en un cultivo de judía (*Phaseolus vulgaris* c.v. Negro Polo).
- Comparar la eficiencia de los lignosulfonatos de zinc respecto del Zn-EDTA.
- Evaluar la distribución del Zn procedente del fertilizante y el Zn procedente de fuentes naturales, en la planta y las fracciones disponible y soluble del suelo.

Para ello se utilizaron lignosulfonatos procedentes de maderas de abeto y eucalipto que fueron complejados con ^{67}Zn y añadidos a suelos cultivados y sin cultivar en condiciones controladas. Las muestras obtenidas de suelo y planta después de 21 días de aplicados los tratamientos, se analizaron por ICP-MS y a los resultados se les aplicó deconvolución matemática de las abundancias isotópicas con el objetivo de diferenciar el contenido de Zn_{Fer} y Z_{Nat} .

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo con un cultivo de judía (*Phaseolous vulgaris* L c.v. Negra polo) en cámara de cultivo durante 36 días a partir de la germinación de las semillas. Las plantas se cultivaron en tiestos con una mezcla de suelo y arena caliza en una relación 70:30 a fin de conferirle al suelo una mejor aireación y facilitar el drenaje. Se colocó una planta por tiesto y se realizó un único muestreo 21 días después de la aplicación de los tratamientos. Además, se colocaron tiestos con idéntica mezcla de suelo y arena pero sin planta. La cámara de cultivo utilizada es Dicometal, modelo CCKF 0/16985 con función fotoperiodo. Durante el ensayo el ciclo de cultivo utilizado fue: 16 horas de día a 28 °C y 40% de humedad, y 8 horas de noche a 20 °C y 60% de humedad.

3.1 Propiedades del suelo y la arena.

Se utilizó suelo de tipo calcáreo y uso agrícola, procedente de Picassent, Valencia (39º 21' 41.28" N, 0º 27' 42.58" W), previamente secado al aire y tamizado a 2mm. Su clasificación taxonómica corresponde a un suelo *Inceptisol Xerept*. Su caracterización fisicoquímica se presenta a continuación en la Tabla 1. El contenido en Zn disponible es medio, dado que es superior a su nivel crítico de 0,5 mg·Kg⁻¹ cuando se utiliza como extractante DTPA (Ratto y Miguez, 2006).

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas del suelo

PROPIEDAD	SUELO	PROPIEDAD	SUELO
Arena (g·Kg ⁻¹)	435	Macronutrientes (NH₄Ac, g·Kg⁻¹)	
Limo (g·Kg ⁻¹)	80	Ca	4,10
Arcilla	485	Mg	1,41
Textura	Arcillo arenosa	K	0,19
pH (H ₂ O, pasta sat.)	7,52	Na	0,03
pH (KCl, pasta sat.)	7,40	P (Olsen)	14,60
C.E. (extracto 1:5) (dS/m)	1,92	Micronutrientes (Soltanpour y Schwab (1977), g·Kg⁻¹)	
M. O. oxidada (%)	1,08	Fe	5,26
N Kjeldahl (g·Kg ⁻¹)	0,30	Mn	4,52
C/N	30,7	Cu	1,07
CaCO ₃ total (g·Kg ⁻¹)	380	Zn	3,00
Caliza activa (g·Kg ⁻¹)	89		

La arena caliza utilizada para el ensayo fue proporcionada por el molino “Mármoles Triturados S. L.” y su tamaño de grano se encuentra entre 2 y 4 mm. En la Tabla 2 se puede observar su caracterización fisicoquímica.

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de la arena	
PROPIEDAD	(g·Kg ⁻¹)
CaCO ₃	975
SiO ₂	11
Al ₂ O ₃	1,8
MgCO ₃	11,5
Fe ₂ O ₃	0,55
Densidad	2,60
(CaO)	548,2

3.2 Preparación de los tratamientos con ⁶⁷Zn.

Todos los tratamientos se prepararon con ⁶⁷ZnNO₃ (26,98 mM) obtenido a partir de la disolución de ⁶⁷Zn en virutas suministrado por Isoflex (riqueza 89.6%).

Los lignosulfonatos se prepararon añadiendo la cantidad necesaria de disolución de ⁶⁷ZnNO₃ y la cantidad de lignosulfonato necesaria para complejar el ⁶⁷Zn, la cual se calculó a partir de su máxima capacidad complejante. Se preparó una disolución de cada lignosulfonato de zinc de concentración 420 µM. Para asegurarnos que la complejación del ⁶⁷Zn fuese completa, se adicionó un exceso del 10% de cada lignosulfonato. El pH de estos tratamientos se ajustó a 6,0 con KOH 0,1 M utilizando un medidor de pH Orion dual star pH/ISE Benchtop Thermo Scientific. Las soluciones se dejaron reposar una noche en la oscuridad y se filtraron al día siguiente mediante un filtro de membrana Millipore 0,45 µm para eliminar impurezas. Cada solución se llevó a 500 ml. En la aplicación de los tratamientos se tomó los volúmenes necesarios de estas disoluciones para obtener una concentración final de 1,5, 2,3 y 4,6 µmol ⁶⁷Zn por tiesto.

La solución de ⁶⁷ZnEDTA 420 µM se preparó disolviendo Na₂EDTA (Tritiplex III, Merk) y se adicionó la cantidad necesaria de disolución de ⁶⁷ZnNO₃ y un exceso del 10% sobre la cantidad del ligando a fin de garantizar la quelación completa del ⁶⁷Zn. La reacción se efectúa mol a mol. Se preparó una disolución de la cual se tomó el volumen correspondiente a fin de obtener una concentración final de 2,3 µmoles ⁶⁷Zn por tiesto. El pH de este tratamiento se ajustó a 6,0 con KOH 0,1 M. La solución se dejó reposar una noche en la oscuridad y se filtró al día siguiente mediante un filtro de membrana Millipore 0,45 µm para eliminar impurezas. La solución se llevó finalmente a 50 ml. En la aplicación de los tratamientos se tomó el volumen necesario de esta disolución para obtener una concentración final de 2,3 µmoles ⁶⁷Zn por tiesto.

En la Tabla 3 se detallan las características químicas de los lignosulfonatos de abeto y eucalipto utilizados en el ensayo. La capacidad complejante de los lignosulfonatos fue determinada por Benedicto et al (2011) y comprende la cantidad máxima de Zn que un lignosulfonato es capaz de mantener en solución a pH 9.

Tabla 3: Características químicas de los lignosulfonatos utilizados en el ensayo.		
	Abeto (LSA)	Eucalipto (LSE)
Peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	25.732	6.275
Contenido LS ($\text{gLS}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{ms}$)	83,5	58,7
Capacidad Complejante ($\text{gZn}\cdot 100\text{g}^{-1}\text{LS}$)	16,2	20,6
pH	3,6	4,3
S orgánico ($\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	55	51
Alcoholes fenólicos ($\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	19	19
Ácidos orgánicos ($\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	26	35

3.3 Desarrollo del cultivo.

Se desinfectaron e hidrataron 250 semillas de judía en una dilución de 1/100 de hipoclorito de sodio 0,5M en agua destilada con agitación, durante 30 minutos, cambiando esta solución cada 10 minutos y realizando el último lavado sólo con agua destilada a fin de retirar el hipoclorito de sodio residual.

Se colocaron las semillas en forma uniforme en bandejas de germinación cubiertas en su base con papel de filtro humedecido con agua destilada. Se pusieron a germinar las semillas durante 3 días en la cámara de cultivo a 28°C y 60% de humedad relativa, en oscuridad.

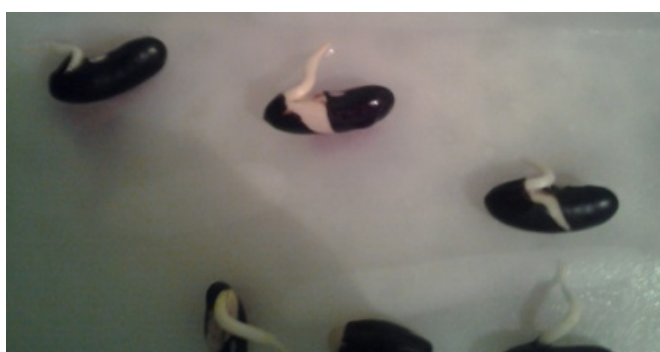


Figura 5: Germinación de semillas de judía.

Las plántulas homogéneas se pasaron a bandejas de 5 litros de disolución nutritiva diluida 1/5 durante 3 días y luego, se cambió a solución nutritiva normal durante 3 días. A fin de garantizar la deficiencia de zinc, se preparó la solución nutritiva con la siguiente composición: 0,8 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,9 mM KNO_3 ; 0,2 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$; 0,1 mM KH_2PO_4 ; 50 μM FeHBED; 1 μM MnSO_4 ; 0,5 μM CuSO_4 ; 0,1 μM NiCl_2 ; 0,1 μM CoSO_4 y

105,5 μM Na_2EDTA para tamponar la actividad de los micronutrientes y asegurar la limpieza de las raíces para los subsiguientes procesos. Se agregó 0,1 g L^{-1} de CaCO_3 a cada bandeja para simular condiciones de suelo calizo.



Figura 6: Plántulas en hidroponía.

Al cabo de ese tiempo se trasplantaron 40 plántulas (5 por cada tratamiento) a tiestos de 600 g de mezcla 70% de suelo y 30% de arena caliza, con un contenido hídrico del 80% de su capacidad de saturación. Se procuró una distribución al azar de los tiestos dentro de la cámara de cultivo (Figura 7). Los tiestos eran de metacrilato transparente, por lo cual se cubrieron las paredes con papel de aluminio a fin de evitar que el paso de la luz al sustrato propicie el desarrollo de algas y la posible fotodegradación del quelato de hierro utilizado en la composición de la solución nutritiva. También se colocaron 16 tiestos (2 por cada tratamiento) sin cultivo que tuvieron igual manejo que los tiestos con cultivo.



Figura 7: Disposición de los tiestos cultivados y sin cultivar dentro de la cámara de cultivo.

A partir del trasplante, las plantas se regaron día por medio alternativamente con disolución nutritiva de macronutrientes cuya composición fue la siguiente: 0,8 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,9 mM KNO_3 ; 0,2 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$; 0,1 mM KH_2PO_4 y con disolución nutritiva que contenía además de macronutrientes, los micronutrientes necesarios para cubrir las necesidades de las plantas excepto Zn: 50 μM FeHBED; 1 μM MnSO_4 ; 0,5 μM CuSO_4 ; 0,1 μM NiCl_2 ; 0,1 μM CoSO_4 . A ambas disoluciones se les añadió 0,1 g L^{-1} de CaCO_3 de modo que el pH de las disoluciones se mantuviera en torno a pH 7,5. En todo momento se procuró evitar durante el riego la posible lixiviación en los tiestos, calculando diariamente por pesada, el volumen de agua consumida entre riegos para su reposición.

3.4 Aplicación de los tratamientos

Seis días después del trasplante (15 días desde la germinación) se suministraron los diferentes tratamientos, realizándose en una única aplicación puntual, de forma que la concentración final fuese de 1,5; 2,3 y 4,6 μmol ^{67}Zn por tiesto. Cada tratamiento fue aplicado a 7 tiestos, 5 de ellos con planta y 2 sin planta. Los tratamientos empleados fueron los siguientes: $^{67}\text{ZnEDTA}$ (sólo a la dosis de 2,3 μmol ^{67}Zn), $^{67}\text{Zn-LSA}$ (Lignosulfonato de Abeto con dosis de 1,5, 2,3 y 4,6 μmol ^{67}Zn por tiesto), $^{67}\text{Zn-LSE}$, (Lignosulfonato de Eucaliptus con dosis de 1,5, 2,3 y 4,6 μmol ^{67}Zn por tiesto), y control, al que no se aplicó fuente exógena de zinc.

3.5 Muestreo del material vegetal.

A los 21 días de aplicados los tratamientos, se tomaron los tiestos con cultivo y se muestreó en primer término la parte aérea de la planta, es decir, hojas y tallos. Posteriormente, tal y como se explica en el apartado siguiente, se extrajeron las raíces del suelo. Hojas, tallos y raíces se pesaron por separado para obtener el peso fresco. Luego se procedió a lavar hojas, tallos y raíces por separado en el siguiente orden: 1) con Tween 80 al 0,1% en solución 0,1 M HCl (Álvarez-Fernández et al, 2001); 2) con agua de grifo; 3) con agua destilada. Concluida la fase de lavado, las muestras se colocaron en una estufa a 65°C hasta peso seco constante.

3.6 Muestreo del suelo con y sin cultivo.

En el muestreo se obtuvieron las fracciones solubles y disponibles del suelo. Para ello todo el suelo de cada tiesto se mezcló con 600 ml de agua destilada, lo que permitió la extracción de las raíces. Posteriormente se agitó en botes de polietileno de 1L, en agitador de volteo a 90 rpm durante 10 minutos. Una alícuota de 40 ml de esta mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm en una centrífuga Rotofix 32 Hettich utilizando tubos Falcon para centrífuga de 50 ml de capacidad. El sobrenadante fue filtrado mediante un filtro rápido Filter Lab 1238, 20-25 μm y a continuación se volvió a filtrar mediante un filtro de membrana Millipore 0,45 μm . Se separaron 20 ml de dicho extracto a los que se añadió HNO_3 al 65% (Suprapur, Merk) de modo que la muestra tuviera una matriz ácida del 1% para su análisis por Absorción Atómica (Zn total) e ICP-Masas (isótopos).

El residuo sólido obtenido tras el proceso anterior se sometió a un segundo proceso de extracción siguiendo una modificación del método de Soltanpour y Schwab (1977) para la extracción de la fracción disponible del suelo. La composición del reactivo utilizado fue DTPA 0,005 M y NH_4HCO_3 1M, NH_4OH 1:1 (ABA- DTPA), ajustado a pH= 7.6 con HNO_3 al 65%. A cada tubo con el residuo sólido se le añadió 25 ml del reactivo preparado y se agitó mecánicamente a 180 rpm en un agitador orbital Rotabit P-Selecta, durante 10 minutos. Luego se llevaron los tubos a centrífuga durante 5 minutos a 6000 rpm. Este procedimiento se realizó tres veces consecutivas, tomando cada vez el sobrenadante, filtrándolo con filtro rápido Filter Lab 20-25 μm y juntando los distintos filtrados. Para neutralizar el HCO_3^- presente en el reactivo y para que las muestras tuviesen una matriz ácida del 1%, a cada tubo se agregó 7,165 ml de HNO_3 al 65%. Cada una de las muestras se llevó a 100 ml con agua destilada y luego se traspasó a dos tubos Falcon de 50 ml, los cuales se guardaron en nevera para posteriores análisis.

3.7 Procesado de las muestras vegetales.

Una vez que las muestras vegetales se secaron y pesaron, se procedió a molerlas utilizando un molino de titanio Retsch ZM 200 con tamiz de 2mm.

Posteriormente se procesó a su mineralización para lo cual se introdujo 0,1 g de material vegetal en tubos de digestión a los cuales se les agregó 7 ml de HNO_3 al 65%, 4 ml de H_2O_2 al 30% y una gota de HF al 40%. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad Suprapur (Merck). A fin de mineralizar los distintos tejidos vegetales, se utilizó un microondas CEM Corporation MARS 240/50. El programa de mineralización consta de un ascenso rápido de temperatura hasta 220°C, donde permanece por 40 minutos. Una vez enfriados los tubos, el contenido de los mismos se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se llevó a volumen con agua destilada MiliQ. Los tubos Falcon se pesaron con tapa antes de ser utilizados y después de ser llevados a volumen a fin de conocer

el volumen exacto del digerido obtenido. Las muestras se guardaron en nevera para su posterior análisis.

3.8 Determinaciones analíticas.

Las determinaciones analíticas que se realizaron a las muestras de suelo (fracción soluble y disponible) y a las muestras de tejido vegetal digerido fueron las siguientes: Fe, Mn, Cu y Zn total por Absorción Atómica mediante un equipo Perkin Elmer AAnalyst 800 y los isótopos ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn y ^{68}Zn por ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo) mediante un equipo Perkin Elmer Sciex Elan 6000 con autosampler AS 91. Se siguió el mismo proceso de calibración y eliminación de interferencias para las mediciones que utilizaron Benedicto et al (2011).

El fósforo se determinó por colorimetría, únicamente en las muestras de tejido vegetal digerido. El método utilizado se basa en la formación del cromóforo azul de fosfo-molibdato (Valenzuela et al, 1993). Se tomaron 5 ml de cada uno de los digeridos, a los que se agregó 8 ml de reactivo colorimétrico (disolución 0,03M de ácido ascórbico en 200 ml de una solución 0,005M de molibdato amónico, 0,0004M de tartrato de potasio y antimonio y 1L de H_2SO_4 2,5M enrasado a 2L con agua MilliQ). La medida de la absorbancia se realizó a 700 nm de longitud de onda, utilizando un espectrofotómetro SHIMADZU UV-160A.

Se tomaron medidas de SPAD (índice de clorofila) durante el cultivo con un equipo Minolta SPAD 502 tres veces por semana para determinar la eficacia de las aplicaciones.

3.9 Procedimiento matemático para el cálculo de las fracciones molares del Zn_{Fer} y Zn_{Nat} .

La determinación cuantitativa por ICP-MS de los isótopos 64, 66, 67 y 68 de zinc y posterior procedimiento de deconvolución matemática de las abundancias isotópicas permite calcular en cada fracción de suelo u órgano de planta muestreado el Zn natural procedente de las semillas y del suelo (Zn_{Nat}) y el Zn procedente del aplicado con el fertilizante (Zn_{Fer}).

Como describe Benedicto et al (2011), el contenido de Zn total en planta o en suelo puede expresarse del siguiente modo:

$$\text{Zn}_{\text{Total}} = \text{Zn}_{\text{Fer}} + \text{Zn}_{\text{Nat}} \quad (1)$$

El balance de masas para cada isótopo de Zn puede expresarse como se detalla a continuación, tomando como ejemplo el isótopo 67:

$$Zn_{Total} \times {}^{67}A_{Total} = Zn_{Fer} \times {}^{67}A_{Fer} + Zn_{Nat} \times {}^{67}A_{Nat} \quad (2)$$

${}^{67}A_{Total}$ es la abundancia isotópica del ${}^{67}\text{Zn}$ en la muestra vegetal o de suelo, ${}^{67}A_{Fer}$ es la abundancia isotópica del trazador y ${}^{67}A_{Nat}$ es la abundancia isotópica natural.

Si se divide la ecuación (2) por la ecuación (1), se obtiene la siguiente expresión:

$${}^{67}A_{Total} \times x_{Total} = {}^{67}A_{Fer} \times x_{Fer} + {}^{67}A_{Nat} \times x_{Nat} \quad (3)$$

Donde x_{Fer} y x_{Nat} denotan las fracciones molares de Zn en la muestra alterada isotópicamente que provienen de dos fuentes diferentes del elemento (fertilizante y natural).

En el procedimiento convencional, las fracciones molares x_{Fer} y x_{Nat} deberían ser calculadas usando la relación ${}^{67}A_{Total}/{}^{64}A_{Total}$. Si están disponibles las medidas de más isótopos, se deben calcular por deconvolución matemática de las abundancias isotópicas. Ecuaciones similares a la 3 se pueden obtener para todos los isótopos y se puede obtener la siguiente notación matricial:

$$\begin{bmatrix} {}^{64}A_{Total} \\ {}^{66}A_{Total} \\ {}^{67}A_{Total} \\ {}^{68}A_{Total} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} {}^{64}A_{Fer} & {}^{64}A_{Nat} \\ {}^{66}A_{Fer} & {}^{66}A_{Nat} \\ {}^{67}A_{Fer} & {}^{67}A_{Nat} \\ {}^{68}A_{Fer} & {}^{68}A_{Nat} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_{Fer} \\ x_{Nat} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} {}^{64}e \\ {}^{66}e \\ {}^{67}e \\ {}^{68}e \end{bmatrix} \quad (4)$$

Dado que hay más parámetros (abundancias isotópicas) que incógnitas (fracciones molares), se introduce el vector de error en la ecuación 4. Los mejores valores de x_{Fer} y x_{Nat} se obtienen por ajuste de mínimos cuadrados del vector error e (minimizando la suma de los cuadrados de los errores). Si el vector de las abundancias isotópicas de la muestra es llamado y , la matriz de las abundancias isotópicas de los componentes puros es llamada A y el vector de las fracciones molares incógnitas x , la solución de cuadrados mínimos de este sistema sobredeterminado de ecuaciones puede ser calculado como:

$$x = (A' \times A)^{-1} \times (A' \times y) \quad (5)$$

donde A' es la matriz transpuesta de A y el exponente -1 indica la matriz inversa.

Como se observa en la ecuación 4, hay más parámetros que incógnitas en los cálculos, por lo tanto las incertidumbres de esos parámetros pueden ser determinados también usando las varianzas de la matriz, $V(x)$. Los elementos diagonales de esta

matriz son las varianzas de las variables x_{Nat} y x_{Fer} . A partir de la regresión lineal multivariante, esta matriz puede ser calculada como:

$$V(x) = (A' \times A)^{-1} \times S_e^2 \quad (6)$$

Donde S_e^2 es la varianza del modelo de regresión (la suma de los cuadrados de los errores dividido por los grados de libertad). Esto demuestra que la varianza del modelo de regresión es una función del factor de sesgo de masa aplicado para la corrección y es mínimo cuando se utiliza el factor de sesgo de masa correcto.

Rodríguez-Castrillón et al (2008) usaron el mismo procedimiento para corregir el sesgo de masa interno seguido por la aplicación del modelo exponencial:

$$R_{cor} = \frac{R_{exp}}{e^{K \times \Delta M}} \quad (7)$$

Donde R_{cor} es la proporción isotópica corregida, R_{exp} es la proporción isotópica medida y ΔM es la diferencia de masa entre los isótopos considerados. K es un valor arbitrario del factor de sesgo de masa. Luego las abundancias isotópicas corregidas en las muestras son calculadas usando la siguiente ecuación:

$$A_{Total}^i = \frac{R_{cor}^i}{\sum_{i=1}^n R_{cor}^i} \quad (8)$$

Cuando estas abundancias corregidas son introducidas en el procedimiento de deconvolución isotópica, el factor de corrección interna del sesgo de masa, K , se calcula minimizando la varianza de la regresión, S_e^2 , es decir, por iteración aplicando la función Solver de programa Excel (se cambia K hasta que S_e^2 sea mínimo).

La concentración total de Zn se calculó sumando las concentraciones de los isótopos de Zn. La concentración del isótopo ^{70}Zn fue estimada sobre la base de la fracción molar de Zn proveniente del fertilizante (x_{Fer}) y de las fuentes naturales (x_{Nat}) en la muestra y sobre la base de la distribución isotópica natural y del fertilizante (Tabla 4).

Tabla 4: Abundancia Isotópica (%) del Zn Natural y el Zn enriquecido en ^{67}Zn					
	^{64}Zn	^{66}Zn	^{67}Zn	^{68}Zn	^{70}Zn
Zn Natural (IUPAC)	48,63	27,90	4,10	18,75	0,62
Zn enriquecido en ^{67}Zn	1,56	3,88	89,60	4,91	0,05

3.10 Tratamiento estadístico de los datos.

A fin de realizar el estudio estadístico de todos los resultados obtenidos, se utilizó el programa SPSS.21 para Windows. Se utilizó Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor y Test de Duncan con nivel de significación $\alpha=0,05$ para evaluar la eficiencia de cada tratamiento en cada una de las distintas partes de la planta y en cada fracción del suelo, tanto para situaciones con y sin cultivo.

Para comparar la eficiencia entre tratamientos se utilizó Análisis Univariante Bifactorial y Test de Duncan con nivel de significación $\alpha=0,10$, mientras que para el análisis estadístico de los datos de medición de SPAD se utilizó Análisis Univariante Trifactorial y Test de Duncan con nivel de significación $\alpha=0,10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En este apartado se detallan en primer lugar los resultados obtenidos para este experimento, considerando los efectos sobre el cultivo y posteriormente los efectos sobre el suelo cultivado y sin cultivar.

A modo de interpretación de tablas y figuras, se detallan las siguientes referencias:

- 0,65 LSE: Lignosulfonato de Eucalipto 1,5 $\mu\text{mol } ^{67}\text{Zn}$ por tiesto.
- 0,65 LSA: Lignosulfonato de Abeto 1,5 $\mu\text{mol } ^{67}\text{Zn}$ por tiesto.
- LSE: Lignosulfonato de Eucalipto 2,3 $\mu\text{mol } ^{67}\text{Zn}$ por tiesto.
- LSA: Lignosulfonato de Abeto 2,3 $\mu\text{mol } ^{67}\text{Zn}$ por tiesto.
- 2 LSE: Lignosulfonato de Eucalipto 4,6 $\mu\text{mol } ^{67}\text{Zn}$ por tiesto.
- 2 LSA: Lignosulfonato de Abeto 4,6 $\mu\text{mol } ^{67}\text{Zn}$ por tiesto.

4.1 Efectos sobre el cultivo.

4.1.1 Aspecto visual.

Las plantas presentaron un buen desarrollo, con coloración normal y sin moteado en la segunda serie de hojas trifoliadas, que indicaría deficiencia de zinc (Brown, J and Legget, G., 1967). En la Figura 8 se presenta una planta deficiente de zinc mantenida en hidroponía hasta el final del ensayo (izquierda) comparada con una planta a la que se le aplicó tratamiento (derecha). Se observó que la planta deficiente es mucho más baja que la tratada dado que se produce un acortamiento de los entrenudos ya que la deficiencia de zinc afecta a la síntesis de triptófano, precursor de la hormona de crecimiento denominada auxina (Marschner, 2012).



Figura 8: Comparación de una planta de judía deficiente de zinc (izq.) con una planta tratada con zinc (der.). En la parte superior izquierda se muestran hojas de la planta deficiente.

Se midió la longitud de las plantas (Tabla 5) a los 21 días de aplicados los tratamientos. Se observó a simple vista que al aumentar la dosis de ^{67}Zn agregado, las plantas tratadas con lignosulfonatos de eucalipto aumentan el tamaño, mientras que las tratadas con lignosulfonatos de abeto disminuyen el mismo, aunque estadísticamente sólo se encontraron diferencias significativas respecto del control para el tratamiento Zn-0,65LSA.

Tabla 5: Longitud de plantas de judía después de 21 días de agregados los tratamientos. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). ns= no significativo.

Tratamiento	Longitud de planta (cm)
Control	129 ± 10^b
0,65 LSE	127 ± 10^b
LSE	133 ± 20^{ab}
2 LSE	142 ± 16^{ab}
0,65 LSA	154 ± 13^a
LSA	134 ± 20^{ab}
2 LSA	121 ± 9^b
EDTA	124 ± 16^b

4.1.2 Peso seco.

En la Figura 9 se observa que el tratamiento Zn-0,65LSA presenta el mayor peso seco para hojas, tallos y raíces, lo que indica que es el tratamiento que mejor promueve el crecimiento de la planta. En hojas no se observaron diferencias significativas en ningún tratamiento respecto del control al igual que lo observado por Santos et al (2011) y Benedicto et al (2009). En tallos y raíces se observaron diferencias significativas sólo en el tratamiento Zn-0,65LSA respecto al control. No se observó una acción destacada del Zn-EDTA como la que obtuvieron Santos et al (2011) para el Zn-EDTA como tratamiento promotor del crecimiento radicular de plantas de judía cultivadas en suelo. Los resultados obtenidos se pueden consultar en la Tabla A del Anexo.

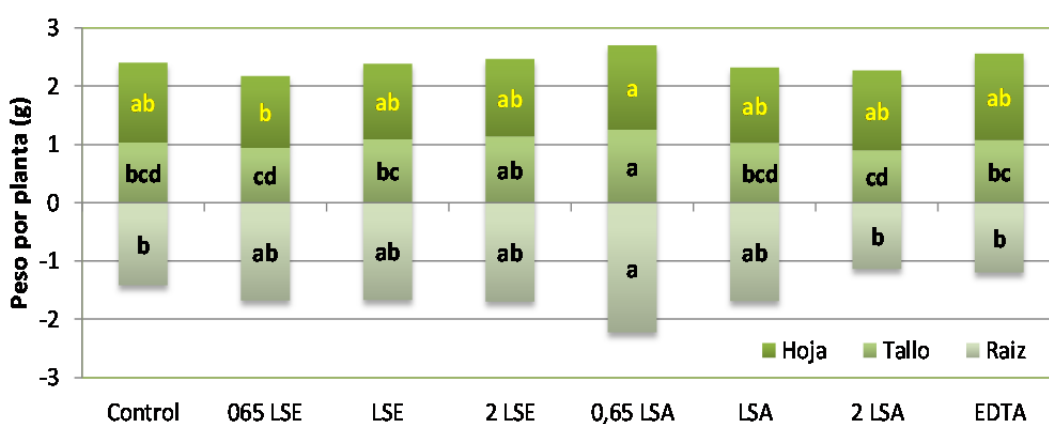


Figura 9: Peso seco de hojas, tallos y raíces a los 21 días de haber aplicado los tratamientos. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). Números positivos refieren a parte aérea de la planta y números negativos a raíces.

En la Tabla 6 se observa la comparación estadística realizada entre dosis y para los tratamientos con lignosulfonatos después de 21 días de aplicación para peso seco en plantas. Si bien Santos et al (2011) obtuvieron que los lignosulfonatos de zinc tanto de abeto como de eucalipto favorecían el crecimiento de la planta de judía en condiciones de cultivo en suelo calizo, en nuestro trabajo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sólo se observa que la dosis 0,65 favorece mayor desarrollo radicular.

Tabla 6: Comparación entre dosis y tratamientos con lignosulfonatos para peso seco (g) de los distintos órganos de la planta. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre las dosis o los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,10$). ns= no significativo. s= Desviación Estándar.

		Hojas	Tallos	Raíces
Dosis	0,65	1,34 ^{ns}	1,10, ^{ns}	1,92^a
	1	1,29	1,06	1,68 ^{ab}
	2	1,34	1,02	1,41 ^b
	s	0,05	0,05	0,18
Tratamientos	LSE	1,29 ^{ns}	1,06 ^{ns}	1,68 ^{ns}
	LSA	1,37	1,06	1,66
	s	0,39	0,05	0,15

4.1.3 Índice de clorofila (SPAD)

El índice de SPAD se midió a partir del día de la aplicación de los tratamientos con una frecuencia de tres veces por semana en cada nivel de hojas de cada una de las plantas de judía cultivadas.

En la tabla 7 se presentan los valores promedio de SPAD medidos en los pisos 6, 7 y 8 de la planta de judía en los días 14, 16 y 20 posteriores a la aplicación de los tratamientos. Se eligió estos números de pisos y en estas fechas dado que la carencia de Zn es observable en hojas jóvenes bien desarrolladas. El análisis estadístico trifactorial (tratamiento, piso y fecha de medición) indica que en estos tres niveles, las plantas tratadas con Zn-Lignosulfonatos presentaron un valor mayor de Spad que las no tratadas (Control) y las tratadas con Zn-EDTA, excepto para el tratamiento 0,65 LSA. Benedicto et al (2009) obtuvieron resultados similares para un ensayo realizado en hidroponía con cultivo de judía, observando los valores más elevados para los tratamientos con lignosulfonato de abeto y eucalipto.

Tabla 7: Valores promedio de SPAD $\pm$ error típico para hojas de los pisos 6, 7 y 8 de los distintos tratamientos durante el experimento. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,10$).

Control	36,8 $\pm$ 0,38 ^{cd}
0,65 LSE	38,5 $\pm$ 0,39^a
LSE	37,6 $\pm$ 0,38^{ab}
2 LSE	38,4 $\pm$ 0,38^a
0,65 LSA	36,2 $\pm$ 0,37 ^d
LSA	37,8 $\pm$ 0,38^{ab}
2 LSA	38,2 $\pm$ 0,40^a
EDTA	36,8 $\pm$ 0,38 ^{bc}

4.1.4 Determinación de Zn total y su distribución en la planta.

El uso del isótopo estable ^{67}Zn en combinación con la deconvolución matemática de las absorbancias isotópicas, permitieron la observación de diferencias en el estudio de la eficacia de los distintos tratamientos aplicados como correctores de la deficiencia de zinc. Este isótopo posibilita realizar un seguimiento del Zn_{Fer} en los distintos tejidos de la planta, de tal modo de conocer cómo se distribuye el mismo una vez aplicado. Si bien la determinación de Zn_{Total} por Absorción Atómica aporta información respecto de la distribución del micronutriente en los tejidos vegetales, el análisis por ICP-MS del isótopo natural amplía aún más el real comportamiento del Zn en la planta, discriminando entre el que procede de fuentes naturales (suelo y semilla) y el que proviene exclusivamente del fertilizante.

En la Figura 10 se presenta el contenido de Zn_{Fer} y Zn_{Nat} distribuidos en los distintos tejidos de la planta, después de 21 días de aplicados los tratamientos. Se pudo observar una tendencia similar en los resultados obtenidos tanto por Absorción Atómica (datos no presentados) como por ICP-MS respecto del contenido de Zn_{Total} en planta calculado a partir de la suma de ^{67}Zn proveniente del fertilizante (Zn_{Fer}) y de fuentes naturales (Zn_{Nat}) obtenidos tras el proceso de deconvolución matemática de las absorbancias isotópicas. Ambos métodos de análisis coinciden en destacar la eficiencia del tratamiento Zn-EDTA respecto de los demás tratamientos para todos los tejidos vegetales en el contenido de Zn_{Total} , coincidiendo con lo observado por varios autores: Martín-Ortiz et al (2009) y Benedicto et al (2011) para cultivos hidropónicos de maíz, trigo y judía; Santos (2011) para cultivo de judía en suelo calizo; Rico et al (1996) para cultivo de maíz en suelo calizo. Álvarez et al (2003) observaron una mayor eficiencia del Zn-EDTA para un cultivo de maíz en suelo calizo sugiriendo al igual que Prasad y Sinha (1981) que la difusión es el principal mecanismo que contribuye a la nutrición con Zn de los cultivos en suelos alcalinos y calcáreos, y que la aplicación de fuentes de Zn muy estables como el quelato Zn-EDTA favorece la difusión y el consumo de zinc por las raíces de las plantas de maíz. Singh et al (1985) argumentaron para su ensayo con cultivo de judía en suelos que la eficacia observada por el tratamiento Zn-EDTA era superior debido a que el quelato incrementa la velocidad de difusión en la vecindad inmediata de las raíces de las plantas.

Con respecto a los lignosulfonatos Benedicto et al (2009) observaron después de 21 días de aplicados los tratamientos en su ensayo hidropónico con judía que el contenido en Zn_{Total} en hojas y raíces era superior para el lignosulfonato de eucalipto. Los mismos autores en su ensayo hidropónico con aplicación foliar en judía en el año 2011 no obtuvieron diferencias significativas en el contenido de Zn_{Total} para hoja pero respecto de tallos el lignosulfonato de eucalipto presentó mejores resultados. En nuestro trabajo no se observaron para Zn_{Total} diferencias estadísticamente significativas para hoja, mientras que para tallos y raíces el lignosulfonato de eucalipto demostró ser el más eficaz. El contenido de Zn_{Total} para tallos coincide para los

tratamientos Zn-EDTA y Zn-2LSE. Los resultados obtenidos se pueden consultar en la Tablas B, C y D del Anexo.

En la Tabla 8 se detalla el análisis estadístico realizado entre los tratamientos con lignosulfonatos y para las distintas dosis aplicadas, donde confirma una vez más que en nuestro trabajo el lignosulfonato de eucalipto demostró una mayor eficiencia que el de abeto en lo que respecta al aporte de Zn_{Total} a la planta, sin evidenciarse diferencias significativas respecto de la dosis.

Tabla 8: Comparación entre dosis y tratamientos del contenido de Zn_{Total} ($\mu\text{moles Zn. planta}^{-1}$) en planta. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre las dosis o los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,10$). ns= no significativo. s= Desviación Estándar.

		Zn_{Total}
Dosis	0,65	2,10 ^{ns}
	1	2,09
	2	1,96
	s	0,14
Tratamiento	LSE	2,22^a
	LSA	1,88 ^b
	s	0,12

Como se puede observar en la Figura 10, el mayor de contenido Zn_{Fer} corresponde al tratamiento Zn-2LSE para hojas, tallos y raíces aunque para éstas no se observaron diferencias significativas respecto del resto de los tratamientos., demostrando una eficiencia similar a la del Zn-EDTA. Benedicto et al (2011) y Santos (2011), comparando dosis iguales, observaron que el mayor contenido de Zn_{Fer} se obtenía en las plantas tratadas con ZnEDTA. El uso de una dosis doble de LSE en nuestro trabajo ha incrementado su efectividad hasta niveles parecidos al Zn-EDTA.

Con respecto al aporte de Zn_{Nat} a la planta, la mayor concentración la encontramos para el tratamiento Zn-EDTA. En el estudio de Santos (2011) también se encontró a 21 días de aplicados los tratamientos al suelo, que la concentración mayor de Zn_{Nat} en hoja correspondía al EDTA. Esto lo podríamos atribuir a la capacidad del EDTA como agente transportador del Zn_{Nat} del suelo hacia los distintos tejidos de la planta, demostrándose de esta manera su efecto transportador.

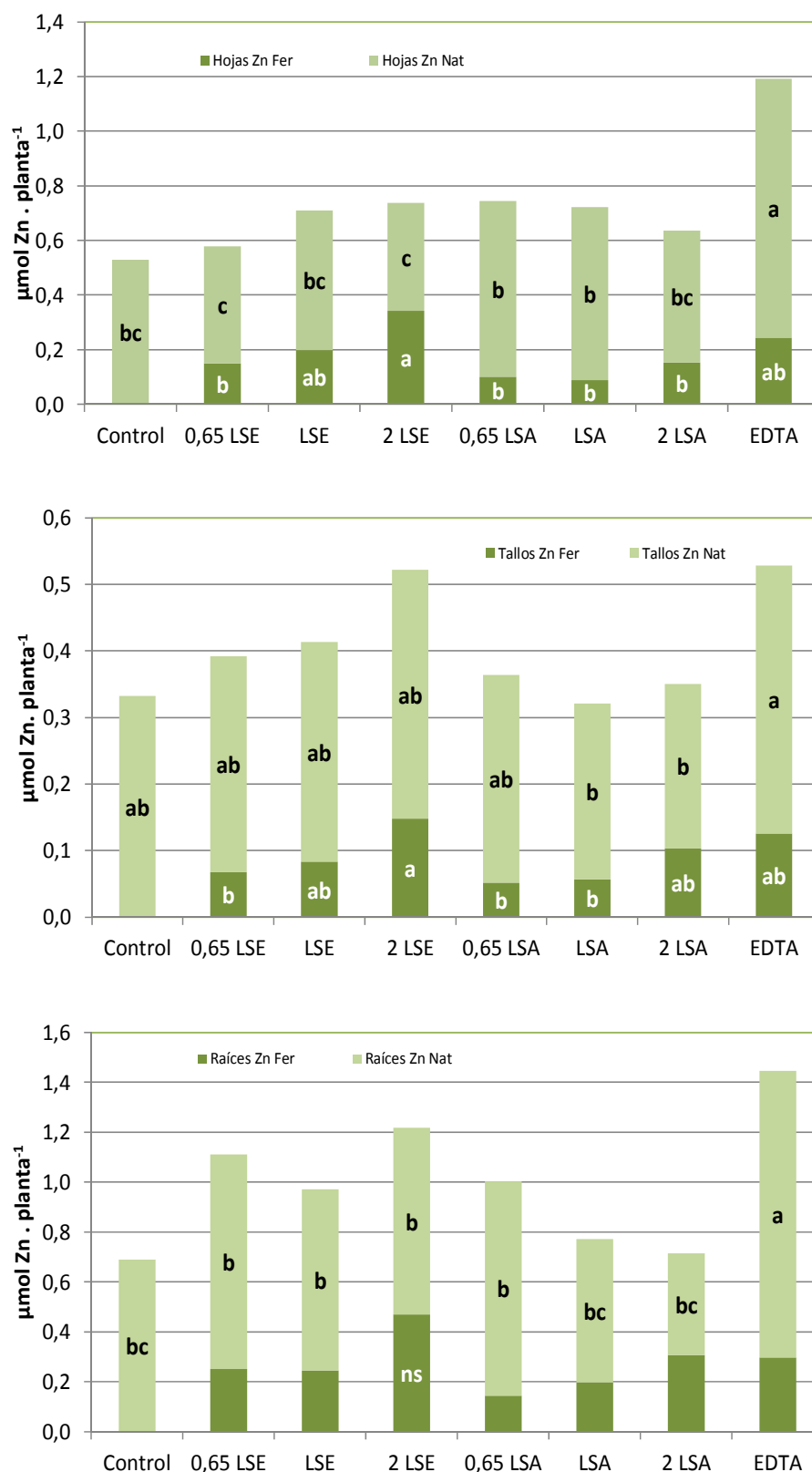


Figura 10: Contenido de Zn_{Fer} y Zn_{Nat} en los distintos tejidos vegetales por planta. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$).

En la Tabla 9 se presenta la comparación entre las dosis y para los tratamientos con lignosulfonatos del contenido de Zn_{Fer} y Zn_{Nat} donde se puede observar la mayor eficiencia del lignosulfonato de eucalipto respecto al de abeto en su aporte de Zn_{Fer} a las hojas. El lignosulfonato de abeto es el que aporta más Zn_{Nat} del suelo. Con respecto a las dosis se observaron diferencias significativas para Zn_{Fer} en hoja, tallo y raíz, comprobándose que a mayor dosis, mayor contenido de Zn_{Fer} . Se observa además que la dosis 1 es la que más aporta Zn_{Nat} a las hojas, mientras que la dosis 0,65 es la que más lo aporta a las raíces.

Tabla 9: Comparación entre dosis y tratamientos del contenido de Zn_{Fer} y Zn_{Nat} ($\mu\text{moles Zn. planta}^{-1}$) en los distintos órganos de la planta. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre las dosis o los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,10$). s= Desviación Estándar. ns= no significativo

		Hoja		Tallo		Raíz	
		Zn_{Fer}	Zn_{Nat}	Zn_{Fer}	Zn_{Nat}	Zn_{Fer}	Zn_{Nat}
Dosis	0,65	0,13 ^b	0,54 ^{ab}	0,06 ^b	0,32 ^{ns}	0,20 ^b	0,86^a
	1	0,14 ^b	0,57^a	0,07 ^b	0,30	0,23 ^{ab}	0,65 ^b
	2	0,25^a	0,44 ^b	0,12^a	0,31	0,39^a	0,58 ^b
	s	0,04	0,04	0,02	0,03	0,07	0,07
Tratamiento	LSE	0,23^a	0,44 ^b	0,10 ^{ns}	0,34^a	0,33 ^{ns}	0,78 ^{ns}
	LSA	0,11 ^b	0,59^a	0,07	0,28 ^b	0,22	0,61
	s	0,04	0,04	0,02	0,02	0,06	0,06

Si bien el tratamiento que más Zn_{Total} aporta a la planta es el correspondiente a Zn-EDTA, entre los lignosulfonatos es el de eucalipto el más eficaz en suministrar Zn_{Fer} a las hojas. Además, se ha demostrado que el tratamiento Zn-2LSE es el que aporta más Zn_{Fer} a la planta, lo cual se explicaría por ser su peso molecular cuatro veces menor que el lignosulfonato de abeto, por lo que su movilidad podría estar facilitada.

Por lo expuesto hasta aquí, se estima que aplicando el doble de concentración de Zn con lignosulfonato de eucalipto se obtendrían similares resultados de Zn_{Fer} que con la fertilización con Zn-EDTA. Por lo tanto, el lignosulfonato de eucalipto supondría una alternativa más económica y ecológicamente eficaz al uso de agentes quelantes como el EDTA.

Una vez más, junto con los trabajos de Santos (2011) y Benedicto et al (2011) se puede apreciar la importancia del uso del marcaje con ^{67}Zn en conjunto con la deconvolución matemática de las absorbancias isotópicas como herramientas de diagnóstico de la eficacia de fertilizantes de Zn aplicados al suelo.

4.1.5 Contenido de micronutrientes en los tejidos vegetales.

Dado que la nutrición en zinc puede interaccionar con las de los otros micronutrientes metálicos, se determinó el contenido de micronutrientes (Fe, Mn y Cu) en los distintos tejidos vegetales después de 21 días de agregados los tratamientos

y se comparó con los valores de referencia obtenidos de bibliografía (Benton Jones and Mills, 1991). Cabe aclarar que estos valores están indicados para muestras de hojas trifoliadas jóvenes superiores completamente desarrolladas. En la Tabla 10 se detallan los resultados obtenidos y los índices calculados.

Navarro y Navarro (2003) establecen que las plantas que manifiestan síntomas de deficiencia de zinc presentan altos contenidos de manganeso y hierro en sus hojas. Los valores establecidos de manganeso en hoja de judía se fijan en el intervalo de 50-300 mg Kg⁻¹. De acuerdo con este parámetro, los resultados obtenidos en hoja (ver Tabla 10) son adecuados, observándose que el tratamiento Zn-EDTA presenta el mayor contenido de manganeso. Con respecto al contenido de hierro en hoja, se establece que los valores óptimos en hoja oscilan entre 50 y 300 mg Kg⁻¹. De acuerdo a los resultados obtenidos, el contenido de hierro es también normal, indicando que las plantas no presentan deficiencia de hierro. El tratamiento Zn-LSA presenta la mayor concentración de hierro en hoja.

Tabla 10: Concentración de Fe, Mn y Cu (mg Kg⁻¹) e índices correspondientes en hoja con su error típico. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$).

Tratamientos	Cu	Mn	Fe	Zn/Fe	Zn/(Fe+Mn+Cu)
Control	7,0 ± 0,5 ^c	81 ± 18^a	100 ± 12 ^{ab}	0,39 ± 0,05 ^c	0,20 ± 0,02 ^d
0,65 LSE	8,6 ± 0,4 ^b	52 ± 28 ^b	77 ± 13 ^b	0,52 ± 0,04 ^{abc}	0,30 ± 0,04 ^{bcd}
LSE	7,4 ± 0,4 ^{bc}	22 ± 10 ^c	73 ± 30 ^b	0,67 ± 0,16 ^{abc}	0,42 ± 0,06 ^{ab}
2 LSE	13,3 ± 1,2^a	25 ± 19 ^c	78 ± 30 ^b	0,73 ± 0,21 ^{ab}	0,47 ± 0,12^a
0,65 LSA	12,8 ± 1,3^a	23 ± 12 ^c	96 ± 15 ^{ab}	0,42 ± 0,02 ^{abc}	0,30 ± 0,01 ^{bcd}
LSA	13,0 ± 1,4^a	49 ± 3 ^b	108 ± 12^a	0,38 ± 0,03 ^c	0,24 ± 0,02 ^{cd}
2 LSA	8,3 ± 0,1 ^{bc}	69 ± 18 ^{ab}	71 ± 27 ^b	0,62 ± 0,11 ^{abc}	0,27 ± 0,03 ^{bcd}
EDTA	8,7 ± 0,7 ^b	93 ± 15^a	89 ± 17 ^{ab}	0,83 ± 0,06^a	0,38 ± 0,03 ^{ab}

Se determinó el índice Zn/Fe con los datos obtenidos a fin de evaluar la incidencia de nutrición de Zn sobre la de Fe. Los valores calculados para este índice a partir de los valores establecidos de hierro y zinc en hoja se deben ubicar entre 0,40 y 0,67 unidades para plantas de judía bien nutridas. Los resultados obtenidos se consideran adecuados, aunque los tratamientos Zn-2LSE y Zn-EDTA exceden el intervalo considerado. Al igual que Santos et al (2011) el mayor índice se obtiene para el tratamiento Zn-EDTA.

Además, se determinó el índice Zn/(Fe+Cu+Mn) como otro parámetro más de evaluación nutricional. Los valores óptimos establecidos para dicho índice deben encontrarse entre 0,19 y 0,32 unidades. Los valores obtenidos exceden el límite establecido para los tratamientos Zn-LSE, Zn-2LSE y Zn-EDTA, evidenciando un cierto desbalance del contenido de zinc respecto de los restantes micronutrientes. Como las concentraciones individuales de los micronutrientes cumplen con los valores estipulados, no se considera que este desbalance afecte a la nutrición de la planta. Con respecto al resto de los tratamientos, se encuentran dentro del intervalo esperado.

Alloway (2008) postula la posible competencia entre cobre y zinc por los mismos sitios de adsorción en la raíz, cuando el cobre se encuentra en alta concentración en el suelo. Los valores óptimos para este micronutriente se encuentran entre 7 y 30 mg Kg⁻¹. Los resultados obtenidos (ver Tabla 10) se encuentran en el rango de normalidad y los tratamientos Zn-2LSE, Zn-0,65LSA y Zn-LSA presentan la mayor concentración en hojas.

4.1.6 Evaluación del antagonismo zinc-fósforo.

Se determinó fósforo total en los distintos tejidos vegetales a fin de evaluar el efecto de los tratamientos sobre el posible antagonismo entre la absorción de zinc y la de fósforo en las plantas. En la Tabla 11 se muestran las concentraciones de fósforo encontradas en hojas. Contrastando con la bibliografía se observó que todos los tratamientos se encontraban dentro de los valores de referencia (0,35 – 0,75 gP Kg⁻¹) lo que evidencia que fueron bien nutridas. Además se observó que todas las plantas tratadas con lignosulfonatos presentaron una disminución en su contenido de fósforo respecto del control. Se encontraron diferencias significativas para todos los tratamientos con lignosulfonatos excepto el Zn-2LSA. Entre las plantas control, las tratadas con Zn-2LSA y las tratadas con Zn-EDTA no se observaron diferencias significativas.

Tabla 11: Contenido de Fósforo (g P Kg⁻¹ ms) en hojas con su error típico después de 21 días de aplicados los tratamientos. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$).

Tratamientos	P
Control	4,7 ± 0,1 ^{ab}
0,65 LSE	3,7 ± 0,3 ^c
LSE	3,5 ± 0,2 ^c
2 LSE	3,7 ± 0,1 ^c
0,65 LSA	3,9 ± 0,3 ^c
LSA	3,5 ± 0,1 ^c
2 LSA	4,1 ± 0,3 ^{ab}
EDTA	5,0 ± 0,2 ^a

Martín Ortiz et al (2009) realizaron un ensayo en suelo con plantas de maíz a las cuales se aplicaron tratamientos NPK, NPK + ZnSO₄ y NPK + Zn-Lignosulfonato de abeto. Se observó que las hojas de las plantas sin adición de Zn eran las que presentaban más concentración de P, mientras que las hojas de las plantas a las que se les adicionó Zn-Lignosulfonato presentaron el menor contenido de P.

Generalmente para el antagonismo de fósforo-zinc, se espera que el fósforo provoque una disminución en la absorción de zinc por parte de la planta debido a que al ser el fósforo un macronutriente, se adiciona en concentraciones más elevadas que el zinc que es un micronutriente. Posiblemente la disminución del contenido de fósforo en las hojas de los tratamientos que corresponden a lignosulfonatos, se deba en parte a la precipitación del fosfato dicálcico dihidratado debido al pH en el que se encuentra el suelo, lo que impide que se encuentre disponible para las plantas. Además, es probable que parte del zinc soluble del lignosulfonato se una a los fosfatos presentes en el suelo, precipitando en forma de Hopeita ($\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Lindsay, 1979). Se realizó una modelización con el programa VMinteq (www2.lwr.kth.se/English/Oursoftware/vminteq/) confirmando la precipitación de la Hopeita en las condiciones de ensayo.

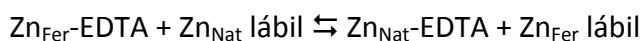
4.2 Efectos sobre el suelo

4.2.1 Determinación de Zn_{Total} y su distribución en el suelo

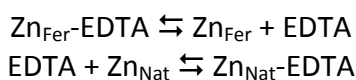
A fin de establecer el aporte del Zn_{Fer} y el Zn_{Nat} a la disponibilidad y solubilidad del suelo cultivado y sin cultivar, se realizaron mediciones en Absorción Atómica del Zn_{Total} y en ICP-MS de todos los isótopos de Zn. Las tendencias observadas con el análisis por Absorción Atómica para los distintos tratamientos (datos no presentados), al igual que en planta, coinciden con lo obtenido por ICP-MS.

En la Figura 11 se observan los resultados obtenidos para la fracción soluble y los mismos se pueden consultar en la Tabla E del Anexo. En nuestro trabajo se observó que Zn-EDTA es el tratamiento que más incrementa el Zn_{Nat} en la disolución del suelo, con y sin cultivo. En el caso del suelo cultivado se observa que el aporte de Zn_{Nat} a la planta coincide con los puntos 2 y 5 postulados por la Figura 2 de la Introducción. Es decir:

1. Se efectúa el siguiente intercambio isotópico (punto 5 de la Figura 2):



2. Se efectúa primero la liberación del agente quelante y del Zn_{Fer} . Luego se produce la quelación del Zn_{Nat} (punto 2 de la Figura 2):



Posteriormente este Zn_{Nat} es liberado en la cercanía de la raíz para ser absorbido por las raíces.

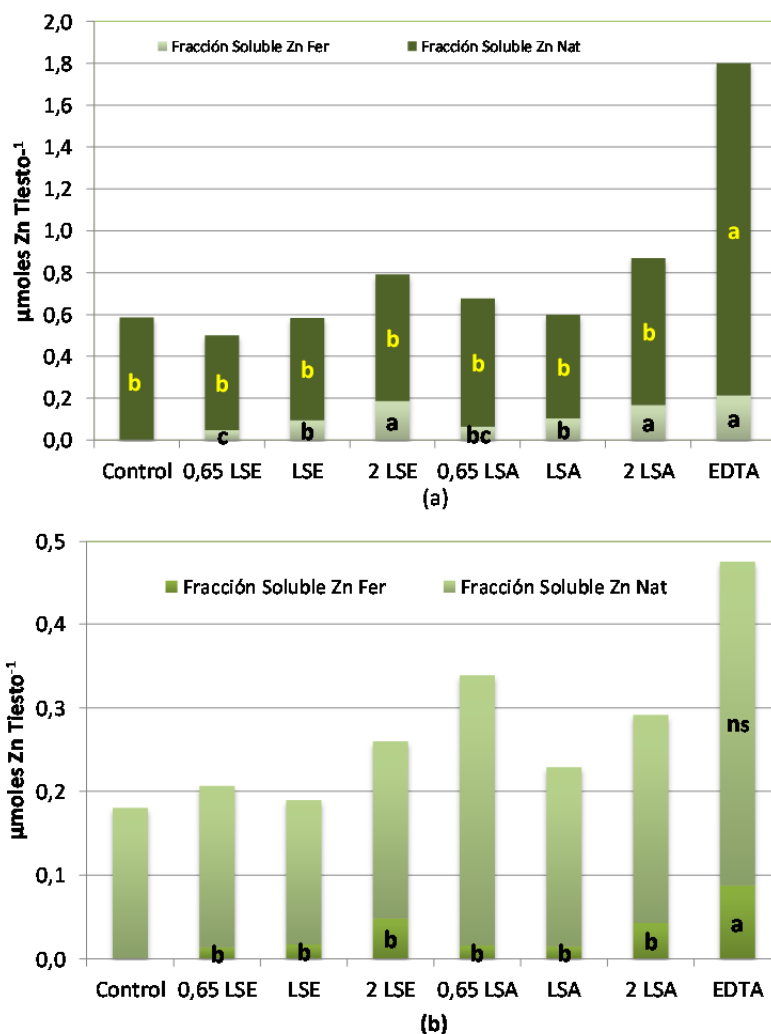


Figura 11: Contenido de Zn_{Fer} y Zn_{Nat} soluble en suelo con cultivo (a) y sin cultivo (b). Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$).

Es fundamental destacar la importancia de las raíces en este mecanismo, dado que permite la movilidad del agente quelante y el transporte del zinc. De hecho se puede ver en los ensayos sin planta que la relación entre las fracciones solubles de $\text{Zn}_{\text{Nat}}\text{-EDTA}/\text{Zn}_{\text{Fer}}\text{-EDTA}$ en el suelo cultivado fue de 7,6:1 mientras que en el suelo sin cultivar fue de 4,4:1. Como se puede observar en la Figura 11, en el suelo sin cultivar no hay diferencias estadísticamente significativas para el Zn_{Nat} aportado por los distintos tratamientos.

Por otro lado, esta elevada solubilidad del quelato tanto en los suelo cultivados como sin cultivar, corrobora una vez más las posibilidades de lixiviación que conlleva la aplicación de de estos productos al suelo con la consiguiente contaminación de aguas subterráneas como lo señalan Bucheli-Witschel, M. and Egli, T., (2000) y Álvarez et al (2003).

Con respecto a la solubilidad del Zn_{Total} correspondiente a los lignosulfonatos en el suelo cultivado se observa que en general es inferior a la obtenida para el Zn-EDTA, algo que ya fue corroborado por Álvarez et al (2003). Debido a la menor estabilidad y movilidad de los lignosulfonatos en el suelo y de acuerdo a los resultados obtenidos comparando las muestras tratadas respecto del control, podemos decir que los efectos de recarga e intercambio isotópico no se producen o se producen en mucha menor medida, de tal modo que los complejos no suministran Zn_{Nat} extra a la planta como lo hace el quelato.

En nuestro caso pudimos observar además, que al aumentar la dosis de zinc aplicado, aumenta el contenido Zn_{Fer} en disolución al punto de no tener diferencias significativas con Zn-EDTA a la mayor dosis de lignosulfonatos. Por lo tanto, si bien el Zn_{Total} soluble de los lignosulfonatos es menor, el Zn_{Fer} soluble aportado por los mismos es significativamente similar al aportado por el Zn-EDTA. Esto implica que utilizando el doble de dosis de cualquiera de los lignosulfonatos obtendríamos similares aportes de Zn_{Fer} soluble que el aportado por el Zn-EDTA.

Respecto a la solubilidad del Zn_{Total} en el suelo sin cultivar se observó al igual que Álvarez et al (1996, 2001 y 2003) que en el caso de los lignosulfonatos es significativamente menor que la del Zn-EDTA, como consecuencia de la menor movilidad y estabilidad en el suelo.

En relación a la disponibilidad del Zn_{Total} Álvarez et al (1996, 2001 y 2003) observaron que cuando se aplicaba lignosulfonatos complejados con Zn, éstos quedaban retenidos en mayor medida en los primeros siete centímetros del suelo dejando el Zn disponible para que la planta pudiese consumirlo cuando lo necesitara. En nuestro trabajo también pudimos observar que en los suelos con y sin cultivo, los tratamientos con lignosulfonatos a dosis medias y elevadas, presentan mejor disponibilidad que el tratamiento ZnEDTA, especialmente en lo que respecta al Zn_{Fer} para los tratamientos Zn-2LSE y Zn-2LSA. Es decir, que aplicando dosis dobles de cualquiera de los lignosulfonatos se obtendría buena disponibilidad y solubilidad del Zn_{Fer} .

Los resultados obtenidos se observan en la Figura 12 y se pueden consultar en la Tabla F del Anexo.

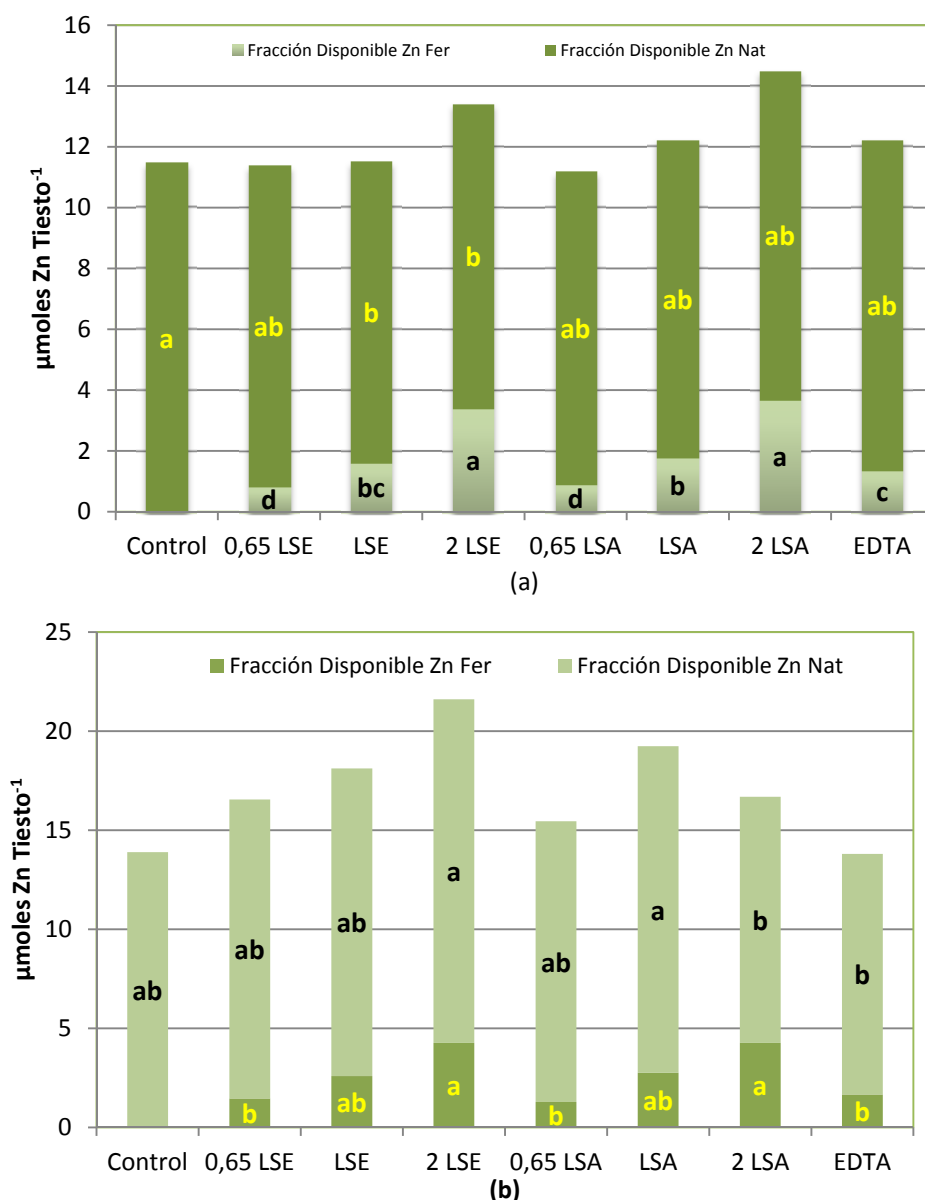


Figura 12: Contenido de Zn_{Fer} y Zn_{Nat} disponible en suelo con cultivo (a) y sin cultivo (b). Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$).

En la Tabla 12 se expone la comparación estadística de los lignosulfonatos aplicados para los factores dosis y tratamiento. Para el suelo cultivado se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos con lignosulfonatos de abeto y eucaliptos. Para la fracción soluble ambos lignosulfonatos aportan mayor cantidad de Zn_{Fer} a mayor dosis y para la fracción soluble ambos lignosulfonatos aportan Zn_{Fer} y Zn_{Nat} a mayores dosis.

En el caso del suelo no cultivado no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para el Zn_{Fer} ni para la fracción soluble ni para la disponible, mientras que para el Zn_{Nat} el tratamiento LSA favorece la presencia de Zn en la fracción en la fracción soluble.

Respecto de las dosis, para el Zn_{Fer} en la fracción soluble y disponible, se observa que a medida que las mismas aumentan, también lo hace el contenido de Zn.

De acuerdo a estos resultados, independientemente del lignosulfonato que se aplique en la dosis mayor, se obtendrían resultados en solubilidad similares a los obtenidos con ZnEDTA.

Dado que lo que se persigue es favorecer el desarrollo de la planta el tratamiento Zn-2LSE sería el más apropiado como alternativa a la fertilización con quelatos sintéticos.

Tabla 12: Comparación entre dosis y tratamientos con lignosulfonatos para Zn_{Fer} y Zn_{Nat} ($\mu\text{moles Tiesto}^{-1}$) en la fracción soluble y disponible del suelo, con y sin cultivo. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre las dosis o los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,10$). ns= no significativo. s= Desviación Estándar.

Con Cultivo					
		Fracción Disponible		Fracción Soluble	
		Zn_{Fer}	Zn_{Nat}	Zn_{Fer}	Zn_{Nat}
Dosis	0,65	0,89 ^c	10,4 ^{ns}	0,06 ^c	0,53 ^{ab}
	1	1,70 ^b	10,2	0,10 ^b	0,49 ^b
	2	3,54^a	10,4	0,18^a	0,65^a
	s	0,10	0,24	0,01	0,05
Tratamiento	LSE	1,95 ^{ns}	10,2 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,52 ^{ns}
	LSA	2,13	10,5	0,11	0,60
	s	0,08	0,19	0,01	0,04
Sin Cultivo					
Dosis	0,65	1,38 ^c	14,6 ^{ns}	0,02 ^b	0,27^a
	1	2,67 ^b	16,0	0,02 ^{ab}	0,19 ^b
	2	4,27^a	14,9	0,05^a	0,23 ^{ab}
	s	0,44	0,93	0,00	0,02
Tratamiento	LSE	2,77 ^{ns}	16,0 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,20 ^b
	LSA	2,77	14,4	0,03	0,26^a
	s	0,36	0,76	0,02	0,02

4.2.2 Distribución del Zn_{Fer}

En la Figura 13 se presenta la distribución del porcentaje (%) de Zn procedente del fertilizante en suelo y planta. Se observa que el tratamiento Zn-0,65LSE presenta el mayor porcentaje de Zn_{Fer} en planta y el tratamiento Zn-2LSA presenta el mayor porcentaje de Zn_{Fer} en suelo. Los resultados obtenidos se pueden consultar en la Tabla G del Anexo.

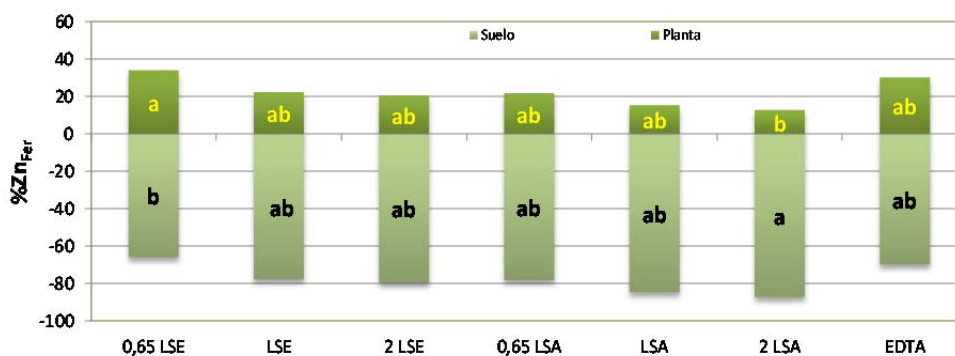


Figura 13: Porcentaje de Zn_{Fer} en suelo y planta. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). Números positivos refieren al contenido de Zn_{Fer} en planta y números negativos refieren al contenido de Zn_{Fer} en suelo.

Se puede observar en la Tabla 13 que el mayor porcentaje de Zn_{Fer} en la planta se encuentra en raíces, lo cual confirma que el Zn es un elemento relativamente poco móvil en judía, acumulándose en raíces. Además se observa que en hojas y tallos los tratamientos Zn-0,65LSE, Zn-LSE, Zn-2LSE, Zn-0,65LSA y Zn-EDTA proporcionan porcentaje similar de Zn_{Fer}. Con respecto a la fracción disponible los tratamientos que presentan mejor desempeño son Zn-LSE, Zn-2LSE, Zn-0,65LSA, Zn-LSA y Zn-2LSA. El tratamiento que suministra mayor porcentaje de Zn en la fracción soluble es el Zn-EDTA.

Tabla 13: Porcentaje (%) de Zn_{Fer} con su error típico presente en los distintos tejidos vegetales y fracciones del suelo. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$).

Tratamientos	Hojas	Tallos	Raíces	Fracción disponible	Fracción soluble
0,65 LSE	10,9 ± 2,2 ^a	4,9 ± 1,0 ^{ab}	18,3 ± 4,7 ^{ns}	63 ± 7,5 ^{bc}	3,5 ± 0,5 ^b
LSE	8,4 ± 2,7 ^{ab}	3,5 ± 0,9 ^{ab}	10,3 ± 5,9	74 ± 8,0 ^{abc}	4,2 ± 0,5 ^b
2 LSE	7,3 ± 2,2 ^{ab}	3,2 ± 0,9 ^{ab}	10,0 ± 3,1	75 ± 5,8 ^{abc}	4,1 ± 0,2 ^b
0,65 LSA	7,4 ± 2,5 ^{ab}	3,9 ± 1,1 ^{ab}	10,6 ± 4,6	73 ± 7,6 ^{abc}	5,1 ± 1,5 ^b
LSA	4,0 ± 1,0 ^b	2,5 ± 0,5 ^b	8,9 ± 3,1	80 ± 4,6 ^{ab}	4,7 ± 0,3 ^b
2 LSA	3,5 ± 1,0 ^b	2,3 ± 0,7 ^b	7,0 ± 2,6	84 ± 3,8 ^a	3,8 ± 0,5 ^b
EDTA	11,6 ± 0,3 ^a	5,6 ± 0,6 ^a	13,1 ± 0,9	61 ± 1,1 ^c	9,2 ± 1,1 ^a

En la Tabla 14 se expone la comparación estadística del efecto de ambos lignosulfonatos en la distribución del Zn_{Fer} considerando como factores la dosis y los tratamientos aplicados para la planta y las fracciones del suelo. Los resultados obtenidos demostraron que la planta toma más Zn_{Fer} del lignosulfonato de eucalipto que el de abeto, quedando éste último mayoritariamente en el suelo en la fracción disponible. Se observó además que el lignosulfonato de eucalipto proporciona un 10%

más de Zn_{Fe} a la planta que el lignosulfonato de abeto. Marschner (2012) expone que la velocidad de consumo de un catión metálico complejoado siempre es menor que la de un catión libre y que disminuye con el aumento de tamaño del ligando orgánico al que se encuentra unido el catión metálico. En este caso, el peso molecular del lignosulfonato de abeto es casi cuatro veces mayor que el del eucalipto, lo cual explicaría la reducción de la velocidad de absorción por parte de las raíces del catión metálico.

Tabla 14: Comparación entre dosis y tratamientos con lignosulfonatos para Zn_{Fe} (%) presente en la planta y las fracciones del suelo. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre las dosis o los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,10$). ns= no significativo. s= Desviación Estándar.

		Planta	Fracción disponible	Fracción soluble
Dosis	0,65	27,91 ^{ns}	67,8 ^b	4,29 ^{ns}
	1	18,82	76,8 ^{ab}	4,43
	2	16,63	79,4^a	3,92
	s	4,49	4,40	0,51
Tratamientos	LSE	25,6^a	70,4 ^b	3,93 ^{ns}
	LSA	16,6 ^b	78,9^a	4,50
	s	3,67	3,6	4,13

En la tabla 15 se presenta la distribución en % del Zn_{Fe} en los distintos tejidos vegetales. Estadísticamente se observó que no hay efecto de la dosis en la distribución de Zn_{Fe} en la planta (Tabla 14) ni para los distintos tejidos vegetales (Tabla 15) pero sí se observaron diferencias significativas entre tratamientos para hoja.

Tabla 15: Distribución en porcentaje (%) de Zn_{Fe} con su error típico en los distintos tejidos vegetales. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre las dosis o los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,10$). ns= no significativo. s= Desviación Estándar.

		Hojas	Tallos	Raíces
Dosis	0,65	36,8 ^{ns}	19,0 ^{ns}	42,6 ^{ns}
	1	34,5	18,7	45,7
	2	33,1	19,4	46,7
	s	4,01	2,34	6,02
Tratamientos	LSE	39,2^a	18,4 ^{ns}	41,4 ^{ns}
	LSA	30,4 ^b	19,6	48,7
	s	3,34	1,91	4,92

Se pudo observar que en las plantas tratadas con lignosulfonato de eucalipto la movilidad del Zn_{Fe} hacia la hoja fue mayor, mientras que para el lignosulfonato de abeto la movilidad del Zn_{Fe} fue menor quedándose en una mayor proporción en raíces.

Benedicto et al (2011) obtuvieron similares resultados para la movilidad de Zn tras las aplicaciones foliares de ^{67}Zn complejoado con lignosulfonatos en hidroponía para cultivo de judía.

4.2.3 Contenido de micronutrientes en las fracciones del suelo.

Se comparó los datos obtenidos de Fe, Mn y Cu de los suelos tratados con los valores obtenidos para las muestras Control, es decir las que no recibieron fuente exógena de zinc. Se observó un aumento generalizado del contenido de Fe y Mn de los suelos sin cultivar y no se encontraron diferencias significativas para Cu. En el caso de los suelos cultivados no se encontraron diferencias significativas para los micronutrientes mencionados, siendo en general inferiores al Control debido a que la planta ha sustraído lo necesario para su crecimiento y desarrollo. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 16:

Tabla 16: Concentración de Fe, Mn y Cu ($mg\ Kg^{-1}$) en fracción disponible de suelo con y sin cultivo. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). ns = no significativo.

Tratamientos	Cu		Fe		Mn	
	Con Cultivo	Sin Cultivo	Con Cultivo	Sin Cultivo	Con Cultivo	Sin Cultivo
Control	2,5 ± 0,2^a	2,9 ± 0,6^{ns}	16 ± 1,3^{ns}	18 ± 3,0 ^{ab}	20 ± 3,0^{ns}	20 ± 4,3 ^b
0,65 LSE	2,3 ± 0,1 ^{ab}	3,5 ± 0,1	17 ± 0,7	21 ± 1,5 ^{ab}	19 ± 0,7	23 ± 1,0 ^{ab}
LSE	2,2 ± 0,2 ^b	3,4 ± 0,4	16 ± 1,3	20 ± 1,5 ^{ab}	18 ± 1,8	24 ± 2,7 ^{ab}
2 LSE	2,1 ± 0,2 ^b	3,5 ± 0,4	16 ± 1,3	21 ± 0,9 ^{ab}	18 ± 1,4	28 ± 3,2^a
0,65 LSA	2,3 ± 0,3 ^{ab}	2,9 ± 0,5	16 ± 1,5	18 ± 2,8 ^{ab}	19 ± 2,3	20 ± 3,2 ^b
LSA	2,3 ± 0,1 ^{ab}	3,5 ± 0,5	16 ± 0,9	22 ± 3,5^a	19 ± 1,4	24 ± 3,7 ^{ab}
2 LSA	2,1 ± 0,1 ^b	2,7 ± 0,1	16 ± 1,3	16 ± 0,8 ^b	19 ± 1,6	18 ± 0,1 ^b
EDTA	2,6 ± 0,2 ^{ab}	2,8 ± 0,2	16,8 ± 0,9	17 ± 1,2 ^{ab}	20 ± 0,9	19 ± 0,8 ^b

4.3 Discusión final.

En el presente trabajo se observó que cuando los lignosulfonatos de zinc son adicionados al suelo, tienen diferentes respuestas en la fertilización dependiendo de su origen, ya que su composición química depende de la madera de la que se extrae y, lo que es más, también del proceso de obtención utilizado (Zhor, 2005). Se observó que el lignosulfonato de eucalipto es más eficaz en la corrección de zinc que el lignosulfonato de abeto, especialmente a dosis altas donde se consigue mayor aporte de zinc fertilizante a la planta (incluso más que con Zn-EDTA) y disponibilidad y solubilidad de Zn_{Fe} en el suelo similar a la obtenida con Zn-EDTA. Se entiende que al poseer el lignosulfonato de eucalipto un peso molecular casi cuatro veces menor que el de abeto (Tabla 3), se favorece su movilidad en el suelo y por lo tanto la presencia del Zn_{Fe} en la rizosfera y su absorción por raíz (Marschner, 2012). Esto posibilita que un 10% más de Zn_{Fe} ascienda a la planta, respecto del lignosulfonato de abeto.

Por estas razones, se considera al lignosulfonato de eucalipto una alternativa eficaz y económica al uso de quelatos sintéticos en la corrección de la deficiencia de zinc en suelos calcáreos. Sin embargo en este trabajo no se ha evaluado su persistencia, por lo que sería apropiado continuar con el experimento hasta la floración y formación del fruto. Esto nos permitiría estudiar la distribución del zinc fertilizante con más detalle.

Además, coincidiendo con lo expuesto por Álvarez et al (1996, 2001 y 2009) y Rico et al (1996) los lignosulfonatos presentaron tanto en suelo cultivado como sin cultivar, alta disponibilidad del Zn_{Fe} . La relevancia de esta fracción no ha quedado demostrada. Por esta razón, se sugiere realizar un segundo cultivo, una vez cosechado el anterior para estudiar el efecto residual del zinc disponible en el suelo luego de la primera fertilización, evitando de este modo una nueva aplicación de tratamientos y por lo tanto, disminuyendo costos, similar a lo realizado por Álvarez et al, 2008.

En este trabajo también se comprobó que el tratamiento más efectivo como corrector de la deficiencia de zinc es el Zn-EDTA porque además de proporcionar Zn_{Fe} a la planta, aporta Zn_{Na} presente en el suelo por los efectos de recarga y/o intercambio isotópico (Lucena 2009). Esto contribuye a una mejor comprensión de la interacción de los quelatos en el suelo y su aporte al sistema suelo planta.

Además, al igual que Álvarez et al (1996, 2001 y 2009) y Rico et al (1996) hemos observado tanto en los suelos cultivados y sin cultivar la elevada solubilidad del Zn-EDTA debida a la alta estabilidad de su estructura que le permite permanecer en solución ($K^o=3,0 \times 10^{16}$) y que confirma su capacidad de lixiviación. Es sabido que se utiliza EDTA como técnica de lavado de suelos contaminados con metales pesados, lo cual permite su movilización (Weihua Zhang et al, 2010). Por lo tanto, su alta estabilidad y posibilidad de remover metales aumenta la probabilidad de riesgo de contaminación de acuíferos subterráneos (Bucheli-Witschel and Egli, 2000).

Por último y según revela la modelización de las condiciones de nuestro ensayo, realizada con el programa de especiación química VMinteq (www2.lwr.kth.se/English/Oursoftware/vminteq/), es posible que haya precipitado fosfato dicálcico dihidratado (DCPD). El DCPD controlaría la disponibilidad del fósforo y este podría controlar la disponibilidad de Zn. Así, para el caso de los lignosulfonatos, el Zn liberado podría formar Hopeíta $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Lindsay, 1979), lo que implica una disminución de la disponibilidad de zinc. Este es un efecto no deseado que sería conveniente considerarlo para futuros ensayos.

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

En este trabajo se propuso comparar la eficiencia de dos tipos de lignosulfonatos complejados con ^{67}Zn (procedentes de abeto y eucalipto), respecto de la eficiencia del quelato Zn-EDTA como correctores de deficiencia de Zn aplicados a un suelo calizo a distintas dosis, cultivado con plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L cv. Negro Polo) y sin cultivar en condiciones controladas. Además se evaluó la distribución del isótopo ^{67}Zn en las fracciones del suelo y los órganos de la planta. De los resultados observados y su discusión, se concluye lo siguiente:

- Los complejos de Zn con lignosulfonatos de abeto (Zn-LSA) y de eucalipto (Zn-LSE) aplicados al suelo aportaron Zn a las plantas. El tratamiento Zn-LSE demostró ser más eficiente que el tratamiento Zn-LSA, movilizándolo el Zn del fertilizante en mayor medida hacia las hojas.
- Aplicando el doble de concentración de Zn-LSE se podría conseguir similares aportes de Zn del fertilizante que con Zn-EDTA.
- El Zn-EDTA en condiciones calcáreas es el tratamiento más eficaz para la corrección de zinc ya que no sólo aporta Zn_{Fer} sino también Zn_{Nat} a la planta, quedando demostrado el efecto transportador del agente quelante. Además se demuestra que existe intercambio isotópico entre el Zn del fertilizante y el nativo del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

6 BIBLIOGRAFÍA:

Adriano, D. C. 2001. Trace elements in terrestrial environments biogeochemistry. Bioavailability and risks of metals. Springer. New York, Berlin and Heidelberg. ISBN: 0-387-98678-2.

Alloway, B. J. 2008 Zinc in soils and crop nutrition. Second edition, published by IZA and IFA. Brussels, Belgium and Paris, France. ISBN: 978-90-8133-310-8.

Alkanani, T., MacKenzie, A. F. 1996. Banding urea and lignosulfonate in (zea mays L). Production and 15N Recovery. Can. J. Soil Sci. 76: 365-371.

Álvarez, J. M., Almendros, P., Obrador, A. 2010. Navy bean response to residual effects of soil fertilization with synthetic chelates. Soil Fert. Plant Nutr. 74: 1228-1238.

Álvarez, J.M., Almendros, P., González, D. 2009. Residual effects of natural Zn chelates on navy bean response, Zn leaching and soil Zn status. Plant Soil. 317: 277-291.

Álvarez, J. M. 2007. Influence of soil type on the mobility and bioavailability of chelated zinc. J. Agric. Food Chem., 55: 3568-3576.

Álvarez, J. M., Rico, M. I. 2003. Effects of zinc complexes on the distribution of zinc in calcareous soil and zinc uptake by maize. J. Agric. Food Chem. 51: 5760-5767.

Álvarez, J. M., Navillo, J. Obrador, A. and López-Valdivia, M. 2001. Mobility and leachability of zinc in two soils treated with six organic complexes. J. Agric. Food. Chem. 49: 3833-3840.

Álvarez, J. M., Rico, M.I, Obrador, A. 1996 Lixiviation and extraction of zinc in a calcareous soil treated with Zn-Chelated Fertilizers. J. Agri. Food Chem. 44: 3383-3387.

Álvarez-Fernández, A., Pérez Sanz, A., Lucena J.J. 2001. Evaluation of effect of washing procedures on minerals analysis of orange and peach leaves sprayed with seaweed extracts enriched with iron. Commun. Soil Sci. Plant Anal 32: 157-170.

Armour, J.D., Robson A. D., Ritchie, G. S. P. 1990. Prediction of zinc deficiency in navy beans (*Phaseolus vulgaris*) by soil and plant analysis. Austr. J. Exp. Agric. 30: 557-563.

Barber, S. 1995. Soil nutrient bioavailability. USA. ISBN: 0-471-58747-8.

Bergmann, Werner. 1992. Nutritional disorders of plants. Development, visual and analytical. New York. USA. ISBN: 3-334-60422-5.

Benedicto, A., Hernández-Apaolaza, L., Rivas, I., Lucena, J.J. 2011. Determination of ⁶⁷Zn distribution in navy bean (*Phaseolus vulgaris* L.) after foliar application of ⁶⁷Zn-lignosulfonates using isotope pattern deconvolution. J. Agric. Food Chem. 59: 8829-8838.

Benedicto, A., Lopez-Rayó, S, Hernández-Apaolaza, L., Lucena J.J. 2009. Modified Zn-lignosulfonate complexes as Zn fertilizers for Navy beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in hydroponics. In P. Sequi, D. Ferri, E. Rea, F. Montemurro, A.V. Vonella, F. Fornarommore (Eds.). Sustainability in Agriculture: New Fertilizers and Fertilization Management - 18th International Symposium of CIEC. Fertilitas Agrorum, Rome Italy. pp 23-28

Benton Jones, J. Jr. and Mills, H. 1991. Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide. Micro-Macro Publishing, Inc. ISBN: 1-878148-001.

Benton Storey, J. 2007 Zinc. Handbook of Plant Nutrition. . Chapter 15. Ed. Barker, A. and Pilbeam, D. USA. ISBN: 0-8247-5904-4.

BOE: Boletín oficial del Estado nº72, 2005, Sec. I, pp: 31871-31910. Orden PRE/630/2011, de 23 de marzo, por la que se modifican los Anexos I, II, III, IV, V y VI del Real Decreto 824/2005, del 8 de julio, sobre productos fertilizantes.

BOE: Boletín oficial del Estado nº171, 2005. Pp: 25592-25669. Real Decreto 824/2005, de 8 de julio sobre productos fertilizantes.

Brown, J and Legget, G. 1967. Zinc deficiency symptoms of beans. Eighteenth Annual Fertilizer Conference of the Pacific Northwest. Twin Falls, Idaho.

Broadley, M. R., White, P.J., Hammond J.P., Zelko, I., Lux, A. 2007. Zinc in plants. Tansley Review. New Phytol. 173: 677-702.

Bucheli-Witschel, M. & Egli, T. 2000. Enviromental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. FEMS Microbiol. Rev. 25: 69-106.

Cakmak, I. 2009. Enrichment of fertilizers with zinc: An excellent investment for humanity and crop production in India. J. Trace Elem. Med. Biol. 23: 281-289.

Cadahía, C. Eymar, E., Lucena J.J. 2005 Materiales fertilizantes utilizados en fertirrigación *En* Cadahía (Ed.) Fertirrigación: cultivos hortícolas, frutales y ornamentales. Capítulo 3.. Mundi Prensa., 3ª edición, Madrid. ISBN: 84-8476-247-5.

Ekeberg, D., Sandersen Gretland, K., Gustafsson, J., Bråten, S.V., Fedheim, G. E. 2006. Characterisation of lignosulphonates and kraf lignin by hydrophobic interaction chromatography. Anal. Chim. Acta 565: 121-128.

Gangloff, W.J., Westfall, D.G., Peterson, G.A., and Mortvedt, J.J. (2006): Mobility of organic and inorganic zinc fertilizers in soils. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 37: 199-209.

Gárate, A and Lucena, J. J. 2010. Chelates and complexes in agriculture. Agriculture Sciences: Topics in modern agriculture. Studium Press, LLC. USA. ISBN: 1-933699-48-5

García-Mina, J.M., Cantera, R. G., Zamarreño, A. 2003. Interaction of different iron chelates with an alkaline and calcareous soil: a complementary methodology to evaluate the performance of iron compounds in the correction of iron chlorosis. J. Plant Nutr. 26: 1943-1954

Goos, R. J., Jhonson, B. E., Thiollet, M. A. 2000. A comparison of the availability of three zinc sources to maize (*Zea mays* L.) under greenhouse conditions. Biol. Fert. Soils. 31: 343-347.

Horton S., Alderman H. and Rivera J. 2008. Copenhagen Consensus Challenge Paper. Hunger and Malnutrition.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 1992. Trace elements in soils and plants (2nd edition). CRC Press, Boca Raton, EE.UU. ISBN: 978-0-8-493-6643-7.

Lindsay, W. L. 1995. Chemical reactions in soil that affect iron availability to plants. A quantitative approach. In J. Abadía (ed.). Iron Nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 7-14. ISBN: 978-94-010-4224-6.

Lindsay, W. L. 1979. Chemical Equilibria in Soils. J Wiley and sons. New York, EE.UU. ISBN: 0-471-02704-9.

López-Valdivia, L. M., Fernández, M. D., Obrador, A. & Álvarez, J. M. 2002. Zinc transformations in acidic soil and zinc efficiency on maize by adding six organic zinc complexes. J.Agric. Food Chem. 50: 1455-1460.

Lucena, J. J. 2003. Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in Strategy I plants. J. Plant Nutr. 26: 1969 – 1984.

Lucena, J. J. 2007. Synthetic Iron Chelates to correct Iron Deficiency in Plants. In Barton, L. and Abadía, J. (ed). Iron Nutrition in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp: 103-128. ISBN: 978-1-4020-4742-8.

Lucena, J.J. 2009, El empleo de complejantes y quelatos en la fertilización de micronutrientes. CERES. 56: 527-535.

Lucena, J.J., Gárate, A., Villén M. 2010. Stability in solution and reactivity with soils and soil components of iron and zinc complexes. J. Plant Nutr. Soil Sci. 173: 900-906.

Ma, X., and Pawlik, M. 2007. The effect of lignosulfonates on the floatability of talc. Int. J. Miner. Process 83: 19-27.

Martín-Ortíz, D., Hernández-Apaolaza, L., Gárate, A. 2009. Efficiency of a NPK fertilizer with adhered zinc lignosulfonate as a Zinc Source for Maize (*Zea mays* L.). J. Agric. Food Chem. 57: 9071-9078.

Martín-Ortíz, D., Hernández-Apaolaza, L., Gárate, A. 2009. Efficiency of a zinc lignosulfonate as Zn source for wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) under hydroponic culture conditions. J. Agric. Food Chem. 57: 226-231.

Marschner, H. 2012. Mineral Nutrition for Higher Plants. Academic Press, 3ª edition, Londres. ISBN: 978-0-12-384905-2.

Navarro Blaya, S., Navarro García, G. 2003. Química Agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Mundi Prensa. Madrid. ISBN: 978-8-48-476155-6.

Prasad, B.; Sinha, M. K. 1981. The relative efficiency of zinc carriers on growth and zinc nutrition of corn. Plant Soil 62: 45-52.

Ratto, S., Miguez, F. H. 2006. Cinc en el cultivo de maíz, deficiencia de oportunidad. Informaciones Agronómicas del Cono Sur. 31:11-14.

Rico, M. I., Álvarez, J. M., Mingot, J. I. 1996. Efficiency of zinc ethylenediaminetetraacetate and zinc lignosulfonate soluble and coated fertilizers for maize in calcareous soil. J. Agric. Food Chem.. 44: 3219-3223.

Rodríguez-Castrillón, J.; Moldován, M.; García Alonso, J.; Lucena, J.J.; García-Tomé, M.; Hernández-Apaolaza, L. Isotope pattern deconvolution as a tool to study iron metabolism in plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 390: 579-590.

Santos, S. 2011. Comparación entre distintos Lignosulfonatos de zinc como fertilizantes aplicados al suelo en cultivo de judía. Trabajo fin de Máster. Departamento de Química Agrícola. Universidad Autónoma de Madrid.

Singh, J. P., Karamanos, R. E., Lewis, N. G. 1986. Effectiveness of zinc fertilizer sources on nutrition of beans. *Can. J. Soil Sci.* 66: 183-187.

Soltanpour, P. N. Schawb, A.P. 1977. A new soil test for simultaneous extraction of macro and micro-nutrients in alkaline soils. *Commun Soil Sci. Plant Anal.* 8: 195 -207.

Tsonev, T., Cebola Lidon, F. 2012. Zinc in Plants. An overview. *Emir. J. Food Agric.* 2012 24: 322-333.

Valenzuela, J. L., Sánchez, A., Romero Monreal, L. M. 1993. Análisis nutricional de las plantas mediante técnicas analíticas y bioquímicas. L. Romero Ed. ISBN: 978-8-4604-7468-5.

Villén, M., Lucena, J.J., Cartagena, M. C., Bravo, R., García-Mina, J. M., Martín de la Hinojosa, I. 2007. Comparison of two analytical methods for the evaluation of the complexed metal in fertilizers and the complexing capacity of complexing agents. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5746-5753.

Xie, R. J., O'Halloran, I. P., Mac Kenzie, A. F., Fyles, J. W. 1994. Concurrent transformation of Lignosulfonate Carbon and Urea Nitrogen in a clay soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58: 824-828.

Wedepohl, K.H. 1978 *Handbook of Geochemistry*, Springer Verlag, New York.

Weihua Zhang, Hao Huang, Fenfang Tan, Hong Wuang, Rongliang Quiu. 2010. Influence of EDTA washing on the species and mobility of heavy metals residual in soils. *J. Haz. Mat.* 173: 369-376.

Zhor, J. 2005. Molecular structure and performance of lignosulfonates in cement-water systems. Heritage Branch Published. Canadá. ISBN: 978-0-494-41252-7.

Referencias utilizadas en Internet:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/471038?lang=es®ion=ES>

Fecha de acceso: 12/06/2014.

http://files.givewell.org/files/DWDA%202009/ICCIDD/CP_Malnutrition_and_Hunger_-_Horton.pdf

Fecha de acceso: 12/06/2014

<http://www2.lwr.kth.se/English/Oursoftware/vminteq/>

Fecha de acceso: 16/06/2014

ANEXO

7 ANEXO

Tabla A: Valores de Peso seco de los distintos tejidos vegetales después de 21 días de aplicados los tratamientos. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). ns= no significativo.

Tratamientos	Hoja (g)	Tallo (g)	Raíz (g)
Control	$1,37 \pm 0,12^{abc}$	$1,03 \pm 0,14^{bcd}$	$1,41 \pm 0,38^b$
065 LSE	$1,23 \pm 0,09^b$	$0,94 \pm 0,05^{cd}$	$1,68 \pm 0,41^{ab}$
LSE	$1,30 \pm 0,06^{ab}$	$1,09 \pm 0,07^{bc}$	$1,67 \pm 0,78^{ab}$
2 LSE	$1,33 \pm 0,17^{ab}$	$1,14 \pm 0,08^{ab}$	$1,69 \pm 0,38^{ab}$
0,65 LSA	$1,45 \pm 0,16^a$	$1,25 \pm 0,07^a$	$2,22 \pm 0,69^a$
LSA	$1,29 \pm 0,10^{ab}$	$1,03 \pm 0,14^{bcd}$	$1,69 \pm 0,55^{ab}$
2 LSA	$1,37 \pm 0,23^{ab}$	$0,90 \pm 0,11^{cd}$	$1,13 \pm 0,35^{ab}$
EDTA	$1,48 \pm 0,17^a$	$1,08 \pm 0,16^{bc}$	$1,19 \pm 0,19^b$

Tabla B: Contenido de Zn_{Fe} y Zn_{Na} ($\mu\text{mol Tiesto}^{-1}$) con su error típico en hojas de judía medido por ICP-MS luego de 21 días de aplicados los tratamientos. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). ns= no significativo, nd=no detectado.

	Hojas		
	Zn_{Fe}	Zn_{Na}	Zn_{Total}
Control	nd	$0,53 \pm 0,09^{bc}$	$0,53 \pm 0,04^b$
0,65 LSE	$0,15 \pm 0,07^b$	$0,43 \pm 0,07^c$	$0,58 \pm 0,05^b$
LSE	$0,20 \pm 0,02^{ab}$	$0,51 \pm 0,15^{bc}$	$0,71 \pm 0,13^b$
2 LSE	$0,34 \pm 0,24^a$	$0,40 \pm 0,20^c$	$0,74 \pm 0,06^b$
0,65 LSA	$0,10 \pm 0,08^b$	$0,64 \pm 0,13^b$	$0,75 \pm 0,06^b$
LSA	$0,09 \pm 0,05^b$	$0,63 \pm 0,13^b$	$0,72 \pm 0,06^b$
2 LSA	$0,15 \pm 0,10^b$	$0,48 \pm 0,14^{bc}$	$0,64 \pm 0,08^b$
EDTA	$0,26 \pm 0,03^{ab}$	$0,95 \pm 0,16^a$	$1,20 \pm 0,07^a$

Tabla C: Contenido de Zn_{Fe} y Zn_{Na} ($\mu\text{mol Tiesto}^{-1}$) con su error típico en tallos de judía medido por ICP-MS luego de 21 días de aplicados los tratamientos. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). ns= no significativo, nd= no detectado.

	Tallos		
	Zn_{Fe}	Zn_{Na}	Zn_{Total}
Control	nd	$0,33 \pm 0,30^{ab}$	$0,33 \pm 0,01^b$
0,65 LSE	$0,07 \pm 0,03^b$	$0,33 \pm 0,07^{ab}$	$0,39 \pm 0,02^{ab}$
LSE	$0,08 \pm 0,05^{ab}$	$0,33 \pm 0,03^{ab}$	$0,41 \pm 0,03^{ab}$
2 LSE	$0,15 \pm 0,10^a$	$0,37 \pm 0,14^{ab}$	$0,52 \pm 0,09^a$
0,65 LSA	$0,05 \pm 0,04^b$	$0,31 \pm 0,01^{ab}$	$0,36 \pm 0,02^b$
LSA	$0,06 \pm 0,02^b$	$0,26 \pm 0,10^b$	$0,32 \pm 0,05_b$
2 LSA	$0,10 \pm 0,06^{ab}$	$0,25 \pm 0,10^b$	$0,35 \pm 0,05^b$
EDTA	$0,13 \pm 0,02^{ab}$	$0,40 \pm 0,11^a$	$0,52 \pm 0,06^a$

Tabla D: Contenido de Zn_{Fe} y Zn_{Na} ($\mu\text{mol Tiesto}^{-1}$) con su error típico en raíces de judía medido por ICP-MS luego de 21 días de aplicados los tratamientos. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). ns= no significativo, nd= no detectado.

	Raíces		
	Zn_{Fe}	Zn_{Na}	Zn_{Total}
Control	nd	$0,69 \pm 0,19^{bc}$	$1,06 \pm 0,09^c$
0,65 LSE	$0,25 \pm 0,15^{ns}$	$0,86 \pm 0,24^b$	$1,11 \pm 0,16^{abc}$
LSE	$0,25 \pm 0,32$	$0,73 \pm 0,30^b$	$0,97 \pm 0,27^{abc}$
2 LSE	$0,47 \pm 0,35$	$0,75 \pm 0,15^b$	$1,22 \pm 0,16^{ab}$
0,65 LSA	$0,14 \pm 0,15$	$0,86 \pm 0,25^b$	$1,00 \pm 0,14^{abc}$
LSA	$0,20 \pm 0,15$	$0,57 \pm 0,15^{bc}$	$0,77 \pm 0,10^{bc}$
2 LSA	$0,31 \pm 0,24$	$0,41 \pm 0,06^{bc}$	$0,71 \pm 0,12^{bc}$
EDTA	$0,30 \pm 0,09$	$1,15 \pm 0,20^a$	$1,45 \pm 0,12^a$

Tabla E: Contenido de Zn_{Fer} y Zn_{Nat} ($\mu\text{mol Tiesto}^{-1}$) con su error típico en la fracción soluble de suelo cultivado y sin cultivar medido por ICP-MS. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). ns= no significativo, nd= no detectado.

Tratamientos	Con Cultivo		Sin Cultivo	
	Zn_{Fer}	Zn_{Nat}	Zn_{Fer}	Zn_{Nat}
Control	nd	$0,59 \pm 0,05^b$	nd	$0,18 \pm 0,00^{ns}$
0,65 LSE	$0,05 \pm 0,01^c$	$0,45 \pm 0,05^b$	$0,01 \pm 0,00^b$	$0,19 \pm 0,00$
LSE	$0,09 \pm 0,01^b$	$0,49 \pm 0,06^b$	$0,02 \pm 0,00^b$	$0,17 \pm 0,01$
2 LSE	$0,19 \pm 0,01^a$	$0,60 \pm 0,04^b$	$0,05 \pm 0,01^b$	$0,21 \pm 0,01$
0,65 LSA	$0,06 \pm 0,02^{bc}$	$0,61 \pm 0,11^b$	$0,02 \pm 0,00^b$	$0,32 \pm 0,07$
LSA	$0,10 \pm 0,01^b$	$0,49 \pm 0,08^b$	$0,02 \pm 0,00^b$	$0,21 \pm 0,02$
2 LSA	$0,17 \pm 0,02^a$	$0,70 \pm 0,10^b$	$0,04 \pm 0,00^b$	$0,25 \pm 0,01$
EDTA	$0,21 \pm 0,02^a$	$1,59 \pm 0,22^a$	$0,09 \pm 0,02^a$	$0,39 \pm 0,01$

Tabla F: Contenido de Zn_{Fer} y Zn_{Nat} ($\mu\text{mol Tiesto}^{-1}$) con su error típico en la fracción disponible de suelo cultivado y sin cultivar medido por ICP-MS. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$). ns= no significativo, nd= no detectado.

Tratamientos	Con Cultivo		Sin Cultivo	
	Zn_{Fer}	Zn_{Nat}	Zn_{Fer}	Zn_{Nat}
Control	nd	$11,5 \pm 0,54^a$	nd	$13,9 \pm 1,76^{ab}$
0,65 LSE	$0,84 \pm 0,09^d$	$10,6 \pm 0,25^{ab}$	$1,46 \pm 0,04^b$	$15,1 \pm 0,22^{ab}$
LSE	$1,62 \pm 0,13^{bc}$	$9,88 \pm 0,31^b$	$2,59 \pm 0,06^{ab}$	$15,5 \pm 0,63^{ab}$
2 LSE	$3,40 \pm 0,19^a$	$10,0 \pm 0,38^b$	$4,27 \pm 1,70^a$	$17,3 \pm 0,77^a$
0,65 LSA	$0,93 \pm 0,08^d$	$10,3 \pm 0,47^{ab}$	$1,29 \pm 0,10^b$	$14,2 \pm 1,16^{ab}$
LSA	$1,79 \pm 0,10^b$	$10,4 \pm 0,20^{ab}$	$2,75 \pm 0,26^{ab}$	$16,5 \pm 1,51^a$
2 LSA	$3,69 \pm 0,20^a$	$10,8 \pm 0,30^{ab}$	$4,27 \pm 0,16^a$	$12,4 \pm 0,34^b$
EDTA	$1,36 \pm 0,13^c$	$10,3 \pm 0,10^{ab}$	$1,67 \pm 0,15^b$	$12,1 \pm 0,59^b$

Tabla G: Porcentaje (%) de Zn_{Fe} con su error típico presente en la planta y el suelo. Letras diferentes para cada serie denotan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados según el Test de Duncan ($\alpha=0,05$).

Tratamientos	Planta	Suelo
0,65 LSE	34 ± 7,8^a	66 ± 7,8 ^b
LSE	22 ± 8,2 ^{ab}	78 ± 8,2 ^{ab}
2 LSE	21 ± 5,8 ^{ab}	80 ± 5,8 ^{ab}
0,65 LSA	22 ± 8,1 ^{ab}	78 ± 8,1 ^{ab}
LSA	15 ± 4,4 ^{ab}	85 ± 4,4 ^{ab}
2 LSA	13 ± 3,8 ^b	87 ± 3,8^a
EDTA	30 ± 0,5 ^{ab}	70 ± 0,5 ^{ab}