

NUTRICIÓN FÉRRICA DE LOS CULTIVOS.

JUÁREZ, M.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A.; CERDÁN, M.

Depto. Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. 03080. ALICANTE

margarita.juarez@ua.es

Introducción.....	1
Causas de la deficiencia de hierro.....	3
A. Disponibilidad de hierro en el suelo.....	3
B. Concentración de ión bicarbonato.....	4
C. Otros factores.....	5
Corrección de la deficiencia de hierro.....	6
Situación de los quelatos de hierro en la agricultura.....	7
Quelantes EDDHA y EDDHMA.....	9
Pureza de los quelatos comerciales.....	11
Estabilidad de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA frente al pH e iones competidores....	12
Reactividad del quelato FeEDDHA con los componentes del suelo.....	18
Capacidad de las plantas para tomar el hierro quelado.....	19
Efecto de la materia orgánica en la toma de hierro quelado.....	21
Efecto del quelante residual.....	25
Conclusiones.....	26
Bibliografía.....	27

INTRODUCCIÓN.

Para que un cultivo se desarrolle de forma óptima, es necesario que la concentración de nutrientes en la disolución del suelo sea suficiente para satisfacer las necesidades del vegetal. Sin embargo, las condiciones ambientales que envuelven a los cultivos (características de los suelos y sustratos, estrés hídrico, ataque de insectos, hongos, bacterias, virus, etc.), pueden causar deficiencias nutricionales sobre todo en lo que se refiere a micronutrientes.

Uno de los problemas más graves a los que se enfrenta la agricultura en amplias regiones del mundo es la deficiencia de hierro, que da lugar a una disminución o inactivación de todos los procesos fisiológicos en los que interviene el Fe y en particular, la síntesis de clorofila. Aunque son varias las causas que inducen la aparición del déficit de Fe en el vegetal (Marschner, 1995), una de las causas más común es la presencia de altos niveles de carbonatos en el suelo de cultivo que hacen que el pH de los mismos esté fuertemente tamponado a valores en torno a 8 (Lindsay, 1979, 1991), lo que se traduce en una baja solubilidad del Fe en el suelo, en la mayoría de los casos insuficiente para cubrir las necesidades del vegetal, y en la inhibición de los mecanismos de toma de Fe por las plantas (Lucena, 2000). A esto hay que sumar el que, en muchos casos, estos suelos se presentan en zonas áridas y semiáridas donde las bajas precipitaciones anuales (<500 mm), típicas de

estas regiones agravan esta situación. En general, este desorden nutricional presenta una destacada incidencia en un gran número de cultivos de alto interés comercial tales como cítricos, melocotonero, kiwi, arroz, tomates, etc...., que necesitan ser tratados con Fe cada año (Sanz et al., 1992; Jaegger et al., 2000). En Europa, el mayor impacto de la deficiencia de hierro se observa en España, donde se estima que unas 284.381 ha destinadas a cultivo de cítricos, melocotoneros, tomate y frutales sufren este problema (M.A.P.A. 2007).

La mejor forma de evitar la carencia de hierro en los cultivos es la aplicación de quelatos de hierro. De la gran variedad de estos productos existentes en el mercado (unos 279 en España (de Liñán, 2007), los constituidos a base de FeEDDHA (etilendiamino-di-o-hidroxifenilacetato ferrato(III)) y FeEDDHMA (etilendiamino-di-(o-hidroxip-metilfenilacetato) ferrato(III)) son los más eficaces en suelos, sustratos y aguas calizas, ya que es máxima su estabilidad frente al pH en el rango de pH 4-9 (Halvorson y Lindsay, 1972; Norvell, 1991) y mínima su reactividad con los componentes del suelo (Álvarez-Fernández et al., 2002). Se puede estimar que el gasto en estos fertilizantes representa en muchos casos un valor superior al 50% de los fertilizantes adicionados a los cultivos.

Las plantas toman preferentemente el hierro como Fe(II), para ello se ven obligadas a reducir la forma predominante de hierro en los suelos aerobios (Fe(III)). Este proceso lo realiza la enzima reductasa, situada en la membrana plasmática de la raíz (Bienfait, 1985; Römheld, 1987). En deficiencia de hierro, las plantas superiores han desarrollado una serie de mecanismos para aumentar la disponibilidad del Fe en la disolución del suelo, las denominadas Estrategia I y Estrategia II (Marschner et al., 1986; Hopkins et al., 1992). La Estrategia II se caracteriza por la liberación por las raíces vegetales de los denominados fitosideróforos, compuestos que forman quelatos muy estables con el hierro(III) y que la planta toma de forma muy específica (Marschner, 1995). La Estrategia I comprende cambios morfológicos y fisiológicos. La respuesta fisiológica incluye un aumento de la liberación de protones con la consiguiente acidificación de la rizosfera (Brown, 1978), liberación de sustancias reductoras y/o quelantes como compuestos fenólicos o flavinas (Welkie y Miller, 1960; Susín et al., 1996), y un mecanismo de dos etapas para la toma de hierro por el cual primero el hierro es reducido por una reductasa de quelatos férricos en la membrana plasmática (Moog y Brüggemann, 1994; Robinson et al., 1999) y a continuación es absorbido como Fe(II) (Chaney et al., 1972; Eide et al., 1996; Fox y Guerinot, 1998). Los cambios morfológicos consisten en un aumento en la formación de raíces laterales, pelos radiculares y células de transición (Kramer et al., 1980; Landsberg, 1982; Marschner et al., 1986; López-Millán et al., 2001). En suelos calizos, la eficacia de la Estrategia I se puede ver reducida debido a que el alto contenido en iones bicarbonato de estos suelos puede

neutralizar los protones liberados por las raíces, perjudicando tanto la solubilización de hierro como la actividad de la reductasa de quelatos férricos. Esto da lugar a una menor eficacia de la Estrategia I en la toma de hierro.

En las últimas décadas se han ido estableciendo una serie de efectos bioestimulantes de la materia orgánica sobre el vegetal, que se traducen fundamentalmente en: cambios en la permeabilidad de las membranas (Vigneault et al., 2000); y modificación de determinadas actividades enzimáticas implicadas en la toma y el metabolismo de nutrientes, especialmente hierro y nitrógeno (Pinton et al., 1997; Varanini et al., 1993; Varanini y Pinton 2000).

El hierro es uno de los nutrientes que más limitan la producción vegetal en medios calizos. La corrección de la deficiencia de hierro supone la aplicación a los cultivos de cantidades importantes de productos de síntesis, de un alto coste económico, y la inclusión en el medio ambiente de compuestos extraños al mismo. En este documento se analiza la eficacia de los quelatos de hierro de uso agrícola en medios calizos, de acuerdo con su: estabilidad tanto frente al pH como a la presencia de iones competidores, interacción con suelos calizos, capacidad de las plantas para tomar el hierro quelado y el efecto bioestimulante de las sustancias húmicas en la toma de hierro por los vegetales.

CAUSAS DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO.

Las causas de la deficiencia de hierro son múltiples y de distinta naturaleza, destacan: disponibilidad de hierro y concentración de ión bicarbonato en el medio de desarrollo, y otros factores como: interacción entre el Fe y otros nutrientes, humedad, enmienda orgánica, temperaturas extremas.

A. Disponibilidad de hierro en el suelo.

La deficiencia de hierro, normalmente, no se produce porque la concentración total de Fe en el suelo sea baja, ya que es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre después de oxígeno, silicio y aluminio (Lindsay, 1979), sino porque existen varios factores tales como: pH, potencial redox, tipo de mineral al que está asociado el hierro, ..., que hacen que la cantidad que permanece en disolución sea muy baja.

En la mayoría de los minerales primarios del suelo el hierro se encuentra como Fe (II), que durante la meteorización en medios aerobios precipita como óxidos e hidróxidos de Fe(III) muy insolubles. Este hecho hace que en los suelos puedan coexistir óxidos e hidróxidos de hierro con distintas composiciones y grados de cristalización y por tanto, con

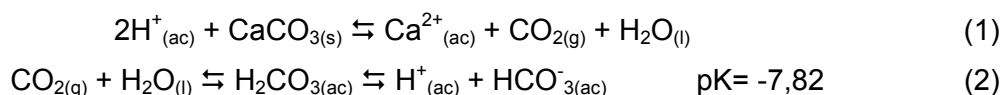
distinta solubilidad. Los estudios realizados por Lindsay (1979, 1991), en relación a la distinta solubilidad de los diferentes óxidos e hidróxidos de hierro en el suelo, ponen de manifiesto que: i) el óxido de Fe amorfo sería el más soluble mientras la goethita sería la de menor solubilidad. ii) La solubilidad de los óxidos e hidróxidos de Fe(III) presentes en el medio está muy relacionada con el pH del suelo, de este modo la solubilidad desciende 1000 veces por cada unidad que aumenta el pH, reduciendo la concentración de Fe soluble a valores inferiores a 10^{-20} M para un valor de pH entorno a 7,5. iii) La región de mínima solubilidad del hierro corresponde al rango de pH entre 7,5 y 8,5, que coincide con el de los suelos calizos. La concentración de Fe para este intervalo de pH es de $10^{-10,4}$ M aproximadamente, cantidad insuficiente para el óptimo crecimiento de las plantas, que requieren un intervalo de Fe soluble entre 10^{-9} y 10^{-4} M en el medio (Guerinot y Yi, 1994).

La solubilidad del Fe en un suelo también depende del contenido en materia orgánica del mismo. Así, la asociación del hierro con los agentes quelantes de la materia orgánica da lugar a la formación de complejos que incrementan considerablemente la concentración y la movilidad de este nutriente en la disolución del suelo (Lobartini y Orioli, 1988; Cesco et al., 2000). Estos agentes quelantes tienen distinta procedencia tales como la transformación de la materia orgánica (ácidos fúlvicos, aminoácidos, ...), los compuestos exudados por las raíces del vegetal (fitosideróforos), y los segregados por los microorganismos (sideróforos).

Puesto que el hierro puede presentar dos estados de oxidación, el potencial redox del suelo es otro de los factores que influye en el contenido de este nutriente en disolución. En suelos bien aireados, condiciones en las que se encuentran normalmente los suelos de cultivo, el Fe(III) no se ve alterado por el potencial redox, siendo las especies hidrolizadas y la fase sólida las que controlan la solubilidad (Lindsay y Schwab, 1982).

B. Concentración de ión bicarbonato.

En los suelos calizos el pH de la disolución del suelo y la concentración de ión bicarbonato están controlados por las reacciones:



Esto hace que la mayoría de los suelos calizos tengan un valor de pH que oscila entre 7,5 y 8,5; pudiendo llegar incluso a valores superiores a 9 cuando en los suelos existen contenidos apreciables de NaHCO_3 disuelto. A estos pH la concentración de Fe soluble es bastante baja (Lindsay, 1979, 1991; Lindsay y Schwab, 1982) y por tanto se

dificulta la nutrición férrica del vegetal. Además, se ven perjudicados los principales mecanismos de respuesta de la planta a la deficiencia de hierro: se neutralizan los protones liberados por el vegetal, la alcalinización reduce la secreción de compuestos fenólicos y dificulta la reducción de Fe(III) en la membrana plasmática (Römheld y Marschner, 1986). Todo ello conduce a una disminución en la toma y transporte de hierro por la planta.

C. Otros factores.

1. Temperaturas extremas.

Las bajas temperaturas disminuyen el desarrollo radicular y por tanto, provocan una reducción en la capacidad de absorción del Fe por la planta (Chaney, 1984). Lahav y Turner (1984) estudiaron el efecto de la temperatura en el proceso de absorción del Fe en plataneras. Estos autores encontraron que el máximo de absorción se producía por encima de los 37/30°C (temperatura día/noche) y que cuando las temperaturas descendían hasta los 17/10°C, la absorción era dos o tres veces menor que en el óptimo de temperatura.

2. Competencia del Fe con otros iones por los centros de toma.

La presencia de elevadas concentraciones de macronutrientes, micronutrientes y metales pesados pueden afectar el grado de clorosis desarrollado por los cultivos.

En relación a los macronutrientes, Loeppert et al. (1994) observaron que altos niveles de **Na** y **K** provocaban un incremento de la clorosis en el vegetal debido al deterioro que generan en la estructura del suelo, en las relaciones suelo-agua y en la aireación bajo condiciones de humedad.

Por otro lado, la presencia de elevadas concentraciones de metales como **Cu**, **Zn**, **Cd**, **Ni**... en el medio, también pueden afectar a la respuesta de las plantas frente a situaciones de estrés férrico, ya que pueden inhibir considerablemente el funcionamiento de la reductasa férrica de la raíz. Cabe señalar que la inhibición que sufre esta enzima va a depender del cultivo y de las concentraciones en las que los metales se encuentren en la disolución del suelo.

Además estos iones también compiten con el Fe(II) a nivel absorción. Así, cuando el Zn está presente en altas concentraciones puede competir con el Fe²⁺ por las zonas de transporte o bien, producir una menor afinidad de dicho ión por esos sistemas de transporte debido a que se producen alteraciones estructurales o bioquímicas (Zaharieva y Römheld, 2000).

3. Aumento de la concentración de CO₂ en los suelos

En los suelos encharcados se produce una acumulación de CO₂ debido a la menor velocidad de difusión de los gases en el agua. Este exceso de CO₂ provoca la aparición de bicarbonato y protones de acuerdo con la reacción 2; con los efectos indicados en el apartado B.

Por tanto, para cubrir la demanda de hierro de los vegetales, es necesario incorporar al suelo compuestos de hierro solubles y estables a los valores de pH de los suelos calizos y que sean capaces de ceder su hierro a los vegetales.

CORRECCIÓN DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO.

Hagstrom (1984) clasificó los materiales para la corrección de la deficiencia de hierro en: 1) Compuestos inorgánicos de hierro (sulfato ferroso, sulfato férrico, sulfato ferroso amónico, fosfato de hierro sintético (vivianita)). 2) Quelatos sintéticos de hierro (FeEDTA, FeHEEDTA, FeDTPA, Fe(o,o-EDDHA), Fe(o,p-EDDHA), Fe(o,o-EDDHMA), Fe(o,p-EDDHMA), Fe(p,o-EDDHMA), Fe(2,4-EDDCHA), Fe(5,2-EDDCHA, FeEDDHSA). 3) Compuestos orgánicos (lignosulfatos de hierro, fenoles (Fe), poliflavonoides (Fe)). 4) Enmiendas acidificantes del suelo. 5) Subproductos industriales y basuras.

Las sales inorgánicas de hierro, cuando se adicionan a suelos calizos, el hierro que contienen precipita en forma de hidróxido, esto mismo ocurre si se emplean con aguas ricas en carbonatos (Abadía et al., 2004). Su aplicación vía foliar da mejores resultados, siempre que se apliquen con un tensioactivo (Lucena, 1990, Sanz et al., 1992; Chen, 1997; Álvarez-Fernández et al., 2004). La materia orgánica en los suelos calizos no tiene mucho efecto en la mejora de la nutrición férrica ya que en este medio, su velocidad de mineralización es muy rápida, no hemos de olvidar que la capacidad de los materiales orgánicos para mejorar la nutrición férrica se debe a su capacidad para formar complejos estables y solubles en las condiciones del suelo, que han de ser transportados hasta las raíces vegetales para su descomposición y reducción del hierro por la reductasa radicular (Lucena, 2003). La aplicación de ácidos al suelo para prevenir o corregir la clorosis férrica, destinados a la disminución del pH con el consiguiente aumento de la solubilidad del Fe del mismo en suelos calizos, es eficaz a muy corto plazo, ya que el poder amortiguador del bicarbonato neutraliza el efecto rápidamente (Lucena, 2003).

Quelatos de hierro sintéticos.

A lo largo del tiempo han demostrado ser la mejor solución para la corrección de la deficiencia de hierro (Lucena, 2003). Su eficacia desde el punto de vista agrícola es

directamente proporcional a su capacidad para mantener hierro en forma disponible para la planta, en cantidad y durante el tiempo necesario para que ésta lo tome. La diferencia entre la eficacia de los distintos quelatos férricos para corregir la clorosis depende de: a) la estabilidad del quelato férrico, b) reactividad del quelato férrico con los componentes del suelo, c) la capacidad de las plantas para tomar el hierro aportado por el quelato.

Los agentes quelantes más utilizados son los derivados de ácidos policarboxílicos: EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), DTPA (Ácido etilentriaminopentaacético), HEEDTA (Ácido 2-hidroxi-etilendiaminotriacético), EDDHA (Ácido etilendiamino-di-(o-hidroxifenilacético)), EDDHMA (Ácido etilendiamino-di-(o-hidroxip-metilfenilacético)), EDDCHA (Ácido etilendiamino-di (2-hidroxip-4-carboxifenilacético)).

Debido a que, FeEDTA y FeHEDTA sólo son estables en condiciones ácidas, FeDTPA es estable tanto en condiciones ácidas como neutras, y que FeEDDHA y FeEDDHMA son estables en condiciones ácidas, neutras y alcalinas (Wreesmann y Bugter, 1998), unido a que los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA son los que mejor constante de estabilidad presentan (Lindsay y Schwab, 1982; Ahrlund et al., 1990), hace que los quelatos de Fe más eficaces en suelos calizos para aportar hierro al vegetal sean FeEDDHA y FeEDDHMA.

De acuerdo con Lindsay y Schwab (1982) y Moog y Brüggermann, (1994) el Fe(III) del quelato es reducido por la raíz a Fe(II), mediante la acción de la reductasa de quelatos férricos situada en la membrana plasmática de las células radiculares. La reducción de Fe(III) a Fe(II) produce una desestabilización del quelato de hierro dando lugar a su disociación, liberándose por una parte el agente quelante y por otra el Fe(II), que es absorbido por la raíz. El quelante libre podría quelar hierro de la fase sólida del suelo y transportarlo a la raíz continuando el proceso (Lucena, 2003).

SITUACIÓN DE LOS QUELATOS DE HIERRO EN LA AGRICULTURA.

El número de productos simples para tratar carencias de hierro ha aumentado progresivamente en el mercado mundial y en el español en particular; en España se ha pasado de encontrar en el mercado 108 preparaciones simples para combatir la clorosis férrica en 1990 a más de 300 en el año 2007 (de Liñan, 1990, 2007). De los cuales el 83 % tiene un agente quelante sintético, el 13 % un agente complejante (M.O, aminoácidos, lignosulfatos, etc) y 4% un agente quelante o complejante no declarado. Aunque la utilización de los quelatos férricos sintéticos en agricultura tiene como principal objetivo la corrección y la prevención de la clorosis férrica vía suelo, también son utilizados como

fuente de hierro en fertirrigación e hidroponía, ya que al igual que en la disolución del suelo, en las disoluciones nutritivas empleadas en fertirrigación e hidroponía es imprescindible que el hierro se mantenga soluble, y la forma más eficaz de hacerlo es aplicarlo en forma de quelatos.

El reglamento sobre abonos de la Comunidad Europea (nº 2003/2003 D.O.C.E. 21/11/2003) actualmente en vigencia, reconoce como agentes quelantes los siguientes compuestos:

Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA	$C_{10}H_{16}O_8N_2$
Ácido etilentriaminopentaacético	DTPA	$C_{14}H_{23}O_{10}N_3$
Ácido 2-hidroxietilendiaminotriacético	HEEDTA	$C_{10}H_{18}O_7N_2$
(o,o): Ácido etilendiamino-di-(o-hidroxifenilacético)	EDDHA	$C_{18}H_{20}O_6N_2$
(o,p): Ácido etilendiamino-di-(o-hidroxi-p-metilfenilacético)	EDDHMA	$C_{20}H_{24}O_6N_2$
(5,2): Ácido etilendiamino-di (5-carboxi-2-hidroxifenilacético)	EDDCHA	$C_{20}H_{20}O_{10}N_2$
(o,p): ácido etilendiamino-N-(o-hidroxifenilacético)-N'- (p-hidroxifenilacético)	EDDHA	$C_{18}H_{20}O_6N_2$
(o,o): ácido etilendiamino-di-(o-hidroxi-o-metilfenilacético)	EDDHMA	$C_{20}H_{24}O_6N_2$
(p,o): ácido etilendiamino-di-(p-hidroxi-o-metilfenilacético)	EDDHMA	$C_{20}H_{24}O_6N_2$
(2,4): ácido etilendiamino-di (2-hidroxi-4-carboxifenilacético)	EDDCHA	$C_{20}H_{20}O_{10}N_2$
(2,5): ácido etilendiamino-di (2-carboxi-5-hidroxifenilacético)	EDDCHA	$C_{20}H_{20}O_{10}N_2$
(2,5): ácido etilendiamino-di (2-hidroxi-5-sulfofenilacético) y sus productos de condensación	EDDHSA	$C_{18}H_{20}O_{12}N_2S_2 +$ $n*(C_{12}H_{14}O_8N_2S)$

De acuerdo con esta normativa se considera quelato de hierro al producto obtenido por combinación química de hierro con un agente quelante mencionado en la lista anterior, con un contenido mínimo de un 5% de Fe soluble en agua, del cual la fracción quelada al menos, ha de ser del 80%, con indicación de los agentes quelantes. Se ha de indicar en que intervalo de pH se garantiza una buena estabilidad de la fracción quelada, y el contenido en Fe soluble en agua, fracción quelada de acuerdo con EN 13366 y Fe quelado por cada agente quelante siempre que supere el 2% (EN 13368 partes 1 y 2)

La actual normativa en relación a la anterior (98/3/CE): 1) Amplia la lista de agentes quelatantes, pasan a considerarse quelatos compuestos que de acuerdo con la anterior se consideraban impurezas. 2) Permite la presencia de Fe quelado por más de un agente quelante en un mismo formulado comercial. 3) La fracción quelada, pasa a quedar definida, según la norma EN 13366. 4) Se ha de indicar el hierro quelado por cada uno de los agentes

quelantes, siempre que éste supere el mínimo del 2%. Se cita en este caso el método analítico EN 13368, partes 1 y 2.

QUELANTES EDDHA Y EDDHMA.

Dada la estructura de los quelantes policarboxílicos (Fig. 1), la síntesis de estos quelantes da lugar a la formación de isómeros posicionales. En el caso del EDDHA se obtienen tres de estos isómeros debido a que el grupo hidroxilo, puede entrar en posición *-orto* o en posición *-para* en el anillo aromático (Fig. 2): **Orto-orto EDDHA**, los dos hidroxilos entran en posición *-orto*. **Para-para EDDHA**, Los dos hidroxilos entran en posición *-para*. **Orto-para EDDHA**, un grupo hidroxilo entra en posición *-orto* y el otro en *-para*.

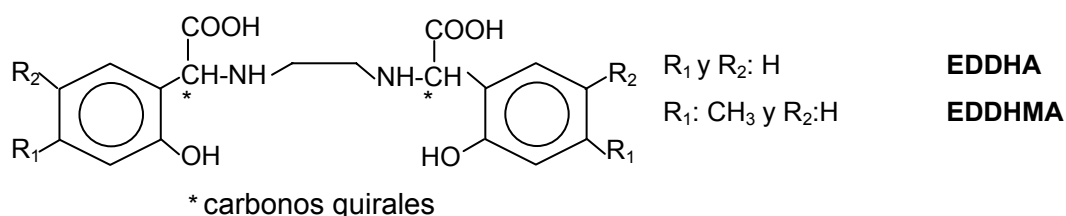


Fig. 1.- Estructura de las moléculas de EDDHA, EDDHMA.

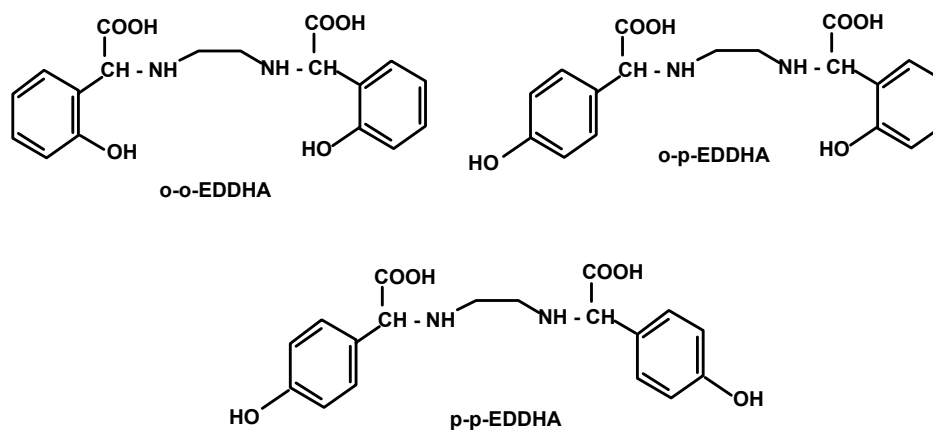


Fig. 2.- Isómeros EDDHA obtenidos por la síntesis de Dexter (1958).

A la hora de formar quelatos a partir del isómero *orto-orto*, los grupos hidroxilos se encuentran en una posición que favorece la formación del enlace Fe-fenol (Fig. 2). Esto permite que el Fe pueda formar seis enlaces de coordinación con la molécula de agente

quelante (dos enlaces con los átomos de nitrógeno, dos con los carboxilos y dos con los fenoles), dando lugar a una estructura de 5 anillos (2 anillos de 6 átomos y 3 de 5 átomos) muy estable que protege al Fe de su precipitación y del ataque de oxidantes. Si el EDDHA tiene los dos grupos hidroxilos en posición *para* (Fig. 2), la formación del enlace Fe-fenol está estéricamente impedida, por lo que el hierro sólo podrá formar cuatro enlaces de coordinación (dos con los carboxilos y dos con los átomos de nitrógeno), obteniéndose una estructura de 3 anillos de 5 átomos que es menos estable, y en consecuencia, menos eficaz como fertilizante. Cuando uno de los grupos hidroxilo se encuentra en posición *orto* y el otro en *para* (Fig. 2), se forma una estructura de 4 anillos (1 anillo de 6 átomos y 3 de 5 átomos) que da lugar a un quelato menos estable que el *orto-orto*, pero más que el *para-para*. Esto hace que los quelatos de hierro comerciales de FeEDDHA, sean una mezcla de estos tres isómeros posicionales, lo que repercute en su eficacia (Lucena, 2003).

Una situación similar se produce con el quelante EDDHMA, cuya síntesis también da lugar a tres isómeros posicionales (Fig. 3): **o,p-EDDHMA** con los dos OH en posición *orto* y los dos metilo en posición *para*; **o,o-EDDHMA** con los OH y los metilos en posición *orto*; y **p,o-EDDHMA**, con los dos metilos en posición *orto* y los dos OH en posición *para*, este isómero no puede realizar uniones entre el átomo de hierro y los fenoles.

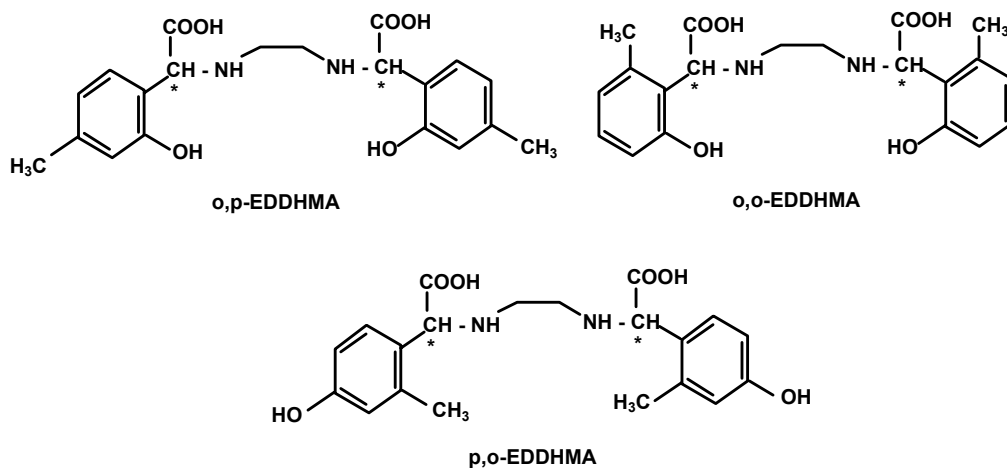


Fig. 3.- Isómeros del EDDHMA.

Las moléculas de quelante poseen dos carbonos quirales (Fig. 1) que dan lugar a dos isómeros ópticos, la forma meso y la mezcla racémica. Cuando los ligandos se unen al hierro, los dos isómeros ópticos forman dos isómeros geométricos: la mezcla racémica, que contiene dos enantiómeros con dos disposiciones espaciales diferentes, una en la que los

dos fenoles se encuentran en posición ecuatorial y otra en la que los dos fenoles están en posición axial; y la forma meso, que solo presenta una disposición espacial que corresponde a aquella que posee un fenol en posición ecuatorial con respecto al plano formado por el Fe y los dos N; y el otro fenol en posición axial (Lucena et al., 1996; Lucena, 2003). Los quelatos comerciales normalmente contienen la misma cantidad de ambos isómeros.

Si se comparan los pK de ambos isómeros geométricos dados por distintos investigadores (Tabla I), se encuentra que para el Fe(o,o-EDDHA) la mezcla d,l-racémica es el isómero más estable (Bannochie y Martell, 1989; Yunta et al., 2003). Mientras, en el caso del Fe(o,p-EDDHMA), el isómero meso es el más estable (Tabla I) (Ahrland et al., 1990; Yunta et al., 2003).

Tabla I.

pK DE LOS ISÓMEROS d,l-RACÉMICO Y MESO DE Fe(o,o-EDDHA) Y Fe(o,p-EDDHMA)			
(o,o-EDDHA)		(o,p-EDDHMA)	
d,l-Racémico	Meso	d,l-Racémico	Meso
35,54 ^a	33,28 ^a	37,90 ^b	39,00 ^b
35,86 ^c	34,15 ^c	33,75 ^c	35,54 ^c

^a Bannochie y Martell, 1989; ^b Ahrland et al., 1990; ^c Yunta et al., 2003

PUREZA DE LOS QUELATOS COMERCIALES.

El desarrollo por parte de Lucena et al. en 1996 de un método de HPLC y la mejora del mismo por Hernández-Apaolaza et al. (1997), permite la separación de los componentes de los quelatos de hierro comerciales, junto con la identificación y cuantificación de los isómeros meso y racémico del quelato Fe(o,o-EDDHA), por su comparación con patrones del quelato. Posteriormente Cremonini et al. (2001) aplicando RMN y Hernández-Apaolaza et al., 2006 por medio de ESI-MS han establecido la presencia en los quelatos comerciales de hierro, además del componente mayoritario o,o-EDDHA, los compuestos o,p-EDDHA, p,p-EDDHA y otros subproductos de síntesis, capaces también de quelar hierro (subproductos de FeEDDHA). Gómez-Gallego et al. (2002) asignaron uno de los picos del cromatograma de HPLC de los productos comerciales al quelato Fe(o,p-EDDHA).

Estas técnicas de análisis han permitido conocer que los quelatos comerciales de FeEDDHA que se vendían en España entorno a 1999 y que declaraban un 6 % de hierro quelado en la etiqueta, contenían entre un 0,5 y un 3,5 % únicamente, siendo el contenido total en hierro igual o superior al 6 % del producto (Álvarez-Fernández et al., 2003). Una vez estos datos se hicieron públicos la riqueza ha mejorado considerablemente, estando

actualmente entre un 3 y un 6% de hierro quelado por o,o-EDDHA. Algunos de los productos comerciales que declaran contener FeEDDHMA contienen más de un isómero posicional de este quelato (Álvarez-Fernández et al., 2003). Por no disponer en el mercado de quelantes de EDDHMA, distintos del o,p-EDDHMA, o de o,p-EDDHA puros no es posible la cuantificación de estos quelatos y por tanto establecer la pureza de los quelatos comerciales de EDDHMA y la cuantificación de la fracción de Fe quelado por o,p-EDDHA en los compuestos comerciales.

ESTABILIDAD DE LOS QUELATOS FeEDDHA Y FeEDDHMA FRENTE AL pH E IONES COMPETIDORES.

Bermúdez et al., (1999) estudian la descomposición de disoluciones de distinta concentración de los quelatos comerciales de Fe(o,o-EDDHA) y Fe(o,p-EDDHMA) con el pH y encuentran que, el porcentaje de quelato descompuesto es mayor cuanto menor es el pH del medio (Figs. 4 y 5), lo que está de acuerdo con su estabilidad frente al pH (Halvorson y Lindsay, 1972; Ahrlund et al., 1990; Yunta et al., 2003). Así, para ambos quelatos a pH 1 la descomposición es prácticamente completa, con un porcentaje de descomposición entorno al 90%. Sin embargo a pH 2, la descomposición es considerablemente menor, alcanzándose porcentajes cercanos al 30%. A medida que aumenta el pH, continúa disminuyendo la descomposición, con valores de porcentajes de descomposición a pH 3 entre 6 y 14% y entre 2 y 9% para pH 4. Las diferencias en la descomposición cuando se pasa de pH 1 a 2 son mayores que entre 2 y 3, encontrándose diferencias mucho menores en el paso de pH 3 a 4. A medida que el pH del medio se aproxima a 4, la descomposición es muy pequeña, con porcentajes cercanos a cero. Cabe recordar que ambos quelatos son muy estables en el rango de pH 4-9 (Norvell, 1991).

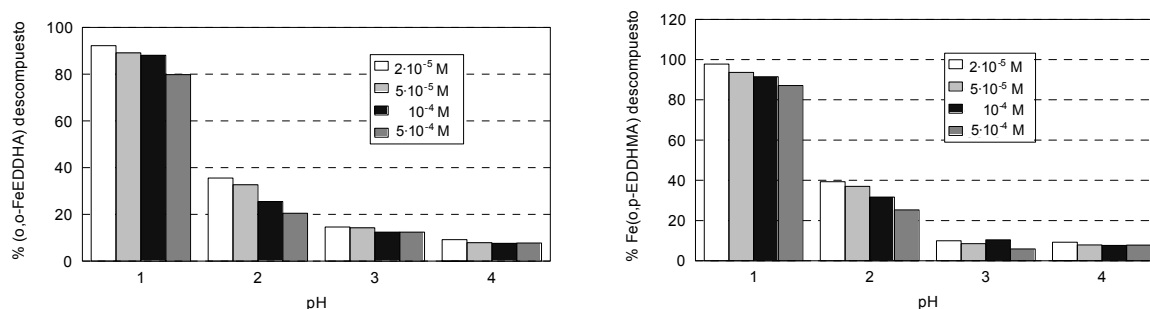


Fig. 4.- Descomposición de Fe(o,o-EDDHA) y Fe(o,p-EDDHMA) con el pH del medio (adaptada de Bermúdez et al., 1999).

El porcentaje de quelato descompuesto no se ve influenciado por la concentración de Fe(o,o-EDDHA) o de Fe(o,p-EDDHMA) en disolución, a los valores de pH más altos (3 y 4). Mientras a los más bajos (1 y 2), a medida que aumenta la concentración de quelato, el porcentaje de descomposición disminuye (Fig. 4) (Bermúdez et al., 1999). Así, a pH 1, el rango de descomposición de mayor a menor concentración del quelato está entre el 80 y el 100% y a pH 2 los porcentajes oscilan entre 20 y 40% (Bermúdez et al., 1999), estos datos coinciden con los señalados por Sánchez-Andreu et al. (1991).

La descomposición de los quelatos es muy rápida, produciéndose durante los primeros segundos (Fig. 5). Se puede considerar que a los cinco minutos ya se ha alcanzado el equilibrio (Bermúdez et al., 1999). La presencia de iones en el medio no afecta a la descomposición de los quelatos Fe(o,o-EDDHA) y Fe(o,p-EDDHMA) (Bermúdez et al., 1999).

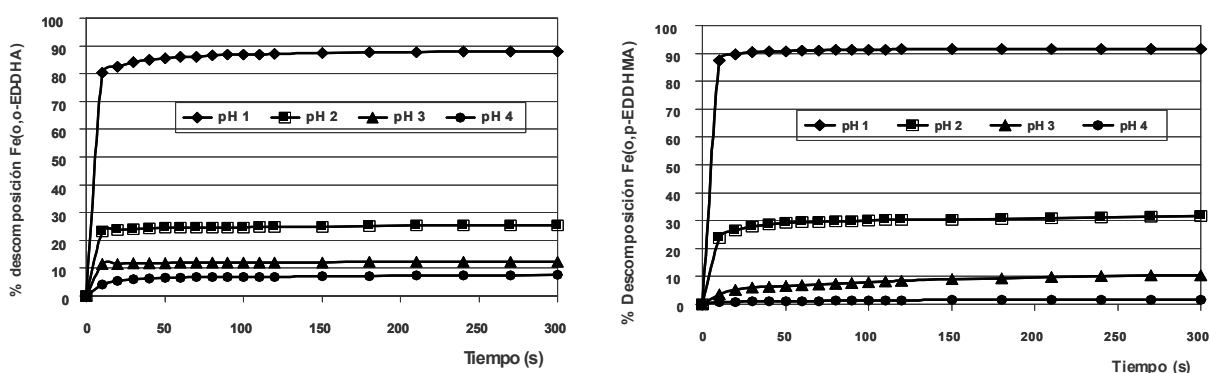


Fig. 5.- Descomposición de Fe(o,o-EDDHA) y Fe(o,p-EDDHMA) 10^{-4} M con el tiempo a distintos pH (adaptada de Bermúdez et al., 1999).

Disoluciones con las mismas concentraciones que las empleadas en el estudio de descomposición, se sometieron a un proceso de descomposición - recomposición bajando el pH a 1 y después aumentándolo hasta valores comprendidos entre 4 y 7, encontrándose que, la recomposición de los quelatos Fe(o,o-EDDHA) y Fe(o,p-EDDHMA) a pH 7, en ausencia de iones competidores, es prácticamente total y no parece verse afectada por la concentración del quelato, al igual que el proceso de descomposición, el de recomposición es prácticamente instantáneo (Fig. 6) (Bermúdez et al., 1999).

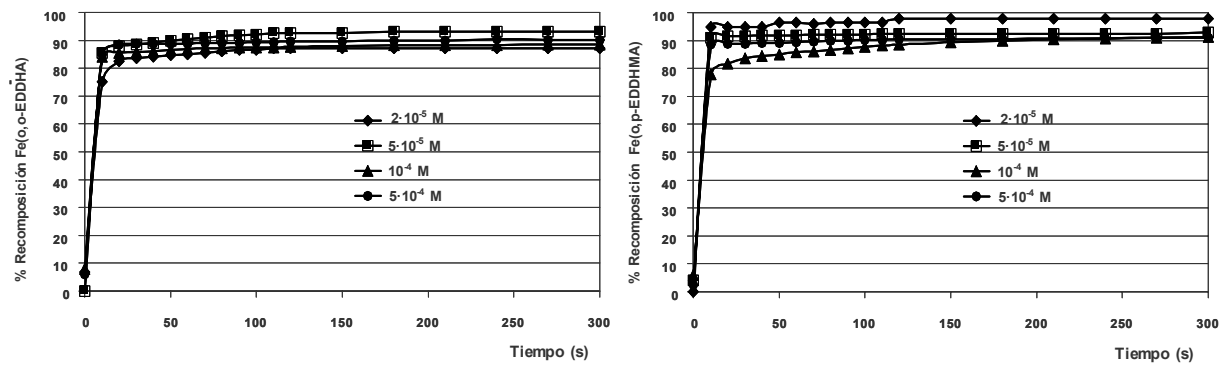


Fig. 6.- Recomposición de los quelatos Fe(o,o-EDDHA) y Fe(o,p-EDDHMA) a pH 7 (adaptada de Bermúdez et al., 1999).

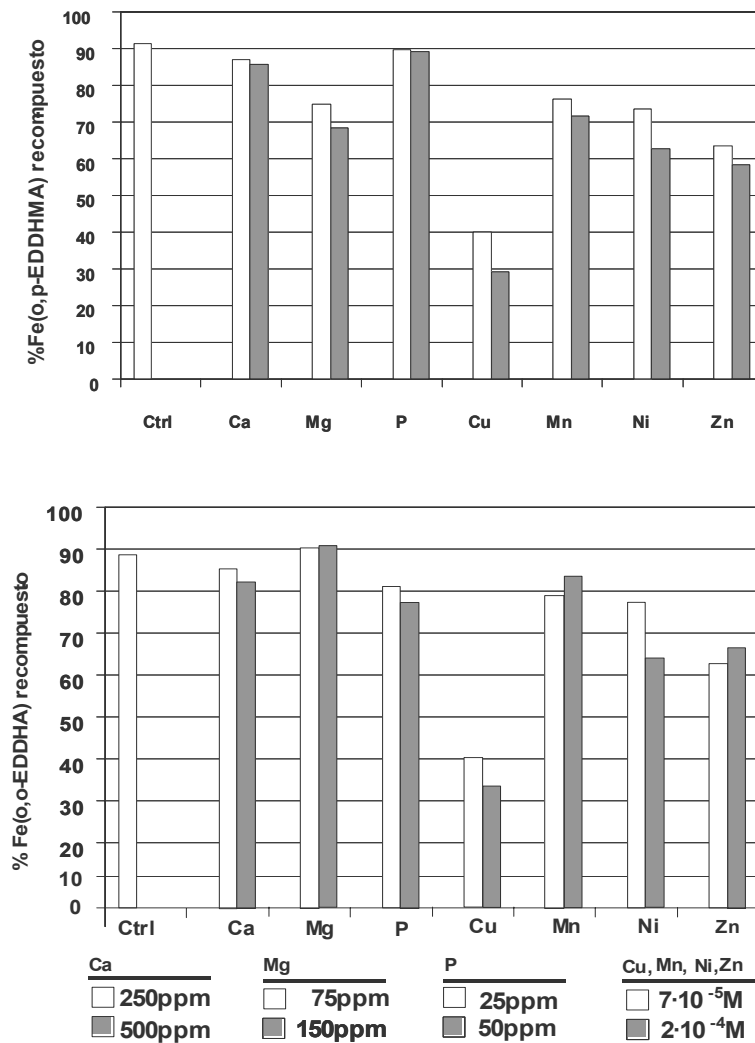


Fig. 7.- Recomposición de los quelatos Fe(o,p-EDDHMA) y Fe(o,o-EDDHA) a una concentración 10⁻⁴ M y pH 7 (adaptada Bermúdez et al., 1999).

La presencia de los iones Ca, P, Cu, Mn, Ni y Zn en el medio reduce la recomposición del quelato de hierro. Este efecto depende tanto del ión presente, el Cu es el que más efecto tiene, este comportamiento está de acuerdo con los valores establecidos por Yunta et al. (2003), para las constantes de estabilidad de estos quelatos con distintos cationes; como de la relación entre las concentraciones de hierro e ión competidor (Fig. 7) (Bermúdez et al., 1999). En el proceso de recomposición el isómero que más afectado se ve, es el menos estable, el meso en el caso del Fe(o,o-EDDHA) y el racémico en el Fe(o,p-EDDHMA) (Fig 8) (Juárez et al., 2001; Bermúdez et al., 2002).

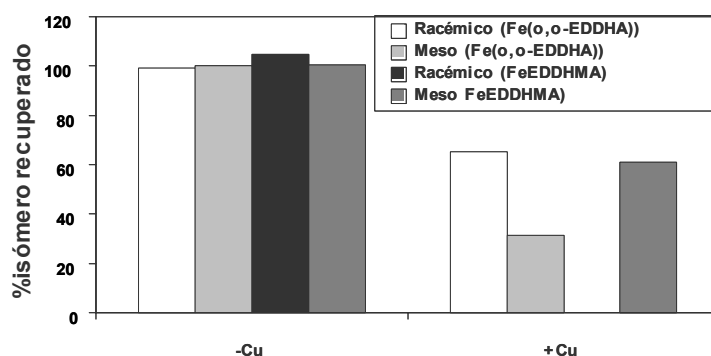


Fig. 8.- Recomposición de cada uno de los isómeros de los quelatos Fe(o,o-EDDHA) y Fe(o,p-EDDHMA) en presencia del ión Cu^{2+} (adaptada Bermúdez et al., 2002)

Tabla II

(IR) _{max} y NQ PARA Fe(o,o-EDDHA) (Q1) Y Fe(o,p-EDDHMA) (Q2) A DISTINTOS pH (Bermúdez et al., 1999)												
Elemento	pH											
	4				5				7			
	(IR)		NQ		(IR)		NQ		(IR)		NQ	
	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2	Q1	Q2
P	-	32	-	48	40	28	-	82	25	-	20	-
Cu	70	85	1,4	2,2	75	86	1	1,4	76	88	1	1
Mn	6	14	1,4	0,6	21	21	1,2	1,2	18	29	1,2	1,6
Ni	31	99	6	3,6	33	103	4	28	72	86	6	12
Zn	-	-	-	-	-	29	-	1,9	40	56	0,7	1,5

Bermúdez et al. (1999) en base a los datos obtenidos sobre el efecto de los diferentes iones en la recomposición de los quelatos de hierro (FeEDDHA y FeEDDHMA) han establecido dos parámetros: NQ (relación entre las concentraciones, en molaridad, del quelato y del ión competidor), e IR (índice de reducción de la recomposición para cada NQ),

que permiten conocer que concentración de cada ión es la que más afecta a la recomposición del quelato y cuanto la reduce. Los datos de la Tabla II, donde se recogen los valores de NQ que dan lugar a la máxima reducción en la recomposición a tres valores de pH, indican que el efecto mayor de los iones se produce a pH 7, si bien se requieren concentraciones similares del quelato y del ión para Cu, Mn y Zn, mientras para P y Ni son necesarias concentraciones muy superiores a las del quelato.

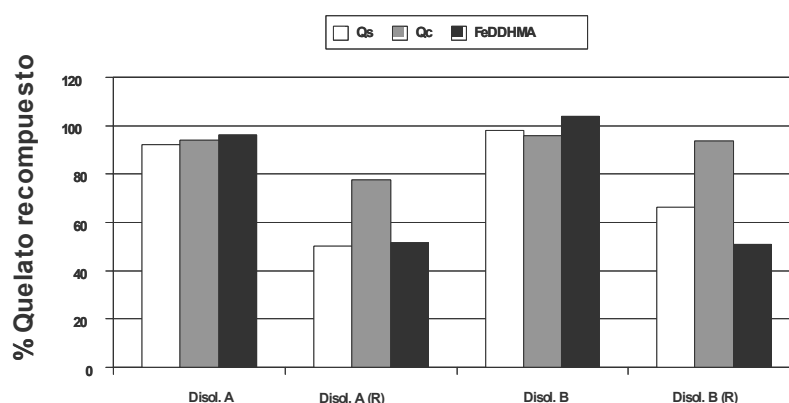


Fig. 9.- Efecto de la presencia conjunta de iones en la descomposición – formación de Fe(o,o-EDDHA). Disol A, disolución con $\mu = 0,316$. Disol. A (R), disolución A recompuesta. Disol. B, disolución con $\mu = 0,047$. Disol. B (R), disolución B recompuesta. (adaptada de Cerdán et al., 2001).

La incorporación de hierro como Fe(o,o-EDDHA) sintetizado en el laboratorio (estándar), como FeEDDHA comercial y FeEDDHMA comercial, a disoluciones de distinta concentración que contienen todos los iones que constituyen una disolución nutritiva, con los macronutrientes a los NQ de mayor incidencia, de acuerdo con lo establecido por Bermúdez et al. (1999) y los micronutrientes a NQ próximos a los de las disoluciones nutritivas, ha puesto de manifiesto que las disoluciones que no han sufrido variaciones de pH la estabilidad del quelato es completa a pH 6 (Fig. 9). Cuando las disoluciones se someten a un proceso de descomposición – recomposición (variación de pH de 1 a 6), las pérdidas de Fe(o,o-EDDHA) aumentan a medida que lo hace la concentración de la disolución (Fig. 9). Los porcentajes de quelato recompuesto en las disoluciones en las que está presente el FeEDDHA comercial son superiores a los obtenidos para el FeEDDHA estándar (Fig. 9). Estos datos parecen indicar que el exceso de Fe no (o,o-EDDHA) que los productos comerciales presentan (Álvarez-Fernández et al., 2003), y/o la reacción de los agentes quelantes no (o,o-EDDHA) que contiene el producto comercial (Hernández-Apaolaza et al., 2006), con los componentes de la disolución, podría reducir el efecto que los iones

competidores ejercen sobre el quelato (Cerdán et al., 2001). En las disoluciones en las que se ha producido la descomposición del quelato, las pérdidas son debidas principalmente a la reducción del contenido de isómero meso (Cerdán et al., 2001). Los porcentajes de reducción de la recuperación, ponen de manifiesto un efecto sinérgico por parte de los diferentes iones competidores del hierro por el quelante, y del quelante por el hierro (Cerdán et al., 2001).

Resultados similares fueron observados con anterioridad por Lucena (1995) cuando en disoluciones nutritivas con una concentración 100 veces superior a la aplicada al vegetal, que contenían mezclas de Fe(*o,o*-EDDHA) y FeEDTA al 50% y que posteriormente habían sido diluidas hasta pH 6 y 7,5, la pérdida de Fe(*o,o*-EDDHA) en la mezcla de quelatos fue inferior a la encontrada en aquellas disoluciones que únicamente contenían Fe(*o,o*-EDDHA). La justificación a este comportamiento podría estar en que, la presencia de FeEDTA en las mezclas de los quelatos, podría aumentar la velocidad de recomposición del Fe(*o,o*-EDDHA) (Lucena, 1995). Brown et al. (1960) observaron que cuando se adicionaba (*o,o*-EDDHA) a una disolución nutritiva que contenía EDTA y DTPA, la capacidad del (*o,o*-EDDHA) para formar quelatos de Fe a pH superiores a 6 en presencia de otros agentes quelantes aumentaba de forma considerable. En consecuencia, la reducción de los efectos negativos de los iones competidores sobre el Fe(*o,o*-EDDHA) parece ser generada por la presencia de otros quelatos o agentes quelantes en el medio, aunque estos efectos no estaría asociados a la presencia de un compuesto en particular. Todos estos resultados se podrían extrapolar al caso de los quelatos comerciales, los cuales además de Fe(*o,o*-EDDHA) también pueden contener Fe(*o,p*-EDDHA) e incluso diferentes proporciones de (*p,p*-EDDHA) y de polímeros de condensación (Cremonini et al., 2001; Gómez-Gallego et al., 2002; Hernández-Apaolaza et al., 2006).

Álvarez-Fernández et al. (2002) estudió el comportamiento de diferentes disoluciones de quelatos FeEDDHA comerciales frente al pH y en presencia de Ca para determinar su evolución en disoluciones calizas, observando que para un intervalo de pH entre 3-10, no sólo se produce la total recuperación del quelato Fe(*o,o*-EDDHA) sino también del Fe soluble presente en los productos comerciales, al que denominan no quelado, y que podría coincidir con el Fe(*o,p*-EDDHA) y otros subproductos de síntesis. Estos resultados estarían de acuerdo con los predichos por Yunta et al. (2003) en el modelo teórico en el que simula el comportamiento de los quelatos en disolución y con lo establecido por Bermúdez et al. (1999) en relación a que el ión calcio no afecta a la descomposición del quelato FeEDDHA en el rango de pH de máxima estabilidad del mismo.

REACTIVIDAD DEL QUELATO FeEDDHA CON LOS COMPONENTES DEL SUELO.

La eficacia de los quelatos EDDHA puede verse afectada además de por el pH del medio y la presencia de iones competidores, por los procesos de adsorción del quelato y/o los agentes quelantes en la fase sólida de suelo (Norvell, 1991). El comportamiento del Fe(*o,o*-EDDHA) tras la interacción con diferentes tipos de suelos ha sido estudiado desde la década de los 50 hasta nuestros días (Hill-Cottigan y Lloyd-Jones, 1958; Ryan et al., 1985; Sharawat, 1988; Norvell, 1991; Sánchez-Andreu et al., 1991; Loupassaki et al., 1997; Hernández-Apaolaza y Lucena 2001; Álvarez-Fernández et al., 1996, 1997, 2002; Cantera et al., 2002; García-Mina et al., 2003; Cerdán, 2003; Hernández-Apaolaza et al., 2006; Schenkeveld et al., 2007; Cerdán et al., 2007). Todos estos autores coinciden en afirmar que, de los diferentes quelatos derivados de los ácidos poliaminocarboxílicos, es el Fe(*o,o*-EDDHA) el que sufre una menor retención en la fase sólida del suelo, siendo además el más eficaz para mantener el Fe disponible para las plantas en las condiciones de los suelos calizos. Cerdán, (2003) pone de manifiesto que los constituyentes del suelo que más efecto tienen en la retención de Fe(*o,o*-EDDHA) son los óxidos de cobre, zinc, manganeso y hierro. Lucena et al. (2003) y Hernández-Apaolaza et al. (2006) han probado que, excepto para la ferrihidrita, el Fe(*o,p*-EDDHA) y los subproductos de FeEDDHA son más retenidos por los distintos componentes del suelo que el Fe(*o,o*-EDDHA). Hernández-Apaolaza y Lucena, (2001) y Cerdán, (2003) encuentran que el isómero meso del Fe(*o,o*-EDDHA) queda más retenido sobre los distintos suelos y constituyentes del suelo que el racémico, que en muchos casos sólo es retenido ligeramente.

Hernández-Apaolaza y Lucena 2001, Álvarez-Fernández et al. (1996, 1997 y 2002), Cantera et al. (2002), García-Mina et al. (2003), Cerdán (2003), Hernández-Apaolaza et al. (2006), Schenkeveld et al. (2007) y Cerdán et al. (2007) han realizado interacciones de quelatos EDDHA comerciales con distintos suelos calizos, encontrando que las pérdidas de Fe(*o,o*-EDDHA) eran mínimas y en la mayoría de los casos inferiores al 10% (Fig. 10). Sin embargo, para todos los quelatos FeEDDHA comerciales ensayados, se produjo un rápido descenso en el contenido de Fe(*o,p*-EDDHA) y de los subproductos de FeEDDHA. Estas pérdidas oscilaron entre un 80 y un 100% para Fe(*o,p*-EDDHA) y entre el 60 y el 90% para los subproductos de FeEDDHA dependiendo del quelato y de las propiedades físico-químicas del suelo (Schenkeveld et al., 2007), por lo que sólo una pequeña parte de este Fe soluble no (*o,o*-EDDHA) podrá ser efectiva como fuente de Fe para las plantas y por tanto, su eficacia como fertilizante férrico aplicado al suelo será muy inferior a la que presenta el Fe(*o,o*-EDDHA). Estos autores afirman que no se sabe a ciencia cierta si las pérdidas de Fe no (*o,o*-EDDHA) se producen por la adsorción, por el desplazamiento del Fe por otros cationes presentes en la disolución o por la degradación de las moléculas orgánicas, aunque

Álvarez-Fernández et al. (1997, 2002) observan que estas pérdidas vienen acompañadas de la solubilización del Cu procedente del suelo y justifican que el descenso en el contenido en Fe no (o,o-EDDHA) tras la interacción con suelos calizos podría ser una consecuencia del desplazamiento del Fe asociado a agentes quelantes no (o,o-EDDHA) por el Cu de la disolución del suelo. Estos mismos autores también afirman que el Fe no (o,o-EDDHA) de los productos comerciales es estable a los valores de pH de los suelos calizos aunque presenta una elevada reactividad con los diferentes materiales del suelo, especialmente con óxidos y turba, por lo que en suelos ricos en dichos materiales edáficos, éste podría ser otro de los motivos que generase las importantes pérdidas de Fe no (o,o-EDDHA).

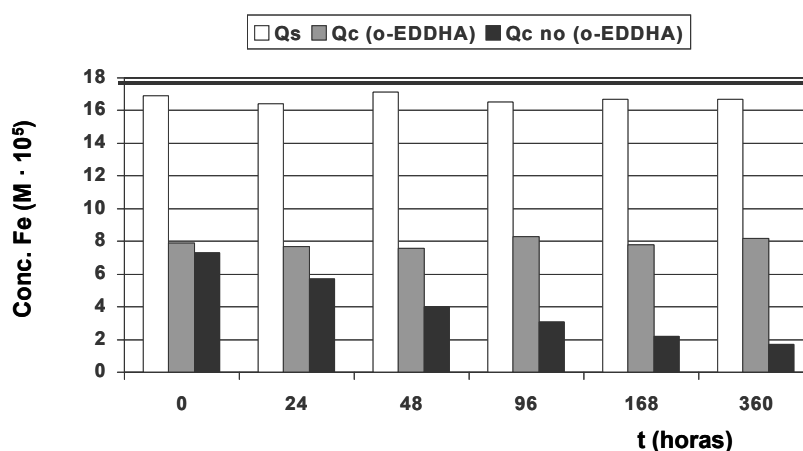


Fig. 10.- Variación de la concentración de Fe(o,o-EDDHA) y no o,o-EDDHA con el tiempo de interacción con un suelo calizo. Línea paralela al eje x, concentración de hierro quelado aplicada al suelo con cada uno de los productos en estudio. Qs: quelato Fe(o,o-EDDHA) puro sintetizado en el laboratorio. Qc (o-EDDHA): Fe(o,o-EDDHA) de un quelato comercial. Qc no (o-EDDHA): hierro soluble no quelado por Fe(o,o-EDDHA) de un quelato comercial (adaptada de Cerdán, 2003).

CAPACIDAD DE LAS PLANTAS PARA TOMAR EL HIERRO QUELADO.

Son muchos los cultivos de alto valor económico, que presentan Estrategia I ante la deficiencia de hierro: manzano, melocotonero, ciruelo, cerezo, vid, almendro, olivo, cítricos, arroz, tomate, maíz, etc y que manifiestan deficiencia de hierro en medios calizos (Sanz et al., 1992; Marschner 1995). Este hecho no se puede achacar únicamente a la insolubilización que del hierro se produce en medios calizos debida a los altos pH, como se ha indicado anteriormente, sino al efecto que el ión bicarbonato presente en el medio tiene en la toma, transporte y disponibilidad de Fe para la síntesis de clorofila en las hojas (Marschner, 1995). Como fuerte tampón de pH, el bicarbonato neutraliza los protones del

medio y los liberados por la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática radicular, dando lugar a altos pH en el apoplasto radicular y a la inhibición de la enzima reductasa de Fe(III) unida a la membrana plasmática radicular (Romera et al., 1992; Nikolic y Kastori, 2000). Alcántara et al. (2000) han encontrado que altos niveles de bicarbonato en el medio radicular inhiben el desarrollo de la capacidad reductora de la raíz con baja disponibilidad de hierro, pero no lo hace con alta disponibilidad. También se ha propuesto que la inactivación de hierro en las hojas puede estar vinculada a un aumento del pH del apoplasto foliar debido a los altos niveles de bicarbonato en el medio de desarrollo, que daría lugar a la inhibición de los procesos de reducción de Fe(III) en la hoja (Mengel et al., 1994). Se ha de tener en cuenta que el pH óptimo de actividad de la reductasa de Fe(III) en el apoplasto del mesofilo foliar está en el rango 5,5 a 6,0, por encima de pH 6,0, la actividad de este enzima disminuye considerablemente (González-Vallejo et al., 2000). Nikolic y Römheld (2002) establecen que altas concentraciones de bicarbonato en el medio radicular no afectan al pH del apoplasto foliar, por tanto el bicarbonato no parece ser la causa de la inhibición de la toma de hierro por el simplasto foliar. Por otro lado, la deficiencia de hierro no aumenta la actividad de la reductasa de Fe(III) foliar como lo hace con la radicular (Rombolà et al., 2000).

Así pues, para poder establecer si un quelato es eficaz como corrector de la deficiencia de hierro es necesario conocer si la planta puede asimilar el hierro aportado por dicho quelato, puesto que el que sea capaz de mantener el Fe en disolución bajo diferentes condiciones agronómicas no implica que suministre Fe de forma efectiva a un determinado cultivo.

Son muchos los estudios que ponen de manifiesto la capacidad de las plantas para tomar el Fe aportado por los quelatos FeEDDHA, tanto cuando se aplican al suelo como en condiciones hidropónicas y para diferentes tipos de cultivos. Bañuls et al. (2003) observan que la aplicación de FeEDDHA comercial a cítricos produjo un incremento de los contenidos en clorofila, N, K, Mg, Fe y Mn en hoja, un aumento de la producción y la mejora de algunos de los parámetros de calidad de los frutos, no apreciándose síntomas visuales de deficiencias de Fe en el vegetal. Reed y Lyons (1988) obtuvieron que la recuperación de las deficiencias de Fe en vid tras la aplicación al suelo de quelatos comerciales FeEDDHA y FeEDDHMA era total, no encontrando diferencias significativas en la eficacia de ambos quelatos como correctores del déficit de hierro en el vegetal. Resultados similares fueron encontrados por Hernández-Apaolaza et al. (1995) al estudiar la capacidad de quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA comerciales para aportar hierro a plantas de girasol y maíz desarrolladas en cultivos hidropónicos bajo condiciones de estrés férrico. Del mismo modo, Álvarez-Fernández et al. (2005) compararon la efectividad de quelatos FeEDDHA y

FeEDDHMA comerciales para corregir las deficiencias de Fe en tres tipos diferentes de cultivos: girasol, melocotonero y peral, mediante la determinación de diferentes parámetros que están relacionados directa o indirectamente con el estado nutritivo del Fe, encontrando que los dos quelatos ensayados son eficaces a la hora de corregir las deficiencias de Fe en el vegetal tanto en medio hidropónico como cuando se aplican al suelo, aunque el FeEDDHA presenta algunas ventajas con respecto al FeEDDHMA ya que su efecto permanece durante un periodo de tiempo mayor. Todos los ensayos descritos hasta el momento se han realizado con quelatos comerciales que contienen Fe(o,o-EDDHA) más un exceso de Fe soluble no (o,o-EDDHA), que podría interferir en el proceso de recuperación del vegetal ante situaciones de déficit de Fe. Sin embargo, cuando estos ensayos biológicos se realizan con disoluciones que únicamente contienen Fe(o,o-EDDHA) también se obtienen resultados positivos. Chouliaras et al. (2004) observaron que cuando plántulas de varias especies de citrus (*taiwanica* y *calkameriana*) se desarrollaron en situaciones de déficit de Fe, se produjo un incremento en la capacidad de reducción de las raíces de vegetal, así como una importante acidificación de la rizosfera. Cuando estas plántulas fueron tratadas con Fe(o,o-EDDHA) se produjo un descenso de ambos parámetros, observándose una elevada velocidad de recuperación del vegetal. Del mismo modo, Yehuda et al. (2003) también obtuvieron resultados satisfactorios al aplicar Fe(o,o-EDDHA) a dos variedades diferentes de pepino.

Alcañiz, et al. (2005) y Cerdán et al. (2006) han establecido que en deficiencia de hierro las plantas de Estrategia II no muestran preferencia en cuanto a la toma de isómero meso o racémico, lo que indica que los fitosideróforos son capaces de desplazar en la misma medida el hierro de ambos isómeros. Por el contrario las plantas de Estrategia I toman preferentemente el isómero menos estable (meso), lo que se puede atribuir al menor gasto de energía que el vegetal ha de realizar para descomponer el isómero de menor estabilidad. García-Marco, et al. (2006) han establecido que la reductasa de hierro quelado de raíces de plantas jóvenes de pepino reducen más rápido el quelato Fe(o,p-EDDHA) que el Fe(o,o-EDDHA), FeEDTA y una fuente comercial de FeEDDHA. También el quelato Fe(o,p-EDDHA) es más eficaz que el Fe(o,o-EDDHA) para reducir la clorosis por deficiencia de Fe en hojas de soja jóvenes desarrolladas en hidroponía.

EFFECTO DE LA MATERIA ORGANICA EN LA TOMA DE HIERRO QUELADO.

Durante mucho tiempo se ha considerado que la mejora en el desarrollo vegetal producida por la materia orgánica, se debía a su capacidad para proporcionar al suelo, medio de desarrollo natural de los vegetales, unas condiciones más idóneas para el crecimiento vegetal, debidas principalmente a que mejoran la aireación, capacidad de

retención de agua, capacidad de intercambio catiónico, y estimulan la actividad microbiana y movilidad de nutrientes en el suelo. En las últimas décadas se han ido estableciendo una serie de efectos bioestimulantes de la materia orgánica sobre el vegetal, los denominados **efectos directos**, que se traducen fundamentalmente en: mejor desarrollo radicular (Adani et al., 1998), cambios en la permeabilidad de las membranas (Vigneault et al., 2000); y modificación de determinadas actividades enzimáticas implicadas en la toma y el metabolismo de nutrientes. Pinton et al. (1997) y Varanini et al. (1993) han puesto de manifiesto el incremento de la actividad H^+ -ATPasa en la membrana plasmática con el consiguiente aumento en la liberación de protones por parte de las raíces, hecho de gran repercusión en la toma de nutrientes, especialmente hierro. Varanini y Pinton (2000) establecen un aumento en la actividad nitrato reductasa inducida por sustancias húmicas, que se traduce en un incremento en la toma de nitratos por el vegetal.

Se ha de tener en cuenta que la acción que la materia orgánica ejerce sobre el suelo requiere la aplicación de cantidades considerables de materia orgánica, y que algunos de sus efectos se producen durante los procesos de transformación de ésta en el suelo. Por el contrario, la incidencia directa requiere de pequeñas cantidades y de tamaños y estructuras moleculares más precisas, y sus efectos sobre el vegetal pueden realizarse tanto por parte de los compuestos o estructuras orgánicas presentes en los suelos como por aplicación foliar de sustancias húmicas.

En base a todos estos datos Varanini y Pinton (2000) resumen los efectos de las sustancias húmicas sobre la nutrición férrica de los vegetales en los siguientes procesos: a) las sustancias húmicas de bajo peso molecular, pueden formar complejos con el hierro de los constituyentes del suelo, aumentando su solubilidad, el complejo férrico se mueve a través del apoplasto hasta la membrana plasmática, y se comporta como un sustrato para la reductasa de complejos o quelatos de Fe(III); b) la sustancia húmica puede estimular directamente la bomba de protones (H^+ -ATPasa) de la membrana plasmática, lo que modifica el pH del citoplasma y apoplasto con cambios en el transporte de iones y los enzimas dependientes del pH (p. e. Fe(III)- reductasa) y posiblemente el metabolismo celular.

Nuestro grupo de investigación ha realizado un estudio en cultivos comerciales de: limonero cv Fino (Santomera, Murcia), vid cv. Italia (Aspe, Alicante) y tomate cv Daniela (Muchamiel, Alicante), sobre suelos calizos, a los que se ha aplicado de forma conjunta, vía suelo, Fe(o,o-EDDHA) y sustancias húmicas procedentes de lignitos, en una proporción del 50%. Los resultados han mostrado que la aplicación conjunta de quelato y sustancia

húmica: en tomate, da lugar a un aumento respecto al tratamiento control (quelato sin ácido húmico) del 15 % en la concentración foliar de hierro, del 18 en cobre, del 9 % en manganeso, del 22 % en zinc y del 16 % en fósforo, mientras se produce una reducción del 2 % en el nivel de sodio (Sánchez-Sánchez et al., 2005). En limonero, los niveles foliares de hierro aumentan un 15 %, mientras en fruto, el peso lo hace en un 20% y el contenido en vitamina C en un 40 % (Sánchez-Sánchez et al., 2002). En uva de mesa, los niveles foliares de hierro sufren un incremento del 24 % (Sánchez-Sánchez et al., 2006). Adani et al. (1998) encuentran aumentos en la toma de nitrógeno, fósforo, hierro y cobre en tomate en hidroponía, por la presencia de ácidos húmicos procedentes de turba y lignitos en la disolución nutritiva.

La sustitución de parte del quelato por sustancias húmicas, en un 17 %, 33 %, 50 % y 67% da lugar en los tres cultivos antes mencionados, tomate, limonero y uva de mesa, a un aumento de los niveles foliares de hierro y fósforo y una disminución del contenido foliar de sodio, con la sustitución de quelato por sustancia húmica (Tabla III) (Sánchez-Sánchez et al., 2005; Sánchez-Sánchez et al., 2006; Cerdán et al., 2007). En tomate se ha mantenido la calidad y cantidad de fruto, en limonero se mejoran el peso y contenido en vitamina C del fruto (Fig. 11) y del peso de grano en uva de mesa (Sánchez-Sánchez et al., 2006; Cerdán et al., 2007)

Tabla III

VARIACIÓN DE LOS CONTENIDOS FOLIARES DE Fe (ppm), P (%) Y Na (%) EN TOMATE (cv Daniela) (Sánchez-Sánchez et al., 2005), LIMONERO (cv Fino) (Cerdán et al., 2007) Y UVA DE MESA (cv Italia) (Sánchez-Sánchez et al., 2006), CON LA SUSTITUCIÓN DE QUELATO FÉRRICO POR SUSTANCIAS HÚMICAS.									
% sustitución	Tomate			Limonero			Uva de mesa		
	Fe (ppm)	P (%)	Na (%)	Fe (ppm)	P (%)	Na (%)	Fe (ppm)	P (%)	Na (%)
0	176a	0,36a	0,55b	95a	0,15a	0,056c	111a	0,204a	0,61b
17	195b	0,39ab	0,49a	98a	0,17b	0,041b	125b	0,218ab	0,43a
33	195b	0,43b	0,51a	101ab	0,18c	0,039b	130bc	0,228bc	0,4a
50	215c	0,43b	0,48a	105b	0,19c	0,035b	127b	0,242c	0,44ab
67	205c	0,42b	0,47a	104b	0,20d	0,03a	136c	0,238bc	0,40a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas al 95 %

Cerdán (2003) y Cerdán et al. (2007) hacen interaccionar con componentes del suelo (óxidos e hidróxidos, carbonatos, silicatos) y los suelos calizos sobre los que se desarrollan los cultivos de limonero, y de vid, antes estudiados, y un cultivo de melocotonero en Aspe (Alicante), las mezclas quelato - sustancia húmica al 50% utilizadas en dichos estudios, y encuentra que no se producen modificaciones en la concentración de Fe(o,o-EDDHA) que permanece en disolución con el tiempo de interacción. La concentración de Fe no (o,o-

EDDHA) que contiene el quelato comercial disminuye a medida que aumenta el tiempo de contacto con los suelos en estudio. Las sustancias húmicas no reducen las pérdidas de Fe no (o,o-EDDHA) que se producen tras la interacción con los suelos, aunque sí produce variaciones en la velocidad de retención del Fe no (o,o-EDDHA) por la fase sólida del suelo. Estos datos hacen pensar en efectos directos de las sustancias húmicas sobre el vegetal que mejoran la nutrición férrica.

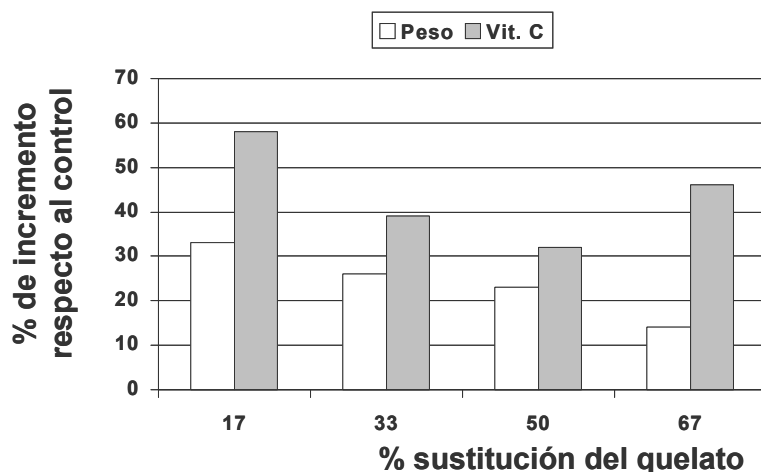


Fig. 11.- Variación del peso y contenido en vitamina C de los frutos de limonero cv Fino con los distintos tratamientos (adaptada Cerdán et al., 2007).

El grupo de investigación "Química Agrícola" de la Universidad de Alicante ha realizado estudios en cámaras de crecimiento vegetal, con tomate cv Jaguar, poniendo de manifiesto que la inclusión de ácidos húmicos o fúlvicos en la disolución nutritiva a distintas dosis: 2,5, 5 y 10 μg C orgánico por mL de disolución, en condiciones de nutrición normal, tanto los ácidos húmicos como los fúlvicos inciden de forma positiva en el desarrollo vegetal y activación de los mecanismos de toma de hierro, siendo más eficaces los ácidos húmicos. En deficiencia de hierro, tanto ácidos húmicos como fúlvicos aumentan la actividad reductasa de la raíz a valores superiores a los de la deficiencia, y mejoran el peso, los niveles de hierro activo y clorofila en el vegetal respecto a las plantas deficientes, en el caso de ácidos húmicos, estos niveles se recuperan hasta valores similares a los del control, mientras la recuperación en tratamientos con ácidos fúlvicos da lugar a valores inferiores a los del control. En deficiencia de hierro debida a altos niveles de carbonato en el medio, el comportamiento es similar al indicado para la deficiencia de hierro, tanto con aporte de hierro en forma de FeEDDHA como de FeEDTA. En general los mejores resultados se obtienen con la dosis de 5 μg C orgánico por mL de disolución. Estos datos ponen

claramente de manifiesto el carácter bioestimulante de los ácidos húmicos y fúlvicos, para la toma de hierro en el rango de concentraciones estudiadas.

En los últimos años el uso extensivo de quelatos Fe(*o,o*-EDDHA) como correctores de las deficiencias de Fe ha planteado la duda de si además del Fe, el agente quelante (*o,o*-EDDHA) también podría ser tomado por la planta y en el caso afirmativo, si esta sustancia podría tener efectos fisiológicos en el vegetal tal y como ocurre con las sustancias húmicas (Chen y Aviad, 1990; Adani et al., 1998; Cesco et al., 2000; Mackowiak et al., 2001). Bienfait et al. (2004) determinaron la presencia de agente quelante (*o,o*-EDDHA) en raíces y hojas de plantas de tomate y pimiento desarrolladas en medios en los que la única fuente de Fe fue el quelato Fe(*o,o*-EDDHA), confirmando que en las plantas se produce la absorción pasiva del quelato Fe(*o,o*-EDDHA). También afirmaron que el agente quelante (*o,o*-EDDHA) tiene efectos fisiológicos en el vegetal que no están únicamente relacionados con la nutrición férrica. Molassiotis et al. (2003) observan que la presencia de Fe(*o,o*-EDDHA) en el medio de cultivo promueve el desarrollo radicular de portainjertos GF-677 (*Prunus amygdalus*xP-persica) desarrollados in vitro. Del mismo modo, Krajncič y Nemeč (2003) mostraron que la aplicación de (*o,o*-EDDHA), Zn(*o,o*-EDDHA), Cu(*o,o*-EDDHA) y Mn(*o,o*-EDDHA) a la disolución nutritiva indujo la floración en plantas *Lemna minor*, *Lemna gibba* y *lemna Spirodela polyrrhiza* mientras que cuando estas mismas plantas se desarrollaron en una disolución nutritiva que carecía de agente quelate, la floración no tuvo lugar.

EFFECTO DEL QUELANTE RESIDUAL.

Otro de los factores que determinan la eficacia de los quelatos EDDHA a la hora de corregir y combatir las deficiencias de hierro en el vegetal es su capacidad para que, una vez el hierro haya sido tomado por la planta, el agente quelante libre pueda quelar el Fe e incluso otros micronutrientes (Cu, Mn y Zn) presentes en la fase sólida del suelo, que posteriormente podrán ser asimilados por el vegetal. Esta es una característica típica de los quelatos sintéticos de Fe que los diferencia de otros fertilizantes férricos y que permite una mejor utilización del potencial nutritivo del suelo.

Sánchez-Andreu et al. (1987, 1988a,b) hicieron interaccionar disoluciones de distinta concentración de agente quelante (*o,o*-EDDHA) con dos suelos calizos de muy diferente contenido en micronutrientes, observando que no sólo se produce la solubilización de Fe, el cual incrementa su concentración de forma progresiva a medida que lo hace el tiempo de agitación, sino también la de Cu y Mn, cuya concentración en disolución alcanza un máximo para después ir decreciendo paulatinamente hasta el final del ensayo. En el caso del Fe, su contenido aumentó al incrementar la concentración de agente quelante inicialmente

adicionado, y para el suelo más rico en Fe. En cuanto al Cu y al Mn, la tendencia fue similar, ya que la máxima solubilización de ambos nutrientes se consiguió con la disolución que presentaba un mayor contenido en agente quelante. Posteriormente, Pérez-Sanz y Lucena (1995) determinaron que la interacción de agente quelante (o,o-EDDHA) con diferentes óxidos de Fe sintéticos generaba la solubilización de grandes cantidades de Fe en un breve periodo de tiempo, siendo la velocidad de solubilización función del grado de cristalinidad del óxido de Fe. Estos mismos autores estudiaron la capacidad del agente quelante libre (o,o-EDDHA) para complejar Fe procedente de diferentes óxidos, cuando plantas de girasol se desarrollaban en un medio hidropónico en el que una vez el Fe aportado por el quelato Fe(o,o-EDDHA) hubiese sido tomado por las plantas, la única fuente de este nutriente fueron los óxidos, encontrando que la cantidad de Fe en disolución permaneció constante a lo largo de todo el ensayo, no observándose síntomas de deficiencia de Fe en el vegetal. García-Marco, et al. (2006) han encontrado que los quelantes o,p-EDDHA y o,o-EDDHA son capaces de solubilizar hierro de suelos y minerales de hierro, si bien, el o,o-EDDHA da lugar a una cantidad solubilizada mayor.

CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas hasta el momento en relación a la nutrición férrica en medios calizos, ponen de manifiesto la necesidad de incorporar a los cultivos, en dichos medios, quelatos de hierro sintéticos de los quelantes EDDHA y EDDHMA. La estabilidad de estos quelatos en disolución, se ve afectada por el pH y la fuerza iónica del medio. pH inferiores a 3 dan lugar a considerables pérdidas de quelato soluble que se puede recuperar si el pH retorna a los valores de máxima estabilidad de los quelatos FeEDDHA y FeEDDHMA (pH 4 – 9). La recuperación del quelato es completa en ausencia de iones competidores, sin embargo, la presencia de los iones calcio, magnesio, fosfato, cobre, níquel y cinc, reduce la recomposición de los quelatos, especialmente los iones cobre y fosfato. En todos los casos el isómero que más afectado se ve es el de menor constante de estabilidad, meso para Fe(o,o-EDDHA) y racémico para Fe(o,p-EDDHMA). La presencia de quelatos o quelantes distintos al Fe(o,o-EDDHA) protegen a éste de los efectos negativos de los iones competidores. Mientras el Fe(o,o-EDDHA) no reacciona con los suelos calizos y los materiales edáficos del suelo, a excepción de ferrihidrita y turba, el resto del hierro presente en las formulaciones comerciales sí lo hace. Los vegetales que presentan Estrategia I ante la deficiencia de hierro, en condiciones de falta de hierro toman preferentemente los quelatos con menor constante de estabilidad. La aplicación conjunta de quelatos y sustancias húmicas mejora la nutrición y calidad del fruto de cultivos comerciales de tomate, uva de mesa y limonero. La inclusión de sustancias húmicas en disolución nutritivas normales y deficientes en hierro, mejoran los mecanismos de toma de este

elemento: aumento de la permeabilidad de la membrana, incremento de la actividad reductasa de quelatos férricos en la membrana plasmática radicular, e incrementar el contenido en aniones orgánicos en raíz. Por tanto, en la utilización de quelatos de hierro se han de controlar el pH y fuerza iónica de las disoluciones empleadas y es recomendable el empleo conjunto de quelatos y sustancias húmicas que mejoran la eficacia de estos y permite reducir las dosis de quelatos, compuestos de síntesis que incorporan productos extraños al suelo.

BIBLIOGRAFÍA.

ABADÍA, J.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; ROMBOLÀ, A. D; SANZ, M.; TAGLIAVINI, M.; ABADÍA, A. 2004. Technologies for the diagnosis and remediation of Fe deficiency. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50 (7): 965-971.

ADANI, F.; GENEVINI, P.; ZOCCHI, G. 1998. The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. *J. Plant Nutr.* 21: 561-575.

AHRLAND, S., DAHLGREN, A., PERSSON, I. 1990. Stabilities and hydrolysis of some iron (III) and manganese (II) complexes with chelating ligands. *Acta Agric. Scand.* 40:101-111.

ALCÁNTARA, E.; ROMERA, F. J.; CAÑETE, M.; DE LA GUARDIA, M. D. 2000. Effects of bicarbonate and iron supply on Fe(III) reducing capacity of roots and lead chlorosis of the susceptible peach rootstock "Nemaguard". *J. Plant Nutr.* 23: 1607-1617.

ALCAÑIZ, S.; CERDÁN, M.; JUÁREZ, M.; JORDÁ, J. D.; BERMÚDEZ, D.; SÁNCHEZ, A. 2005. Uptake of Fe(o,o-EDDHA) isomers by strategy I and II plants. Proceedings of the International Symposium on Soilless Culture and Hydroponics. Almería. Spain. Noviembre 14-19, 2004. *Acta Horticulturae* 697: 535-542.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; GÁRATE, A.; JUÁREZ, M.; LUCENA, J. J. 1996. Tomato acquisition of iron chelates in a calcareous sandy substrate. *J. Plant Nutr.* 19: 1279-1293.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; GÁRATE, A.; LUCENA, J. J. 1997. Interaction of iron chelates with several soil materials and with sil standard. *J. Plant Nutr.* 20: 559-572.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; SIERRA, M. A.; LUCENA, J. J. 2002. Reactivity of synthetic Fe chelates with soils and soil components. *Plant and Soil.* 241: 129-137.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; YUNTA, F.; SIERRA, M. A.; LUCENA, J. J. 2003. Quality of European comercial Fe chelates. The case of Spain. In Proceedings of 10th International symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Rengel, Z.; grusak, M. A. Eds. Kluwer Academic Pubs. Dordrecht.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; GARCÍA-LAVIÑA, P.; FIDALGO, C.; ABADÍA, J.; ABADÍA, A. 2004. Foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Soil.* 262: 5-15.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; GARCÍA-MARCO, S.; LUCENA, J. J. 2005. Evaluation of synthetic iron(III)-chelates (EDDHA/Fe³⁺, EDDHMA/Fe³⁺ and the novel EDDHSA/Fe³⁺) to correct iron clorosis. *Europ. J. Agronomy.* 22, 119-130.

BANNOCHIE, J.; MARTELL, A. E. 1989. Affinities of racemic and meso forms of N N'-ethylenebis[2-(o-hydroxy-3,5-dimethylphenyl)glycine] for divalent and trivalent metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 4735-4742.

BAÑULS, J.; QUIÑONES, A.; MARTÍN, B.; PRIMO-MILLO, E.; LEGAZ, F. 2003. Effects of the frequency of iron chelate supply by fertigation on iron chlorosis in Citrus. *J. Plant Nutr.* 26(10&11), 1985-1996.

BERMÚDEZ, D.; JUÁREZ, M.; JORDÁ, J. D.; SÁNCHEZ-ANDREU, J. J.; LUCENA, J. J. 1999. Kinetics of reactions of chelates FeEDDHA and FeEDDHMA as affected by pH and competing ions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 30 (19&20: 2769-2784.

BERMÚDEZ, D.; JUÁREZ, M.; JORDÁ, J. D.; SÁNCHEZ-ANDREU, J. J.; LUCENA, J. J.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A. 2002. Effect of pH on the stability of the chelates FeEDDHA, FeEDDHMA and their isomers. *Agrochimica.* XLVI (5): 202-211.

BIENFAIT, H. F. 1985. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function iron uptake. *J. Bioenerg. Biomember.* 17:73-83.

BIENFAIT, H. F.; GARCÍA-MINA, J.; ZAMAREÑO, A.M. 2004. Distribution and secondary effects of EDDHA in some vegetables species. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50(7), 1103-1110.

BROWN, J. C.; TIFFIN, L.; HOLMES, R. S. 1960. Competition between chelating agent and roots as factor affecting absorption of iron and other ions by plant species. *Plant Physiol.* 35(6), 878-886.

BROWN, J. C. 1978. Mechanism of iron uptake by plants. *Plant, Cell and Environment.* 1: 249-257.

CANTERA, R. G.; ZAMARREÑO, A. M.; GARCÍA-MINA, J. M. 2002. Characterization of comercial chelates and their behavior in an alkaline and calcareous soil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7609-7615.

CERDÁN, M. M.; JUÁREZ, M.; SÁNCHEZ-ANDREU, J.; BERMÚDEZ, M. D.; JORDÁ, J. 2001. The effect of pH competing metal ions on the stability of the isomers of FeEDDHA in fertigation solutions. *Acta Hort.* 559: 669-674.

CERDÁN, M. M. 2003. Estabilidad de los isómeros de FeEDDHA y FeEDDHMA en diferentes medios nutritivos. Tesis doctoral. Biblioteca Virtual Miguel de Cervantes. ISBN 84-688-5922-2.

CERDÁN, M. M.; ALCANIZ, S.; JUÁREZ, M.; JORDÁ, J.; BERMÚDEZ, M. D.; 2006. Fe uptake from meso and d,l-racemic Fe(o,o-EDDHA) isomers by strategy I and II plants. *J. Agric. Food Chem.* 54: 1387-1391.

CERDÁN, M.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A.; JUÁREZ, M.; SÁNCHEZ-ANDREU, J. J.; JORDÁ, J. D.; BERMÚDEZ, D. 2007. Partial replacement of Fe(o,o-EDDHA) by humic substances for Fe nutrition and fruit quality of citrus. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170: 474-478.

CESCO, S.; RÖMHELD, V.; VARANINI, Z.; PINTON, R. 2000. Solubilization of iron by water-extractable humic substances. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 163: 285-290.

CHANEY, R. L.; BROWN, J. C.; TIFIN, L. O. 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiology.* 50: 208-213.

CHANEY, R. L. 1984. Diagnostic practises to identify iron deficiency in higher plants. *J. Plant Nutr.* 7: 47-67.

CHEN, Y.; AVIAD, T. 1990. Effects of humic substances on plant growth. In: *Humic substances in soil and crop science, Selected readings*. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America (Eds.), Madison, Wisconsin, U.S.A. pp: 161-186.

CHEN, Y. 1997. Remedy of iron deficiency-present and future. In: *Abstracts 9th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Hohenheim, Stuttgart, Alemania. pp: 111.

CHOULIARAS, V.; DAMASSI, K.; THERIOS, I.; MOLASSIOTIS, A.; DIAMANTIDIS, G. 2004. Root-reducing capacity, rhizosphere acidification, peroxidase and catalase activities and nutrient levels of *Citrus taiwanica* and *C. volkamariana* seedlings, under Fe deprivation conditions. *Agronomie*. 24(1), 1-6.

CREMONINI, M. A.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; LUCENA, J. J.; RAMBOLÀ, A.; MARANGONI, B.; PLACUCCI, G. 2001. NMR analysis of the iron ligand ethylenediaminedi(o-hydroxyphenyl) acetic acid (EDDHA) employed in fertilizers. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3527-3532.

De LIÑAN, C. 1990. *Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Agrotécnicas, S L. Madrid.

De LIÑAN, C. 2007. *Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales*. Agrotécnicas, S L. Madrid.

DEXTER, M. 1958. Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic. USA. Patent N° 2.824.128.

EIDE, D.; BRODENIUS, M.; FETT, J.; GUERINOT, M. L. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 93: 5624-5628.

FOX, T. C.; GUERINOT, M. L. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 669-676.

GARCÍA-MARCO, S.; MARTÍNEZ, N.; YUNTA, F.; HERNÁNDEZ-APAOLAZA, L.; LUCENA, J. J. 2006. Effectiveness of ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N'(p-hydroxyphenylacetic) acid (o,p-EDDHA) to supply iron to plants. *Plant and Soil*. 279: 31-40.

GARCÍA-MINA, J. M.; CANTERA, R. G.; ZAMARREÑO, A. 2003. Interaction of different iron chelates with a 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.

GÓMEZ-GALLEGO, M.; SIERRA, M. A.; ALCÁRAZ, R.; RAMÍREZ, P.; PIÑAR, C.; MANCHEÑO, M. J.; GARCÍA-MARCO, S.; YUNTA, F.; LUCENA, J. J. 2002. The synthesis of o,p-EDDHA and its detection as the main impurity in o,o-EDDHA commercial iron chelates. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6395-6399.

GONZÁLEZ-VALLEJO, E. B.; MORALES, F.; CISTUÉ, L.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. 2000. Iron deficiency decreases the Fe(III)-chelate reducing activity of leaf protoplasts. *Plant Physiology*. 122: 337-344.

- GUERINOT, M. L., YI, Y. 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* 104:815-820.
- HAGSTROM, G. R. 1984. Current management practices for correcting iron deficiency in plants with emphasis on soil management. *J. Plant Nutr.* 7:23-46.
- HALVORSON, A. D.; LINDSAY, W. I. 1972. Equilibrium relationships of metal chelates in hydroponic solutions. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 36 : 755-761.
- HERNÁNDEZ-APAOLAZA, L.; GÁRATE, A.; LUCENA, J. J. 1995. Efficacy of commercial Fe (III)-EDDHA and Fe (III)-EDDHMA chelates to supply iron to sunflowers and corn seedling. *J. Plant Nutr.* 18(6), 1209-1210.
- HERNÁNDEZ-APAOLAZA, L.; BARAK, P.; LUCENA, J. J. 1997. Chromatographic determination of comercial Fe(III)-chelates of EDTA, EDDHA and EDDHMA. *J. Chromatogr. A.* 789: 453-460.
- HERNÁNDEZ-APAOLAZA, L.; LUCENA, J. J. 2001. Fe(III)-EDDHA and –EDDHMA sorption on Ca-montmorillonite, ferrihydrite, and peat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49: 5258-5264.
- HERNÁNDEZ-APAOLAZA, L.; GARCÍA-MARCO, S.; NADAL, P.; LUCENA, J. J.; SIERRA, M. A.; GÓMEZ-GALLEGO, M.; RAMÍREZ-LÓPEZ, P.; ESCUDERO, R. 2006. Structure and fertilizer properties of by products formed in the synthesis of EDDHA. *Journal of Agricultura and Food Chemistry.* 54: 4355-4363.
- HILL-COTTIGAN, D. G.; LLOYD-JONES, C. P. 1958. Behaviour of iron chelates in calcareous soils. II. Laboratory experiments with some further chelating agents. *Plant Soil.* 9, 189-201.
- HOPKINS, B. G.; JOLLEY, V. D.; BROWN, J. C. 1992. Plant utilization of iron solubilized by oat phytosiderophore. *J. Plant Nutr.* 15: 1599-1612.
- JAEGGER, B.; GOLDBACH, H.; SOMMER, K. 2000. Release from lime induced iron chlorosis by CULTAN in fruit trees and its characterization by analysis. *Acta Hort.* 531: 107-103.
- JUÁREZ, M.; BERMÚDEZ, D.; JORDÁ, J. D.; SÁNCHEZ-ANDREU, J.; CERDÁN, M. M. 2001. Effect of copper, nickel, zinc, and phosphorus on reactions of FeEDDHA and FeEDDHMA isomers under variable pH. *Commun. Soil Sci. Plant anal.* 32 (3&4): 509-519.
- KRAJNČIČ, B.; NEMEC, J. 2003. Mechanisms of EDDHA effects on the promotion of floral induction in the long-day plant *Lemna minor* (L.). *J Plant Phy.* 160: 143-151.
- KRAMER, D. RÖMHELD, V.; LANDSVERG, E. C.; MARSCHNER, H. 1980. Induction of transfer-cell formation by iron deficiency in the root epidermis of *Helianthus annuus* L. *Planta.* 147: 335-339.
- LANDSBERG, E. C. 1982. Transfer cell formation in the root epidermis: a prerequisite for Fe-deficiency? *J Plant Nutr.* 5: 415-432.
- LAHAV, E.; TURNER, D. W. 1984. The effect of temperature on the iron content of banana suckers. *J. Plant Nutr.* 7 (1-5): 725-732.

- LINDSAY, W. L. 1979. Chemical equilibria in soils. Ed. John Wiley and Sons. N. Y. ISBN: 0-471-02704-9
- LINDSAY, W. L., SCHWAB, A. P. 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr.* 5:821-840.
- LINDSAY, W. L. 1991. pp. 89-112. *In: Micronutrients in agriculture.* J. J. Mortvedt (Ed.). Soil Science Society of America. Madison.
- LOBARTINI, J., ORIOLI, G. 1988. Absorption of iron humate in nutrient solutions by plants. *Plant Soil.* 106:153-157.
- LOEPPERT, R. H.; WEI, L. C.; OCUWPAUGH, R. 1994. Soil factors influencing the mobilization in calcareous soils. *In: Biochemistry of metal micronutrients in the rizosphere.* J. a. Maethey, D. E. Crowley y D. g. Luster (Eds). Lewis Publishers. Florida, USA: 343-360.
- LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; MORALES, F.; GOGORCENA, Y.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. 2001. Iron resupply-mediated deactivation of Fe-deficiency stress responses in roots of sugar beet. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 171-180.
- LOUPASSAKI; M. H.; LIONAKIS, S. M.; ANDROULAKIS, I. I. 1997. Iron deficiency in kiwi and its correction by different methods. *En: Sfakiotakis E.; Porlingis, J. (Eds). Proceedings Tirad International Symposium on Kiwifruit. Acta Hort.* 444, 267-271
- LUCENA, J. J. 1990. La clorosis férrica. *Agrícola Vergel.* 4: 296-301.
- LUCENA, J.J. 1995. Iron fertirrigation. *In Nutrition in soils and plants.* J. Abadía Eds. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. pp: 153-158.
- LUCENA, J. J.; BARAK, P.; HERNÁNDEZ-APAOLAZA, L. 1996. Isocratic ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the determination of varios iron (III) chelates. *J. Chromatogr. A.* 727: 253-264.
- LUCENA, J. J. 2000. Effect of bicarbonate, nitrate and other enviromental factors on iron deficiency chlorosis. A review. *J. Plant Nutr.* 23(11-12):1591-160.
- LUCENA, J. J. 2003. Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in strategy I plants. *J. Plant Nutr.* 26: 1969-1984.
- LUCENA, J. J.; GARCÍA-Marcos, s.; yunta, f.; Hernández-apaolaza, l.; navarro-rodríguez, t. 2003. Theoretical modelization and reactivity of the iron chelates in agronomic conditions. *Abstr. Pap.-Am. Chem. Soc.* 226. U468-U469.
- MACKOWIAK, C. L., GROSSL, P. R., BUGBEE, B. G. 2001: Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 1744-1750
- M.A.P.A. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. 2007. www.mapa.es.
- MARSCHNER, H., RÖEMHELD, V., KISSEL, M. 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9: 695-713.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral nutrition in higher plants. Academic Press. ISBN 0-12-473542-8 (HB). ISBN 0-12-473543-6 (PB).

- MENGEL, K.; PLÄNKER, R.; HOFFMANN, B, 1994. Relationship between leaf apoplast pH and iron chlorosis of sunflower (*Helianthus annuus* L.). J. Plant Nutr. 17: 1053-1065.
- MOLASSIOTIS, A.N.; DIMASSI, K.; THERIOS, I.; DIAMANTIDIS, G. 2003. Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalux P. Persica*) explants in vitro. Biología Plantarum. 47(1), 141-144.
- MOOG, P. R., BRÜGGEMANN. 1994. Iron reductase system on the plant plasma membrane-A review. Plant Soil. 165:241-260.
- NIKOLIC, M.; KASTORI, R. 2000. Effect of bicarbonate and Fe supply on Fe nutrition of grapevine. J. Plant Nutr. 23: 1619-1627.
- NIKOLIC, M.; RÖMHELD, V. 2002. Does high bicarbonate supply to roots change availability of iron in the leaf apoplast? Plant and Soil. 241: 67-74.
- NORVELL, W. A. 1991. Reactions of metal chelates in soils and nutrient solutions. pp. 187-227. In Micronutrients in Agriculture. Mortvedt, Cox, Shuman, Welch (Eds.). SSSA Book Series n° 4. Madison. WI (USA).
- PÉREZ-SANZ, A.; LUCENA, J. J. 1995. Synthetic iron oxides as sources of Fe in a hydroponic culture of sunflower. In Iron nutrition in soils and plants (J. abadía ed). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 241-246.
- PINTON, R.; CESCO, S.; SANTI, S; VARANINI, Z. 1997. Soil humic substances stimulate proton release by intact oat seedling roots. J Plant Nutr. 20 (7&8): 857-869.
- REED, D.W.; LYONS, C.G.; 1988. Field evaluation of inorganic and chelated iron fertilizers as foliar sprays and soil application. J. Plant Nutr. 11: 1369-1378.
- ROBINSON, N.; PROCTER, C.; CONNOLLY, E.; GUERINOT, M. L. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. Nature 397: 694-697.
- ROMBOLÀ, A. D.; BRÜGGEMANN, W.; TAGLIAVINI, M.; MARANGONI, B.; MOOG, P. R. 2000. Iron source affects iron reduction and re-greening of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves. J. Plant Nutr. 23: 1751-1765.
- ROMERA, F. J.; ALCÁNTARA, E.; DE LA GUARDIA, M. D. 1992. Effect of bicarbonate, phosphate and high pH on the reducing capacity of the Fe-deficient sunflower and cucumber plants. J. Plant Nutr. 15: 1519-1530.
- RÖMHELD, V., MARSCHNER, H. 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. pp. 155-204. In Advances in plant nutrition. Vol. 2. B. Tinker, A. Läuchli (Eds.). Praeger Scientific. NY.
- RÖMHELD, V. 1987. Existence of two difference strategies for the acquisition of iron in higher plants. pp. 353-374. In Iron transport in microbes, plant and animals. G. Winkelmann, D. van der Helm, J. B. Neiland. VCH-Verlag. Weinheim.
- RYAN, J.; HAMZE, M.; SHWAYRI, R.; HARINQ, S.N. 1985. Behavior of iron-supplying materials in incubated calcareous soils. J. Plant Nutr. 8, 425-436.
- SANCHEZ-ANDREU, J.; JUAREZ, M.; PLA, L.; MATAIX, J. 1987. Quelación por EDDHA de micronutrientes en suelos calizos: ecuación modificada de Freundlich. Anales de Edafología y Agrobiología. 46(9&10),1117-1126.

SANCHEZ-ANDREU, J.; JUAREZ, M.; PLA, L.; MATAIX, J. 1988a. Quelación por EDDHA de micronutrientes en suelos calizos: Ecuación de orden "n". *Anales de Edafología y Agrobiología*. 47(3&4), 599-607.

SANCHEZ-ANDREU, J.; JUAREZ, M.; PLA, L.; MATAIX, J. 1988b. Quelación por EDDHA de micronutrientes en suelos calizos: Ecuación de límite máximo. *Anales de Edafología y Agrobiología*. 47(3&4), 589-597.

SÁNCHEZ-ANDREU, J., JORDÁ, J., JUÁREZ, M. 1991. Reactions of FeEDTA and FeEDDHA applied to calcareous soils. pp 57-62. *In* Iron nutrition and interactions in plants. Y. Chen, Y. Hadar (Eds.). Kluwer Academic Publishers. Netherdalnds.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-ANDREU, J. JUAREZ, M.; JORDA, J. 2002. Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate FeEDDHA in lemon cv Fino. *J Plant Nutr*. 25 (11): 2433-2442.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A.; JUAREZ, M.; SÁNCHEZ-ANDREU, J.; JORDA, J.; BERMUDEZ, D. 2005. Use of humic substances and amino acids to enhance iron availability for tomato plants from applications of the chelate FeEDDHA. *J Plant Nutri*. 28: 1877-1886.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A.; JUAREZ, M.; SÁNCHEZ-ANDREU, J.; JORDA, J.; BERMUDEZ, D. 2006. Improvement of iron uptake in table grape by humic substances. *J Plant Nutr*. 29: 259-272

SANZ, M., CAVERO, J., ABADÍA, J. 1992. Iron chlorosis in Ebro river basin, Spain. *J. Plant Nutr*. 15, 1971-1981.

SCHENKEVELD, W. D. C.; REICHWEIN, A. M.; TEMMINGHOFF, E. J. M.; VAN RIEMSDIJK, W. H. 2007. The behaviour of EDDHA isomers in soils as influenced by soil properties. *Plant Soil*. 290: 85-102.

SHARAWAT, K.L. 1988. Extrectable iron in two soils of contrasting pH fertilized with ferrous sulfate, FeEDTA y FeEDDHA. *Fertilizer Research*. 16, 31-35.

SUSÍN, S.; ABADÍA, A.; GONZÁLEZ-REYES, J. A.; LUCENA, J. J.; ABADÍA, J. 1996. The pH requirement for *in vivo* activity of the iron-deficiency-induced "Turbo" ferric chelate reductase. A comparison of the iron-deficiency-induced iron reductase activities of intact plants and isolated plasma membrane fractions in sugar beet. *Plant Physiology*. 110: 111-123.

VARANINI, Z.; PINTON, R.; DE BIASI, M. G.; ASTOLFI, S.; MAGGIONI, A. 1993. Low molecular weight humic substances stimulate H⁺-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from oat (*Avena sariva* L) roots. *Plant Soil*. 153: 61-69.

VARANINI, Z.; PINTON, R. 2000. Direct versus indirect effects of soil humic substances on plant growth and nutrition. *In* The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface (R. Pinton; Z. Varanini; P. Nannipieri) Marcel Dekker, Inc: 141-157.

VIGNEAULT, B.; PERCOT, A.; LAFLEUR, M.; CAMPBELL, P. 2000. Permeability changes in Model and Phytoplankton Membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environ. Sci Technol*. 34: 3907-3913.

WELKIE, G. W.; MILLER, G. W. 1960. Iron nutrition of *Nicotiana tabacum* L. in relation to riboflavin, riboflavin-5'-phosphate, and flavin adenine dinucleotide content. *Plant Physiology*. 35: 516-520.

WREESMANN, C. T. J.; BUGTER, M. H. J. 1998. Fertilizers and chelated micronutrients. *Agro Food Industry Hi-Tech*. 9: 25-26.

YEHUDA, Z.; HADAR, Y.; CHEN, Y. 2003. Immobilized EDDHA and DFOB as iron carriers to cucumber plants. *J. Plant Nutr.* 26 (10&11), 2043-2056.

YUNTA, F.; GARCÍA-MARCO, S.; LUCENA, J. J.; GÓMEZ-GALLEGO, M.; ALCARAZ, R.; SIERRA, M. A. 2003. Chelating agents related to ethylenediamine bis(2-hydroxyphenyl) acetic acid (EDDHA): synthesis, characterization, and equilibrium studies of the free ligands and their Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , and Fe^{3+} chelates. *Inorg. Chem.* 25: 42: 5412-5421.

ZAHARIEVA, T. B.; RÖMHELD, V. 2000. Specific Fe^{2+} uptake system in strategy I plant inducible under Fe deficiency. *J. Plant Nutr.* 23 (11&12): 1733-1744.