



Convocatoria de septiembre

Curso académico 2020/2021

## *Trabajo final de grado*

*Incremento de la tolerancia al exceso de boro en el agua de riego en el cultivo de tomate var. 'Muchamiel' mediante el empleo vía radicular de ácidos húmicos y fúlvicos.*

**Autor:** Tomás Moya, Víctor  
**Tutor:** Simón Vilella, Inmaculada  
**Cotutores:** García Sánchez, Francisco  
y Alfonsea Simón, Marina  
**Departamento/Área:** Física aplicada



**Resumen.** - El cambio climático está dando lugar a que los periodos de sequía sean cada vez más largos e intensos. A consecuencia de ello, los agricultores de zonas áridas y semiáridas se ven en la obligación de tener que emplear para el riego aguas procedentes de fuentes no convencionales que pueden llegar a contener una gran concentración de Boro (B), sino se les aplica un tratamiento adicional. Dentro de este tipo de aguas encontramos las procedentes de desalinizadoras. Ante esta perspectiva, nos encontramos con que el tomate es uno de los muchos cultivos que pueden llegar a presentar problemas de toxicidad por B a largo de su ciclo, ya que presenta una tolerancia relativa en torno a 4-6 mg L<sup>-1</sup> de B presente en el agua de riego. Ante esto, y dada la importancia que tiene el cultivo del tomate en España, lo que se ha pretendido con este estudio es evaluar si la aplicación de ácidos húmicos y fúlvicos vía radicular ayuda al cultivo de tomate, especialmente a la variedad 'Muchamiel', a sobrellevar esta condición de estrés.

**Palabras clave:** Boro, toxicidad, tolerancia, prolina, ácido húmico y ácido fúlvico.

**Abstract.** – The climate change effect is continuously increasing and intensifying the periods of drought. As a result, farmers in arid and semi-arid areas are forced to use water from unconventional sources for irrigation. But these waters contain a large concentration of Boron (B) without an additional treatment. Within this type of water we find those from desalination plants. Given this perspective, we find that tomato is one of the many crops that can present long-term toxicity problems due to B, since this crop has a relative tolerance of around 4-6 mg L<sup>-1</sup> of B in irrigation water. For this reason, and for the importance of tomato cultivation in Spain, what has been intended with this study is to evaluate whether the application of humic and fulvic acids via the roots helps tomato cultivation, especially the variety 'Muchamiel', to cope with this stressful condition.

**Key words:** Boron, toxicity, tolerance, proline, humic acid and fulvic acid.

# Índice

<b>1. Introducción.</b>	<b>1</b>
<b>1.1 El Boro: consideraciones generales.</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Influencia de la actividad humana en la distribución de Boro en los suelos. Agua de desaladoras.</b>	<b>3</b>
<b>1.3 El Boro en las plantas: funciones, absorción, transporte y movilidad.</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Cultivo del tomate: síntomas y mecanismos de tolerancia.</b>	<b>6</b>
<b>1.4.1 Cultivo del tomate. Síntomas y efectos de la toxicidad por Boro.</b>	<b>6</b>
<b>1.4.2 Tolerancia al exceso de boro por parte de las variedades de tomate comerciales.</b>	<b>7</b>
<b>1.4.3 Mecanismos de tolerancia a la toxicidad por Boro en plantas de tomate.</b>	<b>7</b>
<b>1.5 Estrategias agronómicas para incrementar la tolerancia a la toxicidad por boro.</b>	<b>9</b>
<b>1.5.1 Ácidos Húmicos y fúlvicos.</b>	<b>9</b>
<b>1.5.2 Empleo de Ácido Húmico y Ácido Fúlvico como estrategia agronómica para incrementar la tolerancia a la toxicidad por boro.</b>	<b>9</b>
<b>2. Antecedentes.</b>	<b>10</b>
<b>3. Objetivos y plan de trabajo.</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Objetivos.</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Plan de trabajo.</b>	<b>11</b>
<b>4. Materiales y métodos.</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Material vegetal y condiciones.</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Tratamiento con exceso de Boro y materia activa de ácidos húmicos y fúlvicos.</b>	<b>13</b>
<b>4.3 Seguimiento de la transpiración de las plantas.</b>	<b>14</b>
<b>4.4 Parámetros de intercambio gaseoso, fluorescencia y contenido de clorofilas.</b>	<b>14</b>
<b>4.5 Parámetros de crecimiento.</b>	<b>15</b>
<b>4.6 Porcentaje de reducción y grado de tolerancia.</b>	<b>16</b>
<b>4.7 Determinación de nutrientes minerales.</b>	<b>17</b>
<b>4.8 Determinación de prolina.</b>	<b>17</b>
<b>4.9 Análisis estadístico.</b>	<b>18</b>
<b>5. Resultados.</b>	<b>18</b>
<b>5.1 Parámetros de crecimiento.</b>	<b>18</b>
<b>5.2 Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro en plantas de tomate.</b>	<b>20</b>

<b>5.3 Grado de tolerancia de las plantas de tomate crecidas bajo condiciones de exceso de B en el agua de riego a las cuales se ha aplicado el producto Materia activa ácidos húmicos y fúlvicos. ....</b>	<b>20</b>
<b>5.4 Evolución de la transpiración. ....</b>	<b>21</b>
<b>5.5 Parámetros fisiológicos. ....</b>	<b>22</b>
<b>5.6 Concentración de boro en las diferentes partes del sistema sustrato-planta. ....</b>	<b>23</b>
<b>5.7 Concentración de prolina foliar. ....</b>	<b>24</b>
<b>6. Discusión. ....</b>	<b>25</b>
<b>7. Conclusión. ....</b>	<b>27</b>
<b>8. Proyección futura. ....</b>	<b>27</b>
<b>9. Bibliografía. ....</b>	<b>28</b>



## 1. Introducción.

### 1.1 El Boro: consideraciones generales.

Para comprender mejor las implicaciones del Boro en un sistema agrícola debemos comprender y tener en cuenta algunas de sus principales características. El Boro se representa en la tabla periódica con el símbolo 'B' en el grupo 13, con el número atómico 5 y con una masa de 10,811 g. Es un elemento metaloide, es decir, posee propiedades intermedias de un metal y un no metal (Hovanski, Santella y Grant, 2007<sup>[11]</sup>; Weber y Tavanga, 2007<sup>[12]</sup>; Liu, Cheng, Zhang y Wu. 2007<sup>[13]</sup>). A continuación en la tabla 1.1 se muestran las características físico-



**Imagen 1.1** Cristal de Bórax, con color añadido para uso decorativo. El Bórax  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , conocido como borato de sodio es comercializado como sal de boro y también es un fertilizante conocido. Fuente: Anne Marie Helmenstine, 2019.

químicas del Boro como elemento de la tabla periodica y en la imagen 1.1 podemos ver un ejemplo de cristal de bórax, una de las formas comercializadas del Boro, sobre todo en la agricultura por su aplicación como fertilizante. Otros usos destacables del Boro son la fabricación de aislantes, fibras de vidrio, ladrillos de sílice con resistencia al calor, muelles y detergentes (Greenwood y Earnshaw 1997)<sup>[4]</sup>.

**Tabla 1.1** Características físico-químicas del boro.

Simbolo	B	Dureza Mohs	9,3
Serie química	Metaloides	Estructura cristalina	Romboédrica
Número atómico	5	Conf. electrónica	$1s^2 2s^2 2p^1$
Grupo	13	Electrones por capa	2,3
Periodo	2	Electronegatividad	2,04
Bloque	P	Conductividad	$1,0 \times 10^{-4} \text{ m}^{-1} \text{ S/m}$
Masa atómica	10.811 u	Calor específico	1026 J/(Kkg)
Densidad	2460 Kg/m <sup>3</sup>	Conduct. térmica	27,4 W/(Km)
Estado de oxidación	3	Calor de fusión	50,2 kJ/mol
Radio medio	85 pm	Punto de fusión	2349 K
Radio atómico	87	Punto de ebullición	4200 K
Radio covalente	82 pm	Presión de vapor	0,348

En cuanto a su disposición en la naturaleza se encuentra en rocas, ríos y océanos en distintas concentraciones. Rondando entre 5 y 10 mg Kg<sup>-1</sup> en las rocas, concentraciones que van de 3 a 30 µg L<sup>-1</sup> en ríos y aproximadamente con 4,5 mg L<sup>-1</sup> en los océanos (Shorrocks, 1997)<sup>[5]</sup>. En cuanto a sus isotopos en la naturaleza, se pueden encontrar los isótopos <sup>10</sup>B con una distribución del 19,78% y <sup>11</sup>B con una distribución del 80,22% (Rodgers, 1995<sup>[6]</sup> y World Health Organization, 1998)<sup>[7]</sup>.

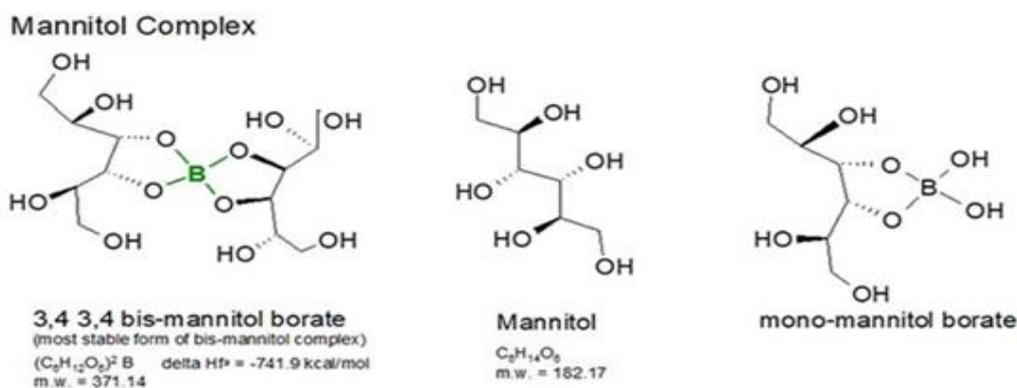
Puede formar distintas especies, pero a pH habitual entre 6 y 6,5 en el suelo, se encuentra más abundante como ácido bórico no disociado B(OH)<sup>3</sup> (Hu y Brown, 1997)<sup>[8]</sup>, como Borato [B(OH)<sub>4</sub>]<sup>-</sup> o como mineral borosilicato. Como se muestra en la ecuación el ácido bórico en una solución acuosa se comporta como un ácido débil de Lewis, aceptando iones de hidróxido y liberando protones (pK<sub>a</sub> = 9,24 a 25°C).



Mediante esta ecuación se determina el estado del boro marcado por el pH, manteniéndose como anión B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> por encima de un pH de 9,24 y como ácido bórico a un pH más ácido o neutro. Y con la siguiente ecuación el ácido bórico puede formar ésteres de Boro, lo cual repercute en el efecto de este elemento sobre los seres vivos.



Respecto a su capacidad para establecer enlaces, en la figura 1.1 vemos que el Boro una vez en la planta tiene una gran capacidad para formar complejos con azúcares como el manitol y otros polioles con enlaces boro-diol que tienen mucha estabilidad.



**Figura 1.1** Aislamiento y caracterización de complejos de boro solubles en plantas superiores. Hening H., Peen G., Lebrilla B. y Brown H. (1997).<sup>[11]</sup>

## **1.2 Influencia de la actividad humana en la distribución de Boro en los suelos. Agua de desaladoras.**

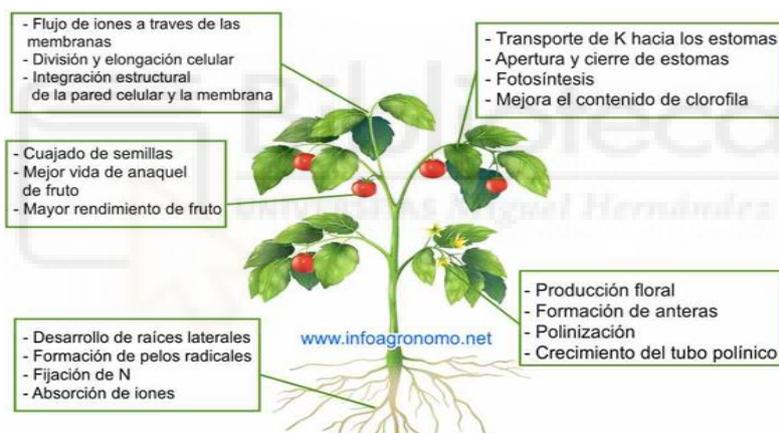
Una de las fuentes de agua no convencionales para el riego en la agricultura que más se plantea hoy en día es el agua procedente de desaladora, algo que se está tomando muy en cuenta para zonas de climas semiáridos como las provincias de Murcia y Alicante. Estas aguas pueden ser un riesgo importante para la agricultura ya que, entre otros parámetros, presentan generalmente una alta concentración de Boro, pudiendo provocar toxicidad en los cultivos. En cuanto a la concentración y forma del Boro, en este tipo de agua, sabemos que podemos encontrar este elemento en el mar con una concentración entorno a los 4,6 ppm. En este ambiente el B se muestra como moléculas que varían con el pH, prefiriendo un medio más ácido el  $B(OH)^3$  y un medio más alcalino el  $B(OH)^4$ , manteniéndose equilibradas entre ellas a un pH de 8,7 y 8,8 en el agua. Estos elementos pueden traspasar con facilidad las membranas de osmosis utilizadas en la desalinización del agua de mar por lo que su eliminación debería ser por un tratamiento específico para este fin, suponiendo un coste adicional.

Según la Asociación Española de desalinización y reutilización<sup>[9]</sup>, solamente en España se generan 5.000.000 m<sup>3</sup> día<sup>-1</sup> de agua desalada que se gasta en abastecer, en riego y en industria. Además, en 2019 ya se calcularon 765 desaladoras en España con producción por encima de 100 m<sup>3</sup> día<sup>-1</sup>; de las cuales, 360 de esas desaladoras se encargan de desalar agua procedente del mar y 405 de aguas salobres con otras procedencias. Con estas cifras, la cantidad de agua que es desalada y que puede acabar en el suelo es enorme, aunque la mayoría de ese agua tenga un uso industrial actualmente. Por ello, debe considerarse que según cuál sea el destino final del agua procedente de desaladoras después de su uso en la industria, esta agua conllevará un tratamiento posterior diferente.

## **1.3 El Boro en las plantas: funciones, absorción, transporte y movilidad.**

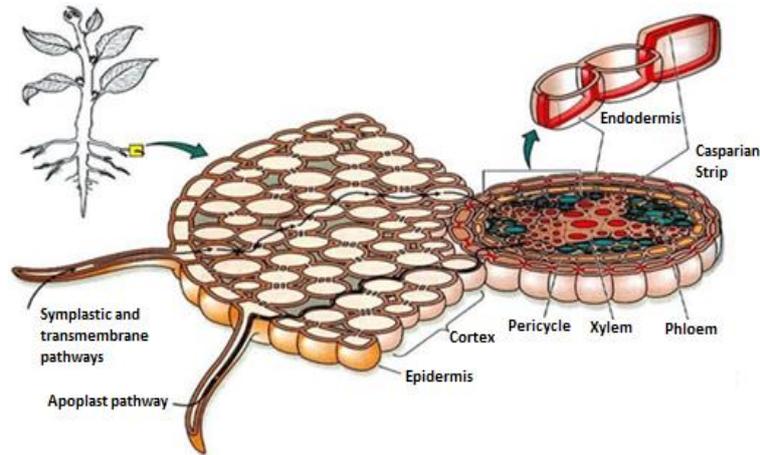
El Boro es un micronutriente necesario para las plantas, es decir, un elemento químico necesario en muy pequeñas cantidades para la vida. De hecho, se han encontrado indicios en varios estudios de que la deficiencia de Boro en plantas causa lesiones como manchas y grietas en frutos (Malavolta, Vitti y Oliveira, 1989)<sup>[10]</sup>. También se ha visto en plantas de tomates que si es deficiente hay reducción en el tamaño de las hojas y de las raíces (Marschner, 1995)<sup>[11]</sup> y aparición de puntos necróticos (Dell y Huang 1997)<sup>[12]</sup>.

Aunque aún no están del todo claras las funciones que desarrolla, es un micronutriente que se muestra necesario en la formación de anteras y en la germinación del tubo polínico entre otras funciones relativas a la fertilización (Brown y col., 2002)<sup>[13]</sup>. En la figura 1.3 se aprecian estas funciones junto a otras que realiza el Boro en cada uno de los lugares de la planta; pero sobre todo, el Boro se encuentra en la pared celular de los tejidos, porque es necesario para formar el RG-II, (dímero reticulado por un diéster de borato-diol 1:2 (4)) y la formación de pectina (O'Neill, 2004)<sup>[14]</sup>. Por otra parte, la absorción del Boro está estrechamente relacionada con la formación de azúcares en la planta y a absorción de otros micronutrientes como el calcio, el nitrógeno y el potasio; habiendo muchas evidencias en estudios que muestran una relación entre la deficiencia de boro y una menor concentración del calcio en la estructura de pectina presente en la pared celular de las hojas de tomate (Yamauchi, Hara y Sonida, 1986)<sup>[15]</sup>. Incluso se está viendo la posibilidad de que tratamientos en semillas de tomate con B, Mn, Mo y Co impidan que luego estas se vean afectadas por el virus del mosaico (Raginov U. A., 1969)<sup>[16]</sup>.



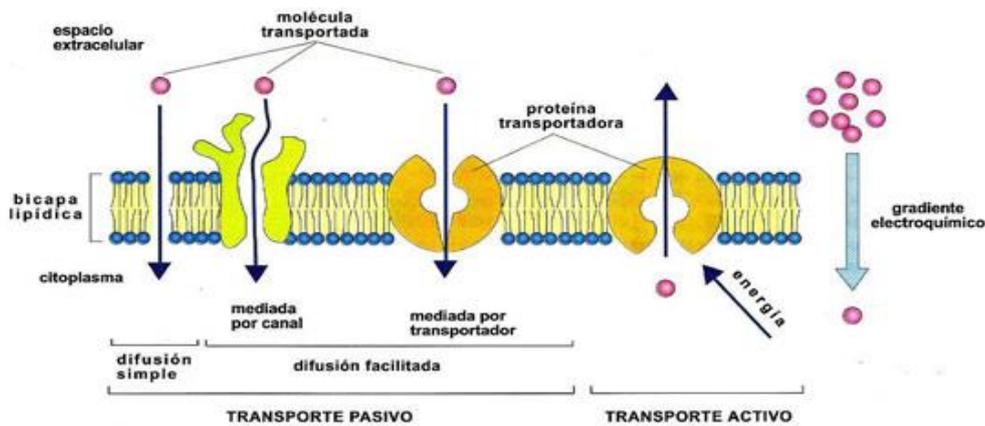
**Figura 1.3** Papeles en los que participa el Boro como micronutriente.  
Fuente: <https://infoagronomo.net/guia-tecnica-cultivo-de-canela-pdf/>.

El Boro para su absorción debe encontrarse disponible y en la forma adecuada ya que si, por ejemplo, se encuentra en rocas, queda inmovilizado por lo que pasa a no estar disponible para su absorción por las especies vegetales (Herrera Rodríguez, 2010)<sup>[17]</sup>. Por ello, las plantas absorben el Boro a través del suelo cuándo este se encuentra en las formas disponibles que son el ácido bórico neutro ( $B[OH]^3$ ) y el borato ( $B[OH]^4$ ). El ácido bórico pasa por la raíz y sigue las vías que llevan al xilema: i) vía apoplasto, pasando por las paredes celulares sin entrar a las células, impulsada por la transpiración foliar que ejerce una presión al evaporar el agua en los estomas de la hoja elevando el flujo que pasa por toda la planta a través del xilema; o por la ii) vía simplasto siguiendo el floema, donde pasa de una célula a otra a través de los plasmodesmos. En la figura 1.4 aparecen los componentes de estas vías por las que se distribuye.



**Figura 1.4** Vías de entrada a la planta por la raíz.  
 Fuente: Relaciones hídricas en células y plantas. <https://slideplayer.es/slide/17002642/>

Para entrar a la planta estas formas del Boro necesitan los procesos de transporte celular que les permiten pasar por la membrana plasmática semipermeable de las células. Estos procesos de transporte en la membrana esquematizados en la figura 1.5 son: i) la difusión pasiva, ii) el transporte facilitado y iii) el transporte activo (Brown y col., 2002)<sup>[18]</sup>. Los mecanismos de difusión pasiva y transporte facilitado no requieren un gasto energético por parte de la planta, simplemente aprovechan el gradiente que se forma al haber una mayor concentración de los compuestos en el medio que en el interior de la planta, ayudándose de una proteína transportadora en el caso del transporte facilitado; pero, en el caso de que no se de este gradiente, la absorción dependerá únicamente del transporte activo que requiere un aporte energético por parte de la planta en forma de ATP.



**Figura 1.5** Transporte pasivo y transporte activo primario. Fuente: <https://www.studocu.com/ca-es/document/universitat-rovira-i-virgili/nutricio-molecular/apunts/nutricion-molecular-temas-1-4/6820107/view>.

Una vez el Boro es absorbido pasa al xilema de la planta, es dirigido según el flujo de transpiración, flujo que se produce por la pérdida de agua evaporada a través de las hojas, llegando el Boro a los brotes de la planta (Shelp, 1995)<sup>[19]</sup>; pero también es capaz de ser desplazado de manera eficaz por el floema. En especies con capacidad de transferir polialcoholes, conocidos generalmente como polioles, este tipo de azúcares son capaces de formar enlaces Boro-diol haciendo que el transporte del Boro sea posible a través del floema (Hu y Brown, 1997)<sup>[20]</sup>. Este tipo de enlace es similar al que podemos encontrar con el Boro en la pared celular. El hecho de que algunas especies tengan una baja formación de polioles implica, por tanto, que el Boro se mueva de manera casi exclusiva por el xilema y que cuándo llegue a las hojas quede inmovilizado y acumulado, al no poder pasar al floema, causando algunos de los síntomas y efectos característicos de la toxicidad por Boro' (Brown y Hu, 1998<sup>a</sup>)<sup>[21]</sup>. También hay que resaltar, respecto a la movilización del boro, que, tanto para especies tolerantes como no tolerantes y aun cuándo se presentan diferentes concentraciones tanto en hojas como en otras partes del cultivo, las concentraciones de la parte aérea y la parte radicular mantienen una relación lineal.

#### **1.4 Cultivo del tomate: síntomas y mecanismos de tolerancia.**

##### **1.4.1 Cultivo del tomate. Síntomas y efectos de la toxicidad por Boro.**

Aunque el cultivo de tomate tenga cierta tolerancia a la toxicidad por Boro, es capaz de manifestarla como cualquier otro cultivo. En el caso de las plantas de tomate, los síntomas se explican por la formación de los complejos que forma el ácido bórico con carbohidratos como manitol y sorbitol. Estos azúcares reductores o polioles tienen una configuración cis-diol lo que se traduce en una alta estabilidad para los complejos a los que está unido el boro. En los cultivos de tomate el nivel de polioles producidos es bajo si lo comparamos con el de otras especies, pero esto también causa que cuándo el Boro llega a las hojas, este quede inmovilizado y empiece a acumularse lo que explica que los síntomas más característicos de la toxicidad por Boro sean marcas que se asemejan a quemaduras en márgenes y puntas de hojas (Brown y Hu, 1998<sup>a</sup>)<sup>[22]</sup>. Otro efecto es la repercusión sobre las enzimas encargadas de metabolizar nitrógeno, como la nitrato reductasa y la asparagina sintasa. De aquí se entiende que, si afecta al nitrógeno, indirectamente provoca la disminución del crecimiento de raíces y brotes, así como una reducción de la floración y una peor formación de frutos (Herrera Rodríguez, 2010)<sup>[23]</sup>.

Aparte de los descritos anteriormente, están los daños causados indirectamente por los propios síntomas al generar un mayor nivel de estrés. El estrés en la planta puede llevar a un desequilibrio en las fases encargadas de la realización de la fotosíntesis, ya sea una menor captación de luz o una mayor dificultad en la síntesis de hidratos de carbono, este desequilibrio implica que la energía captada por la clorofila no es usada en la asimilación de CO<sub>2</sub>, sino que es desviada a otras funciones, esta falta de asimilación conlleva la formación de especies reactivas de oxígeno (Simón-Grao y col., 2019b)<sup>[24]</sup>, variando su tolerancia por parte de la planta según su especie y variedad.

#### **1.4.2 Tolerancia al exceso de boro por parte de las variedades de tomate comerciales.**

El tomate es una especie con tolerancia al boro, teniendo capacidad para soportar concentraciones entre 2,0 y 4,0 mg L<sup>-1</sup> en el agua de riego. Los síntomas de toxicidad llegan a presentarse al alcanzar una concentración en las hojas que supera entre 250 y 300 mg Kg<sup>-1</sup>, en peso seco (Ayers y Westcot, 1989)<sup>[24]</sup>. Pero la tolerancia a la toxicidad no solo varía entre diferentes especies de plantas, sino que hay diferentes rangos de tolerancia entre diferentes variedades. La planta del tomate no es una excepción y se encuentran variedades más sensibles y otras con mayor tolerancia; tal y como demostró un estudio realizado por Simón-Grao y col. (2020)<sup>[25]</sup> en donde las variedades de tomate ‘Corazón de Buey’ y ‘Roma’ fueron las variedades más tolerantes al ser regadas con aguas que contenían 10 mg L<sup>-1</sup> de B; mientras que, por el contrario, ‘Muchamiel’ fue la variedad claramente más sensible, presentado síntomas a una concentración menor. Por lo que se entiende que algunas variedades presentaran menores síntomas y serán preferibles a nivel comercial ya que se adaptaran mejor a una agricultura en la que están presentes mayores niveles de boro.

#### **1.4.3 Mecanismos de tolerancia a la toxicidad por Boro en plantas de tomate.**

Los mecanismos de tolerancias no son fáciles de determinar ya que, por ejemplo, la concentración de Boro inmovilizado en las hojas, no se ha demostrado estar relacionada con el rango de tolerancia de las variedades ni presenta indicios de que se relacione de manera proporcional a la presencia de los síntomas por toxicidad a una concentración menor. Sin embargo, a partir de algunas evidencias se pueden mencionar diferentes mecanismos.

Uno de los primeros mecanismos estudiado sobre toxicidad por Boro se basa en que la disposición de las concentraciones en la parte aérea y la parte radicular mantienen una relación lineal, aun cuando la concentración en el sustrato es muy alta y debería presentarse un mayor nivel en la zona radicular. Por lo que se ha llega a la conclusión de que la concentración en la raíz puede regular la concentración en el resto del organismo existiendo mecanismos asociados al transporte que permiten extraer el exceso de boro en la zona radicular.

No obstante, también hay funciones que permiten una mayor tolerancia sin eliminar el Boro, como ocurre al manifestar cambios morfológicos en ápices de raíces bajo condiciones de exceso de Boro, resultantes de un incremento de la presión osmótica causada por la formación de azúcares reductores, para compensar la rigidez que dificulta el crecimiento causada por el desequilibrio osmótico que causa el Boro. Otros ejemplos de mecanismos son la supresión de un nucleótido durante la transcripción capaz aumentar la tolerancia y una mejor distribución en la acumulación del Boro en las hojas almacenándolo principalmente en las vesículas en lugar de almacenarlo en el citoplasma de las hojas, reduciendo así los daños que puede causar.

Además, aunque necesitan de más pruebas, otro mecanismo muy efectivo es el aumento de la prolina que esta proporcionalmente relacionada con la capacidad de tolerar los altos niveles de concentración que llevan a la toxicidad de este elemento. Aunque este es realmente un método de tolerancia al estrés por factores abióticos, ya que la prolina es un aminoácido que además de intervenir en la regulación osmótica, aparece en la planta como respuesta al estrés oxidativo. El estrés oxidativo, es la generación de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno), las especies oxidantes potentes tales como radicales superóxidos, hidróxidos, peróxido de hidrogeno, etc., causan este tipo de estrés en moléculas biológicas, como lípidos y proteínas, provocando la muerte celular y por tanto acortan la vida de la planta. Así pues, se relaciona los sistema antioxidantes no enzimáticos y las enzimas antioxidantes como los mecanismos principales para reducir la toxicidad al Boro y el estrés oxidativo.

## **1.5 Estrategias agronómicas para incrementar la tolerancia a la toxicidad por boro.**

### **1.5.1 Ácidos Húmicos y fúlvicos.**

Las sustancias húmicas no están definidas con exactitud, pero tienen ciertos rasgos que las definen: i) están relativamente oxidadas, ii) son sustancias complejas y iii) principalmente aromáticas de elevado peso molecular e hidrófilas (Porta J., 2019)<sup>[26]</sup>. Son clasificables según el grado de solubilidad que mantienen dependiendo del pH: 1) ácidos fúlvicos (solubles independientemente del pH), 2) ácidos húmicos (solubles a pH alcalino e insolubles a un pH ácido menor que 2) y 3) la humina (insoluble a cualquier pH) (Aldaba-Muñoz D., 2013)<sup>[27]</sup>.

Por tanto, tienen la capacidad de translocar y absorber micronutrientes, así como mejorar indirectamente reteniendo el agua, aumentando el intercambio catiónico y la actividad microbiana del suelo. La rápida absorción de estas sustancias es por su menor peso molecular, sobre todo los ácidos fúlvicos en comparación a los ácidos húmicos por su fácil absorción (Ramos, 2000)<sup>[28]</sup>.

### **1.5.2 Empleo de Ácido Húmico y Ácido Fúlvico como estrategia agronómica para incrementar la tolerancia a la toxicidad por boro.**

Las sustancias húmicas limitan la movilidad de los metales pesados al hacer complejos que los mantienen retenidos en la materia orgánica impidiendo su absorción (Wang y col., 1997)<sup>[29]</sup>. De esta manera la materia orgánica es un componente que afecta directamente a la disponibilidad de este elemento para la planta. El estado de la materia orgánica es muy influyente ya que en estado sólido favorece su adsorción y en estado soluble la disminuye (Goldberg y Suarez, 2012)<sup>[30]</sup>. Con base en el peso, la capacidad de adsorción del Boro en compost húmico y orgánico es mayor que en los minerales arcillosos (Yermiyahu, 2001)<sup>[31]</sup>.

Otra posible manera de reducir la concentración de Boro es la de combinar el cultivo con otras plantas propias de fitorremediación que tienen gran capacidad de absorber metales en exceso el suelo. Aunque probablemente no sea tan eficaz y haya que tener en cuenta los costes que supondría.

Por otra parte, en suelos arenosos, la lixiviación reduce los niveles de Boro, al añadir materia orgánica se reduce la lixiviación e incrementa la absorción del Boro (Yermiyahu, 2001)<sup>[32]</sup>.

## **2. Antecedentes.**

Como base de este trabajo se ha utilizado como fuente principal otro estudio realizado por Simón Grao S., Alfosea Simón M. y col (2020)<sup>[33]</sup> y que incorporaba la medida de tolerancia de la variedad de tomate estudiada en este trabajo junto con otras variedades típicas de la zona, resultando la variedad 'Muchamiel' la más sensible con diferencia y, por tanto, la que más precisaba de un tratamiento que aumentara su tolerancia al Boro, para adaptarse así a las nuevas condiciones del agua de riego. Dicho estudio, se centró en identificar los rangos de tolerancia de las diferentes variedades, para ello también se analizan y cuantifican los síntomas, así como el crecimiento de las diversas partes de la planta, el rendimiento de sus funciones, la movilidad del Boro y los niveles de minerales, carbohidratos y prolina.

A continuación, se buscaron diversos trabajos que corroboraran los resultados del trabajado utilizado como base. Los más relevantes fueron: el realizado por Simón Grao, S. (2015)<sup>[34]</sup> que, aunque trabajaba con cítricos en lugar de plantas de tomate, indicaba con mucho detalle la absorción del boro y los mecanismos relacionados a su tolerancia, otro trabajo de gran importancia fue la tesis doctoral de Cadahía López C. (2015)<sup>[35]</sup> que trabaja con plantas de tomate en condiciones de toxicidad de Boro de manera similar a este estudio y, por otro lado, en la consulta de métodos para aumentar el rango de tolerancia se usaron como modelos el trabajo de Gu B. y Lowe L. E. (1990)<sup>[36]</sup> y el trabajo de Goldberg S. y Suarez L. D. (2012)<sup>[37]</sup> en los cuales se estudiaba la relación del ácido húmico con el Boro.

## **3 Objetivos y plan de trabajo.**

### **3.1 Objetivos.**

Por culpa de las fuertes sequías en las zonas semiáridas de España y a la fuerte demanda alimentaria, los agricultores buscan nuevas fuentes de agua. Esto junto a nuevas tecnologías han hecho que se comience a desalinizar agua para campos de cultivos. Pero este abastecimiento de agua implica el aporte de otros factores como es el aumento de los niveles de Boro que en exceso causa toxicidad en ciertos cultivos.

El tomate, es un cultivo tolerante a este elemento semimetálico y altamente demandado. Es por ello por lo que el Departamento de Nutrición Vegetal del CEBAS-CSIC, junto con el grupo ‘Cultivos Agroenergéticos y Agricultura Sostenibles’ perteneciente a la UMH organiza un estudio científico para determinar factores que implican los rangos para la tolerancia a la toxicidad del Boro para este cultivo. Implicando en un comienzo cuatro variedades de tomate de los cuales solo nos centraremos en una variedad concreta “Muchamiel” en este trabajo, por ser la variedad más sensible a las condiciones que implican toxicidad por Boro. A consecuencia de ello, en el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. El evaluar si la aplicación de ácidos húmicos y fúlvicos de forma radicular contribuye a incrementar la tolerancia de la variedad ‘Muchamiel’ cuando esta es regada con agua que contiene altas concentraciones de Boro ( $10$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de B).
2. Estudiar los mecanismos que permitan dicha tolerancia para combatir las condiciones de estrés oxidativo por Boro y los mecanismos de absorción y acumulación de boro.

El resultado obtenido, mediante el método científico, será necesario para la comprensión de como permitir riegos con características de alta concentración en Boro para el mantenimiento de la agricultura.

### **3.2 Plan de trabajo.**

Basando el trabajo en una variedad altamente comercializada de tomate: ‘Muchamiel’, típica de la zona semiárida necesaria de nuevas fuentes de riego. Se prosigue con la siguiente metodología:

1. Exposición de las plantas a las mismas condiciones para un periodo de aclimatación.
2. Mantenimiento de las plantas con un tratamiento control de  $0,25 \text{ mgL}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$  y enfrentándolas a dos tratamientos de exceso de Boro de  $10$  y  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Simultáneamente se forma un grupo formado por plantas de ambos tratamientos y se les aplica desde el inicio  $5\text{g}$  de materia activa procedentes de ácidos húmicos y fúlvicos.
3. Pasados tres días, son revisados para su posterior comparación: Los parámetros de crecimiento, la nutrición mineral, la cantidad de clorofila y los niveles de carbohidratos.
4. Terminado el tratamiento de duración de  $10$  días, se calcula la capacidad fotosintética y se revisan tanto los parámetros de crecimiento, como relaciones alométricas, nutrición mineral, el nivel del aminoácido prolina y de los carbohidratos.

## 4. Materiales y métodos.

### 4.1 Material vegetal y condiciones.

Para la realización de este ensayo se germinaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) perteneciente a la variedad ‘ en bandejas con vermiculita estéril (sustrato sólido) utiliza la cámara de germinación del CEBAS-CSIC. Previamente las semillas fueron esterilizadas con solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 2% durante 5 min. y después lavadas con abundante agua desionizada. La elección de la variedad de tomate ‘Muchamiel’ se debió a que, en ensayos previos realizados por el CEBAS-CSIC, esta variedad se reveló como una de las más sensibles a la toxicidad por B (resultados publicados en el artículo: “Respuestas fisiológicas y morfológicas al exceso de boro en la solución nutritiva de diferentes variedades de tomate cultivadas en hidropónico” por Simón Grao S., Alfosea Simón M. y col (2020) en *Agrícola Vergel*. Núm. 424, p. 49-58)<sup>[38]</sup>.

Una vez germinadas, fueron trasplantadas a macetas con el mismo tipo de sustrato (vermiculita) y pasadas a una cámara de cultivo situada en las mismas instalaciones del CEBAS-CSIC con condiciones medioambientales controladas: fotoperiodo de 16 horas equivalente a una radiación fotosintética activa (PAR, photosynthetically active radiation) igual a 500  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a una temperatura de 25°C, y una humedad relativa igual al 60%. Cuando las plántulas hubieron emergido y desarrollado completamente 2 hojas verdaderas, se pasaron a macetas de 4 L de capacidad con fibra de coco para que se fueran aclimatando a sus nuevas condiciones ambientales. La fibra de coco está compuesta por: residuo del mesocarpio del fruto del cocotero (*Cocos nucifera*), 70% chip de coco y 30% coco grueso. Una vez trasplantadas, las plantas de tomate se regaban una vez al día durante aproximadamente 2 semanas que duró la fase de aclimatación. El riego se aplicaba con un sistema de goteros autocompensantes de 2 Lh<sup>-1</sup> a un volumen de riego suficiente para que se produjera drenaje en cada riego. En cuanto a la fertilización, las plantas se regaron en la fase de aclimatación con solución nutritiva ‘Hoagland’ al 50% que consiste en un medio nutritivo hidropónico compuesta de KNO<sub>3</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Fe-EDTA y micronutrientes en las concentraciones recomendadas para el correcto desarrollo del cultivo. Tras esa fase y a medida que las plantas fueron creciendo, se aumentó el porcentaje de Hoagland, hasta alcanzar el 100%, y de riego a medida que crecía la demanda nutricional e hídrica.

Para combatir las plagas, se colocaron trampas cromáticas a lo largo del invernadero y se aplicaron periódicamente vía foliar insecticidas, fungicidas y acaricidas para el control de la mosca blanca (*Trialeuro desvaporariorum* y *Bemisa tabaci*), pulgones (*Myzus persicae* y *Aphis gossypii*), trips (*Frankliniella occidentalis*), araña roja (*Tetranychus urticae*) y minador (*Phyllocnistis citrella*). A lo largo de las 6 semanas que duró el ensayo y, al menos, una vez por semana, se procedía a la eliminación de los brotes axilares, cuando estos estaban todavía pequeños (no más de 2 cm). Con esta práctica se evita la pérdida de energía, al evitar que la inviertan en formar nuevas ramas y hojas, y se consigue que la planta esté más aireada.

Todo ello, se llevó a cabo en un invernadero de tipo multitunel en la finca experimental del CEBAS situada en el término municipal de Santomera. Para el control de la temperatura, se disponía de un sistema de refrigeración del tipo “Cooling-System” y de una malla de sombreado de Aluminio (30%). El invernadero incluía también sensores de irradiación, temperatura y humedad relativa colocados a una altura de 1,5 m. El experimento se llevó a cabo durante los meses comprendido entre abril y junio. En este tiempo la temperatura máxima no llegó a 35°C.

#### **4.2 Tratamiento con exceso de Boro y materia activa de ácidos húmicos y fúlvicos.**

Tras dos semanas de aclimatación, las plantas de tomate de la variedad ‘Muchamiel’ fueron regadas a diferente concentración de Boro mediante un sistema de goteros autocompensantes que se ponían en marcha una vez al día. En el control del riego, también se tenían en cuenta que se produjera un drenaje de alrededor del 10-15% del volumen. Teniendo en cuenta que el tomate es un cultivo tolerante al boro, los tratamientos fueron los siguientes: 1) condiciones control en la que la solución nutritiva de riego contenía una concentración de boro de 0.25 mg L<sup>-1</sup> de B (después se analizó y se comprobó que el control utilizado alcanzaba los 0.69 mg L<sup>-1</sup>); y 2) dos tratamientos con exceso de Boro en la que la solución nutritiva de riego contenía una concentración final de 10 y 20 mg L<sup>-1</sup> de B, aplicado en forma de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Para incrementar la tolerancia al exceso de boro, se formaron grupos de plantas regadas con exceso de boro a las que se aplicó materia activa procedente de ácidos húmicos y fúlvicos.

El experimento contó con 5 tratamientos:

1. **Tratamiento control:** plantas regadas con 'Hoagland' a una concentración final de B de  $0.25 \text{ mgL}^{-1}$ .
2. **Tratamiento control  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de B:** plantas regadas con 'Hoagland' a una concentración final de B de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ .
3. **Tratamiento ácidos húmicos y fúlvicos +  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de B:** plantas a las que se les aplicó materia activa de ácidos húmicos y fúlvicos en el momento del trasplante (5 g por maceta) y regadas con 'Hoagland' a una concentración final de B de  $10 \text{ mgL}^{-1}$ .
4. **Tratamiento control  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de B:** plantas regadas con 'Hoagland' a una concentración final de B de  $20 \text{ mg L}^{-1}$ .
5. **Tratamiento ácidos húmicos y fúlvicos +  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de B:** plantas a las que se les aplicó materia activa de ácidos húmicos y fúlvicos en el momento del trasplante (5 g por maceta) y eran regadas con Hoagland a una concentración final de B de  $20 \text{ mgL}^{-1}$ .

#### **4.3 Seguimiento de la transpiración de las plantas.**

Semanalmente, desde que se iniciaron los tratamientos, se realizó un seguimiento de la transpiración de las plantas mediante el peso de las macetas recién regadas y tras 24 h desde el riego. Como control, se pusieron macetas sin plantas para tener en cuenta la pérdida de humedad del sustrato para luego restárselo a las macetas con plantas. Los resultados se expresaron en  $\text{mL de H}_2\text{O transpirada maceta}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ .

#### **4.4 Parámetros de intercambio gaseoso, fluorescencia y contenido de clorofilas.**

Terminado el ensayo, se midieron la tasa de asimilación neta de  $\text{CO}_2$ , la conductancia estomática y se calcularon el uso eficaz del agua por parte de las plantas y la relación  $\text{CO}_2$  subestomático y  $\text{CO}_2$  externo. La medición de estos parámetros vista en la imagen 4.1 se hizo utilizando un analizador portátil de gases para la medición de parámetros de intercambio gaseoso. Durante las medidas el equipo se configuró para mantener la radiación fotosintética activa en un valor de  $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y la concentración de  $\text{CO}_2$  a 400 ppm en la cámara de medida y la radiación fotosintética activa en un valor de  $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Por su parte, las medidas de fluorescencia de clorofilas de la imagen 4.2 se midieron en las mismas hojas en las que se midieron los parámetros de intercambio gaseoso utilizando un fluorímetro de pulso modulado FMS-2 portátil. El equipo de fluorescencia de clorofilas mide los parámetros relacionados con la fase luminosa de la fotosíntesis: la eficiencia de las antenas en los centros de reacción del fotosistema II, el “quenching fotoquímico” o centros del fotosistema II en estado ‘abierto’ y la eficiencia fotoquímica del fotosistema II.

Para ello, las hojas se iluminaron con un radiación fotosintética activa de  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante 2 minutos y después un pulso de luz saturante a  $12000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para 0.8s. Tras este pulso se apagó la fuente de luz actínica y se aplicó un pulso de luz roja lejana para drenar los electrones. Para la cuantificación del contenido relativo de clorofilas, se realizó la medida mediante un medidor portátil CL-01, que determina el contenido relativo de clorofila utilizando la absorbancia de doble longitud de onda óptica de las muestras de hojas.



**Imagen 4.1** Medición de fluorescencia en clorofilas con Fluorímetro portátil de pulso modulado FMS-2.



**Imagen 4.2** Medición de clorofila en hojas con un medidor portátil modelo CL-01.

#### **4.5 Parámetros de crecimiento.**

Tras las medidas de fotosíntesis y fluorescencia, se midieron la altura, la anchura del tallo en la parte media y, finalmente, las plantas de tomate se muestrearon por completo, pesándose por separado las hojas, tallo y raíces (gramos de peso fresco). Posteriormente se lavaron con abundante agua desionizada y se procedió al secado en estufa a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante al menos 48 h. Tras este tiempo, se volvieron a pesar (gramos de peso seco) y se molieron hasta obtener un polvo fino para su posterior análisis en el laboratorio.

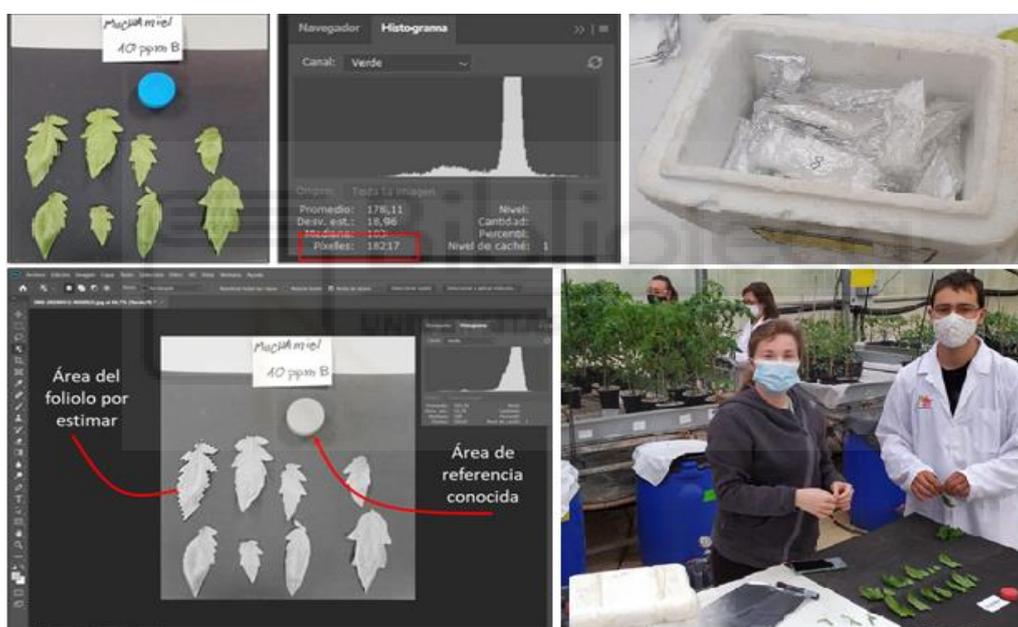
Con esto se calculó la biomasa seca de cada tejido (hojas, tallo y raíz) y el contenido de agua de la parte aérea y raíz. También, se muestrearon las flores del primer racimo emergido para su posterior análisis mineral. Además, de los folíolos muestreados para posteriores análisis se tomaron fotografías para cuantificar el área foliar de los folíolos mediante un protocolo de análisis de imágenes utilizando fotografías digitales y el software Photoshop CS5 que se muestra en la figura 4.3.

#### Contenido en agua (%)

$$[(\text{Peso} - \text{Peso seco}) / \text{Peso}] \times 100.$$

#### Biomasa pesada (%)

$$[\text{Peso seco} / \text{Peso}] \times 100.$$



**Figura 3.4** Estimación del área foliar mediante fotografías en fondo negro y con el software Photoshop CS5. Conservación con nitrógeno líquido antes de pasar a calcular el peso seco después de las fotografías.

#### 4.6 Porcentaje de reducción y grado de tolerancia.

Para la determinación del nivel de tolerancia de las plantas de tomate var. ‘Muchamiel’ a la toxicidad por B, se calculó el porcentaje de reducción de las hojas y de la raíz (de manera independiente) de las plantas crecidas bajo esas condiciones (10 y 20 mg L<sup>-1</sup> B) con respecto al de las crecidas bajo condiciones control (0.25 mg L<sup>-1</sup> B; datos tomados en g Ps). En la tabla 4.1 se muestra la relación entre el % de reducción de cada tejido con el nivel de tolerancia que se ha seguido.

**Tabla 4.1.** Nivel de tolerancia establecido en función del porcentaje de reducción de los distintos tejidos de las plantas (gPs) con respecto al tratamiento control  $0.25 \text{ mgL}^{-1} \text{ B}$ .

<i>Nivel de tolerancia</i>	<i>% Reducción</i>
<i>Muy tolerante</i>	<b>&lt; -20</b>
<i>Tolerante</i>	<b>-20 a 10</b>
<i>Semitolerante</i>	<b>11 a 30</b>
<i>Sensible</i>	<b>31 a 50</b>
<i>Muy sensible</i>	<b>51 a 100</b>

#### **4.7 Determinación de nutrientes minerales.**

En el tejido vegetal se determinó la concentración de nutrientes minerales (K, Mg, Ca, P, Mn, Zn, Fe y B), tanto en hoja como en raíz, para cada planta por espectrometría de plasma acoplado inductivamente (ICP, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA), previamente se había realizado la digestión con  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$  (5:3 en volumen) utilizando un microondas (CERM Mars Xpress, North Carolina, USA) con rampa de temperatura alcanzado los  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ . También se determinó la presencia de B en la fibra de coco (en forma asimilable y no asimilable) y en el agua de drenaje; todo ello, para conocer la presencia de B en cada una de sus partes y así determinar si los tratamientos alteran su distribución y/o movilización en dicho sistema. Para la cuantificación de la concentración de B presente en forma asimilable en la fibra de coco se procedió a la extracción de este con agua caliente y posterior cuantificación siguiendo el método determinación colorimétrica con azometina-H.

#### **4.8 Determinación de prolina.**

La concentración de prolina en el tejido foliar, se midió por espectrofotometría de acuerdo con el protocolo que describieron Bates y col. (1973)<sup>[39]</sup> y expresada en  $\text{mg}$  de prolina  $\text{g}^{-1}$  peso seco.

## 4.9 Análisis estadístico.

Se presentó un diseño unifactorial, aplicando materia activa de ácido húmico y fúlvico sobre plantas de tomate (variedad 'Muchamiel') desarrolladas bajo dos condiciones de exceso de boro 10 y 20 mgL<sup>-1</sup> y comparándolas con la condición control 0.25 mgL<sup>-1</sup>. Debido a esto, el análisis estadístico incluyó un análisis de la varianza ANOVA mediante el paquete estadístico SPSS versión 24. Los valores que se presentan para cada tratamiento son las medias de 6 repeticiones ( $n=6$ ) por tratamiento. Aplicando el test de rangos múltiples de Tukey para la separación de las medias cuando el factor resultaba significativo ( $P<0.05$ ).

## 5. Resultados.

### 5.1. Parámetros de crecimiento.

Para comparar los resultados obtenidos se tomó en cuenta como referencia, los resultados de un ensayo anterior a este estudio, realizado por este mismo grupo de investigación ("Respuestas fisiológicas y morfológicas al exceso de boro en la solución nutritiva de diferentes variedades de tomate cultivadas en hidropónico" por Simón Grao S., Alfosea Simón M. y col (2020) en *Agrícola Vergel*. Núm. 424, p. 49-58<sup>[40]</sup>, en los que se trabajó sobre esta misma variedad de tomate 'Muchamiel' en base a una concentración de Boro 10 mg L<sup>-1</sup> en la solución nutritiva. En este ensayo se muestra como resultado una disminución del 47% en el tejido radicular y un 31% del foliar, lo que supone una pérdida del 32% en la biomasa de las plantas.

Era de esperar por tanto que, en este ensayo las concentraciones de 10 y 20 mg L<sup>-1</sup> B en el agua de riego redujeran la cantidad de biomasa perteneciente a las hojas y a las raíces. No obstante, las diferencias en los parámetros de crecimiento no han sido relevantes, al comparar las plantas expuestas a aguas de riego con 10 y 20 mg L<sup>-1</sup> de Boro con las del tratamiento control, regadas con una concentración de 0.25 mg L<sup>-1</sup>. Estos resultados quedan expuestos en la figura 4.1, en la que también se ve un incremento significativo del crecimiento de la parte foliar, del tejido radicular y del diámetro del tallo en las plantas a las que se les aplicó, mediante vía radicular, materia activa perteneciente a ácidos húmicos y fúlvicos. Lo que concuerda con la idea de que esta materia activa puede retener el Boro, evitando que sea absorbido por completo en la raíz permitiendo así el mejor desarrollo de algunas partes de la planta.

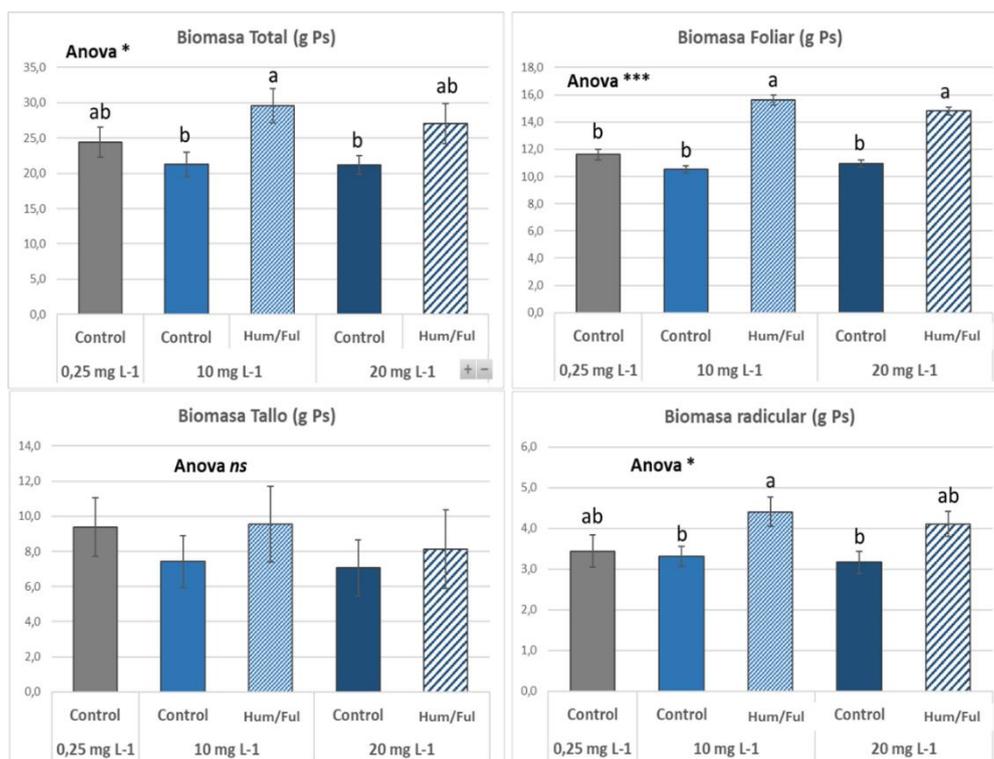


Figura 5.1 Crecimiento en peso seco de hojas, tallo, raíz, y biomasa total en aplicaciones Control 0.25 mgL<sup>-1</sup> B y excesos de boro: 10 mgL<sup>-1</sup> B, 10 mgL<sup>-1</sup> B + Hum/Ful (ácidos húmicos y fúlvicos), 20 mgL<sup>-1</sup> B y 20 mgL<sup>-1</sup> B + Hum/Ful. En Anova: ‘ns’ es que no hay diferencias significativas en un intervalo de confianza del 95%; \* y \*\*\* en cambio muestran diferencias significativas en P<0.05 y 0.001. Para cada variable, las *letras minúsculas* muestran diferencias significativas entre aplicaciones con el test de rangos múltiples de Duncan (n=6).

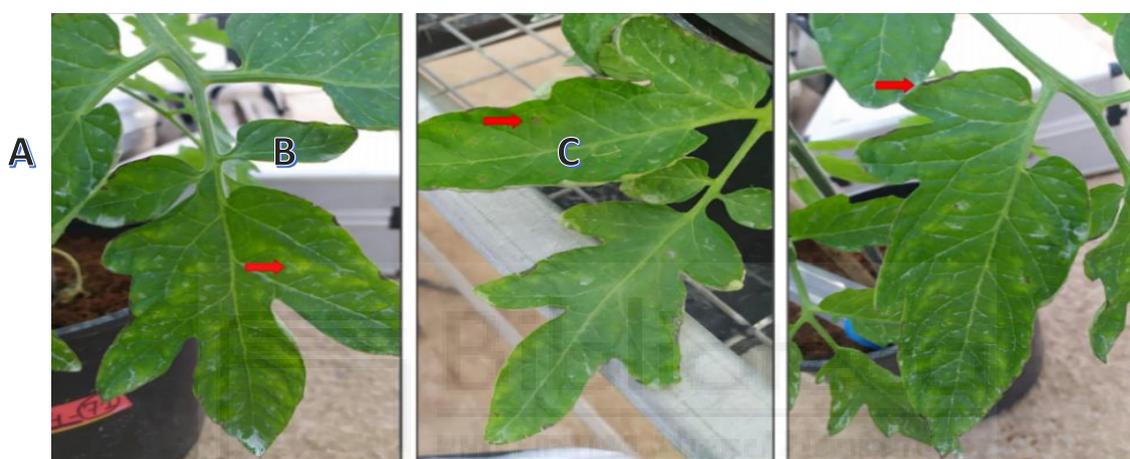
UNIVERSITAS Miguel Hernández

**Tabla 5.1.** Crecimiento, tratamiento control con las diferentes concentraciones de Boro en agua de riego y del uso de materia activa. Los parámetros usados son altura, diámetro del tallo, área foliolo y la relación de la parte aérea con la parte radicular. Las siglas NS, significan que no hay diferencia significativa en un 95% con ANOVA y el signo ‘\*’ marca valores significativos en P<0,05. En cada variable, las *letras minúsculas* son diferencias significativas entre las distintas aplicaciones establecidas con un test de rangos múltiples de Duncan (n=6).

Tratamientos de Boro agua de riego (mgL <sup>-1</sup> B)						
Producto	Control 0.25	10	10+Hum/Ful	20	20+Hum/Ful	ANOVA
Relación aérea/radicular	6.45	5.67	5.82	5.92	5.70	NS
Altura (cm)	62.2	58.3	55.3	58.4	59.0	NS
Diámetro tallo (mm)	8.48 ab	7.7 b	9.11 a	8.37 ab	8.97 a	*
Área Foliolo (cm <sup>2</sup> )	30.6 b	36.7 ab	44.6 a	35.2 ab	42.8 a	*

## 5.2 Síntomas externos de toxicidad por exceso de boro en plantas de tomate.

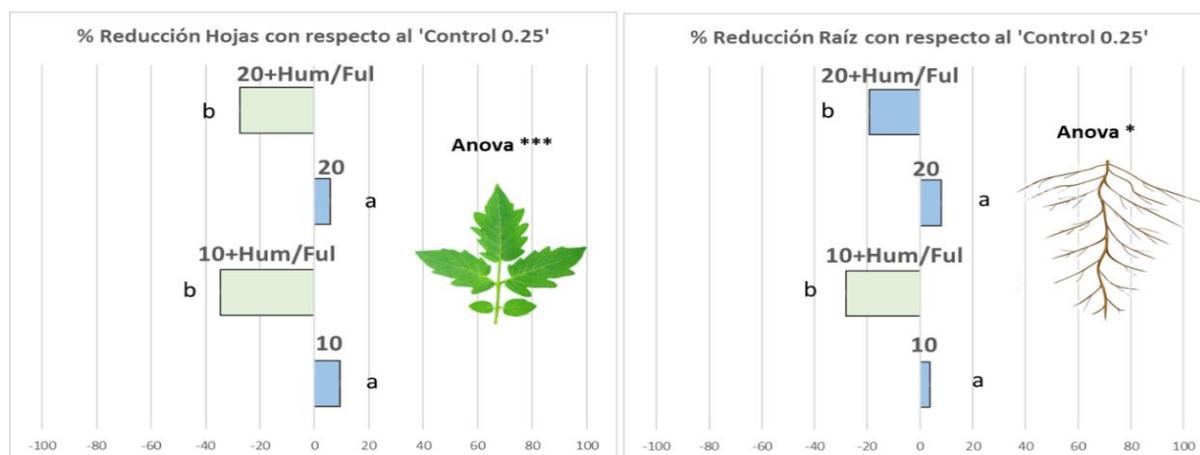
Las plantas tratadas con exceso de Boro, tanto las de concentración de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  y de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  manifestaron síntomas fitotóxicos, pero solo en hojas basales más viejas. Aunque las plantas de ambas concentraciones manifestaban los síntomas, no se mostró una relación significativa entre la concentración de Boro en el agua de riego con la intensidad de los síntomas. En las partes más jóvenes no se detectó a simple vista ningún síntoma como en las hojas más viejas que presentaban en el haz de las hojas, zonas necrosadas junto con clorosis, presentando también necrosis en el envés en las hojas más afectadas. En la imagen 5.1 se ven estas hojas ya formadas con sus respectivos síntomas.



**Imagen 5.1** Fitotoxicidad por exceso de Boro en el agua empleada en el riego. En la imagen 'A', se señala unas manchas causadas por clorosis y en las imagen 'B' y 'C', se muestran áreas necrosadas.

## 5.3 Grado de tolerancia de las plantas de tomate crecidas bajo condiciones de exceso de B en el agua de riego a las cuales se ha aplicado el producto Materia activa ácidos húmicos y fúlvicos.

La afirmación de que el tomate de la variedad 'Muchamiel' es un cultivo tolerante al estrés oxidativo, causado por exceso de Boro concuerda con los datos obtenidos en el crecimiento del cultivo al regarlos con agua que contenía concentraciones de  $10$  y  $20 \text{ mgL}^{-1}$ , ya que apenas ha habido reducción del crecimiento de la biomasa con estas concentraciones. Pero también prueban que el Boro causa síntomas de fitotoxicidad junto con una reducción del crecimiento por lo que un aumento de este podría ocasionar la muerte de la planta, lo que se puede evitar según los resultados usando materia activa de ácido húmico y fúlvico, lo que podría permitir el riego continuado de agua con estos valores.



**Figura 5.2** % de reducción en la parte aérea con distintas aplicaciones de exceso de B en plantas de tomate de variedad 'Muchamiel'. En ANOVA: \* y \*\*\* son diferencias significativas para  $P < 0.05$  y  $0.001$ . Las letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre las aplicaciones con el test de rangos múltiples de Duncan. La barra vertical es el error estándar de la media ( $n=6$ ).

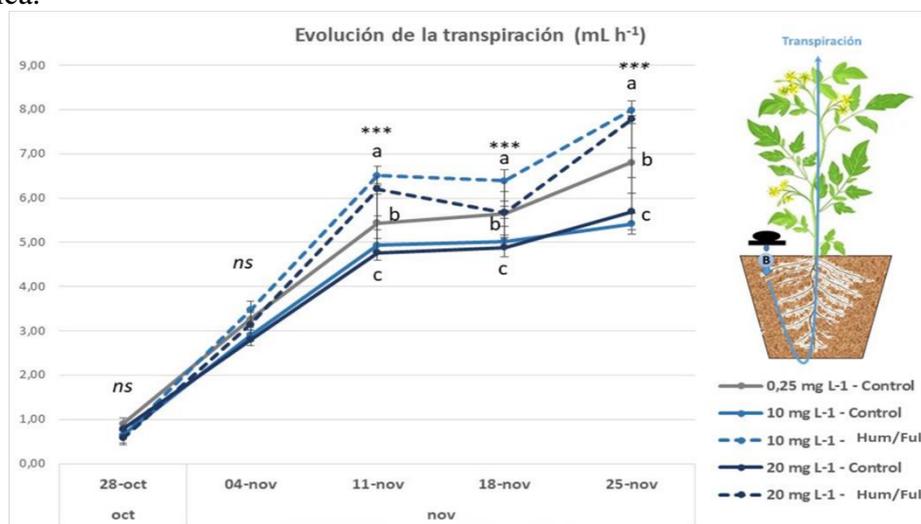
**Tabla 5.2** Tolerancia de las plantas de tomate variedad 'Muchamiel' a los distintos tratamientos con exceso de Boro, los números negativos en '% Reducción Parte aérea' representan un incremento del crecimiento en la zona.

Cultivo: TOMATE. Variedad 'MUCHAMIEL'			
Tejido	Tratamiento	% Reducción Parte aérea	Nivel de Tolerancia
HOJA	10 mg L <sup>-1</sup> B	9	Tolerante
	10 mg L <sup>-1</sup> B + Hum/Ful	-34	Muy Tolerante
	20 mg L <sup>-1</sup> B	6	Tolerante
	20 mg L <sup>-1</sup> B + M.A.	-27	Muy Tolerante
RAIZ	10 mg L <sup>-1</sup> B	4	Tolerante
	10 mg L <sup>-1</sup> B + Hum/Ful	-28	Muy tolerante
	20 mg L <sup>-1</sup> B	8	Tolerante
	20 mg L <sup>-1</sup> B + Hum/Ful	-19	Tolerante

#### 5.4 Evolución de la transpiración.

Manteniendo un seguimiento continuo de la transpiración a través de los estomas, se obtuvo que los valores máximos para la transpiración de aquellas plantas regadas con exceso de Boro fueron los previos al muestreo final entre  $5,40$  y  $8,00 \text{ mlh}^{-1}$ . Los valores de transpiración en los cultivos regados con  $10$  y  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de Boro son siempre inferiores a los que se muestran en el control con excepción de aquellas plantas a las que se les aplicó la materia activa de ácidos húmicos y fúlvicos, las cuales presentaron continuamente valores mayores y muy parecidos a las plantas controles.

Lo que parece mostrar que el exceso de Boro en el riego efectivamente disminuye la transpiración de las plantas aun teniendo cierta tolerancia y que la aplicación de materia activa procedente de ácidos húmicos y fúlvicos de lenta liberación retienen parte del Boro mejorando la adecuada asimilación de este por las raíces y afectando positivamente a la transpiración estomática.



**Figura 5.3** Seguimiento de transpiración en los cultivos de los tratamiento Control 0.25 mgL<sup>-1</sup> B y de exceso de boro: 10 mgL<sup>-1</sup> B, 10 mgL<sup>-1</sup> B + Hum/Ful , 20 mgL<sup>-1</sup> B y 20 mgL<sup>-1</sup> B + Hum/Ful En Anova: ‘ns’ se refiere a que no se ha visto una diferencia significativa en un intervalo de confianza del 95%; y \*\*\* muestra que hay diferencias significativas en P<0.001. En cada fecha, las *letras minúsculas* representan diferencias significativas entre tratamientos establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan (n=6).

## 5.5 Parámetros fisiológicos.

Los datos obtenidos de las mediciones de intercambios gaseosos y las de clorofilas por fluorescencia, no mostraron tener una diferencia significativa entre las plantas regadas con exceso de Boro y en las representativas como control respecto a estos parámetros, tanto para las concentraciones de 10 mgL<sup>-1</sup> como para las de 20 mgL<sup>-1</sup>. Además, los datos tampoco mostraron que el exceso de Boro cambiara el nivel de clorofila de manera significativa entre las hojas de diferentes alturas dentro de las mismas plantas, representando las distintas alturas la diferencia de maduración de las hojas. Pero si hay un incremento significativo del crecimiento en las hojas situadas a mediana altura en el tratamiento que aplicaba una concentración de 10 mgL<sup>-1</sup> al aplicar simultáneamente la materia activa de ácidos húmicos y fúlvicos de lenta liberación y también un incremento de las hojas más nuevas a alta altura y de las medianas en el tratamiento con una concentración de 20 mgL<sup>-1</sup> al aplicar también la materia activa. Por lo que la aplicación de ácidos húmicos y fúlvicos parece compensar las condiciones de toxicidad por boro que afectan al desarrollo del área foliar.

**Tabla 5.3** 5 tratamientos: Control (0.25 mg L<sup>-1</sup> B), 10 mg L<sup>-1</sup> B, 10 mg L<sup>-1</sup> B + MA, '20 mg L<sup>-1</sup> B y '20 mg L<sup>-1</sup> B + MA. ANOVA: 'ns' indica diferencias significativas para un intervalo de confianza del 95%; por su parte, \*\* indica diferencias significativas para P<0.01. Para cada variable, las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos establecidas por el test de rangos múltiples de Tukey (n=6).

Producto	Tratamientos de Boro con agua de riego (mg L <sup>-1</sup> )					ANOVA
	0.25	10	10+M.A	20	20+M.A	
A <sub>CO2</sub> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	12.9	19.4	16.7	19.9	18.5	Ns
Gs (mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	204.3	223.7	250.7	232.3	198.7	Ns
CiCa	0.55	0.50	0.61	0.53	0.51	Ns
UEA (μmol CO <sub>2</sub> mmol <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O)	2.67	3.34	2.55	3.09	3.22	Ns
Chl-HV	10.4	10.8	11.2	10.7	10.4	Ns
Chl-HM	13.4 b	14.3 b	17.4 a	13.7 b	15.5 ab	**
Chl-HA	20.5 b	22.7 b	22.7 b	19.6 b	28.1 a	**
Fv'/Fm'	0.778	0.780	0.809	0.812	0.768	Ns
qP	0.833	0.892	0.825	0.837	0.856	Ns
Φ <sub>PSII</sub>	0.640	0.695	0.662	0.674	0.659	Ns

#### Intercambio gaseoso

Asimilación neta de CO<sub>2</sub> (A<sub>CO2</sub>)  
 Conductancia estomática (Gs)  
 CO<sub>2</sub> subestomático y ambiental (CiCa)  
 Eficiente del Agua fisiológico (UEAf)

#### Fluorescencia

Eficiencia de las antenas (Fv'/Fm)  
 'Quenching fotoquímico' (qP)  
 Eficiencia fotoquímica PSII (Φ<sub>PSII</sub>)

#### Clorofilas en hojas

Hojas vieja (Chl-HV)  
 Hojas medianas (Chl-HM)  
 Hojas del ápice (Chl-HB)

## 5.6 Concentración de boro en las diferentes partes del sistema sustrato-planta.

En el ensayo es importante también obtener los valores que expresan la acumulación de Boro tanto en el sustrato utilizado como en las plantas. Como mostraban los estudios previamente consultados, el exceso de Boro en el agua empleada para el riego incrementaron la concentración de este en las diferentes partes del cultivo, en el sustrato y el agua que va drenando el propio sustrato. El sustrato del ensayo fue fibra de coco y las partes en las que se acumulaba el Boro dentro de las plantas de tomate fueron: la flor, las hojas y la raíz, pero no todos los tratamientos presentaron el mismo porcentaje de distribución en la acumulación de Boro en estos elementos.

- Tratamiento control con una concentración de Boro equivalente a 0.25 mg L<sup>-1</sup>, la mayor acumulación se centró en la fibra de coco después en las flores, en menor cantidad en hojas y por último en la raíz.
- En exceso de Boro, en estos tratamientos el sustrato de fibra de coco también es donde se encontró una mayor concentración, pero a diferencia del tratamiento control las flores pasaron a tener el nivel más bajo de acumulación en comparación con las hojas y la raíz.

El valor más bajo de acumulación en flores, hojas y en el drenado del agua, dependiendo del tratamiento fueron con el tratamiento control de 0.25 mg L<sup>-1</sup> y el más alto el valor resultante de aplicar 20 mgL<sup>-1</sup> de Boro con la materia activa de ácidos húmicos y fúlvicos, seguido del mismo tratamiento sin la materia activa, igual ocurre con el tratamiento de 10 mg L<sup>-1</sup> que presenta mayores valore al aplicar conjuntamente la materia activa. Sin embargo, para el sustrato y la raíz, aunque el valor de la acumulación aumenta en el tratamiento de 20 mg L<sup>-1</sup> al aplicar la materia activa, no ocurre igual con el tratamiento de 10 mg L<sup>-1</sup> que muestra mayores valores de acumulación en el sustrato y la raíz en ausencia de la materia activa. Por lo que los resultados parecen indicar que la acumulación se puede disminuir en la raíz de los cultivos de tomates aplicando materia activa.

**Tabla 5.4** Boro cuantificado en el sistema sustrato-planta, en tomateras cultivadas con 5 tratamientos: Control 0.25 mgL<sup>-1</sup> B, 10 mgL<sup>-1</sup> B, 10 mgL<sup>-1</sup> B + M.A., 20 mgL<sup>-1</sup> B y 20 mgL<sup>-1</sup> B + M.A. En Anova: \*\*\* indican diferencias significativas para P<0.001. En cada variable, las *letras minúsculas* indican diferencias significativas entre tratamientos por el test de rangos múltiples de Duncan ( $n=6$ ).

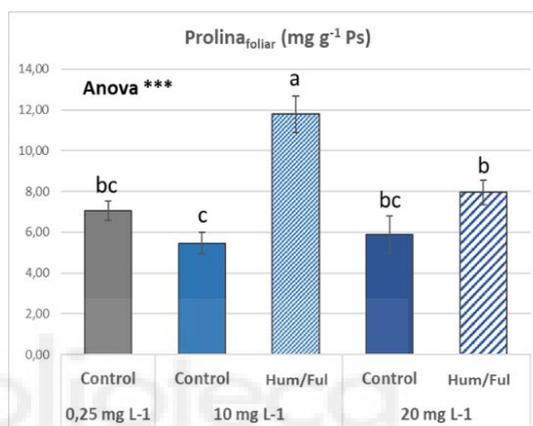
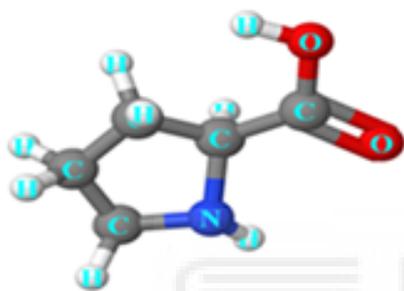
Producto (mg Kg <sup>-1</sup> Ps)	Tratamientos de Boro agua de riego (mg L <sup>-1</sup> )					ANOVA
	Control 0.25	10	10+M.A.	20	20+M.A.	
Flores	38.9 e	53.7 d	66.7 c	75.9 b	104.7 a	***
Hojas	35.5 c	76.5 bc	121.9 b	135.0 b	333.1 a	***
Raíz	32.4 c	93.8 ab	79.5 b	108.0 ab	121.4 a	***
Fibra de coco	46.5 c	214.5 b	208.3 b	375.1 a	395.6 a	***
Fibra de coco asim.	3.39 c	7.48 b	6.62 b	8.80 a	9.68 a	***
Agua de drenaje mgL <sup>-1</sup>	0.32 d	2.85 c	6.35 b	7.77 b	12.9 a	***

### 5.7 Concentración de prolina foliar.

Otro de los factores a tener en cuenta es la respuesta ejercida por la planta al estrés abiótico causado por la toxicidad y que le confiere cierta tolerancia, como la generación del aminoácido prolina que se ha visto previamente en otros estudios que es característica su acumulación en variedades más tolerantes de tomates. Sin embargo, la variedad de ‘Muchamiel’ es una variedad más sensible, puesto que manifiesta síntomas fototóxicos a menores concentraciones lo que podría deberse a una menor respuesta en la generación de este aminoácido, ya que se han obtenido valores menores del nivel de la prolina foliar al aplicar ambas concentraciones de exceso de Boro por vía radicular que con la concentración control.

No obstante, el nivel de concentración de la prolina foliar se ha visto aumentado significativamente en ambos tratamientos con exceso de Boro al añadir la materia activa, especialmente en las correspondientes a la concentración de Boro de 10 mg L<sup>-1</sup> donde el valor de la prolina aumenta más del doble respecto al valor obtenido sin la materia activa de lenta liberación (de 5.46 a 11.8 mg g<sup>-1</sup>Peso seco). Lo que muestra que la materia activa de lenta liberación genera acumulación de prolina en las hojas de esta especie, mejorando su tolerancia a estas condiciones de estrés inducidas por la toxicidad.

**Prolina C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>**  
**Modelo 3D**



**Figura 5.4** Prolina foliar (mgg<sup>-1</sup>Ps) en plantas cultivadas con tratamientos Control (0.25 mgL<sup>-1</sup> B) y exceso de boro: 10 mgL<sup>-1</sup> B, 10 mgL<sup>-1</sup> B + Hum/Ful, '20 mgL<sup>-1</sup> B' y '20 mgL<sup>-1</sup> B + Hum/Ful. En el Anova: \*\*\* son diferencias significativas en P<0.00. Las *letras minúsculas* diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos establecidas por el test de rangos múltiples de Duncan ( $n=6$ ).

## 6. Discusión.

El objetivo final del estudio fue conocer si con la aplicación de productos comerciales formulados con ácidos orgánicos, principalmente ácidos húmicos y fúlvicos, se pueden cultivar en zonas semiáridas de forma comercial plantas de tomate regadas con aguas que contienen alta concentración de Boro. Con este fin se propuso en primer lugar, encontrar el rango de tolerancia del tomate para la variedad 'Muchamiel' en condiciones de toxicidad por boro. Y, en segundo lugar, se propuso la mejora de este rango de tolerancia aplicando una estrategia agronómica para tal fin. La metodología implicada nos proporcionó datos realistas para lograr los objetivos propuestos. Tras el estudio de diferente documentación bibliográfica se tomó como hipótesis para el primer objetivo que el rango de tolerancia para la variedad a ensayar podría estar entre 10 y 20 mg L<sup>-1</sup> en el agua de riego y para la estrategia agronómica para incrementar dicho nivel de tolerancia se seleccionó el efecto que tienen los ácidos húmicos y fúlvicos en la química del boro y su efecto estimulante en las plantas.

El cultivo de tomate se clasifica en la categoría de cultivo moderadamente tolerante (concentración máxima en el agua de riego = 4-6 mgL<sup>-1</sup> B) según British Columbia Water Quality Guidelines (2019)<sup>[41]</sup>. Sin embargo, cuando estas plantas se mantienen un tiempo prolongado regándose con aguas de alto contenido en Boro tienen problemas de toxicidad ya que este nutriente se va acumulando progresivamente en las hojas. Y, hasta la fecha de hoy, no se ha visto que las plantas de tomate tengan un control eficaz en la restricción del Boro desde la raíz hacia la parte aérea. Por lo tanto, para impedir la reducción de la producción y la pérdida de calidad de los frutos en el cultivo de tomate es necesario diseñar una estrategia agronómica basada en la aplicación de ácidos orgánicos del tipo húmicos y fúlvicos.

Las medidas de biomasa seca de nuestro experimento muestran que hay una reducción del crecimiento vegetativo de las plantas (área foliar y la raíz). Esta respuesta es similar a otros cultivos como tomate o cítricos según los datos aportados por la investigadora Simón-Grao y col (2015)<sup>[42]</sup>. Aunque la duración del ensayo no permitió ver diferencias significativas en el desarrollo de las plantas ya que el periodo experimental fue relativamente corto en relación con el tiempo necesario para que esta planta desarrolle todas sus fases fenológicas, podemos decir por los síntomas de fitotoxicidad de esta variedad es particularmente sensible a dicha toxicidad. Los síntomas de amarilleamiento y manchas necrosadas en hojas por boro aparecieron en ambas concentraciones 10 y 20 mgL<sup>-1</sup> B en hojas viejas, sin embargo, no se encontró una relación entre la cantidad de boro suministrada y la intensidad de los síntomas. Esto se debe a que el Boro se va acumulando primero en las hojas viejas siguiendo el flujo de transpiración, y, el ensayo de 10 días no fue suficiente para observar cambios ni en el estado vegetativo de las plantas, ni en la distribución de Boro en sus tejidos. Esto también fue observado por otros autores que comprobaron que los síntomas de toxicidad primero ocurren en las hojas viejas y no en jóvenes (Nable y col., 1997)<sup>[43]</sup>. En cuanto a la distribución de boro en el sistema sustrato-planta se ha visto que el boro se acumula mayoritariamente en el sustrato y después en las plantas con más concentración en las hojas seguidas de las raíces y por último los órganos reproductores. El orden en el que las diferentes partes de la planta de tomate acumulan el boro concuerdan con el presentado por Simón Grao S., Alfosea Simón M. y col (2020)<sup>[44]</sup>.

Los datos de nuestro experimento mostraron que la aplicación de ácidos húmicos y fúlvicos en concentraciones de 5 g por cada planta de tomate incrementó la tolerancia al boro de esta variedad. Esto fue debido a que la toxicidad del B pudo haber sido desactivada al formar complejos con los ácidos fúlvicos y húmicos, formando compuesto B-OH.

No obstante, a pesar de que la materia activa incrementó dicha tolerancia, también incrementó la concentración de B en flores, hojas y raíz. Esta respuesta pudo ser debida a que indujo una mejor respuesta fisiológica en las plantas de tal manera que al incrementar la tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> y la transpiración produjo colateralmente una mayor acumulación de boro. Este micronutriente se absorbe en las raíces de forma pasiva cuya entrada y transporte en la planta depende de la tasa de transpiración.

## **7. Conclusiones.**

Efectivamente al cultivar bajo condiciones de exceso de boro como mostraron los resultados, esta variedad se mostró más bien sensible a este tipo de toxicidad como se esperaba, pero se puede apreciar una notable resistencia en las plantas a las que solo se les aplico 10 mg L<sup>-1</sup> ya que poseen un mayor crecimiento en hojas y diámetro del tallo que las regadas con una concentración de 20 mg L<sup>-1</sup>.

Por su parte, la aparición de ácidos húmicos y fúlvicos muestra una mejora considerable tanto del crecimiento como de las funciones de la planta junto con la desaparición de los síntomas causantes de problemas fotosintéticos. Por lo que podemos concluir que utilizar materia activa procedente de ácidos húmicos y fúlvicos es una buena estrategia agronómica capaz de reducir el efecto negativo en las plantas de tomate al exceso de boro en la solución nutritiva, sobre todo en aquellas variedades que resultan sensibles a este tipo de estrés. Esto es debido a que esta materia activa es de liberación lenta por lo que con pocas aplicaciones a lo largo del cultivo reduce el estrés que causa la alta concentración de boro en las aguas de riego no convencionales. No obstante, es interesante llevar este tipo de cultivo a producción y ver la función de los ácidos húmicos y fúlvicos en la acumulación de boro en los frutos de tomate.

## **8. Proyección futura.**

Es interesante continuar con los ensayos y llevar a cabo este tipo de cultivo a producción en invernadero para ver la función de los ácidos húmicos y fúlvicos en la acumulación de boro en los frutos de tomate. Este tipo de ensayo se pueden realizar en otras plantas que también tengan alta sensibilidad al boro.

## 9. Bibliografía.

- ALDABA-MUÑOZ D. (2013). *Transporte por difusión de radionucleidos en suelos y arcillas*. Tesis. Barcelona. Universidad de Barcelona.<sup>[27]</sup>
- Asociación Española de Desalación y Reutilización (AEDyR). ‘*Cifras de desalación en España*’ (11/02/2019). <<https://aedyr.com/cifras-desalacion-espana/>>.<sup>[9]</sup>
- AYERS R.S., WESTCOT D.W. (1989). ‘Water Quality for Agriculture’ en *Irrigation and Drainage paper*, N° 29, Página 174. FAO (Food and Agriculture Organization.). Roma.<sup>[24]</sup>
- BATES L.S., WALDREN R.P. y TEARE I.D. (1973). “Rapid determination of free proline for water-stress studies”. *Plant and Soil*. Volumen 39, págs 205–207.<sup>[39]</sup>
- BRITISH COLUMBIA (2019). “Water quality guidelines”.<sup>[41]</sup>
- BROWN P. H., BELLALOU I., WIMMER M.A., BASSIL E.S., RUIZ J., HU H., PFEFFER H., DANIEL F., RÖMHELD V. (2002). “Boron in Plant Biology”. *Plant Biology*. Volumen 4, págs 211-229.<sup>[13][18]</sup>
- BROWN P.H. y HU H. (1998(a)). “Boron mobility and consequent management in different crops”. Volumen 82 (2), páginas 28-31.<sup>[8][21][22]</sup>
- CADAHÍA LÓPEZ C. (2015). *Estudio de la incidencia del boro en la nutrición de las plantas de tomate, rendimientos y calidad de los frutos*. Tesis. Madrid. Universidad Complutense de Madrid.<sup>[35]</sup>
- DELL B. y HUANG L. (1997). “Physiological response of plants to low boron”. *Plant Soil*. Volumen 193. Números 1 y 2, páginas 103–120.<sup>[12]</sup>
- GOLDBERG S. y SUAREZ D.L. (2012). ‘Role of Organic Matter on Boron Adsorption-Desorption Hysteresis of Soils’. *Soil Science*. Volumen 177, número 7, páginas 417-571.<sup>[30][37]</sup>

- GREENWOOD N. y EARNSHAW A. (1997). “Chemistry of the elements”. *Pergamon Press*, New York, segunda edición. Págs 139-212.<sup>[4]</sup>
- GU B. y LOWE L.E. (1990). “STUDIES ON THE ADSORPTION OF BORON ON HUMIC ACIDS”. *Canadian Journal of Soil Science*. Volumen 70, págs 305-311.<sup>[36]</sup>
- HANSMANN, E.W. y PHINNEY, H.K. (1973). ‘Effects of logging on periphyton in coastal streams of Oregon’. *Ecology*: Volumen 54, número 1, páginas 194-199.<sup>[30]</sup>
- HERNÁNDEZ-RIOS I., MARKWELL J., NAMUTH D. (2003). “Plant Pigments and Photosynthesis”. *Plant and Soil*  
[https://passel2.unl.edu/view/lesson/ae42848963d4/glossary.\[x\]](https://passel2.unl.edu/view/lesson/ae42848963d4/glossary.[x])
- HERRERA-RODRÍGUEZ M.B., GONZÁLEZ-FONTES A., REXACH J., CAMACHO-CRISTÓBAL J.J., MALDONADO J.M., NAVARRO-GOCHICOA M.T. (2010). “Role of boron in vascular plants and response mechanisms to boron stress”. *Plant Stress*. Volumen 4. Número 2, págs 115-122.<sup>[17][23]</sup>
- HOVANSKI Y., SANTELLA M.L. y GRANT G.J. (2007). ‘Friction stir spot welding of hot-stamped boron Steel’ en *Scripta Materialia*, volumen 57, Número 9, pags 873-876.<sup>[1]</sup>
- HU H. y BROWN P.H. (1997). “Absorption of boron by plant roots”. *Plant and Soil*. Volumen 193, páginas 49–58.<sup>[8][20]</sup>
- HU H., PENN S.G., LEBRILLA C.B., BROWN P.H. (1997). “Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants (the mechanism of phloem mobility of boron”. *Plant Physiology*.<sup>[f1.1]</sup>
- LIU Y., CHENG L., ZHANG L. y WU S. (2007). ‘Oxidation protection of multilayer CVD SiC/B/SiC coatings for 3D C/SiC composite’ en *Material Science and Engineering: A*, Volumen 466, Números 1-2 y Pág 172-177.<sup>[3]</sup>

- MALAVOLTA E., VITTI G.C. y DE OLIVEIRA S. (1989). Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. Pág 201.<sup>[10]</sup>
- MARSCHNER H. (1995). “Functions of mineral nutrients: micronutrients”. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2ª edición, págs 313–404. London: Academic Press.<sup>[11]</sup>
- NABLE, R., BAÑUELOS G. y PAULL J. (1997). “Boron toxicity”. *Plant and Soil*. Volumen 193, números 1 y 2, p. 181-198.<sup>[43]</sup>
- O'NEILL M.A., ISHII T., ALBERSHEIM P. y DARVILL A.G. (2004). “Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide”. *Annual Review Plant Biology*. Volumen 55, págs: 109–139.<sup>[14]</sup>
- PORTA J., LÓPEZ-ACEBEDO M., ROQUERO C. (1994). ‘Edafología para la agricultura y el medio ambiente’. *Mundi-Prensa*, Madrid, España.<sup>[26]</sup>
- POWER P. y WOODS W. (1997). ‘The chemistry of boron and its speciation in plants’ en *Plant and Soil*, volumen 193, Issues 1-2 y páginas 1-13.
- RAGINOV U. A., (1969). “Application of microelements for increasing the resistance of tomatoes to virus diseases”. *Horticultural Abstracts*, XL, pág 785.<sup>[16]</sup>
- RAMOS RUIZ R. (2000). *Aplicación de sustancias húmicas comerciales como productos de acción bioestimulantes. Efectos frente al estrés salino*. Tesis. Alicante. Universidad de Alicante.<sup>[28]</sup>
- RODGERS G.E. (1995). “Química Inorgánica”, editorial *McGraw-Hill Interamericana de España*, pág 415.<sup>[6]</sup>
- SHELP B.J., MARENTES E., KITHEKA A.M., VIVEKANANDAN P. (1995). “Boron mobility in plants”. *Plant Physiology*. Volumen 94, páginas 356-361.<sup>[19]</sup>
- SHORROCKS V.M. (1997). “The occurrence and correction of boron deficiency”. *Plant and Soil*. Volumen 193, págs 121–148.<sup>[5]</sup>

- SIMÓN GRAO S., ALFOSEA SIMÓN M., SIMÓN VILELLA I., LARROSA GILABERT L., GARCÍA SÁNCHEZ F. (2020). “Respuestas fisiológicas y morfológicas al exceso de boro en la solución nutritiva de diferentes variedades de tomate cultivadas en hidropónico”. ISSN 0211-2728, Número 424, págs. 49-58.<sup>[25][33][38][40][42][44]</sup>
- SIMÓN GRAO S., GARCIA SÁNCHEZ F. y MARTÍNEZ NICOLÁS J. J. (2015). *Respuestas fisiológicas de los cítricos al exceso de boro. Estudio de portainjertos y micorrizas*. Tesis. Elche. Universidad Miguel Hernández.<sup>[34]</sup>
- SIMÓN GRAO S., NIEVES M., MARTÍNEZ NICOLÁS J. J., ALFOSEA SIMÓN M., CÁMARA ZAPATA J. M., FERNÁNDEZ ZAPATA J. C., GARCIA SÁNCHEZ F. (2019b) “Arbuscular mycorrhizal symbiosis improves tolerance of Carrizo citrange to excess boron supply by reducing leaf B concentration and toxicity in the leaves and roots”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volumen 173, p. 322–330.<sup>[24]</sup>
- WANG D. Y., QING C. L., GUO T. J. (1997). ‘Effects of humic acid on transport and transformation of mercury in soil-plant system’. *Water, Air and Soil Pollution*. Volumen 95, p. 35-43.<sup>[29]</sup>
- WEBER L. y TAVANGA R. (2007). ‘On the influence of active element content on the thermal conductivity and thermal expansion of Cu-X (X=Cr, B) diamond composites’ en *Scripta Materialia*, Volumen 57, págs 988-991.<sup>[2]</sup>
- WOODS W.G. (1996). ‘Review of possible boron speciation relating to its essentiality’. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. volumen 9, páginas 153-163.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998). *EHC 204, Boro*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.<sup>[7]</sup>
- YAMAUCHI T., HARA T. y SONIDA Y. (1986) “Distribution of calcium and boron in the pectin fraction of tomato leaf cell wall”. En *Plant and Cell Physiology*, volumen 27, págs 729-732.<sup>[15]</sup>
- YERMIYAHU, U., KEREN R. y CHEN Y. 2001. “Effect of composted organic matter on boron uptake by plants”. *Soil society of america journal*. Volumen 65, páginas 1436-1441.<sup>[31][32]</sup>