

**EFFECTO DE SOJA, GIRASOL Y MAÍZ SOBRE EL pH Y FRACCIONES
DE FOSFORO DE LA RIZÓSFERA.**

Valeria Soledad Faggioli

Ingeniera Agrónoma
Universidad Nacional de Villa María (Cba)
2004

Magíster de la Universidad de Buenos Aires, área: Ciencias del Suelo,
orientación Fertilidad de Suelos.
Escuela para Graduados Alberto Soriano

COMITÉ CONSEJERO

CONSEJERO PRINCIPAL
Flavio Hernán Gutiérrez Boem
Ingeniero Agrónomo
Ph. D

CONSEJERO
Gerardo Rubio
Ingeniero Agrónomo
Doctor

JURADO DE TESIS

Hernán Echeverría
Ingeniero Agrónomo

Atilio Barneix
Ingeniero Agrónomo
Doctor

Fecha de aprobación de la tesis: 6 de junio de 2008

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a Flavio y Gerardo por la oportunidad que me brindaron de aprender junto a ellos, la confianza que depositaron en mí y su paciencia. Supieron brindarme no sólo conocimientos relacionados al proceso de investigación sino también los valores y conceptos éticos que sólo poseen los investigadores sobresalientes.

Los compañeros de trabajo también merecen mi agradecimiento. A Mariana por su compañía y comprensión. A Maria Julia por su gran predisposición. Siempre supe que podía contar con ellas para cuando el tiempo no alcanzaba y no sólo me daban una mano sino que también se las ingeniaban para que todos los momentos fueran divertidos. Hernán es el gran habilidoso del grupo. Él dedicó gran parte de su tiempo en la realización de la infraestructura necesaria para los experimentos de esta tesis con esmero y dedicación. Tal vez sin darse cuenta, ellos enriquecieron con su presencia la monotonía de los días de mucho trabajo. ¡Muchas Gracias!

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	IV
INDICE GENERAL.....	V
INDICE DE TABLAS.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
DECLARACIÓN.....	IX
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
Capítulo 1: INTRODUCCION GENERAL.....	1
1.1 Requerimientos nutricionales de soja, girasol y maíz.....	1
1.2 Mecanismos rizosféricos que intervienen en la adquisición de fósforo del suelo.....	3
1.3 Caracterización de las distintas formas de fósforo del suelo.....	8
Capítulo 2: FRACCIONES DE FOSFORO DEL SUELO ADQUIRIDAS POR CULTIVOS DE SOJA, GIRASOL Y MAÍZ.....	12
2.1 Introducción.....	12
2.2 Materiales y Métodos.....	14
2.3 Resultados.....	22
2.4 Discusión.....	35
2.5 Conclusiones.....	40
Capítulo 3: MODIFICACIÓN DE pH RIZOSFÉRICO DE SOJA, GIRASOL Y MAÍZ: EFECTO DE LA NUTRICIÓN FOSFORADA.....	41
3.1 Introducción.....	41
3.2 Materiales y Métodos.....	43
3.3 Resultados.....	45
3.4 Discusión.....	51
3.5 Conclusiones.....	55
Capítulo 4: CONCLUSIONES GENERALES.....	56
Bibliografía.....	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Requerimientos y eficiencia de adquisición de fósforo de soja, girasol y maíz.....	2
Tabla 1.2: Umbral crítico de fósforo extractable (Bray I) del suelo (0-20 cm) para los cultivos de soja, girasol y maíz en las principales zonas de producción agrícola de Argentina.....	3
Tabla 2.1: Características de los suelos (0 – 20 cm) utilizados en los experimentos.....	15
Tabla 2.2: Resultado de los ANOVA y Contrastes (valores de p) de pH en agua (1:20) de suelo rizosférico (Riz.) y no rizosférico (No Riz.) y distintas comparaciones entre cultivos.....	23
Tabla 2.3: Resultado de los ANOVA y Contrastes (valores de p) de las distintas fracciones de fósforo entre suelo rizosférico (Riz.) y no rizosférico (No Riz.) y diferentes comparaciones entre cultivos.....	26
Tabla 2.4: Parámetros (α ; β), coeficiente de determinación (R^2) y significancia (p-value) de las funciones obtenidas a través de diferentes regresiones lineales simples para explicar las variaciones en la concentración rizosférica de las fracciones de fósforo (y) en función de distintas variables regresoras (x_1 , x_2 ó x_3).....	31
Tabla 2.5: Valores promedio de materia seca (g) y P absorbido (μgP) por planta de soja, girasol y maíz de cada uno de los suelos (I – VII) de los experimentos de Campo (Suelo I, n= 5, 80 días), Macetas I (Suelos II – V, n=5, 90 días) y Macetas II (Suelos VI y VII, n=4, 80 días).....	33

Tabla 2.6: Valores medios de biomasa radical (g), densidad radical (g raíz kg ⁻¹ suelo), fósforo radical (µg P), fósforo total absorbido (µg P planta ⁻¹) y eficiencia de adquisición de fósforo (µg P g ⁻¹ raíz) de soja, girasol y maíz a los 80 días de la siembra (Experimento Macetas II).....	34
Tabla 3.1: Valores medios de biomasa aérea (T) y radical (R), relación entre la biomasa de raíz y órganos aéreos (R:T), concentración de fósforo en tejidos vegetales aéreos y radicales (µg P g ⁻¹) y absorción de fósforo (g) de plantas de soja, girasol y maíz que crecieron en soluciones nutritivas con diferente concentración de fósforo: +P (P= 50 µM) y -P (P= 1 µM).....	46
Tabla 3.2: Efecto de la nutrición fosforada sobre el número de nódulos, peso (mg nódulo ⁻¹); peso total de nódulos (mg) y relación biomasa nódulo/biomasa raíz (N:R) en plantas de soja que crecieron en una solución nutritiva con cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (4x10 ⁶ bacterias ml ⁻¹).....	47
Tabla 3.3: Valores de p del ANOVA de los resultados de pH a distancias de 1,3; 2,6 y 3,9 mm desde la superficie de la raíz de soja, girasol y maíz correspondiente a la figura 3.1.....	48
Tabla 3.4: Valores medios (n=4) de diámetro (mm) e índice AA:AR obtenido del cociente entre el área acidificada por unidad de superficie de raíz.....	50
Tabla 3.5: Tasa de liberación de H ⁺ por unidad de raíz (µmol H ⁺ g ⁻¹ Peso Fresco h ⁻¹) de plantas de soja, girasol y maíz a los 20 días desde el inicio del tratamiento +P (50 µM) y -P (1 µM) de la solución nutritiva.....	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Maceta de PVC con diferentes estratos de arena fina y suelo utilizada en el Experimento en Macetas.....	16
Figura 2.2: Fotografías de los experimentos y muestreo de suelo rizosférico.....	17
Figura 2.3: Diagrama de flujo de la extracción secuencial de fósforo (P) del suelo (adaptado de Tiessen y Moir, 1993).....	21
Figura 2.4: Valores promedio de pH en agua (1:20) y barras de error estándar correspondientes a muestras de suelo no rizosférico y rizósfera de soja, girasol y maíz de cada uno de los suelos (I – VII) de los experimentos de Campo (Suelo I, n= 5), Macetas I (Suelos II – V, n=5) y Macetas II (Suelos VI y VII, n=4).....	23
Figura 2.5: Valores medios de fracciones de fósforo en suelo no rizosférico y rizósfera de soja, girasol y maíz.....	25
Figura 2.6: Variación de la concentración rizosférica de P-Ca (mgP kg ⁻¹ suelo) en función de los valores medios de modificación de pH del suelo.....	28
Figura 3.1: Valores medios de pH (n=4) a distancias de 1,3; 2,6 y 3,9 mm desde la superficie de la raíz de soja, girasol y maíz.....	48
Figura 3.2: Modificaciones rizosféricas de pH en soja, girasol y maíz cultivadas en soluciones nutritivas con diferentes concentraciones de fósforo en agar con púrpura de bromocresol.....	49

DECLARACIÓN

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”

Valeria Faggioli

EFFECTO DE SOJA (*Glycine max*), GIRASOL (*Helianthus annuus*) Y MAÍZ (*Zea mays*) SOBRE EL pH Y FRACCIONES DE FÓSFORO DE LA RIZÓSFERA.

RESUMEN

Los fosfatos cálcicos son la forma predominante de fósforo en los suelos de la región pampeana y su biodisponibilidad es altamente dependiente del pH del suelo. En diferentes condiciones experimentales se estudió el efecto de la actividad de las raíces sobre el pH y fracciones de fósforo del suelo en soja, girasol y maíz. Estas especies difieren marcadamente en sus umbrales críticos de respuesta al fósforo. Se realizaron un experimento a campo y dos experimentos en macetas con 7 suelos provenientes de diferentes zonas agrícolas de la región pampeana y se midió el pH rizosférico y las fracciones de fósforo del suelo. Para estudiar específicamente el efecto de la actividad de las raíces sobre el pH rizosférico se realizó un experimento en hidroponía. Se analizó el efecto de las raíces sobre una lámina de agar con púrpura de bromocresol y se estimó la tasa de liberación de protones en plantas de soja, girasol y maíz que crecieron en dos situaciones de oferta de fósforo (+P = 50 μ M y -P = 1 μ M). Se observó que ni las fracciones de fósforo inorgánicas ni las orgánicas tuvieron diferencias en su biodisponibilidad para las plantas. Todas las fracciones de fósforo fueron aprovechadas por las raíces de los tres cultivos (tanto las reconocidas como lábiles como las resistentes según la técnica de referencia). En todas las situaciones experimentales las raíces de girasol acidificaron el ambiente rizosférico en mayor medida que la soja y maíz. La acidez de la rizósfera no estuvo relacionada con la adquisición de fracciones de fósforo. En el experimento de hidroponía se observó que las raíces de girasol presentaron menor pH rizosférico que el maíz independientemente de la oferta fosforada mientras que la soja tuvo un comportamiento intermedio entre las especies anteriores. Las raíces de maíz incrementaron 2,5 veces su tasa de liberación protones en la solución nutritiva con bajo nivel de fósforo.

PALABRAS CLAVE: acidificación, fracciones de fósforo del suelo, nutrición vegetal, relación suelo-planta

**SOYBEAN (*Glycine max*), SUNFLOWER (*Helianthus annuus*) AND
MAIZE (*Zea mays*) EFFECTS ON RHIZOSPHERE pH AND SOIL
PHOSPHORUS FRACTIONS.**

ABSTRACT

Calcic phosphates are the main pool of soil phosphorus in the Argentinean Pampas Region. Soil pH has a strong influence on its bioavailability. Soybean, sunflower and maize are the main summer crops of Argentinean Pampas Region. It was observed in local experiments that soybean has the lower dependence of phosphorus fertilizers and the higher soil phosphorus acquisition per root unit compared with maize and sunflower. In this thesis, I studied the relationship between root-mediated pH changes and soil phosphorus acquisition in soybean, sunflower and maize. For this purpose, we conducted two pots experiments with seven agriculture soils and one field trial. Rhizosphere pH and soil phosphorus fractions (Hedley et al. 1982; modif. by Tiessen & Moir 1993) were measured. Soybean, maize and sunflower root induced pH changes were studied in a nutrient solution experiment with two levels of phosphorus +P (50 μM) and -P (1 μM). Root H^+ release was measured in agar films with purple bromocresol and the rate of H^+ release per root unit ($\mu\text{mol H}^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) was estimated. Obtained results shows that neither organic nor inorganic soil phosphorus fractions have differences in its bioavailability to plants. All of them were depleted by roots including the resistant fractions according to Hedley fractionation assumptions. Sunflower roots had a stronger effect on rhizosphere pH than maize and soybean. Rhizosphere pH was not related to soil phosphorus acquisition. Under hydroponic conditions, sunflower produced higher rhizospheric acidification than maize, whereas soybean had an intermediate behaviour. Maize roots increase 2.5 times the H^+ efflux rate in the deficient phosphorus conditions.

KEY WORDS: acidification, soil phosphorus fractions, plant nutrition, soil-plant relation

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION GENERAL

1.1. Requerimientos nutricionales de soja, girasol y maíz

La soja (*Glycine max L. Merr.*) es el principal cultivo agrícola de Argentina. En la campaña 2004/2005 su cultivo se extendió a lo largo de 14,4 millones de hectáreas relegando al girasol (*Helianthus annuus L.*) y al maíz (*Zea mays L.*), los cultivos estivales que le siguen en orden de importancia, a 3,58 y 3,40 millones de hectáreas cultivadas, respectivamente (SAGPyA, 2006). Con la expansión de la agricultura, el consumo de fertilizantes fosfatados a nivel nacional ha manifestado una tendencia creciente desde la última década. Las mayores dosis aplicadas a los cereales son las que explican este incremento y no la fertilización de los lotes de soja, a pesar de su amplia difusión en suelos de baja aptitud agrícola (SAGPyA, 2006). De hecho, la soja ha mostrado baja respuesta a la aplicación de fertilizantes fosfatados en comparación con otras especies (García *et al.*, 2006). Esta ventaja sumada a los importantes avances tecnológicos que simplificaron el manejo del cultivo y su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico han favorecido su protagonismo en suelos de moderada a baja oferta de nutrientes.

La causa de la menor dependencia de la soja a los fertilizantes fosfatados aún no ha sido dilucidada. En la Tabla 1.1 se observa que la soja posee un alto requerimiento de fósforo por unidad de rendimiento (6 kgP tn⁻¹ grano) en comparación con el girasol y el maíz (3.9 y 3.1 kgP tn⁻¹ grano respectivamente). En un sentido amplio puede decirse que la absorción total de fósforo de la soja es similar a la de maíz a pesar de su menor producción de biomasa por unidad de superficie. Sin embargo, el umbral de respuesta a la fertilización es el menor de los tres cultivos: soja 12.5 mg kg⁻¹ P; girasol 15.1 mg kg⁻¹ P y maíz 16 mg kg⁻¹ P Bray I (Tabla 1.2). Si se considera que un tercio de la biomasa asignada a los granos equivale a la biomasa radical acumulada durante el ciclo de los cultivos, las raíces de soja presentarían una mayor eficiencia de adquisición de fósforo (i.e. fósforo absorbido por tonelada de raíz) que las de girasol y de maíz. En este sentido, las raíces de soja absorben 23 kgP Mg⁻¹ raíz mientras que las de girasol y maíz apenas alcanzan los 11 y 15 kgP Mg⁻¹ raíz respectivamente. Puede deducirse entonces que cada unidad de raíz de soja absorbería del suelo aproximadamente un 40% más fósforo por unidad radical que girasol y maíz. Dado que este hecho no incide en igual medida en su respuesta a la fertilización fosfatada sería probable que las raíces de soja adquieran formas de fósforo a las cuales las raíces de girasol y maíz no pueden acceder.

Tabla 3.1: Requerimientos y eficiencia de adquisición de fósforo de soja, girasol y maíz. Elaborado a partir de García (2001); Berardo (2004) y Andrade y Sadras (2002).

Cultivo	Rendimiento <i>Mg grano ha⁻¹</i>	P en grano <i>kgP tn⁻¹ grano</i>	P absorbido <i>kgP ha⁻¹</i>	Eficiencia de adquisición <i>kgP tn⁻¹ raíz</i>
Maíz	7.5	3.7 – 4.4	28 – 33	11.2 – 11
Girasol	2.5	4.8 – 5.6	12 – 14	14.4 – 17
Soja	3	7 – 8.3	21 – 25	21 - 25

La naturaleza química de los compuestos fosfatados del suelo determina su biodisponibilidad. El pool de fósforo del suelo está compuesto por fracciones que difieren en su disponibilidad para las plantas, tales como: fósforo asociado a calcio, fósforo adsorbido por compuestos de hierro y aluminio en la superficie de las arcillas, fósforo como constituyente de compuestos orgánicos y fosfatos como iones libres en la solución de suelo, entre otras fracciones. El predominio de una fracción sobre otra está vinculado con los procesos genéticos de formación del suelo. Esta variedad de formas de fósforo sugiere que las raíces deben adoptar diferentes estrategias para solubilizarlas y cubrir su demanda nutricional porque la cantidad de fosfatos presentes en la solución de suelo es insuficiente. Este hecho podría estar vinculado con la existencia de mecanismos a nivel rizosférico que tornan a ciertas especies más eficientes en la adquisición de fracciones de fósforo del suelo de baja biodisponibilidad.

Tabla 1.4: Umbral crítico de fósforo extractable (Bray I) del suelo (0-20 cm) para los cultivos de soja, girasol y maíz en las principales zonas de producción agrícola de Argentina.

Cultivo	Zona	Umbral Crítico (mg kg⁻¹ P Bray)	Referencia
Soja	Entre Ríos	9.5	Barbagelata <i>et al.</i> , 2001; Melchiori <i>et al.</i> , 2002
Soja	S O Bs As	9	Melgar <i>et al.</i> , 1995; Melgar y Díaz Zorita, 1997.
Soja	Ctro N de Bs As	9 – 12	Scheiner <i>et al.</i> , 1996; 1997; Gutiérrez Boem <i>et al.</i> , 2002ab
Soja	SE Córdoba	10	Baigorri, 1999
Soja	Bs As y Sta Fe	8 – 13	Echeverría <i>et al.</i> , 2002
Soja	SE Bs As	8 – 11	Echeverría y García, 1998
Soja	SE Bs As	12	Díaz Zorita <i>et al.</i> , 2002
Soja	Sta Fe	10 - 12	Parra, 1997; Fontanetto, 2004
Soja		12,5	García <i>et al.</i> , 2006
Maíz	SE Bs As	16 – 17	García <i>et al.</i> , 1997, 2006; García, 2002
Maíz	SE Bs As	15 – 17 seco 20 riego	Berardo <i>et al.</i> , 2001
Maíz	O Entre Ríos	17	Mistrorigo <i>et al.</i> , 2000
Maíz	N Bs As	13 -14	Ferrari <i>et al.</i> , 2000
Girasol	SO Bs As	10 – 12	Díaz Zorita, 2004
Girasol	SE Bs As	15,1	García <i>et al.</i> , 2006

1.2. Mecanismos rizosféricos que intervienen en la adquisición de fósforo del suelo.

Las plantas adoptan diversas estrategias ante una deficiencia de fósforo. Estas estrategias pueden agruparse en dos categorías: a) mayor producción de biomasa a partir de una cantidad de fósforo absorbida (mayor eficiencia de uso) y/o b) habilidad de tomar más fósforo de un suelo deficiente (mayor eficiencia de

adquisición) (Raghothama, 1999; Raghothama y Karthikeyan, 2005). Esta última se relaciona con cambios en la fisiología y/o morfología de la raíz que le permiten tomar fósforo a bajas concentraciones en la solución de suelo y/o de fuentes orgánicas e inorgánicas poco solubles a través de modificaciones de las condiciones químicas y bioquímicas del suelo rizosférico (Vance *et al.*, 2003). En adelante, el término adquisición de fósforo se utilizará como sinónimo de absorción del nutriente independientemente de los mecanismos fisiológicos implicados en el pasaje de iones desde la solución de suelo rizosférico al interior de las células vegetales. La rizósfera es el volumen de suelo afectado por la actividad de las raíces vivas (Bertin *et al.*, 2003; Hinsinger, 1998; Hinsinger *et al.*, 2003). Es un sitio de intensas interacciones entre las raíces, los microorganismos y los constituyentes del suelo (Kuzyakov *et al.*, 2003; Gregory y Hinsinger, 1999). Las características químicas y biológicas de esta zona difieren drásticamente de las del suelo no rizosférico. Se sabe que las raíces pueden excretar sustancias que forman quelatos, excretar enzimas capaces de mineralizar fósforo orgánico (fosfatasas y fitasas), incidir sobre la actividad de los microorganismos, o modificar el pH de la rizósfera (Claassen, 1991; Hinsinger, 2001; Trollove *et al.*, 2001). La importancia de estos distintos mecanismos para la nutrición fosforada varía de acuerdo a la especie, edad de la planta y el tipo de suelo considerado. En general, presentan mayor actividad en la medida que la concentración de fósforo inorgánico disponible disminuye en la solución de suelo.

En la mayoría de los suelos agrícolas el fósforo orgánico comprende aproximadamente un 50% del total de fósforo del suelo pero sólo puede ser aprovechado por las raíces si es mineralizado previamente (Dalal, 1977). En la Argentina, el fósforo orgánico representa entre el 78% y 83% del fósforo total en suelos Molisoles del sudeste de la provincia de Buenos Aires (Diez *et al.*, 2000; Picone y Zamuner, 2002); mientras que en suelos Vertisoles y Alfisoles de la provincia de Entre Ríos oscila entre el 41% y 74% del fósforo total en los horizontes superiores (Boschetti *et al.*, 2000; Pascale *et al.*, 2000). Gran parte del fósforo orgánico en el suelo está unido al carbono por uniones ésteres. Las raíces de algunas especies liberan enzimas que pueden mineralizar compuestos orgánicos lábiles de fósforo a través de la hidrólisis del ácido fosfórico (Duff *et al.*, 1994). El grupo más importante de estas enzimas lo constituyen las fosfatasas. Las fitasas son enzimas liberadas por las raíces que mineralizan formas orgánicas de fósforo más resistentes (fitatos). La hidrólisis de fósforo orgánico por fosfatasas excretadas por las raíces puede ser una fuente importante de este nutriente para algunas especies (Tarafdar y Junk, 1987; Seeling y Junk, 1996; Tarafdar y Claassen, 1988). Sin embargo, el aporte de fósforo a través de fosfatasas no llega a compensar las deficiencias severas (Gahoonia y Nielsen, 2004). En plántulas de maíz, Gaume *et al.* (2001a) y Kandeler *et al.* (2002) hallaron que la exudación de fosfatasas se produjo en todas las raíces, pero fue significativamente superior en los genotipos tolerantes a condiciones de baja disponibilidad de fósforo, sugiriendo que es un mecanismo importante en la nutrición fosforada durante los estadios iniciales del cultivo. Marschner *et al.* (2006) observaron el mismo comportamiento en ciertos genotipos de trigo (*Triticum aestivum*). La soja y la colza (*Brassica napus*) presentan una limitada capacidad de aumentar la actividad de las fosfatasas frente a un déficit de fósforo, mientras que el lupino (*Lupinus albus*) puede incrementar la actividad de fosfatasas casi 20 veces comparado con el control bien provisto de fósforo (Tadano y Sakai, 1991; Tadano *et al.*, 1993; Solaiman *et al.*, 2006). Por lo tanto, no hay evidencia suficiente como para afirmar que la

mineralización de fósforo orgánico es el mecanismo involucrado en la adquisición de fósforo por las raíces de soja.

La liberación de ácidos orgánicos por las raíces de algunos cultivos puede aumentar la disponibilidad de fósforo del suelo en la rizósfera (Jones, 1998; Raghothama, 1999; Ryan *et al.*, 2001; Gahoonia y Nielsen, 2004). Hay diferentes maneras a través de las cuales estos ácidos orgánicos aumentan la disponibilidad de fósforo en la rizósfera. La competencia de los fosfatos y ácidos orgánicos por sitios similares de adsorción puede incrementar la concentración de fósforo en la solución de suelo (Bar-Yosef, 1991). Otro mecanismo de acción es la formación de quelatos con Ca^{+2} , Al^{+3} y Fe^{+3} que es responsable de la movilización de fósforo proveniente de fosfatos de dichos cationes. Frente a una deficiencia fosforada, es común observar un aumento en la exudación de ácidos orgánicos (Ej. citrato, malato, oxalato) por las raíces de varias especies, principalmente dicotiledóneas (Yadav y Tarafdar, 2001). La colza (*Brassica napus*) utiliza este mecanismo como estrategia para la adquisición de fósforo en ambientes pobres en este nutriente (Hoffland *et al.*, 1989, 1990, 1992). Las raíces de garbanzo (*Cicer arietinum*) poseen una elevada liberación espontánea de compuestos orgánicos que favorece a la planta cuando crece en ambientes pobres en fósforo. Sin embargo, Wouterlood *et al.*, 2004 observaron que en las raíces de garbanzo la exudación no estuvo correlacionada con la disponibilidad de dicho nutriente. En maíz se advirtió un aumento en la síntesis y exudación de ácidos málico y cítrico cuando las plantas crecieron en un medio pobre en fosfatos (Gaume *et al.*, 2001ab; Ström *et al.*, 2002). Dentro de las leguminosas hay una gran variabilidad en la capacidad para excretar ácidos orgánicos frente a una deficiencia fosforada. Otani y Ae (1996) observaron que el maní (*Arachis hypogaea*) creció mejor que otros cultivos en suelos ácidos (Alfisolos) con baja disponibilidad de fósforo. La soja, por el contrario, mostró una limitada capacidad de excretar ácidos orgánicos frente a una deficiencia fosforada por lo que no se cree que éste tampoco sea un mecanismo importante en su nutrición (Otani y Ae, 1996; Ohwaki e Hirata, 1992).

Las asociaciones con hongos micorrícicos también son reconocidas por su efecto sobre la absorción de fósforo del suelo (Bucher, 2007). Una de las razones radica en la baja movilidad de los iones fosfato en el suelo. En raíces con micorrizas el incremento en la absorción de fósforo del suelo se debe a la mayor eficiencia en acceder a este nutriente y luego tomarlo puesto que las hifas del hongo actúan como una extensión de la raíz de la planta (Abbot y Robson, 1991). La longitud absorbente de la raíz crece y por consiguiente la exploración de suelo también aumenta. Otro de los efectos que favorece el acceso al fósforo del suelo por las raíces de las plantas son los exudados orgánicos y fosfatasas producidos por los hongos (Abbot y Robson, 1991). Los beneficios de estos compuestos se explicaron en párrafos anteriores. Las relaciones existentes entre la absorción de fósforo del suelo de soja, girasol y maíz y el grado de micorrización es motivo de estudio de una tesis de doctorado del equipo de trabajo que dirigen los consejeros de esta tesis.

Otro mecanismo que puede influir en la disponibilidad de fósforo en el suelo es el cambio en el pH de la rizósfera, que puede tener una diferencia con el pH del suelo de hasta dos unidades (Marschner, 1995). El factor más importante en la determinación de esta diferencia es la absorción desbalanceada de aniones y cationes y la consecuente liberación neta de H^+ o OH^- (ó HCO_3^- por carbonatación de OH^-) (Thibaud *et al.*, 1994). El pH resultante deriva de la regulación necesaria para mantener el pH interno de las células vegetales dentro

de valores óptimos para el funcionamiento de las mismas. El mecanismo de regulación de pH está basado en la producción y consumo de H^+ a través de la carboxilación y descarboxilación de ácidos orgánicos en el interior de las células radicales (Haynes, 1990). En consecuencia, a través de procesos de extrusión (i.e. liberación de los H^+ en exceso) el pH citoplásmico de las células vegetales es mantenido dentro de un rango óptimo para las funciones de la célula. Los cambios de pH que inducen las raíces dependen fundamentalmente de la forma de nitrógeno que absorben. En condiciones normales más del 50% de los aniones que ingresan a la raíz son NO_3^- (Marschner, 1995). Cuando el nitrógeno es absorbido como NO_3^- , se absorben más aniones que cationes y para mantener la neutralidad eléctrica en la interfase suelo-raíz las raíces excretan HCO_3^- (ó OH^-) aumentando el pH de la rizósfera (Hinsinger *et al.*, 2003). Además, el mecanismo de absorción de este tipo de aniones iría acompañado por el ingreso de H^+ al apoplasto de la raíz, lo cual contribuye a disminuir la concentración de H^+ en el suelo rizosférico (Marschner, 1995). Cuando el nitrógeno es absorbido como NH_4^+ , se absorben más cationes que aniones y se excretan H^+ disminuyendo el pH de la rizósfera (Nye, 1981). Esta vinculación del pH de la rizósfera al balance de aniones y cationes absorbidos por la planta fue observada en numerosas especies a través de la aplicación de fuentes de nitrógeno basadas exclusivamente en NO_3^- o NH_4^+ . Los primeros experimentos donde se observó este comportamiento fueron con soja (Riley y Barber, 1971). Otras especies tales como poroto (Thomson *et al.*, 1993), maíz (Hoffmann *et al.*, 1994), rye-grass (Gahoonia *et al.*, 1992; Jungk *et al.*, 1993), trigo y cebada (Gahoonia y Nielsen, 1996) también alteraron en distinta medida el pH rizosférico según la fuente nitrogenada. En las leguminosas el fenómeno de fijación simbiótica de nitrógeno también influye en el balance entre los aniones y cationes que ingresan a la planta. Debido a que éstas pueden satisfacer buena parte de sus requerimientos de nitrógeno a través de la fijación simbiótica, y por lo tanto absorben más cationes (K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+) que aniones ($H_2PO_4^-$, SO_4^{-2} , Cl^- , NO_3^-) el resultado es una acidificación de la rizósfera (Marschner y Römheld, 1991). Esto ocurre sólo si se dan condiciones propicias para la fijación simbiótica. Cuando satisfacen sus requerimientos de nitrógeno a través de la absorción de nitrógeno mineral del suelo, ejercen un efecto sobre el pH de la rizósfera similar a otras especies no leguminosas, de acuerdo a cual sea la fuente predominante de nitrógeno (NO_3^- o NH_4^+). Este efecto acidificante de las leguminosas cuando utilizan nitrógeno fijado simbióticamente fue observado en soja, alfalfa (Aguilar y van Diest, 1981; Nyatsanga y Pierre, 1973) y lupino (Coventry y Slaterry, 1991; Neumann *et al.*, 1999). No es fácil identificar el origen del nitrógeno que ingresa a la raíz de las leguminosas. Es por ello que suele evaluarse el efecto de la fijación simbiótica de nitrógeno sobre el pH rizosférico utilizando soluciones nutritivas como medio de crecimiento para plántulas de leguminosas (Tang *et al.*, 1997; 2001) o arena fina (Aguilar y Van Diest, 1981). La cantidad de H^+ que liberan las raíces por unidad de nitrógeno fijado depende de la especie, y para la soja es de alrededor de 44 meq de H^+ por cada gramo de nitrógeno fijado (Nyatsanga y Pierre, 1973). Pero como no todo el nitrógeno en planta proviene de la fijación simbiótica, la acidificación neta es menor. Por ejemplo, un cultivo de soja que fija el 50% de sus requerimientos de nitrógeno y el resto lo absorbe del suelo (como NO_3^-) produciría una acidificación neta de 16 meq de H^+ por cada gramo de nitrógeno fijado. Esto significa que en caso de fijar 100 kg N ha^{-1} produciría una acidificación en la rizósfera equivalente al agregado de $78 \text{ kg H}_2\text{SO}_4 \text{ ha}^{-1}$. Por lo tanto, la disminución de pH que ocurre en la rizósfera de las leguminosas es un mecanismo estrechamente vinculado con su nutrición nitrogenada. Este mecanismo conduce a que algunas leguminosas puedan

incrementar la disponibilidad de fósforo del suelo al solubilizar fosfatos ligados al calcio (Aguilar y Van Diest, 1981; Troløve *et al.*, 2001). Se ha observado que la acidificación rizosférica aumenta el aprovechamiento de roca fosfórica agregada al suelo como fertilizante (Thomson *et al.*, 1993, Gahoonia y Nielsen, 1992). Las rocas fosfóricas consisten en diferentes tipos de fosfatos de calcio (apatitas) con distintos grados de solubilidad. Ciertas características del suelo regulan la importancia de este mecanismo para la nutrición fosforada. Primero, los cambios de pH del suelo no sólo obedecen al balance de H^+ y HCO_3^- (ó OH^-) que excretan las raíces, sino también a la capacidad que tenga el suelo de regular su pH (poder buffer). Segundo, la importancia de la acidificación desde el punto de vista de la nutrición fosforada va a depender de la abundancia de compuestos de fósforo que aumentan su solubilidad cuando el pH baja. Por lo tanto, se podrían esperar grandes variaciones entre distintos tipos de suelo. Para finalizar, cabe aclarar que si bien la fuente de nitrógeno es el factor más importante en la modificación del pH rizosférico hay otros procesos fisiológicos responsables de este mecanismo. Se ha observado que deficiencias de hierro en girasol promueven una mayor liberación de H^+ desde la raíz en plantas que crecieron en condiciones de hidroponía (Römheld y Marschner, 1981; Römheld *et al.*, 1984). A diferencia del girasol, las raíces de soja no respondieron del mismo modo ante un déficit de hierro (Landsberg, 1991) pero sí lo hicieron ante deficiencias de fósforo (Chiera *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006). En ciertos híbridos de maíz la deficiencia de fósforo ha activado la enzima H^+ - ATPasa causando una disminución del pH rizosférico (Liu *et al.*, 2004). La exudación de compuestos orgánicos y la respiración radical alteran en menor medida el pH de la rizósfera (Hinsinger, 2003, 2005; Lambers *et al.*, 2006). Los primeros han sido mencionados como posibles fuentes de acidificación rizosférica pero su contribución depende de la especie y de las condiciones nutricionales en las que se desarrolla la planta (Hoffland *et al.*, 1989, Petersen y Böttger, 1991, Neumann y Römheld, 1999). Para afectar significativamente el pH deberían excretarse importantes cantidades de ácidos orgánicos (Kirk *et al.*, 1999). Además, los cationes que se excretan junto con estos compuestos desde la raíz para mantener la neutralidad eléctrica de la célula no siempre son H^+ (Zhu *et al.*, 2005). Tanto las raíces como los microorganismos que habitan la rizósfera aportan gran parte del CO_2 del suelo. Sin embargo, el efecto de estos gases sobre el pH rizosférico es despreciable al compararse con los procesos mencionados anteriormente (Nguyen *et al.*, 1999).

1.3 Caracterización de las distintas formas de fósforo en el suelo

Una de las limitaciones de los extractantes químicos utilizados para caracterizar la disponibilidad de fósforo de un suelo es que no toman en cuenta los cambios en la disponibilidad de fósforo que pueden ocurrir en la interfase suelo-raíz por acción de las raíces. Estas modificaciones pueden ser particularmente importantes para un nutriente de tan baja movilidad como es el fósforo. El movimiento del fósforo del suelo hacia las raíces ocurre en una pequeña área alrededor de las raíces, y esta transferencia de fósforo es afectada por las interacciones entre el suelo y la planta. Para poder caracterizar las transformaciones del fósforo en el suelo causadas por la acción de las raíces se debe contar con una metodología de fraccionamiento de fósforo donde las fracciones extraídas tengan relación con su disponibilidad y origen. Un clásico y muy difundido método de fraccionamiento de fósforo del suelo es el desarrollado en la década del '50 por Chang y Jackson. Consiste en una caracterización química donde las fracciones no tienen relación con la disponibilidad de las

distintas fracciones de fósforo extraídas (Kuo, 1996). A partir de éste se generaron otras metodologías para la determinación de las diversas formas de fósforo presentes en el suelo, abonos orgánicos, sedimentos marinos, etc. Una de las técnicas más difundidas fue la propuesta por Hedley *et al.* (1982a) quienes desarrollaron un método de fraccionamiento secuencial de fósforo del suelo para caracterizar diferentes fracciones de acuerdo a su grado de disponibilidad y asociación con distintos compuestos. Este fraccionamiento tiene por objetivo determinar el fósforo lábil (extraído con resinas de intercambio aniónico y NaHCO_3), fósforo asociado con hierro y aluminio (extraído con NaOH), fósforo asociado con calcio (extraído con HCl) y formas más resistentes de fósforo extraídas por digestión. También contempla la extracción de fósforo por ultrasonido cuya disponibilidad para las raíces se encontraría entre las formas extraídas con NaHCO_3 y NaOH . Esta última fracción no ha sido tan difundida como las anteriores. En las extracciones con NaHCO_3 y NaOH las fracciones de fósforo se subdividen en orgánicas e inorgánicas (Tiessen y Moir, 1993). Las plantas absorberían más fácilmente las formas de fósforo inorgánico extraídas con resinas, NaHCO_3 y NaOH . En tanto que la fracción obtenida con HCl sería la de menor disponibilidad. Con respecto al fósforo orgánico, la fracción extraída con NaHCO_3 correspondería al fósforo inmovilizado por los microorganismos presentes en la rizósfera y en consecuencia, de rápida mineralización. El fósforo orgánico extraído con NaOH correspondería a los fosfatos alojados en estructuras orgánicas más estables.

Tradicionalmente, el fraccionamiento de Hedley se ha utilizado para caracterizar transformaciones de fósforo que ocurren en la proximidad de las raíces. En tal sentido, la solubilización rizosférica de fosfatos cálcicos provenientes de rocas fosfóricas de distinto grado es uno de los eventos más estudiados. Por ejemplo, se determinaron las fracciones de fósforo presentes en la rizósfera de trigo y colza en suelos de pH cercanos a la neutralidad. El trigo absorbió fósforo proveniente de las fracciones que se extrajeron predominantemente con resinas, y en segundo término con NaHCO_3 y NaOH , mientras hizo escaso uso del extraído con HCl . La colza, que acidificó ligeramente su rizósfera, absorbió más fósforo extraíble con HCl que el trigo (MacKenzie *et al.*, 1995). La fracción de fósforo extraíble con HCl se estima que corresponde a compuestos de fósforo asociados con calcio, que aumentan su solubilidad cuando el pH baja. En plántulas de maíz y colza (Bertrand *et al.*, 1999) y soja (Barber y Riley, 1971) observaron, a través del suministro de NO_3^- o NH_4^+ como únicas fuentes de nitrógeno, que en las tres especies el aprovechamiento del fósforo del suelo está directamente relacionado con la disminución del pH rizosférico. En tréboles (*Lotus pedunculatus* y *Trifolium repens*) Trolove *et al.* (1996) también observaron la misma relación entre acidificación y agotamiento de fosfatos cálcicos provenientes de roca fosfórica pero sin el agregado de fuentes nitrogenadas. En cambio, en suelos altamente meteorizados como los Ultisoles los mecanismos que deben adoptar las raíces para la adquisición de fósforo son diferentes. Por ejemplo, Zoysa *et al.* (1997, 1998ab, 1999) estudiaron el efecto de las fuentes de nitrógeno sobre el agotamiento de fracciones de fósforo realizada por diferentes clones de té en suelos ácidos y altamente meteorizados en condiciones normales y con el agregado de roca fosfórica. Cuando el nitrógeno fue suministrado como NH_4^+ la disminución del pH rizosférico acentuó la formación de complejos de fósforo con los cationes de hierro y aluminio que predominan en el complejo de cambio, afectando negativamente el aprovechamiento del fósforo del suelo. Mientras que cuando el nitrógeno era provisto como NO_3^- el incremento del pH en la rizósfera

favoreció la adquisición de fósforo. Cuando aplicaron roca fosfórica la acidificación rizosférica favoreció la disolución de la misma pero gran parte del fósforo liberado fue fijado por el suelo sin ser aprovechado por la planta. En todos los experimentos hallaron agotamiento de las fracciones más lábiles.

El fraccionamiento de Hedley también se utiliza para caracterizar las transformaciones de fósforo del suelo comparando suelos desarrollados en distintos ambientes u origen (Cross y Schlesinger, 1995; Tiessen *et al.*, 1984) o bajo diferentes manejos (Guo y Yost, 1998; Hedley *et al.*, 1982a; Zubillaga y Giuffre, 1998; 1999). Se observó que en suelos muy meteorizados como Oxisoles y Ultisoles, la fracción de fosfatos cálcicos era muy pequeña. En tanto que los suelos menos meteorizados como los Molisoles y Vertisoles de la Región Pampeana cuentan con una considerable cantidad de fósforo unido al calcio (Cross y Schlesinger, 1995; Mizuno, 1981). Los fosfatos cálcicos son de baja disponibilidad para las plantas. Pero como parte de esta fracción se puede solubilizar en medio ácido, la acidificación de la rizósfera podría hacerla disponible para ser absorbida por las raíces de soja. Si esto sucediera, gran parte del fósforo del suelo contenido en dicha fracción quedaría disponible para los cultivos subsecuentes gracias a la solubilización realizada por la leguminosa (Nuruzzaman *et al.*, 2005). Para finalizar, puede afirmarse que el efecto de las modificaciones químicas inducidas por la raíz sobre la dinámica de las fracciones de fósforo del suelo mezclado con distintos tipos de roca fosfórica ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, se desconoce si los fosfatos cálcicos que predominan en suelos fértiles como los Molisoles presentan el mismo comportamiento que los aportados por rocas fosfóricas.

El objetivo general de esta tesis fue comparar las modificaciones de pH y concentración de diversas formas de fósforo del suelo inducidas por la actividad de las raíces de soja, girasol y maíz en diferentes condiciones de crecimiento. Se puso a prueba la hipótesis que las raíces de soja tienen la capacidad de acceder a fracciones de fósforo del suelo de baja biodisponibilidad debido a la mayor acidez de su ambiente rizosférico. Los objetivos y las hipótesis específicas se considerarán en cada capítulo.

CAPITULO 2

FRACCIONES DE FÓSFORO DEL SUELO ADQUIRIDAS POR CULTIVOS DE SOJA, GIRASOL Y MAIZ

2.1 INTRODUCCION

El fósforo es el macronutriente de menor movilidad y baja disponibilidad para las plantas en la mayoría de los suelos. La baja movilidad de los iones fosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) se debe a su interacción con los constituyentes coloidales del suelo (Kirk, 1999) que determina que sólo una pequeña proporción del fósforo esté presente como iones en la solución de suelo (Barber, 1995). Las formas químicas originadas de dichas interacciones no tienen la misma biodisponibilidad para las plantas.

Es conocido que cada especie vegetal posee un umbral crítico de fósforo disponible en el suelo a partir del cual satisface sus requerimientos (Tabla 1.2). A pesar de la similitud en la extracción total de fósforo que realizan los cultivos de soja, girasol y maíz (Tabla 1.1), la soja puede cubrir sus requerimientos a partir de una menor cantidad de P disponible (extractable con Bray1) del suelo (Tabla 1.2). Este hecho podría estar vinculado con algún mecanismo rizosférico que le permite acceder a formas de fósforo de baja disponibilidad para las demás especies. La modificación del pH rizosférico es el mecanismo que más afecta la adquisición de fósforo del suelo (Hinsinger, 2001). Dado que la soja puede cubrir gran parte de sus requerimientos de nitrógeno a través de la fijación atmosférica, la proporción cationes/aniones que ingresan a la raíz es mayor en soja que en maíz y girasol. Este fenómeno podría producir una liberación neta de H^+ y un ambiente rizosférico de mayor acidez (Nyasanga y Pierre, 1973). Las condiciones generadas favorecerían la solubilización de fosfatos cálcicos los cuales poseen baja solubilidad en pH cercano a la neutralidad. Si esto sucediera, las plantas de soja utilizarían estas formas de fósforo en mayor medida que girasol y maíz. Para probar esta hipótesis habría que determinar las fracciones de fósforo presentes en el suelo rizosférico de las tres especies. La metodología de fraccionamiento secuencial propuesta por Hedley *et al.* (1982a) es una de las técnicas más difundidas para caracterizar las formas de fósforo del suelo de acuerdo a su grado de disponibilidad y asociación con distintos compuestos. Este fraccionamiento tiene por objetivo determinar el fósforo lábil (extraído con resinas de intercambio aniónico y NaHCO_3), fósforo asociado con hierro y aluminio (extraído con NaOH), fósforo asociado con calcio (extraído con HCl) y formas más resistentes extraídas por digestión. En las extracciones con NaHCO_3 y NaOH las fracciones de fósforo se subdividen en orgánicas e inorgánicas (Tiessen y Moir, 1993). De acuerdo con Hedley *et al.* (1982a) las plantas absorberían más fácilmente las fracciones extraídas con resinas, NaHCO_3 y NaOH , en tanto que la fracción obtenida con HCl sería la de menor disponibilidad. Se sabe que suelos poco meteorizados como los Molisoles y Vertisoles de la Región Pampeana cuentan con una considerable cantidad de fósforo unido al calcio (Cross y Schlesinger, 1995; Mizuno, 1981). Varios autores han observado un mayor aprovechamiento de roca fosfórica (fosfatos cálcicos) en aquellas especies capaces de disminuir el pH de la rizósfera (Thomson *et al.*, 1993; Gahoonia y Nielsen, 1992; Aguilar y Van Diest, 1981; Troløve *et al.*, 2001).

El objetivo de este capítulo fue comparar las fracciones de fósforo del suelo extraídas por las raíces de soja, maíz y girasol. Se puso a prueba la hipótesis que el cultivo de soja absorbe formas de fósforo del suelo de baja disponibilidad para otros cultivos y que el agotamiento de esas fracciones de fósforo de la rizósfera está directamente relacionado con las modificaciones rizosféricas de pH. La comprobación de esta hipótesis ayudaría a explicar el relativamente bajo umbral crítico de esta leguminosa.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento de campo

Se comparó el efecto que causan los cultivos sobre el pH y las fracciones de fósforo del suelo de la rizósfera a través de un experimento a campo en bloques completos aleatorizados con 5 repeticiones (Figura 2.2 a). El factor cultivo tuvo cuatro niveles:

1. Soja, variedad DM 4800 RR.
2. Girasol, híbrido Paraíso 20.
3. Maíz, híbrido DK628 RR.
4. Sin cultivo o suelo no rizosférico, es decir, aquel que no fue afectado por la actividad de las raíces vivas.

El experimento se ubicó en un lote agrícola con producción en siembra directa de la localidad de Alberti (Provincia de Buenos Aires). El suelo era un Hapludol típico cuyas propiedades de 0 a 20 cm se detallan en la Tabla 2.1. Las parcelas tenían 6 metros de largo por 5 surcos (distantes a 0,70 m) de ancho. La siembra se realizó manualmente con el mínimo laboreo del suelo (utilizando surcos realizados por una sembradora de siembra directa) a una profundidad aproximada de 5 cm. Se sembraron 36, 6 y 7 semillas m⁻² de soja, girasol y maíz, respectivamente. Pevio a la siembra, las semillas de soja se inocularon en forma manual con un formulado comercial de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (10⁹ bacterias ml⁻¹). Las parcelas de maíz y girasol fueron fertilizadas con el equivalente de 150 kg N ha⁻¹ con urea (46% N) aplicada en la superficie del suelo al momento de la siembra. Las precipitaciones acumuladas desde la siembra a la recolección de muestras (80 días después de la siembra) fueron 382 mm.

Experimento en macetas I

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 5 repeticiones y dos factores: suelo y cultivos (Figura 2.2b). El factor suelo estuvo constituido por cuatro diferentes suelos de la provincia de Buenos Aires (ver propiedades en Tabla 2.1). Estos suelos fueron Hapludoles típicos pertenecientes a lotes agrícolas de las localidades de General Viamonte (suelos II y III) y Junín (IV y V). El factor cultivo estuvo compuesto por los mismos niveles y características detalladas en el experimento de campo. En este caso, el suelo no rizosférico estuvo representado por macetas sin plantas

Tabla 2.1: Características de los suelos (0 – 20 cm) utilizados en los experimentos

Nº	Exp.	P Bray1 ppm	pH 1:20	CO %	Arcilla %	Limo %	Arena %	Textura
I	Campo	10	6.2	3.65	16.25	56.15	26.60	Fr limoso
II	Macetas I	12	6.5	3.65	6.25	40.45	53.3	Fr. arenoso
III		14	6.4	3.30	6.25	50.85	42.9	Fr. limoso
IV		17	6.2	4.40	20	59.6	20.4	Fr. limoso
V		44	6.4	3.65	15	56.3	28.7	Fr. limoso
VI		Macetas II	45	6.2	2.55	22.5	71.3	6.2
VII	72		6.3	3.8	3.8	18.75	77.45	Areno franco

En macetas cilíndricas de PVC de 2,85 l de capacidad, se colocó 3,7 kg de suelo previamente secado al aire y tamizado (2 mm de malla). Las dimensiones de las macetas fueron 0,30 m de alto por 0,11 m de diámetro. Las semillas de las tres especies se pre-germinaron durante 4 días a 25 °C con CaCl 0,08 M. Se colocaron 2 semillas pregerminadas por maceta. A los 20 días se raleó a 1 planta por maceta. Las semillas de soja se inocularon con un formulado comercial de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (10^9 bacterias ml^{-1}). Las macetas con maíz y girasol recibieron 1 g de N como $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$. Las macetas se distribuyeron aleatoriamente sobre una superficie al aire libre que podía cubrirse con un techo de polietileno para evitar el ingreso del agua de lluvia. Los riegos se realizaron diariamente con agua desionizada ajustando por peso a un 80% de la máxima capacidad de retención hídrica del suelo de cada maceta. El experimento finalizó a los 90 días después de la siembra.

Experimento en macetas II

A partir de los resultados obtenidos de los experimentos anteriores se decidió realizar un segundo experimento en macetas. Se siguieron los mismos lineamientos generales que en los experimentos anteriores pero se introdujeron modificaciones en el diseño del medio de cultivo para exacerbar el efecto de la absorción de fósforo. El diseño estadístico fue completamente aleatorizado, con 5 repeticiones y 2 factores: suelo y cultivos. El factor suelo contó con dos niveles (VI y VII). Ambos fueron Hapludoles típicos seleccionados especialmente por su alto contenido de P Bray I (Tabla 2.1). El suelo VI provino de un área de monte del partido de Junín (provincia de Buenos Aires). El suelo VII se recolectó de una pastura de 5 años, sin fertilización fosforada, de la localidad de Noetinger (provincia de Córdoba). El factor cultivo estuvo compuesto por los mismos niveles y características detalladas en los experimentos anteriores.

El suelo previamente secado al aire y tamizado (2 mm de malla) se colocó en las macetas de PVC descritas anteriormente pero parte del volumen se ocupó con arena fina. En la base de la maceta se puso un papel de filtro para evitar pérdidas de arena por los orificios de salida del agua de percolación. A continuación se agregaron sin mezclarse: 7 partes de arena (2,160 kg); 4 partes de suelo (1,250 kg) y 1 parte de arena (0,310 gr). Esta última tuvo la función de atenuar las pérdidas de agua por evaporación (ver Figura 2.1). En este experimento la reducción del volumen de suelo por maceta tuvo la finalidad de

exacerbar el agotamiento del fósforo del suelo. Se sembraron 5 semillas de cada especie por maceta. A los 7 días se ralearon a 2 plántulas y a los 20 días a 1 planta por maceta. Las semillas de soja se inocularon con un formulado comercial de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (10^9 bacterias ml^{-1}). A los 25 días desde la siembra las macetas con girasol y maíz se fertilizaron con 1 g de nitrógeno como urea (46% N). Ese mismo día se fertilizó todo el experimento con 70 cc maceta^{-1} de: a) macro nutrientes: K_2SO_4 (2,5 mM), CaSO_4 (1,2 mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 mM) y Fe EDTA (0,005 mM) y b) micro nutrientes: H_3BO_3 (0,5 μM), $\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,5 μM), $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,5 μM), $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5 μM) y MoO_3 (0,143 μM). Las macetas se distribuyeron aleatoriamente en una superficie de 20 m^2 cubierta por un techo de policarbonato de 90 % de transparencia y sin paredes laterales. Los riegos se realizaron diariamente con agua desionizada ajustando por peso a un 80% de la máxima capacidad de retención hídrica del suelo y arena de cada maceta. El experimento finalizó a los 80 días después de la siembra.

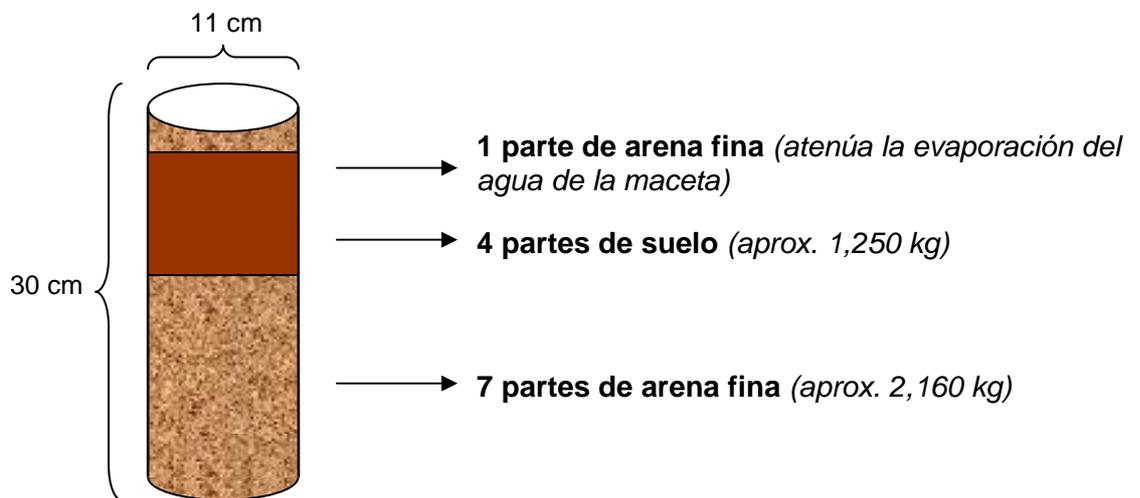


Figura 2.1: Maceta de PVC con diferentes estratos de arena fina y suelo utilizada en el Experimento en Macetas II.

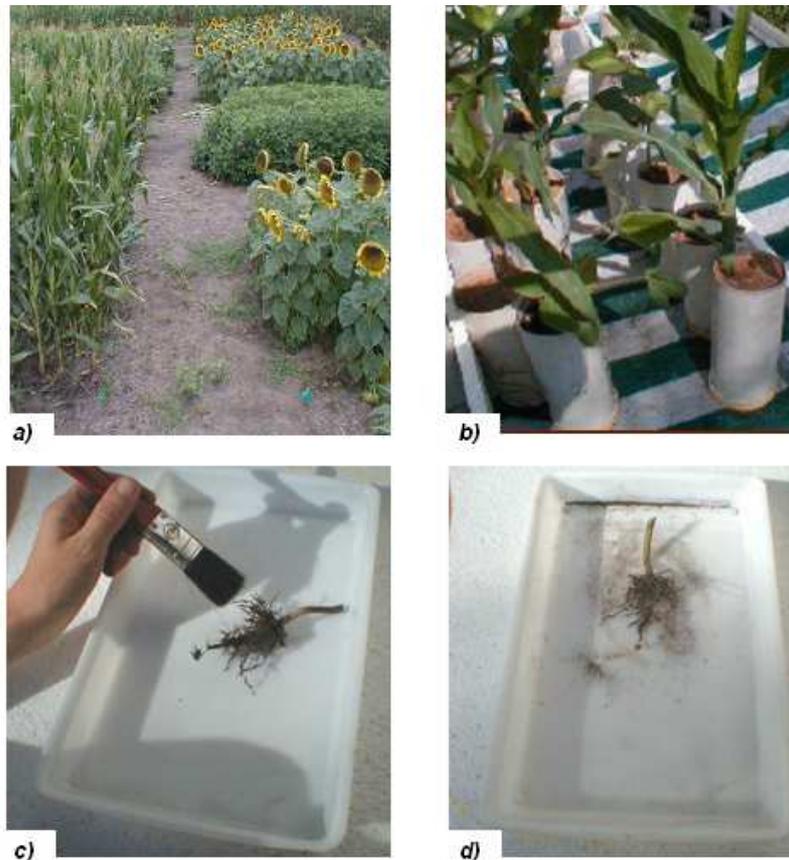


Figura 2.2: Fotografías de los experimentos y muestreo de suelo rizosférico. a) Vista general del experimento de campo, b) Macetas con plantas de maíz del experimento de macetas II, c) Extracción de suelo rizosférico de una raíz de girasol del experimento de campo y d) Muestra de suelo rizosférico obtenida de una raíz de girasol del ensayo de campo.

Extracción de suelo rizosférico

En el experimento de campo y en el de macetas las muestras de rizósfera de soja, girasol y maíz se obtuvieron de los primeros 10 cm superficiales de la raíz ya que es la zona de mayor exploración radical. En el experimento de campo se muestreó el surco central de cada parcela. En primera instancia se separó el suelo que no era retenido por las raíces agitándolas con suaves movimientos (Riley y Barber, 1971). Posteriormente se extrajo con un pincel el suelo que permaneció adherido a la raíz (aproximadamente <2 mm de espesor) según la metodología empleada por Nurlaeny *et al.* (1996) y Lee *et al.*, (1997; ver Figura 2.2 c y d). En el experimento de campo las muestras de suelo no rizosférico se obtuvieron con un barreno de 5 cm de diámetro a la misma profundidad que las pertenecientes a la rizósfera. En los experimentos en macetas se conservó todo el suelo de las macetas sin plantas. Por lo tanto todas las determinaciones químicas se realizaron sobre muestras obtenidas

simultáneamente al finalizar los experimentos. Tanto las muestras provenientes de la rizósfera como las representantes del suelo no rizosférico se secaron a temperatura ambiente hasta peso constante y se tamizaron (0,5 mm malla) antes de realizar las determinaciones correspondientes.

Cosecha de biomasa

Se cosechó la biomasa aérea acumulada por las plantas de soja, girasol y maíz al momento de muestreo de suelo rizosférico de los tres experimentos. En el experimento de campo se cosechó un metro lineal de surco por parcela y se ponderó para obtener una estimación de la producción por planta. En el experimento en macetas II se lavaron y conservaron las raíces. Los tejidos vegetales aéreos y radicales se secaron durante 48 horas a 60° C. Posteriormente se pesaron y molieron (2 mm de malla) para realizar las determinaciones químicas correspondientes.

Determinaciones químicas

Suelo

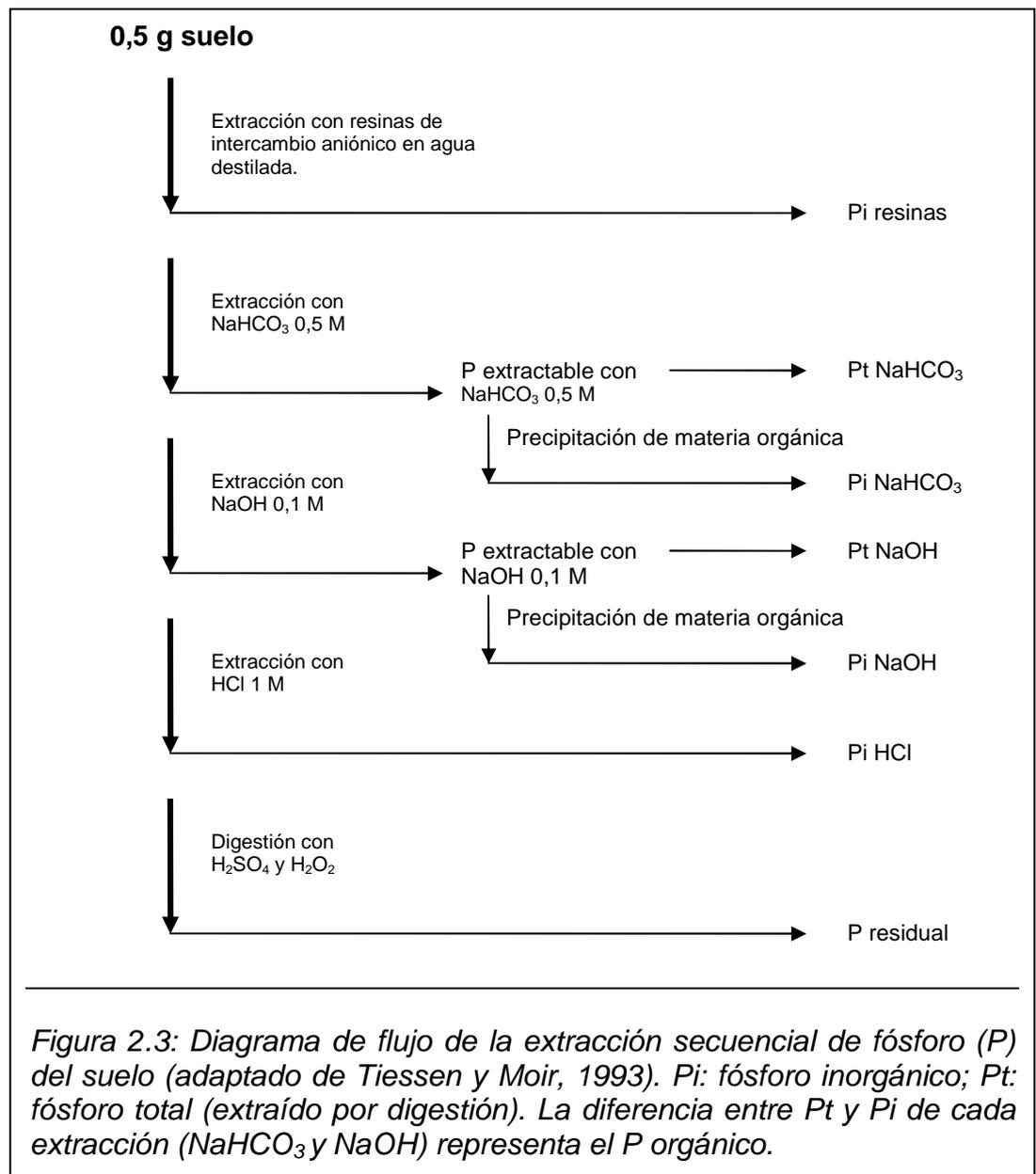
En las muestras de suelo rizosférico y no rizosférico se determinó pH en agua con una relación de 1 parte de suelo cada 20 partes de agua dado el reducido volumen de las muestras de rizósfera (Chen *et al.*, 2002). La caracterización de las diferentes formas de fósforo del suelo se realizó a través de la metodología de fraccionamiento secuencial de Hedley *et al.* (1982) modificada por Tiessen y Moir (1993) sin la extracción con HCl concentrado. Se determinaron las siguientes fracciones (ver Figura 2.3):

- a) P lábil (Pi resinas + Pi NaHCO₃): fósforo extraído con resinas de intercambio aniónico (Cooperband y Logan, 1994) más el fósforo inorgánico extraído con NaHCO₃ 0,5 M (pH 8,5) luego de la precipitación de la materia orgánica. Según Hedley *et al.* (1982a) representa el fósforo inorgánico lábil fácilmente disponible para las plantas.
- b) P-Al y P-Fe (Pi NaOH): fósforo inorgánico extraído con NaOH 0,1 M luego de la precipitación de la materia orgánica. Según Hedley *et al.* (1982a) representa formas de fósforo menos lábiles que las anteriores constituidas por fosfatos unidos a minerales amorfos de Al y Fe. Formas de fósforo no ocluido.
- c) P-Ca (Pi HCl): fósforo extraído con HCl 1 M. Según Hedley *et al.* (1982a) representa los fosfatos cálcicos y de menor disponibilidad para las plantas que las fracciones anteriores. Formas de fósforo ocluido.
- a) Po Bic (Pt NaHCO₃ - Pi NaHCO₃): es determinado por diferencia entre el fósforo inorgánico y el fósforo total extraídos con NaHCO₃ 0,5 M (pH 8,5). Según Hedley *et al.* (1982a) representa el fósforo orgánico lábil fácilmente mineralizable que abastece a las formas de fósforo inorgánico disponibles para las plantas.
- b) Po NaOH (Pt NaOH - Pi NaOH): es determinado por diferencia entre el fósforo inorgánico y el fósforo total extraídos con NaOH

0,1 M. Según Hedley *et al.* (1982a) representa formas orgánicas de fósforo más estables que la anterior.

- c) P residual: determinado por digestión húmeda con H_2SO_4 . Según Hedley *et al.* (1982a) representa formas de fósforo orgánico e inorgánico estables y ocluidas.

El contenido de fósforo de cada fracción se cuantificó por colorimetría a través de la metodología de Murphy y Riley (1962). Todas las determinaciones de realizaron por duplicado.



Sobre los tejidos vegetales aéreos y radicales se determinó la concentración de fósforo a través de la metodología de digestión húmeda con H_2SO_4 concentrado y H_2O_2 30%. Se pesaron 0,10 g de material vegetal seco y molido en un tubo de 50 ml y se le agregó 3 ml de H_2SO_4 . Los tubos se colocaron en un bloque digestor a 330 °C durante 2 horas. Luego se retiraron del bloque hasta que se enfriaran (aproximadamente 15 minutos), se les añadió 0,5 ml de H_2O_2 30% y se volvieron a llevar al bloque digestor por 10 minutos. Este paso se repitió 4 veces o hasta que el extracto quedara incoloro. Finalizado el proceso, se llevó a 50 ml con agua destilada. El contenido de P se determinó colorimétricamente por el método de Murphy y Riley (1962). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA y cuando los efectos fueron significativos ($p < 0,05$) se realizaron contrastes entre medias (t de Student). Para analizar el efecto de las raíces de cada cultivo sobre las fracciones de fósforo y el pH del suelo se realizaron contrastes de cada cultivo con el suelo no rizosférico y para probar la hipótesis de agotamiento diferencial de ciertas fracciones de fósforo se hicieron contrastes entre cultivos. Se realizaron regresiones lineales simples y se estimaron los parámetros y significancia de los modelos obtenidos con la finalidad de explicar las variaciones (Δ) de las concentraciones rizosféricas de fracciones fósforo del suelo en función de ciertas variables explicativas. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa *infoStat/P* (Universidad Nacional de Córdoba, 2004).

2.3 RESULTADOS

Modificación rizosférica de pH

El pH rizosférico fue afectado por la actividad radical de la soja, girasol y maíz en la mayoría de los suelos estudiados (Figura 2.4). En todos los experimentos las raíces de girasol acidificaron notablemente su rizósfera en mayor magnitud que soja y maíz (Tabla 2.2). Los rangos medios de pH rizosférico estuvieron entre 5,83 y 6,29 en soja; 5,55 y 6,05 en girasol y 5,98 y 6,28 en maíz. El girasol acidificó su rizósfera en los 7 suelos estudiados, mientras que la soja y el maíz en 4. La reducción de pH resultante de la actividad de las raíces de maíz y soja alcanzó aproximadamente un tercio de la observada en la rizósfera de girasol en las mismas condiciones experimentales: las diferencias medias de pH entre suelo no rizosférico y rizósfera de soja, girasol y maíz fueron de 0,17; 0,45 y 0,13 unidades de pH respectivamente. El pH de la rizósfera de soja y maíz no fue diferente del pH del suelo no rizosférico en los experimentos de campo ni macetas II (Tabla 2.2). En ningún caso se encontró diferencias significativas ($\alpha > 0,05$) entre las medias de pH rizosférico de soja y maíz (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Resultado de los ANOVA y Contrastes (valores de *p*) de pH en agua (1:20) de suelo rizosférico (Riz.) y no rizosférico (No Riz.) y distintas comparaciones entre cultivos.

	Campo	Macetas I				Macetas II	
	I	II	III	IV	V	VI	VII
ANOVA	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
CONTRASTES							
No Riz. vs Riz.	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Soja vs Maíz	0.92	0.74	0.45	0.07	0.06	0,13	0,56
Soja vs Girasol	0.03	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Girasol vs Maíz	0.04	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Soja vs No Riz.	0,15	<0.01	0.02	<0.01	<0.01	0,07	0,21
Girasol vs No Riz.	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Maíz vs No Riz.	0,13	<0.01	<0.01	0.01	0,06	0.10	0.11

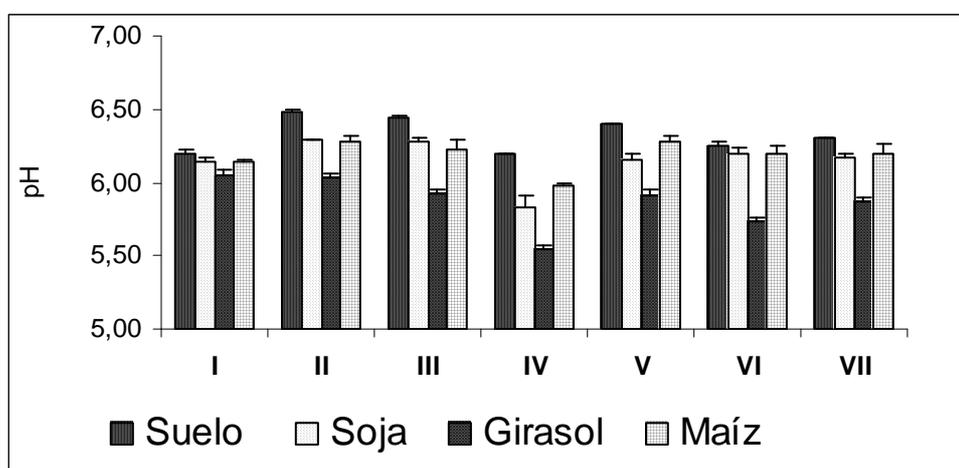


Figura 2.4: Valores promedio de pH en agua (1:20) y barras de error estándar correspondientes a muestras de suelo no rizosférico y rizósfera de soja, girasol y maíz de cada uno de los suelos (I – VII) de los experimentos de Campo (Suelo I, n=5), Macetas I (Suelos II – V, n=5) y Macetas II (Suelos VI y VII, n=4)

Fracciones de fósforo

En la Figura 2.5 se observa la distribución de las distintas formas de fósforo obtenidas a través de la metodología de fraccionamiento secuencial. Los gráficos representan las concentraciones de fósforo en suelo rizosférico y no rizosférico de cada uno de los suelos ordenados de menor a mayor disponibilidad inicial de fósforo Bray 1. Se observó una tendencia creciente en la magnitud de las fracciones inorgánicas P lábil y P-Al P-Fe a medida que los suelos presentaron mayores valores de P Bray 1. En general, las formas de fósforo predominantes fueron aquellas señaladas por Hedley *et al.* (1982a) como de menor disponibilidad para las plantas. Dentro de éstas, P-Ca y Po NaOH representaron los pools inorgánicos y orgánicos, respectivamente, de mayor predominio en los suelos (sin considerar el P residual). Según Hedley *et al.* (1982a) la fracción P-Ca representa los fosfatos cálcicos solubles en medios ácidos y la fracción Po NaOH contiene a los fosfatos alojados en compuestos

orgánicos relativamente estables del suelo. La distribución de las formas químicas de fósforo fue más uniforme en los suelos de las macetas (suelos II a VIII en Fig. 2.5) que en el experimento de campo. En éste último la fracción Po NaOH ocupó aproximadamente el 47% del fósforo del suelo mientras que en ambos experimentos de macetas Po NaOH no superó el 35% (sin contar el P residual).

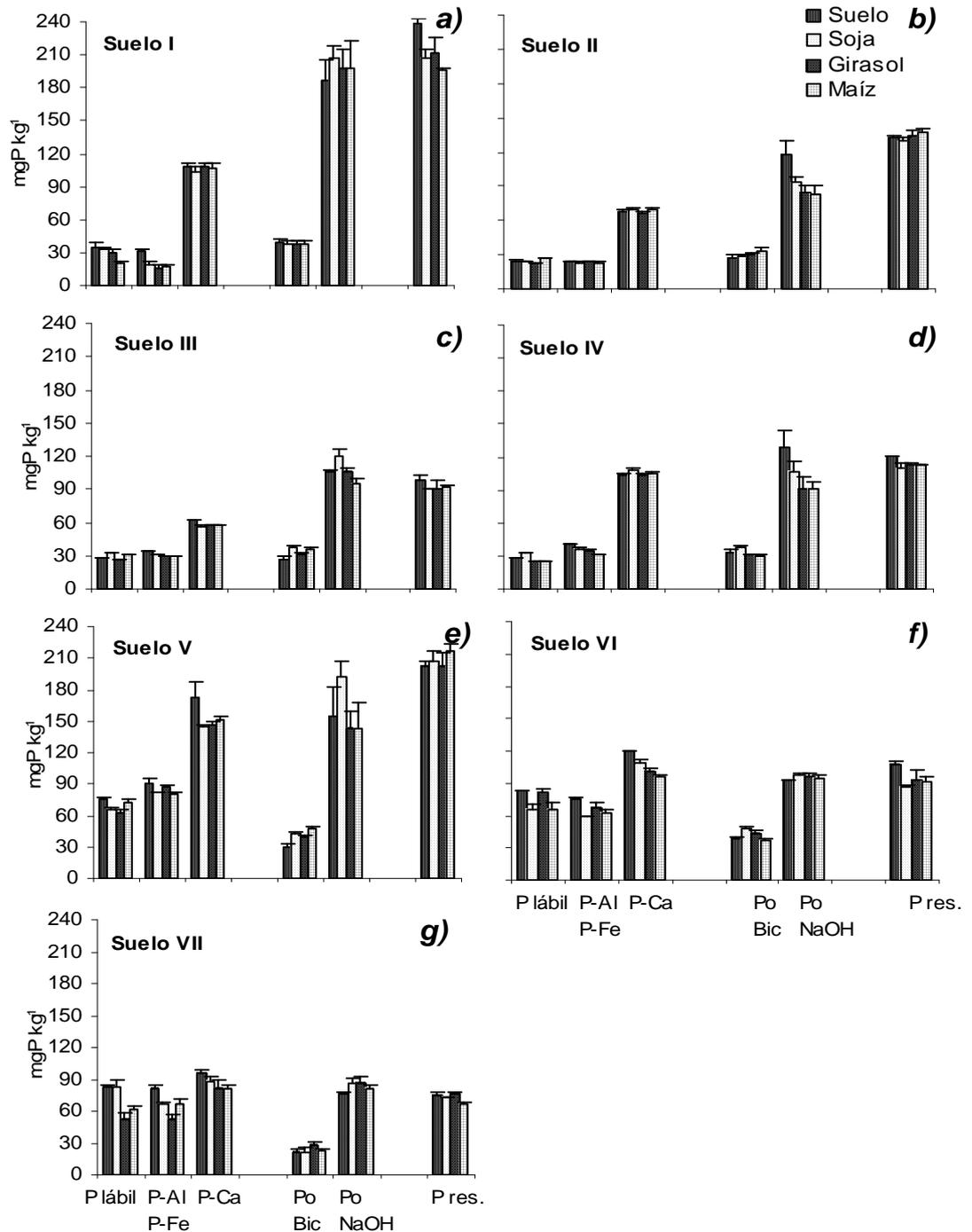


Figura 2.5: Valores medios de fr. de fósforo en suelo no rizosférico y rizósfera de soja, girasol y maíz. Las barras corresponden al error estándar. Fr. inorgánicas: P lábil: resinas y NaHCO₃ 0.5 M; P-Al P-Fe: NaOH 0.1 M y P-Ca: HCl 1 M. Fr. orgánicas: Po Bic y Po NaOH obtenidas por diferencia entre el P total y el P inorgánico NaHCO₃ 0.5 M y con NaOH 0.1 M respectivamente. P res.: P residual. a) Exp. campo (Suelo I); b), c), d) y e) Exp. Macetas I (Suelos II a V); f) y g) Exp. Macetas II (Suelos VI y VII)

Tabla 2.3: Resultado de los ANOVA y Contrastes (valores de p) de las distintas fracciones de fósforo entre suelo rizosférico (Riz.) y no rizosférico (No Riz.) y diferentes comparaciones entre cultivos.

<i>Suelo I</i>	P lábil	P-Al	P-Fe	P-Ca	Po Bic	Po NaOH	P res.
ANOVA	< 0.01	< 0.01	0,69	0,99		0,94	0,25
CONTRASTES							
No Riz. vs Riz.	0,13	<0.01					
Soja vs Maiz	< 0.01	0,53					
Soja vs Girasol	0,52	0,38					
Girasol vs Maíz	0,02	0,80					
Soja vs No Riz.	0,96	< 0.01					
Girasol vs No Riz.	0,49	< 0.01					
Maíz vs No Riz.	< 0.01	< 0.01					
Suelo II							
ANOVA	0.02	0,74	0,14	0,14		0.02	0,26
CONTRASTES							
No Riz. vs Riz.	0,59					<0.01	
Soja vs Maiz	0,05					0,36	
Soja vs Girasol	0,17					0,43	
Girasol vs Maíz	<0.01					0,89	
Soja vs No Riz.	0,50					0.04	
Girasol vs No Riz.	0,05					<0.01	
Maíz vs No Riz.	0,16					<0.01	
Suelo III							
ANOVA	<0.01	<0.01	<0.01	0.02		0.01	0,54
CONTRASTES							
No Riz. vs Riz.	0,11	<0.01	<0.01	<0.01		0,97	
Soja vs Maiz	0,06	0.01	0,10	0,86		<0.01	
Soja vs Girasol	<0.01	0.02	0,33	0,17		0.04	
Girasol vs Maíz	0.01	0,67	0,45	0,12		0,10	
Soja vs No Riz.	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		0.05	
Girasol vs No Riz.	0,29	<0.01	<0.01	0,11		0,88	
Maíz vs No Riz.	0,13	<0.01	<0.01	<0.01		0,08	
Suelo IV							
ANOVA	<0.01	<0.01	0,26	0,14		0,10	0.01
CONTRASTES							
No Riz. vs Riz.	0,40	<0.01					<0.01
Soja vs Maiz	<0.01	<0.01					0,34
Soja vs Girasol	<0.01	0,11					0,96
Girasol vs Maíz	0,99	<0.01					0,36
Soja vs No Riz.	<0.01	<0.01					<0.01
Girasol vs No Riz.	<0.01	<0.01					0.01
Maíz vs No Riz.	<0.01	<0.01					0.01

Cont.

Tabla 2.3 (Cont.): Resultado de los ANOVA y Contrastes (valores de p) de las distintas fracciones de fósforo entre suelo rizosférico (Riz.) y no rizosférico (No Riz.) y diferentes comparaciones entre cultivos.

Suelo V	P lábil	P-Al	P-Fe	P-Ca	Po Bic	Po NaOH	P res.
ANOVA	<0.01	0.03	<0.01	<0.01	<0.01	0,35	0,67
CONTRASTES							
No Riz. vs Riz.	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	<0.01		
Soja vs Maiz	0.07	0,79	0,66	0,17			
Soja vs Girasol	0,37	0,13	0,95	0,26			
Girasol vs Maíz	0.01	0,08	0,70	0.02			
Soja vs No Riz.	0.01	0.01	<0.01	<0.01			
Girasol vs No Riz.	<0.01	0,30	<0.01	<0.01			
Maíz vs No Riz.	0,36	0.01	<0.01	<0.01			
Suelo VI							
ANOVA	0.05	0.03	<0.01	<0.01	0,42	0,13	
CONTRASTES							
No Riz. vs Riz.	0,06	0.01	<0.01	0.05			
Soja vs Maiz	0,91	0,40	0.01	<0.01			
Soja vs Girasol	0.05	0,13	0,07	0.05			
Girasol vs Maíz	0.04	0,47	0,31	0.02			
Soja vs No Riz.	0.03	<0.01	0.02	<0.01			
Girasol vs No Riz.	0,81	0,09	<0.01	0,08			
Maíz vs No Riz.	0.03	0.02	<0.01	0,47			
Suelo VII							
ANOVA	<0.01	<0.01	0,17	0,31	0,34	0,10	
CONTRASTES							
No Riz. vs Riz.	0.02	<0.01					
Soja vs Maiz	0.02	0,24					
Soja vs Girasol	<0.01	0.02					
Girasol vs Maíz	0,19	0.02					
Soja vs No Riz.	0,97	0.03					
Girasol vs No Riz.	<0.01	<0.01					
Maíz vs No Riz.	0.02	0.03					

Referencias: Fracciones inorgánicas: P lábil: extraído con resinas y NaHCO₃ 0.5 M; P-Al P-Fe: extraído con NaOH 0.1 M y P-Ca: extraído con HCl 1 M. Fracciones orgánicas: Po Bic y Po NaOH obtenidas a partir de la diferencia entre el P total y el P inorgánico extraído con NaHCO₃ 0.5 M y con NaOH 0.1 M respectivamente. P res.: P residual obtenido por digestión con H₂SO₄ No Riz.: Suelo no rizosférico. Riz.: Suelo rizosférico.

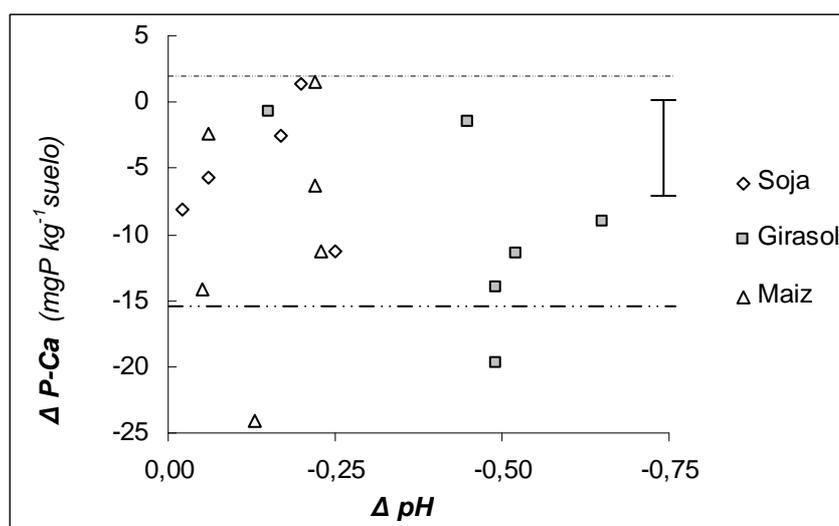


Figura 2.6: Variación de la concentración rizosférica de P-Ca (mgP kg^{-1} suelo) en función de los valores medios de modificación de pH del suelo. La variable Δ representa la diferencia de P-Ca y pH entre el suelo no rizosférico y la rizósfera de cada especie. La barra representa la magnitud del error estándar. Los coeficientes de regresión se encuentran detallados en la Tabla 2.4. Las líneas punteadas perpendiculares al eje de las ordenadas corresponden al promedio de los valores de acumulación ($\Delta \text{P-Ca} > 0$) y agotamiento ($\Delta \text{P-Ca} < 0$) de P-Ca.

La concentración de las fracciones de fósforo del suelo fue afectada por la actividad radical de las plantas en crecimiento, lo cual indica una absorción activa de fósforo en el volumen de suelo vecino a las raíces. Esto puede ser observado mediante los valores absolutos y la diferencia que se obtiene al restar a cada fracción de fósforo medida en el suelo no rizosférico los valores observados en el suelo rizosférico y calculando los coeficientes de las regresiones (Δ , en las Figuras 2.5 y 2.6 y en la Tabla 2.4). La variable regresora x_1 corresponde a la diferencia de pH entre la media de suelo rizosférico y el pH de la rizósfera de cada especie. Es una medida cuantitativa directa del efecto neto que la actividad de las raíces produce sobre el ambiente rizosférico. La variable regresora x_2 ($\mu\text{gP abs. kg}^{-1}$ suelo) corresponde al cociente entre el fósforo acumulado por la biomasa aérea de cada especie y la masa de suelo de la maceta sobre la que se desarrollaron. Esta variable es una medida de la intensidad de agotamiento de fósforo que producen las raíces en un volumen de suelo conocido. La variable regresora x_3 ($\mu\text{gP abs. planta}^{-1}$) corresponde a la cantidad de fósforo medido en la biomasa aérea de cada planta a la finalización de los experimentos. Dicha variable representa la demanda acumulada del nutriente por cada una de las especies. Las variables x_2 y x_3 sólo se estimaron en los experimentos en macetas. En adelante, el término agotamiento hará referencia a una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de determinada fracción de fósforo de la rizósfera de una especie con respecto al suelo no rizosférico. El término acumulación significará lo opuesto (i.e. incremento de los valores de fósforo en la rizósfera). Los valores medios de

agotamiento de fósforo rizosférico de las tres especies fueron de -9,82 (Δ P lábil), -9,36 (Δ P-Al P-Fe) y -14,24 (Δ P-Ca). El efecto de las raíces sobre la fracción P-Ca fue superior al ejercido sobre P lábil y P-Al P-Fe ($p < 0,05$)

La fracción P lábil manifestó una respuesta errática a la presencia de las raíces. En la rizósfera se pudo observar tanto agotamiento (en los suelos I, IV, V, VI y VII) como acumulación de P lábil (suelos III y IV; ver Tabla 2.4 y Figura 2.5). Mientras que en el suelo II no se observaron diferencias de P lábil entre suelo no rizosférico y la rizósfera de cada especie. La variación de la concentración rizosférica de esta fracción estuvo más directamente relacionada con el fósforo absorbido por las plantas que con las modificaciones rizosféricas de pH ($p < 0,05$, Tabla 2.4). En la fracciones P-Al P-Fe se verificó agotamiento rizosférico en los suelos I, II, IV, V, VI y VII (Figura 2.5, Tabla 2.3). A excepción del suelo II, en todas las situaciones las raíces de soja, girasol y maíz agotaron los fosfatos representados por la fracción P-Al y P-Fe. La concentración rizosférica de la fracción P-Ca fue afectada significativamente en los suelos III, V y VI. En los tres suelos se detectaron diferencias entre el suelo no rizosférico y la media de los valores de fósforo del suelo rizosférico (contraste No Riz. vs Riz., Tabla 2.3). En el suelo VI también se encontraron diferencias entre especies en cuanto a las concentraciones de dicha fracción. De acuerdo con los contrastes de la Tabla 2.3, las raíces de girasol y maíz extrajeron más P-Ca que la soja pero no fueron diferentes entre sí. Sólo en el cultivo de girasol se observó una relación estadísticamente significativa entre Δ pH y Δ P-Ca en la regresión lineal que agrupa los valores obtenidos en los tres experimentos (Tabla 2.4) sin que este hecho significara una ventaja en la adquisición de P-Ca (Figura 2.6). En el modelo general (Tabla 2.6) la relación entre Δ P-Ca y Δ pH no fue significativa ($p > 0,20$). En la Figura 2.6 se representan los valores medios de Δ P-Ca de todos los experimentos en función de las modificaciones rizosféricas de pH (Δ pH). Se observa que todas las observaciones se concentran en el mismo rango de valores del eje de "y" independiente de los valores de "x". Los puntos sombreados corresponden al girasol.

El agotamiento de fósforo de las fracciones orgánicas sólo ocurre si existe mineralización previa de los fosfatos alojados en las estructuras orgánicas del suelo. La fracción Po Bic representa, según Hedley *et al.* (1982a), a los fosfatos asimilados por la biomasa microbiana que habita el ambiente rizosférico. Se encontró que la concentración de Po Bic fue mayor en la rizósfera de las tres especies que en el suelo no rizosférico, excepto en maíz en los suelos IV y VI donde el efecto no fue significativo (Figura 2.5, Tabla 2.3). Hubo agotamiento de la fracción Po NaOH en la rizósfera de las plantas que crecieron en los suelos II y IV de los experimentos en macetas. En general, las variaciones rizosféricas de la concentración del fósforo contenido en fracciones orgánicas (Δ Po Bic y Δ Po NaOH) no fueron significativamente afectadas por Δ pH ni por el fósforo absorbido por las plantas de soja, girasol y maíz (Tabla 2.4).

Tabla 2.4: Parámetros (α ; β), coeficiente de determinación (R^2) y significancia (p -value) de las funciones obtenidas a través de diferentes regresiones lineales simples para explicar las variaciones en la concentración rizosférica de las fracciones de fósforo (y) en función de distintas variables regresoras (x_1 , x_2 ó x_3).

	$x_1 = \Delta \text{pH}$				$x_2 = P \text{ abs } (\mu\text{g P kg}^{-1} \text{ suelo})$				$x_3 = P \text{ abs } (\mu\text{g P planta}^{-1})$			
	α	β	R^2	p -value	α	β	R^2	p -value	α	β	R^2	p -value
$y = \Delta P \text{ lábil}$												
Soja	-7,79	-31,39 x_1	0,21	0,29	6,80	-1,15 x_2	0,30	0,05	-18,33	0,80 x_3	0,09	0,57
Girasol	4,58	26,71 x_1	0,16	0,37	0,84	-0,91 x_2	0,56	<0,08	23,14	-1,45 x_3	0,72	0,03
Maíz	-5,16	12,49 x_1	0,05	0,64	0,03	-0,41 x_2	0,76	<0,02	3,67	-0,36 x_3	0,60	<0,01
Modelo general	-3,52	7,13 x_1	0,02	0,20	-1,02	-0,48 x_2	0,33	<0,01	2,08	-0,37 x_3	0,21	<0,01
$y = \Delta P\text{-Al P-Fe}$												
Soja	-14,34	-33,81 x_1	0,47	0,09	3,01	-1,32 x_2	0,79	<0,01	-25,24	0,89 x_3	0,21	0,35
Girasol	-8,59	2,01 x_1	0,00	0,94	2,44	-1,01 x_2	0,91	<0,01	22,61	-1,40 x_3	0,90	<0,01
Maíz	-9,34	-0,02 x_1	0,00	0,99	-5,87	-0,16 x_2	0,44	0,15	-4,66	-0,13 x_3	0,31	0,24
Modelo general	-9,66	-2,99 x_1	0,01	0,46	-4,57	-0,30 x_2	0,26	<0,01	-3,73	-0,18 x_3	0,10	0,01
$y = \Delta P\text{-Ca}$												
Soja	-6,14	-19,80 x_1	0,11	0,11	9,64	-1,43 x_2	0,86	0,01	-14,04	0,58 x_3	0,09	0,20
Girasol	2,13	23,96 x_1	0,17	0,03	6,36	-0,39 x_2	0,37	0,05	-4,26	-0,30 x_3	0,11	0,15
Maíz	-9,25	0,79 x_1	0,00	0,75	-7,21	-0,19 x_2	0,21	0,90	-6,92	-0,12 x_3	0,09	0,41
Modelo general	-4,70	6,72 x_1	0,02	0,20	-3,87	-0,29 x_2	0,20	<0,01	-3,34	-0,18 x_3	0,08	0,06
$y = \Delta P \text{ inorgánico } (\Delta P \text{ lábil} + \Delta P\text{-Al P-Fe} + \Delta P\text{-Ca})$												
Soja	-33,09	-126,96 x_1	0,71	0,03	28,36	-4,55 x_2	0,94	<0,01	-59,96	2,50 x_3	0,18	0,23
Girasol	-1,96	52,71 x_1	0,15	0,15	1,33	-2,49 x_2	0,92	<0,01	47,28	-3,32 x_3	0,86	<0,01
Maíz	-24,47	11,84 x_1	0,01	0,98	-11,29	-0,80 x_2	0,53	0,02	-5,87	-0,65 x_3	0,36	0,07
Modelo general	-17,43	10,83 x_1	0,01	0,41	-1,01	-4,8 x_2	0,39	<0,01	-2,52	-0,77 x_3	0,19	<0,01

Cont.

Tabla 2.4 (Cont.): Parámetros (α ; β), coeficiente de determinación (R^2) y significancia (p -value) de las ecuaciones obtenidas a través de diferentes regresiones lineales simples para explicar las variaciones en la concentración rizosférica de fracciones de fósforo (y) en función de distintas variables regresoras (x_1 , x_2 ó x_3).

	$x_1 = \Delta pH$				$x_2 = P \text{ abs } (\mu\text{g P kg}^{-1} \text{ suelo})$				$x_3 = P \text{ abs } (\mu\text{g P planta}^{-1})$			
	α	β	R^2	p -value	α	β	R^2	p -value	α	β	R^2	p -value
$y = \Delta Po \text{ Bic}$												
Soja	3,79	-9,45 x_1	0,05	0,62	7,03	-0,08 x_2	0,00	0,89	-11,65	0,93 x_3	0,40	0,17
Girasol	-0,32	-8,13 x_1	0,11	0,47	3,23	0,11 x_2	0,07	0,61	3,28	0,05 x_3	0,01	0,86
Maíz	4,43	1,45 x_1	0,00	0,94	7,19	-0,13 x_2	0,15	0,45	8,11	-0,11 x_3	0,10	0,54
Modelo general	3,89	-1,34 x_1	0,00	0,71	6,41	-0,09 x_2	0,04	0,14	7,17	-0,08 x_3	0,03	0,18
$y = \Delta Po \text{ NaOH}$												
Soja	17,46	67,79 x_1	0,13	0,42	-5,35	1,05 x_2	0,04	0,72	-29,07	1,66 x_3	0,05	0,66
Girasol	15,14	47,99 x_1	0,15	0,38	-26,76	1,39 x_2	0,46	0,13	-36,30	1,11 x_3	0,15	0,44
Maíz	-9,97	5,03 x_1	0,00	0,92	-24,70	0,61 x_2	0,49	0,11	-30,43	0,55 x_3	0,41	0,17
Modelo general	3,05	27,3 x_1	0,03	0,11	-13,18	0,50 x_2	0,06	0,06	-15,15	0,33 x_3	0,03	0,22
$y = \Delta P \text{ orgánico } (\Delta Po \text{ Bic} + \Delta Po \text{ NaOH})$												
Soja	22,44	60,87 x_1	0,09	0,53	0,73	1,19 x_2	0,04	0,52	-31,33	2,15 x_3	0,07	0,54
Girasol	9,58	23,76 x_1	0,02	0,27	-27,83	2,16 x_2	0,59	<0,01	-51,80	2,14 x_3	0,30	0,10
Maíz	-23,54	-125,58 x_1	0,33	0,04	-26,33	1,65 x_2	0,80	<0,01	-46,69	1,65 x_3	0,81	<0,01
Modelo general	5,13	7,74 x_1	0,00	0,70	-14,18	1,47 x_2	0,31	<0,01	-27,17	1,27 x_3	0,25	<0,01
$y = \Delta P \text{ residual}$												
Soja	-18,55	-49,28 x_1	0,26	0,45	2,48	-1,13 x_2	0,29	0,11	2,55	-0,48 x_3	0,03	0,53
Girasol	-25,33	-37,96 x_1	0,39	0,10	-4,52	0,03 x_2	0,00	0,96	-8,35	0,19 x_3	0,03	0,45
Maíz	-14,45	-29,32 x_1	0,08	0,36	0,18	-0,20 x_2	0,15	0,09	1,45	-0,16 x_3	0,09	0,17
Modelo general	-15,04	-20,93 x_1	0,04	0,06	-0,66	-0,19 x_2	0,04	0,13	0,84	-0,16 x_3	0,03	0,20

Referencias: Δ) Diferencia de pH o fracciones de fósforo entre los valores medios observados en la rizósfera de cada especie y el suelo no rizosférico correspondiente. $x_2 = P \text{ abs } (\mu\text{g P kg}^{-1} \text{ suelo})$: es el cociente entre los valores medios de fósforo acumulado en la biomasa aérea de cada especie y la masa de suelo de la maceta. $x_3 = P \text{ abs } (\mu\text{g P planta}^{-1})$: corresponde al fósforo acumulado en la biomasa aérea de cada especie a la finalización de su respectivo experimento.

Biomasa vegetal y fósforo acumulado.

En la Tabla 2.5 puede observarse que la producción de biomasa (materia seca) de cada especie fue similar en los dos experimentos en macetas. En cambio, en el experimento de campo las plantas de girasol y maíz produjeron 10 veces más biomasa que en macetas. La soja fue la especie más estable para este parámetro en las diferentes condiciones experimentales. Con excepción de lo observado en el suelo VI, la biomasa aérea acumulada por las plantas de maíz siempre fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la de soja y girasol (Tabla 2.5). El rango de la concentración de fósforo en la biomasa aérea fue de 1,06 – 1,60 $\mu\text{gP g}^{-1}$ en soja, 1,12 – 1,35 $\mu\text{gP g}^{-1}$ en girasol y 0,60 – 1,11 $\mu\text{gP g}^{-1}$ en maíz (soja=girasol>maíz; $p < 0,05$). La extracción aérea media de fósforo en cada maceta fue de 19,34 μgP por soja; 22,32 μgP por girasol y 28,38 μgP por maíz. Para las tres especies, el fósforo absorbido por unidad de masa de suelo (x_2 : $\mu\text{gP kg}^{-1}$ suelo) fue la variable que mejor explicó los cambios en las variaciones rizosféricas de fracciones inorgánicas de fósforo (Tabla 2.4)

Tabla 2.5: Valores promedio de materia seca (g) y P absorbido (μgP) por planta de soja, girasol y maíz de cada uno de los suelos (I – VII) de los experimentos de Campo (Suelo I, $n=5$, 80 días), Macetas I (Suelos II – V, $n=5$, 90 días) y Macetas II (Suelos VI y VII, $n=4$, 80 días).

	Campo	Macetas I				Macetas II	
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Biomasa Aérea (g)							
Soja	14,74 a	16,70 b	16,33 a	14,07 a	15,63 a	13,41 a	9,68 a
Girasol	104,5 b	13,68 a	15,37 a	15,55 a	14,30 a	16,71 a	26,31 b
Maíz	212,4 c	30,07 c	34,65 b	27,30 b	25,73 b	24,63 a	61,32 c
P absorbido aéreo ($\mu\text{g P planta}^{-1}$)							
Soja		17,62 a	24,74 a	20,28 a	20,41 a	18,75 a	14,25 a
Girasol		17,37 a	17,17 a	24,30 a	18,92 a b	20,84 ab	35,32 b
Maíz		20,69 a	21,04 a	16,52 a	16,28 b	27,63 b	68,12 c

Referencias: P absorbido aéreo: P acumulado en biomasa aérea durante el período de duración de los experimentos. Tanto en los experimentos en macetas como en el de campo los valores corresponden al promedio de plantas individuales. Letras distintas indican diferencias significativas entre especies LSD test ($p < 0,05$).

Tabla 2.6: Valores medios de biomasa radical (g), densidad radical (g raíz kg⁻¹ suelo), fósforo radical (µg P), fósforo total absorbido (µg P planta⁻¹) y eficiencia de adquisición de fósforo (µg P g⁻¹ raíz) de soja, girasol y maíz a los 80 días de la siembra (Experimento Macetas II).

	Macetas II	
	VI	VII
Biomasa radical (g)		
Soja	2,78 a	2,82 a
Girasol	3,35 a	5,96 a
Maíz	5,86 b	21,35 b
Densidad radical (g raíz kg⁻¹ suelo)		
Soja	2,12 a	2,25 a
Girasol	2,68 a	4,77 a
Maíz	4,68 b	17,08 b
P absorbido raíces (µg P)		
Soja	4,05 a	4,42 a
Girasol	4,47 a	8,94 b
Maíz	8,31 b	25,76 c
P absorbido total^(*) (µg P planta⁻¹)		
Soja	22,81 a	18,67 a
Girasol	25,31 a	44,26 b
Maíz	35,94 b	93,87 c
Ef. Adquisición P (µg P g⁻¹ raíz)		
Soja	8,23 a	6,63 a
Girasol	7,57 a	7,67 a
Maíz	6,13 b	4,47 b
Referencias: (*) P absorbido total: P en biomasa aérea + P en biomasa radical. Todos los valores corresponden a la media (n=4) de cada especie. Letras distintas indican diferencias significativas entre especies. LSD test (p<0,05)		

En cuanto al sistema radical, las determinaciones de biomasa y su contenido de fósforo se realizaron sólo en el experimento macetas II. Se observó que las raíces representaron aproximadamente un 20% de la biomasa total acumulada a los 80 días de la siembra (Tabla 2.6). Se logró una mayor concentración de raíces en el estrato de la maceta constituido por la masa de suelo. El 85% y 95% de las raíces producidas en los suelos VI y VII, respectivamente, se ubicaron en dicho compartimiento. La producción de raíces por soja y girasol fue inferior a la alcanzada por las de maíz (Tabla 2.6). Las plantas de maíz alcanzaron mayor biomasa de raíces por unidad de suelo (densidad radical) que soja y girasol (ver Tabla 2.6). La absorción total de fósforo fue diferente entre especies, siendo las raíces de maíz las de mayor extracción de este nutriente (p<0,05). La eficiencia de adquisición de fósforo de las raíces de soja y girasol fue superior a la observada en maíz (Tabla 2.6).

2.4 DISCUSION

Modificaciones de pH en la rizósfera

En la rizósfera de soja, girasol y maíz los valores de pH fueron inferiores a los observados en el suelo no rizosférico. A través de estas modificaciones químicas la planta podría controlar la movilización de nutrientes (Thibaud *et al.*, 1994). Staunton y Leprince (1996) y Morel y Hinsinger (1999) observaron que el poder buffer del suelo determina la magnitud de las modificaciones de pH del suelo y de la rizósfera. Las raíces de soja acidificaron el suelo rizosférico aunque las diferencias observadas fueron leves y no siempre resultaron significativas (Tabla 2.2). Se sabe que la nutrición nitrogenada es el factor que mayor influencia posee sobre el balance de aniones y cationes en la mayoría de las especies (Hinsinger, 2001). La importancia de este fenómeno depende de la cantidad de nitrógeno que fija la planta y por lo tanto, de condiciones favorables para la fijación (Mengel, 1994, Aguilar y Van Diest, 1981). Cuando la planta toma nitrógeno exclusivamente como NO_3^- o NH_4^+ los cambios de pH rizosférico son previsibles (Riley y Barber, 1971). Por ejemplo, Gahoonia *et al.* (1992) hallaron una diferencia de -2,2 y 0,3 unidades de pH entre el suelo no rizosférico y la rizósfera de ryegrass (*Lolium perenne*) fertilizado con NH_4^+ y NO_3^- , respectivamente. En cambio, cuando las leguminosas toman nitrógeno del suelo ingresan a la raíz NO_3^- , NH_4^+ y también nitrógeno fijado simbióticamente. En estas condiciones de fuentes diversas de nitrógeno el balance entre aniones y cationes absorbidos es variable y los cambios de pH también (Nye, 1981). Es probable que gran parte de los requerimientos nitrogenados de la soja hayan sido cubiertos por NO_3^- mineralizados en el período de tiempo en que se llevaron a cabo los experimentos. De este modo las formas de nitrógeno absorbidas por la soja podrían no haber sido significativamente diferentes a las absorbidas por las otras dos especies y por eso su efecto sobre el pH del suelo fue similar al ejercido por las raíces de maíz (Tabla 2.2, ver contraste soja vs maíz). Las raíces de maíz ejercieron sensibles disminuciones del pH de la rizósfera (-0,05 a -0,22 unidades de pH) aunque no en todos los suelos: en el caso de los suelos I, V, VI y VII no resultaron significativas (Tabla 2.2). George *et al.* (2002) observaron que el pH de la rizósfera de maíz permaneció prácticamente invariable a los 30 días desde la siembra, incluso a menos de 1 mm de distancia del rizoplano. Al comparar el efecto de las tres especies sobre el pH del suelo resalta el impacto que tuvo la actividad de las raíces de girasol sobre el suelo (Figura 2.4). Este hecho fue consistente en todos los suelos. En todos los casos, la acidificación provocada por esta especie fue mayor que la observada en soja y maíz (*ver contrastes de* Tabla 2.2). La acidificación observada en la rizósfera de girasol podría estar vinculada con la naturaleza de los compuestos orgánicos que liberan sus raíces aunque no hay antecedentes que expliquen con certeza este fenómeno. Entre los principales carboxilatos (acetato¹⁻, malato²⁻, oxalato²⁻, citrato³⁻) producidos por los vegetales, los tricarboxilatos (citrato³⁻) son los de mayor producción y liberación por las raíces de dicotiledóneas (Jones y Darrah, 1994). Este podría ser el caso de las raíces de girasol. En pH cercano a la neutralidad, el ácido cítrico acumulado en la raíz se disocia en citrato³⁻ y H^+ cuando alcanza el ambiente rizosférico. Este incremento en las concentraciones de H^+ en la rizósfera explicaría el descenso de pH (Hedley *et al.*, 1982b). El efecto de este tricarboxilato sobre la solubilización de fosfatos del suelo será abordado en párrafos posteriores. No se hallaron trabajos previos en los cuales se haya estudiado el efecto sobre el pH rizosférico del girasol y/o de otros representantes de la familia *Compositae* en comparación con otras especies bajo las mismas condiciones experimentales. Por lo tanto, el consistente efecto que

las raíces de girasol produjeron sobre el pH del suelo de los tres experimentos es un resultado que constituye un interesante hallazgo para seguir explorando.

Efecto de la actividad de las raíces sobre las fracciones de fósforo

Como ha sido mencionado, Hedley *et al.* (1982a) propusieron que las fracciones de fósforo obtenidas a través de su fraccionamiento secuencial no poseen la misma disponibilidad para las plantas. Según estos autores la biodisponibilidad de las fracciones inorgánicas seguiría el orden P lábil > P-Al P-Fe > P-Ca. Al comparar la concentración de fósforo en el ambiente rizosférico, los resultados muestran que las tres especies absorbieron fósforo proveniente de las tres fracciones inorgánicas. Esto se deduce a partir de la similitud observada del efecto de las raíces de las tres especies sobre las principales fracciones de fósforo inorgánico: Δ P-lábil; Δ P-Al P-Fe y Δ P-Ca. Los valores medios de agotamiento de fósforo rizosférico de las tres especies fueron de -9,82 (Δ P lábil), -9,36 (Δ P-Al P-Fe) y -14,24 (Δ P-Ca). En la rizósfera de soja la concentración rizosférica de la fracción P-lábil fue superior a la del suelo no rizosférico en los suelos III y V ($p < 0,05$; Tabla 2.3). Las mayores concentraciones rizosféricas de P lábil podrían atribuirse a las interacciones entre los iones H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} con otros solutos que afectan su solubilidad como los H^+ y ácidos orgánicos (Kirk *et al.*, 1999). Como las muestras de suelo se obtienen en un determinado momento, es probable que cualquiera de los exudados radicales haya solubilizado o mineralizado fosfatos que la raíz todavía no absorbió (Hinsinger, 2001, Horst *et al.*, 2001). Otro factor que incide en la dinámica del fósforo en la rizósfera es la capacidad del suelo para reponer los iones fosfato exportados de la solución de suelo (Darrah, 1993). Por ejemplo, Grinsted *et al.*, (1982) y Kirk *et al.* (1999) hallaron un incremento en la concentración de fosfatos solubles, en el período de tiempo que abarcaron los experimentos, en colza (*Brassica napus*) y arroz (*Oriza sativa* L.), respectivamente. Radersma y Grierson (2004) no pudieron detectar diferencias en P lábil entre maíz y especies forestales a pesar de la gran diferencia en la exudación de compuestos orgánicos que hallaron en la rizósfera de cada especie.

En la Tabla 2.4 se observa que el fósforo contenido en la biomasa vegetal por unidad de suelo (x_2) fue la variable que mejor explicó los cambios en Δ P-lábil. Las modificaciones rizosféricas de pH no afectaron el aprovechamiento de P-lábil de ninguna de las tres especies en forma significativa (Tabla 2.4). En maíz, el notable agotamiento de P lábil observado en el experimento de campo podría estar vinculado con la acción de micorrizas puesto que a través de ellas la adquisición de fósforo se produce por el incremento de la zona de exploración radical y no por la solubilización de fracciones de baja biodisponibilidad (Nurlaeny *et al.*, 1996; George *et al.*, 2002). Cabe acotar que en una tesis paralela a la presente se tiene previsto el análisis de la simbiosis micorrítica en el experimento de campo utilizado en el presente trabajo. La participación relativa de la fracción P-Al P-Fe fue similar a P-lábil en los siete suelos estudiados (Figura 2.5). A excepción del suelo II, en todas las situaciones se observó un efecto significativo (y depresor) de las raíces sobre la concentración de P-Al P-Fe (Tabla 2.5). Estos resultados, permiten sugerir que los fosfatos de dicha fracción son una fuente importante de fósforo para los tres cultivos. En la Tabla 2.4 se observa que Δ P-Al P-Fe guardó una relación directa con el fósforo

absorbido por las plantas por unidad de masa de suelo (X_2). Los valores medios de agotamiento de P-lábil y P-Al P-Fe fueron -9,82 ppm y -9,36 ppm; respectivamente. Puesto que las dos medias no son diferentes entre sí ($p > 0,05$) no puede afirmarse que difieran en su biodisponibilidad para las plantas. Nuruzzaman *et al.* (2006) hallaron que las fracciones de fósforo de mayor agotamiento rizosférico fueron P-lábil y P-Al P-Fe independientemente de la especie y que no se diferenciaron entre sí. Ellos compararon un cereal (*Triticum aestivum*) y tres leguminosas (*Lupinus albus*, *Pisum sativum* y *Vicia faba*). Los autores sugieren que las especies estudiadas pueden aprovechar indistintamente los dos pools de fósforo del suelo rizosférico. El agotamiento medio de P-Ca fue de -14,24 ppm P (Δ P-Ca) y superó significativamente a los valores de agotamiento de P-lábil y P-Al P-Fe ($p < 0,05$). Sin embargo, según Hedley *et al.* (1982a) la fracción P-Ca es de menor disponibilidad para las raíces y su baja solubilidad no permitiría su inmediato aprovechamiento por las raíces a menos que posean algún mecanismo para solubilizarla, por ejemplo, la acidificación rizosférica (Hinsinger, 2001). Debido a la gran participación relativa que tiene esta fracción en el componente total de fósforo en los suelos de la región pampeana, si una especie fuera capaz de acceder a dichos fosfatos tendría una ventaja competitiva frente a las demás. En el experimento *Macetas I* se observó agotamiento de P-Ca en los suelos III y V pero sin diferencias entre especies (Tabla 2.3). Las diferencias interespecíficas en el agotamiento de P-Ca sólo se observaron en el suelo VI (Tabla 2.3). Éstas macetas tenían una reducida masa de suelo que concentraba el 85% de las raíces producidas a los 80 días de la siembra. El menor contenido de fósforo extractable (Bray 1) del suelo VI con respecto al VII habría posibilitado la detección de diferencias interespecíficas en la adquisición de P-Ca. La mayor producción de biomasa y densidad radical del maíz con respecto a la soja y el girasol (Tabla 2.5) permiten suponer que la superposición de las mismas habría incidido sobre su capacidad de absorber fósforo del suelo por superposición de cilindros de agotamiento de fósforo.

A excepción de lo observado en el suelo II, las formas orgánicas de fósforo del suelo no representaron una fuente importante de fósforo para las plantas (Tabla 2.3). En la Tabla 2.4 se observa que ni Δ Po Bic ni Δ Po NaOH fueron explicadas por las variables regresoras seleccionadas (x_1 ; x_2 y x_3) y por ello no se representaron gráficamente. Sin embargo, la suma de ambas variables se relacionó positivamente con la concentración de fósforo en los tejidos vegetales por unidad de suelo (x_2) en girasol y maíz (Tabla 2.4). En general, las plantas cubren sus requerimientos de fósforo a través de la mineralización de formas orgánicas cuando los suelos tienen alta capacidad de fijación de fosfatos por ejemplo Oxisoles (Dakora y Phillips, 2002). George *et al.*, 2006 hallaron que en la fracción Po NaOH predominan los fosfatos monoésteres. Este tipo de uniones son las más susceptibles a la mineralización por la acción de fosfatasa. Los mismos autores sostienen que agotamientos rizosféricos de Po NaOH no implican que los fosfatos mineralizados hayan sido aprovechados por las raíces porque una vez que ingresan a la solución de suelo gran parte de ellos quedan retenidos por los sitios de intercambio aniónico de las superficies coloidales. Otra parte de los fosfatos mineralizados es inmovilizado por los microorganismos que habitan en el ambiente rizosférico (Oehl *et al.*, 2001). La principal forma de inmovilización biológica de fósforo por los microorganismos son los fitatos cuya estructura es más resistente a la acción de fosfatasa radicales (Hayes *et al.*, 2000). Esto podría explicar por qué la fracción Po Bic tendió a acumularse en la rizósfera de soja, girasol y maíz en todos los suelos estudiados en los tres

experimentos con diferencias significativas en los suelos III, V y VI (Figura 2.5). Zoyza *et al.* (1997, 1998a, 1999) observaron que una mayor concentración rizosférica de Po NaOH se observa principalmente en los suelos mejores provistos de fósforo. La mineralización de Po NaOH es una estrategia muy importante en especies forestales pero no sería efectiva en especies de alta demanda nutricional como los actuales cultivos agrícolas (George *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos muestran que las diversas formas de fósforo del suelo cuantificadas a través de la metodología de Hedley *et al.* (1982) pueden ser afectadas por la actividad de las raíces. La disminución del pH rizosférico no explicó las variaciones en la concentración de fosfatos cálcicos de la rizósfera. Es decir, la acidificación observada con consistencia en la rizósfera de girasol no constituyó una ventaja en la adquisición de fósforo del suelo con respecto a las demás especies (Figura 2.6). El fósforo absorbido por las plantas por unidad de masa de suelo (x_2) fue la variable que mejor relación tuvo con el agotamiento o acumulación rizosférica de fracciones orgánicas e inorgánicas de fósforo del suelo. De hecho, en la Tabla 2.4 se observa que los modelos generales de mejor ajuste son los que tuvieron a x_2 como variable regresora. Esto indica que la intensidad de exploración de la masa de suelo y no la modificación de pH fue el mecanismo más efectivo en la adquisición de fósforo del suelo de soja, girasol y maíz en las condiciones experimentales evaluadas.

2.5 CONCLUSIONES

De acuerdo con el objetivo planteado para este capítulo se compararon las fracciones de fósforo de la rizósfera de soja, girasol y maíz. Las principales fracciones inorgánicas y orgánicas de fósforo del suelo fueron afectadas significativamente por la actividad de las raíces. El fósforo acumulado en la biomasa vegetal por unidad de masa de suelo fue la variable que mejor explicó los cambios en las concentraciones rizosféricas de cada fracción de fósforo del suelo. Las raíces de girasol y no las de soja fueron las que afectaron en mayor medida el pH rizosférico. Se desconoce el mecanismo a través del cual las raíces de girasol lograron descender hasta 0,65 unidades el pH del suelo. Es probable que la naturaleza de los exudados radicales de esta especie fueran los responsables de tal fenómeno. El desbalance entre los aniones y cationes absorbidos por la soja no habría representado un mecanismo relevante en la modificación de pH rizosférico en los suelos de nuestros experimentos. Independientemente del mecanismo que responsable de los cambios de pH en la rizósfera, este hecho no representó una ventaja en la adquisición de fosfatos cálcicos del suelo. Por otra parte, no se observó un patrón de agotamiento de fracciones de fósforo del suelo que permita inferir que ciertas formas químicas de fósforo poseen mayor biodisponibilidad para las raíces que otras.

A partir de los resultados obtenidos, sería interesante continuar el presente trabajo mediante el estudio de los mecanismos de acidificación rizosférica de las raíces de girasol y el ajuste de la técnica de fraccionamiento de Hedley *et al.* (1982) en cuanto a la relación de las formas químicas de fósforo del suelo determinadas y su biodisponibilidad para las plantas.

CAPITULO 3

MODIFICACIÓN DE pH RIZOSFÉRICO DE SOJA, GIRASOL Y MAÍZ: EFECTO DE LA NUTRICIÓN FOSFORADA

3.1 INTRODUCCION

El intercambio de iones entre las raíces y la solución de suelo afecta el pH del ambiente rizosférico (Haynes, 1990). Diferencias en la relación de cationes y aniones absorbidos por la raíz son responsables de perturbaciones en el pH intracelular (Thibaud *et al.*, 1994). La enzima H^+ -ATPasa juega un papel clave tanto en la regulación del pH intracelular como en el intercambio de aniones y cationes de la raíz. Otro mecanismo de regulación de pH se basa en la producción y consumo de H^+ a través de la formación y traslado de ácidos orgánicos (Marschner, 1995). Como consecuencia de la regulación interna de pH de la célula radical la cantidad de moles de H^+ , OH^- ó HCO_3^- liberados a la rizósfera está estrechamente vinculada a la cantidad de moles de cationes y aniones ingresen a la raíz (Haynes, 1990). El pH resultante en el ambiente rizosférico dependerá del predominio de uno u otro ión. Estos cambios de pH varían considerablemente según las características del suelo, edad de la planta, especie y sección de la raíz (Thibaud *et al.*, 1994). La forma de nitrógeno que absorbe la raíz (NO_3^- , NH_4^+ , N_2) es la variable más relacionada con los cambios de pH rizosféricos en la mayoría de las especies (Marschner, 1995). Numerosas investigaciones demuestran que en la mayoría de las especies si la fuente de nitrógeno predominante es NH_4^+ o N_2 (fijación simbiótica) se incrementa la liberación de H^+ por la raíz y disminuye si se absorbe como NO_3^- . Tal es el caso de la soja (Riley y Barber, 1971; Nytsanga y Pierre, 1973; Tang *et al.*, 2004) y el maíz (Petersen y Böttger, 1991, Hoffman *et al.*, 1994). El efecto de la nutrición fosforada sobre las modificaciones rizosféricas de pH no ha recibido la misma atención que el nitrógeno. Se ha observado que ante disminuciones de pH ciertas especies incrementan la eficiencia de adquisición de fosfatos pero poco se conoce del efecto *per se* del fósforo sobre la exudación de H^+ . En ciertos híbridos de maíz la deficiencia de fósforo activa la enzima H^+ -ATPasa causando una disminución del pH rizosférico (Liu *et al.*, 2004). Chiera *et al.*, 2004 y Shen *et al.*, 2006 observaron la misma respuesta en plántulas de soja. No se hallaron antecedentes del efecto de la oferta de fósforo sobre el pH rizosférico del girasol.

El déficit o exceso de otros nutrientes también puede originar modificaciones del pH rizosférico en ciertas especies aunque en menor medida que el nitrógeno. Por ejemplo, Römheld *et al.* (1984) observaron que la deficiencia de hierro en girasol originó incrementos significativos en la liberación de H^+ a la rizósfera. Las mayores tasas de acidificación se ubicaron en la región terminal de la raíz. A diferencia del girasol, las raíces de soja no respondieron del mismo modo ante un déficit de hierro (Landsberg, 1991). Ciertas características del ambiente tales como el pH inicial del suelo (Schubert *et al.*, 1990) y la intensidad lumínica (Bashan y Levanony, 1989) afectaron la tasa de extrusión de H^+ en vicia (*Vicia faba*) y trigo (*Triticum aestivum*) respectivamente.

La rizósfera es un sitio de intensas interacciones entre los iones liberados por la raíz y los iones presentes en la solución de suelo (Marschner, 1995). El pH resultante es producto del equilibrio iónico que se logra en dicho ambiente y afecta en gran medida a la absorción de nutrientes por la raíz. Se sabe que la

acidificación rizosférica incrementa la disponibilidad de fósforo en suelos de pH cercano a la neutralidad y con fosfatos solubles en medio ácido (Hinsinger, 2001). Liu *et al.* (2004) observaron que el genotipo de maíz de mejor comportamiento en suelos de baja disponibilidad de fósforo liberaba más H⁺ al ambiente rizosférico que los híbridos tradicionales. En el capítulo 2 se observó que las raíces de girasol acidificaron significativamente su rizósfera en todos los experimentos. El descenso de pH del suelo llegó a 0,65 unidades. Habida cuenta de lo novedoso de este hallazgo, en este capítulo nos propusimos testear específicamente la hipótesis que el girasol provoca descensos en el pH rizosférico más marcados que la soja y el maíz. En el capítulo anterior, comparamos la rizósfera de girasol, soja y maíz en experimentos de campo y macetas. En el presente, extendemos esas observaciones a otras aproximaciones experimentales, para obtener un test de hipótesis más sólido. Métodos más precisos, como el uso de geles con indicadores de pH, permiten aislar el efecto que producirían las raíces sobre el ambiente rizosférico sin la interferencia de los iones de la solución de suelo e identificar las zonas de la raíz que liberan H⁺ (Jaillard *et al.*, 1996). El objetivo de este capítulo fue comparar los cambios de pH originados por las raíces de soja, girasol y maíz y evaluar el impacto que la nutrición fosforada posee sobre dicha variable en un experimento en hidroponía.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1) *Semillas*: para llevar a cabo el experimento se utilizaron semillas de soja (DM 4800), girasol (Paraíso 20) y maíz (DK 628RR).

3.2.2) *Germinación*: semillas de las tres especies fueron esterilizadas agitándolas durante 15 minutos en una solución 50 % (v/v) de NaOCl comercial (hipoclorito de sodio). Posteriormente las semillas se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en un papel absorbente humedecido con Cl₂Ca 0,8 M a 25° C durante 7 días.

3.2.3) *Cultivo en hidroponía*: se seleccionaron plántulas de tamaños similares para asignarles sus respectivos tratamientos luego del período de germinación. Para el cultivo en hidroponía se utilizaron contenedores plásticos de 25 l de capacidad (22 x 25 x 45 cm). En la tapa de cada uno de ellos se realizaron 4 orificios de 2 cm de diámetro donde se colocaron las plántulas sostenidas con un listón de guata envuelto en su tallo. En cada contenedor se colocaron dos plántulas de girasol y dos de maíz. Las plántulas de soja crecieron en contenedores separados de las otras especies porque en su solución nutritiva en lugar de nitrógeno se agregaron 4 ml l⁻¹ de un formulado comercial con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (10⁹ bacterias ml⁻¹). Para el volumen de líquido del contenedor la concentración final de bacterias fue de 4x10⁶ bacterias ml⁻¹. La composición de las soluciones nutritivas donde crecieron las plantas fue la siguiente: K₂SO₄ (2,5 mM), CaSO₄ (1,2 mM), MgSO₄ 7H₂O (0,5 mM), Fe EDTA (5 µM), H₃BO₃ (0,5 µM), MnSO₄ H₂O (1,5 µM), ZnSO₄ 7H₂O (1,5 µM), CuSO₄ 5H₂O (0,5 µM), MoO₃ (0,0143 µM). A los contenedores con maíz y girasol se agregó NH₄NO₃ (3,5 M). Para el tratamiento +P y -P se agregó KH₂PO₄ 0,05 mM y 0,001 mM respectivamente. Las soluciones nutritivas se renovaron cada 4 días. Para prepararlas se utilizó agua desionizada. El pH inicial de todos los tratamientos se ajustó a 6,5 con NaOH 0,1 M. Cada contenedor contó con un sistema de aireación permanente de la solución nutritiva. El experimento se

ubicó en un invernáculo con 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad, la temperatura media fue de 25° C. El diseño estadístico fue completamente aleatorizado. Cada contenedor constituyó una unidad experimental con cuatro repeticiones. La ubicación de los mismos se rotó diariamente. El experimento finalizó a los 20 días desde la asignación del tratamiento.

3.2.4) *Determinaciones*

a) Biomasa y fósforo absorbido: a la finalización del experimento se tomó una planta de soja, girasol y maíz de cada unidad experimental. La biomasa aérea se separó de la radical y se llevaron a estufa de 60 °C durante 48 horas. Previamente las raíces se enjuagaron con agua desionizada para que la composición de la solución nutritiva del tratamiento no afectara las determinaciones químicas posteriores. Al mismo tiempo se realizó la separación y recuento de nódulos de soja antes de llevarlos a estufa. Sobre los tejidos vegetales aéreos y radicales se determinó la concentración de fósforo a través de la metodología de digestión húmeda con H₂SO₄ concentrado y H₂O₂ 30%. Se pesaron 0,10 g de material vegetal seco y molido (0,5 mm) en un tubo de 50 ml y se le agregó 3 ml de H₂SO₄. Los tubos se colocaron en un bloque digestor a 330 °C durante 2 horas. Luego se retiraron del bloque hasta que se enfriaran (aproximadamente 15 minutos), se les añadió 0,5 ml de H₂O₂ 30% y se volvieron a llevar al bloque digestor por 10 minutos. Este paso se repitió hasta que el extracto quedara incoloro. Finalizado el proceso, se llevó el digesto a 50 ml con agua destilada. El contenido de fósforo se determinó colorimétricamente a partir de una alícuota de 1 ml por el método de Murphy y Riley (1962). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

b) Tasa de liberación de protones por unidad de raíz: una porción de las raíces de la planta restante de cada contenedor se utilizó para realizar las determinaciones relacionadas a las modificaciones de pH inducidas por la raíz. Se tomaron 2,5 gr (peso fresco) de raíces de cada especie y se colocaron en tubos con 7,5 ml de agua destilada a la cual se ajustó el pH a 7 con NaOH 0,1 M. Todas las raíces se enjuagaron previamente con la solución de pH 7 y se secaron con papel tissue. Para permitir la aireación de la solución los tubos se agitaron durante 60 minutos (60 rpm) y transcurrido ese tiempo se volvió a medir el pH de la solución. La diferencia entre la concentración inicial y final de H⁺ se consideró originada por la raíz.

c) Modificación rizosférica de pH: la porción restante de las raíces de la misma planta que se utilizó para el ítem anterior se extrajo cuidadosamente del contenedor. Cada raíz se colocó sobre una lámina, de aproximadamente 5 mm de espesor de agar (0,7 %) y púrpura de bromocresol (0,06%) en una placa de petri de 110 mm de diámetro. El púrpura de bromocresol es un indicador de pH que adquiere color rojo si el pH es 5,5; amarillo si pH < 5,5 y violeta o púrpura si pH > 5,5. Para la preparación del agar se utilizó agua destilada y se ajustó su pH a 5,5 con NaOH 0,1 M. Después de dos horas se escanearon las imágenes de cada placa de petri y se analizaron mediante el software SIARCS 3.0 (EMBRAPA-CNPDIA, 1998). Se obtuvo la longitud y el diámetro de la raíz de cada imagen y se estimó a partir de estas variables la superficie radical. También se estimó la superficie de la lámina de agar afectada por la actividad de la raíz. Por último, se midió el pH a 1,3; 2,6 y 3,9 mm desde la raíz con un microelectrodo Orion 98-10 (tip= 1,3 mm de diámetro). Para las tres distancias se realizaron dos mediciones por placa.

3.2.5) *Análisis estadístico*: los resultados se analizaron mediante ANOVA y test de comparación de medias (t de Student)

3.3 RESULTADOS

Biomasa y absorción de fósforo

Independientemente de la oferta de fósforo de la solución nutritiva la biomasa producida siempre fue diferente entre especies (Tabla 3.1). La asignación de materia seca a órganos aéreos fue severamente afectada por la deficiencia de fósforo en las plantas de maíz. Se observó que ante deficiencia de fósforo las plantas acumularon un 26% menos biomasa aérea que cuando el nutriente no era limitante ($p < 0,05$; Tabla 3.1). La absorción total de fósforo (aéreo + radical) fue severamente afectada en las plantas de maíz. Dicha variable fue de 1,20 y 6,19 g P en las plantas que crecieron en $-P$ y $+P$ respectivamente (Tabla 3.1). A diferencia del maíz, la deficiencia de fósforo en las plantas de girasol sólo se manifestó por cambios en la concentración del elemento en los tejidos ($p < 0,01$). En tal sentido, las plantas que crecieron en la solución $-P$ concentraron en sus tejidos aéreos y radicales un 60% y un 84% menos fósforo, respectivamente, que sus pares del tratamiento $+P$ (Tabla 3.1). En la soja, el efecto del fósforo sólo se observó en el fósforo total absorbido por las raíces ($p < 0,05$). El contenido de fósforo en la solución nutritiva afectó significativamente el número y peso de nódulos (Tabla 3.2). Ante la deficiencia de fósforo las plantas de soja formaron un gran número de nódulos pequeños que lograron equiparar la biomasa total de nódulos del tratamiento $+P$ (Tabla 3.2). En $-P$ y $+P$ la biomasa total de nódulos fue de aproximadamente el 10% de la biomasa total que acumularon las plantas a los 20 días de iniciado el tratamiento (Tablas 3.1 y 3.2). En soja, girasol y maíz en $-P$ se observó un incremento significativo en la proporción de fósforo asignado a las raíces en relación con el fósforo contenido en los órganos aéreos ($R_p:T_p$; Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Valores medios de biomasa aérea (T) y radical (R), relación entre la biomasa de raíz y órganos aéreos (R:T), concentración de fósforo en tejidos vegetales aéreos y radicales ($\mu\text{g P g}^{-1}$) y absorción de fósforo (g) de plantas de soja, girasol y maíz que crecieron en soluciones nutritivas con diferente concentración de fósforo: +P (P= 0,05 mM) y -P (P= 0,001 mM). Las evaluaciones se realizaron a los 20 días de iniciado el tratamiento. Se presentan los *p-values* de los ANOVAs con los que se compararon las medias de las variables en estudio.

	Biomasa (mg)			P ($\mu\text{g P g}^{-1}$)		Absorción de P (g)		
	R	T	R:T	R	T	R	T	R _P :T _P
- P (0,001 M)								
Soja	115	235	0,49	2,59	5,62	0,30	1,32	0,22
Girasol	170	445	0,39	1,37	0,56	0,24	0,25	0,96
Maíz	565	745	0,75	0,93	0,92	0,52	0,68	0,76
+ P (0,05 M)								
Soja	75	265	0,28	2,48	5,12	0,18	1,35	0,13
Girasol	95	415	0,23	3,29	3,50	0,31	1,47	0,21
Maíz	440	1020	0,43	4,61	4,08	2,03	4,16	0,48
SE	15,71	18,16	0,008	0,06	0,06	0,02	0,04	0,03
ANOVAs								
Especie	<0,01	<0,01	<0,01	0,25	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
P	0,12	0,12	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
P x Especie	0,74	0,10	0,19	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,04
Efecto de P en (contrastes):								
Soja				0,84	0,39	<0,01	0,80	0,02
Girasol				<0,01	<0,01	0,36	0,04	0,03
Maíz				<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Observaciones: R: Raíz. T: conjunto de órganos aéreos (hojas y tallos). R_P:T_P: contenido de fósforo en raíces/contenido de fósforo en órganos aéreos.

Tabla 3.2: Efecto de la nutrición fosforada sobre el número de nódulos, peso (mg nódulo⁻¹); peso total de nódulos (mg) y relación biomasa nódulo/biomasa raíz (N:R) en plantas de soja que crecieron en una solución nutritiva con cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (4×10^6 bacterias ml⁻¹). La extracción de nódulos se realizó a los 20 días de iniciado el tratamiento +P (0,05 M) y -P (0,001 M).

Tratamiento	Nº	Peso mg nódulo ⁻¹	Peso total mg	N:R
- P	132	0,25	33,85	0,28
+ P	58	0,66	38,35	0,48
SE	5,06	0,023	2,8	0,013
Contraste (valor de <i>p</i>)	0,03	0,04	0,68	<0,01

Modificaciones de pH originadas por la raíz.

En las Figuras 3.1 y 3.2 se observa la intensidad y ubicación del efecto de las raíces de soja, girasol y maíz sobre el pH rizosférico. Desde 1,3 a 3,9 mm de distancia de la raíz el pH fue diferente ($p < 0,05$) entre especies (Figura 3.2 girasol < soja < maíz). Las raíces de girasol y soja presentaron valores de pH inferiores a las de maíz independientemente de la oferta fosforada de la solución nutritiva (Figura 3.1). En la Figura 3.1 y Tabla 3.5 se observa que el descenso de pH y la tasa de liberación de H^+ de las raíces de maíz fueron mayores en el tratamiento $-P$ que $+P$ ($p < 0,05$). Para esta especie los valores medios de pH a 1,3 mm de la raíz fueron de 5,68 ($-P$) y 6,06 ($+P$). En la Figura 3.2 también se observa que las raíces de soja y girasol mantuvieron un pH inferior al del agar con púrpura de bromocresol donde se realizó la medición (pH 5,5) más allá de los 3,9 mm. Este hecho queda reflejado por la gran extensión de la superficie amarilla que rodea a las raíces de soja y girasol. En ambas especies el área acidificada por unidad de superficie radical (AA:AR) superó a la de maíz (Tabla 3.4). Para esta variable las diferencias entre especies fueron significativas ($p < 0,05$) pero no se detectó diferencias entre $+P$ y $-P$ ($p < 0,05$). En promedio, la variable AA:AR de girasol superó a soja y maíz en 1,6 y 5,5 veces respectivamente (Tabla 3.4). No se detectaron zonas de liberación de H^+ específicas en el sistema radical a las 2 horas de colocar las raíces sobre la lámina de agar con púrpura de bromocresol (Figura 3.2). En la Tabla 3.5 se observa que la tasa de liberación de H^+ fue similar en soja y girasol y no dependió del nivel de fósforo del medio ($p > 0,05$). Mientras que el maíz en $+P$ hubiera necesitado unas 12 horas para alcanzar la concentración media de H^+ que liberaron las raíces de soja y girasol en sólo 60 minutos. Ante un déficit de fósforo las raíces de maíz incrementaron 2,5 veces su tasa de liberación de H^+ (Tabla 3.5).

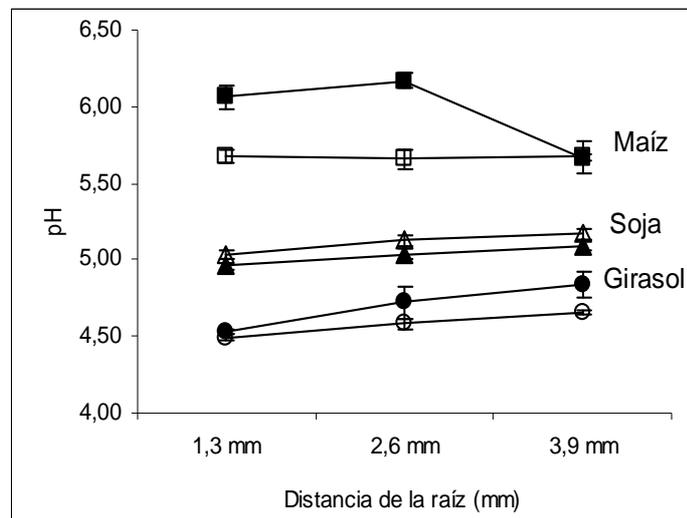


Figura 3.1: Valores medios de pH ($n=4$) a distancias de 1,3; 2,6 y 3,9 mm desde la superficie de la raíz de soja, girasol y maíz. Los símbolos llenos corresponden al tratamiento $+P$ ($P= 50 \mu M$) y las vacías al tratamiento $-P$ ($P= 1 \mu M$) de cada especie. Las mediciones de pH se realizaron con un microelectrodo en láminas de agar sobre las cuales se depositaron las raíces durante 2 horas. Las raíces se extrajeron de las soluciones nutritivas a los 20 días de iniciado el tratamiento. Las barras representan el error estándar.

Tabla 3.3: Valores de p del ANOVA de los resultados de pH a distancias de 1,3; 2,6 y 3,9 mm desde la superficie de la raíz de soja, girasol y maíz correspondiente a la figura 3.1

ANOVA	p-value
Especie	< 0,01
P	0,02
Distancia	< 0,01
P x Especie	< 0,01
P x Distancia	0,06
Especie x Distancia	< 0,01
P x Especie x Distancia	< 0,01

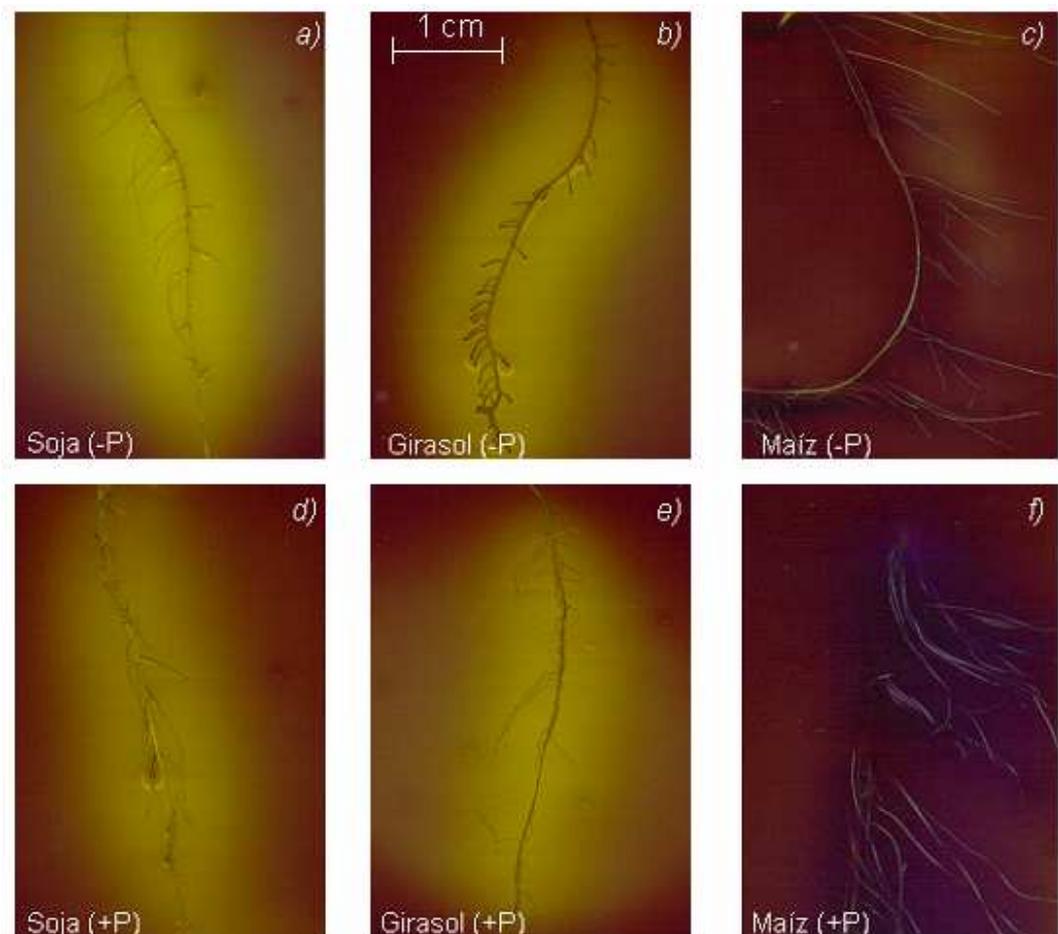


Figura 3.2: Modificaciones rizosféricas de pH en soja (a; d), girasol (b; e) y maíz (c; f) cultivadas en soluciones nutritivas con diferentes concentraciones de fósforo: +P (P= 50 uM) y -P (P= 1 uM). Las variaciones de colores corresponden a las modificaciones de pH de la lámina de agar con púrpura de bromocresol (pH 5.5) sobre la que se colocaron las raíces. El color amarillo indica valores de pH < 5.5 y el color púrpura indica pH > 5.5. Las imágenes se obtuvieron a los 20 días desde el inicio del tratamiento (+P y -P) a las 2 horas de colocar las raíces sobre la lámina de agar y púrpura de bromocresol.

Tabla 3.4: Valores medios (n=4) de diámetro (mm) e índice AA:AR obtenido del cociente entre el área acidificada por unidad de superficie de raíz. El área acidificada (AA, cm²) corresponde a la superficie de color amarillo (pH < 5,5) de una lámina de agar con el indicador púrpura de bromocresol (pH 5,5) a las 2 horas de haberle colocado las raíces. Las raíces se tomaron a los 20 días de iniciado el tratamiento +P (P= 0,05 M) y – P (P= 0,001 M) del experimento de hidroponia.

	Diámetro mm	AA:AR
- P (0,001 M)		
Soja	1,41	1,62
Girasol	1,02	4,38
Maíz	1,01	0,71
+ P (0,05 M)		
Soja	1,71	1,56
Girasol	0,97	3,94
Maíz	1,49	0,57
SE	0,04	0,02
ANOVA		
<i>Especie</i>	0,05	< 0,01
<i>P</i>	0,15	< 0,01
<i>P x Especie</i>	0,40	< 0,01
Efecto de P en:		
<i>Soja</i>	0,10	0,99
<i>Girasol</i>	0,68	< 0,01
<i>Maíz</i>	0,03	< 0,01

Tabla 3.5: Tasa de liberación de H⁺ por unidad de raíz (μmol H⁺ g⁻¹ Peso Fresco h⁻¹) de plantas de soja, girasol y maíz a los 20 días desde el inicio del tratamiento +P (50 μM) y -P (1 μM) de la solución nutritiva.

	Tasa de liberación de H⁺ (μmol H⁺ g⁻¹ PF h⁻¹)		Efecto P p-values
	+P	-P	
Soja	4,04	3,04	0,20
Girasol	4,54	5,68	0,22
Maíz	0,36	1,29	0,01
SE	0,15		
ANOVA			
<i>Especie</i>	<0,01		
<i>P</i>	0,27		
<i>P x Especie</i>	0,04		

3.4 DISCUSIÓN

Los efectos de la nutrición fosforada sobre la producción de biomasa aérea y radical han sido ampliamente estudiados (Atkinson, 1973; Halsted y Lynch, 1996). Se sabe que en muchas especies una deficiencia de fósforo promueve un incremento en la relación R:T posiblemente por una asignación preferencial de fotoasimilados a la raíz (Mollier y Pellerin, 1999, Fredeen *et al.*, 1989). Ante una deficiencia de fósforo la primera respuesta es la disminución de la expansión foliar mientras que el crecimiento de las raíces se mantiene por un lapso más o menos prolongado según la especie (Atkinson, 1973). En esta etapa se habrían encontrado las plantas de soja y girasol puesto que no se hallaron diferencias significativas entre la producción de raíces y órganos aéreos en respuesta a la oferta de fósforo de la solución nutritiva a los 20 días de iniciado el tratamiento (Tabla 3.1). En nuestro caso, la oferta de fósforo en la solución nutritiva no afectó la relación R:T de las plantas de soja y girasol (Tabla 3.1). Fredeen *et al.* (1989) observaron que la soja recién a partir de los 17 días disminuyó significativamente el crecimiento a causa de la deficiencia de fósforo. Resultados similares fueron observados por Chiera *et al.* (2004). Ellos observaron que ante deficiencias de fósforo las plantas de soja mantuvieron los mismos niveles de ATP en los ápices de crecimiento que aquellas que crecieron sin limitantes del nutriente y por ello no se produjeron diferencias en la producción de materia seca. Mientras que Mollier y Pellerin (1999) observaron que en las plantas de maíz a partir de los 7 días se afecta significativamente el crecimiento de los órganos aéreos. En tal sentido, se halló un incremento de aproximadamente el 75% en la relación R:T en las plantas de maíz que crecieron en -P con respecto a lo observado en +P (Tabla 3.1). La drástica reducción del crecimiento aéreo del maíz sería la causa de la mayor disponibilidad de carbohidratos para la raíz ante el stress de fósforo (Mollier y Pellerin, 1999). En líneas generales, los resultados indican que en soja y girasol la producción de biomasa fue menos afectada por la deficiencia de fósforo que la concentración del nutriente en sus tejidos (Tabla 3.1). En las plantas de ambas especies el indicador $R_p:T_p$ fue más sensible que R:T para detectar el efecto que la deficiencia de fósforo les provoca (Tabla 3.1). En las plantas de soja la sensibilidad de éste índice estaría explicado por las diferencias en la cantidad de fósforo contenido en las raíces mientras que en girasol por la gran disminución en las concentraciones internas de fósforo entre la situación +P y -P (Tabla 3.1). Lauer y Blevins (1989) también observaron que en soja la cantidad de fósforo asignada a las raíces aumentó en mayor medida que la relación R:T ante menores tenores de fósforo de la solución nutritiva. Una drástica disminución de la concentración de fósforo de girasol frente a deficiencia de fósforo también fue observada por Eaton (1949). La concentración de fósforo de las plantas de girasol que crecieron con una oferta limitada del nutriente alcanzó sólo el 16% en hojas y el 40% en raíces de lo observado en +P sin afectarse la producción de biomasa (Tabla 3.1). Beleski y Ferguson (1983) sostienen que las plantas que crecen con una buena provisión de fósforo pueden acumular entre un 85% y 95% del nutriente en las vacuolas celulares. Los niveles de fósforo en citoplasma se mantienen relativamente constantes mientras que el contenido en las vacuolas puede ser removilizado originando grandes fluctuaciones de concentración de fósforo en dicho compartimento (Theodorou y Plaxton, 1993). Por otro lado, es importante destacar que las especies con mayor contenido de fósforo en semilla son menos vulnerables a una baja oferta de fósforo del medio que aquellas con bajas reservas de fósforo en tejidos seminales durante

estadios iniciales de crecimiento (Atkinson, 1973). En las leguminosas a la demanda de fósforo de raíces y tallos se suman los requerimientos vinculados a la nodulación (Tang *et al.*, 2001). El fósforo tiene un efecto positivo en la fijación biológica de nitrógeno porque actúa directamente en la iniciación, crecimiento y funcionamiento de los nódulos (Israel, 1987). En la Tabla 3.2 se observa que la deficiencia de fósforo afectó significativamente la producción de nódulos. El mayor número de nódulos livianos en las plantas que sufrieron stress de fósforo indicaría que se afectó la iniciación de la nodulación (Israel, 1987). En concordancia con lo observado por Cassman *et al.* (1980) la relación N:R - biomasa nódulos/biomasa raíz - fue más afectada ($p < 0,05$) que R:T en respuesta a una baja oferta de fósforo de la solución nutritiva (Tablas 3.1 y 3.2). Tang *et al.* (2001) también observaron un efecto compensatorio entre número y peso de nódulos en genotipos de soja que crecieron con diferentes niveles de fósforo.

El efecto de las raíces sobre el pH de la lámina de agar hasta los 3,9 mm desde la superficie de la raíz fue diferente entre especies (Figura 3.1). El descenso de pH que tiene lugar en la rizósfera de las leguminosas ha sido relacionado con la fijación simbiótica de nitrógeno (Nyatsanga y Pierre, 1973). El aprovechamiento del nitrógeno atmosférico genera un patrón de absorción alcalino o básico con la consecuente extrusión de H^+ desde las células radicales por activación de la enzima H^+ -ATPasa (Haynes, 1990). En este sentido, la nutrición nitrogenada ha sido reconocida como la principal causa de las variaciones de pH rizosférico (Riley y Barber, 1971). En la Figura 3.1 y Tabla 3.4 se observa que el pH medido desde la superficie radical de soja y el índice AA:AR, respectivamente, se encontraron en valores intermedios entre el maíz y el girasol sin ser afectados por la concentración de fósforo de la solución nutritiva. Es probable que para el período comprendido en el experimento la deficiencia de fósforo no haya desencadenado un desequilibrio metabólico que pudiera manifestarse a través de la liberación de H^+ desde las raíces. Tang *et al.* (2001) compararon la liberación de H^+ de raíces de distintos genotipos de soja. Observaron que en ninguno de ellos la oferta de fósforo modificó la tasa de liberación de protones pero que algunos genotipos liberaban más H^+ que el exceso de cationes absorbidos por las raíces. Ellos concluyen que la acidificación rizosférica no sería un aspecto relevante que explique las diferencias genotípicas en la adquisición de fósforo a campo.

El poder acidificante de las raíces de girasol que se había observado en el capítulo anterior fue corroborado a través de los resultados obtenidos del experimento en hidroponía: a) En el área afectada por las raíces de girasol se observó menor pH que en las de soja y maíz ($p < 0,05$; Figura 3.1 y Tabla 3.3) b) La relación AA:AR superó ($p < 0,05$) a las otras dos especies (Tabla 3.4) y c) La tasa de liberación de H^+ por unidad de raíz superó a soja y maíz ($p < 0,05$; Tabla 3.5). Ninguna de las variables fue afectada por la concentración de fósforo de la solución nutritiva donde crecieron las plantas durante 20 días. Nuestros resultados constituyen una fuerte evidencia que las raíces de girasol cuentan con un sistema regulador del pH celular que funciona afectando drásticamente el pH rizosférico. El origen de estos cambios de pH no ha sido estudiado a pesar de la trascendencia de sus implicancias nutricionales. Los mecanismos de mayor importancia implicados en los cambios rizosféricos de pH son la liberación de H^+ y la exudación de compuestos orgánicos (Thibaud *et al.*, 1994; Neumann y Römheld, 1999). En general, la extrusión de H^+ es resultado del exceso de cationes absorbidos por la raíz (Haynes, 1990). La acidez generada por este mecanismo promueve la solubilización de nutrientes que incrementan su biodisponibilidad en medios ácidos como los fosfatos cálcicos (Hinsinger, 2001).

Los compuestos orgánicos, en cambio, han sido reconocidos por su participación en un mayor número de procesos que favorecen la adquisición de nutrientes del suelo (Jones y Darrah, 1994). Esta ventaja nutricional sólo ha sido observada en unas pocas especies (Jones, 1998; Neumann y Römheld, 1999). Comparado con la acidificación rizosférica producto de la liberación neta de H^+ , la exudación de altas cantidades de citrato en lupino (*Lupinus albus* L.) ante deficiencias de fósforo tiene la ventaja de ser efectiva en la movilización de diferentes fuentes de fósforo del suelo de baja solubilidad como fosfatos cálcicos en suelos calcáreos (Dinkelaker *et al.*, 1989) y fosfatos unidos a cationes de hierro y aluminio en suelos ácidos (Marschner, 1995). Se ha descubierto que el garbanzo (*Cicer arietinum*) produce y libera altas cantidades de ácidos orgánicos no vinculadas a deficiencias nutricionales específicas (Wouterlood *et al.*, 2004; 2005). A diferencia del lupino la exudación se produce en todo el sistema radical y no en estructuras determinadas como los *cluster-roots* de la Proteácea (Wouterlood *et al.*, 2004). En consecuencia, tal como se observó en el girasol, el ambiente rizosférico es más ácido que el de otras especies independientemente de la disponibilidad de nutrientes del medio (Figura 3.1, Tabla 3.4) a lo largo de todo el sistema radical (Figura 3.2).

La acidificación generada por las raíces de maíz fue más baja que en soja y girasol (Figura 3.1). A diferencia de estas últimas, el efecto de las raíces de maíz sobre el pH del agar sí fue diferente según la concentración de fósforo en la que crecieron las plantas (Figura 3.1). A pesar que la producción de raíces no fue distinta, la tasa de liberación de H^+ por unidad de raíz se incrementó 3,5 veces en $-P$ con respecto a $+P$ (Tabla 3.1 y 3.5). Liu *et al.* (2004) y Gaume *et al.* (2001) observaron que la enzima H^+ -ATPasa incrementó hasta un 50% su actividad en maíces que sufrieron stress de fósforo. Pettersen y Böttger (1991) hallaron en un experimento en hidroponía que la acidificación rizosférica del maíz se mantuvo a través de bombas de H^+ (H^+ -ATPasa) y no por la exudación de ácidos orgánicos los cuales sólo contribuyeron entre un 0,2 y 0,3% en la disminución de pH. Anuradha y Narayanan (1991) observaron un descenso del pH de la solución nutritiva y un incremento en la relación catión/anión absorbida por plantas de *Macrotyloma uniflorum* en respuesta a una deficiencia de fósforo. Los mismos autores observaron que la exudación de H^+ y la elongación de células radicales se relacionaron inversamente con la oferta de fósforo del medio. Mollier y Pellerin (1999) adjudican a este mecanismo la ausencia de diferencias entre la producción de biomasa radical y los cambios morfológicos de raíces de maíz que crecieron en medios nutritivos con distintos niveles de fósforo.

3.5 CONCLUSIONES

De acuerdo a lo planteado en el objetivo de este capítulo se comparó el efecto de las raíces de soja, girasol y maíz sobre el ambiente rizosférico en dos situaciones de oferta de fosforada. La actividad de las células radicales de soja, girasol y maíz modificó en distinta medida el pH de su ambiente rizosférico. Las raíces de girasol ocasionaron reducciones de pH mayores que soja y maíz independientemente de la oferta de fósforo de la solución nutritiva, con lo cual se acepta la hipótesis planteada. La acidificación observada en las proximidades de las raíces de soja se mantuvo en valores intermedios entre el girasol y el maíz. En ésta última, la deficiencia de fósforo realzó el descenso de pH del ambiente rizosférico.

A partir de los resultados obtenidos restaría identificar concretamente la fuente de acidificación producida por las raíces de girasol. Se sabe que los

mecanismos que podrían estar implicados en dicho evento afectan de manera distinta la adquisición de nutrientes del suelo. En tal sentido, sería interesante conocer la naturaleza de los exudados radicales orgánicos de las raíces de girasol y conocer su patrón de absorción de cationes/aniones ya que se vincula estrechamente con la liberación de H^+ desde la raíz.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES GENERALES

En Argentina la soja ocupa más del 70% de la superficie destinada a los cultivos estivales de la Región Pampeana. Se sabe que su gran expansión está relacionada a la rentabilidad económica del cultivo y también con el avance tecnológico que tuvo lugar en la década pasada. El predominio de la soja sobre el girasol y el maíz también es favorecido por su menor dependencia a la fertilización nitrogenada y fosfatada. La fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas les permite prescindir de las fertilizaciones nitrogenadas. La baja respuesta a la aplicación de fertilizantes fosfatados es más difícil de explicar. La soja posee un alto requerimiento de fósforo por unidad de rendimiento (7.65 kgP tn⁻¹ grano) en comparación con el girasol y el maíz (5.2 y 4 kgP tn⁻¹ grano respectivamente) por lo cual la absorción total de fósforo de la soja es similar a la de maíz a pesar de su menor producción de biomasa por unidad de superficie (Tabla 1.1). Sin embargo, el umbral de respuesta a la fertilización es el menor de los tres cultivos: soja 12.5 ppm P Bray I; girasol 15.1 ppm P Bray I y maíz 16 ppm P Bray I (Tabla 1.2).

La naturaleza química de los compuestos fosfatados del suelo determina su biodisponibilidad. El pool de fósforo del suelo está compuesto por fracciones que difieren en su disponibilidad para las plantas, tales como: fósforo asociado a calcio, adsorbido por compuestos de hierro y aluminio en la superficie de las arcillas, constituyendo compuestos orgánicos y como iones libres en la solución de suelo, entre otras fracciones. El predominio de una fracción sobre otra está vinculado con los procesos genéticos de formación del suelo. Esta variedad de formas de fósforo sugiere que las raíces deben adoptar diferentes estrategias para solubilizarlas y cubrir su demanda nutricional porque la cantidad de fosfatos presentes en la solución de suelo es insuficiente. Este hecho podría estar vinculado con la existencia de mecanismos a nivel rizosférico que tornan a ciertas especies más eficientes en la adquisición de fracciones de fósforo del suelo de baja biodisponibilidad.

La menor dependencia de la soja a los fertilizantes fosfatados podría estar relacionada con mecanismos rizosféricos que le permitirían acceder a formas de fósforo del suelo poco disponibles para los demás cultivos. Las modificaciones químicas de la rizósfera han sido identificadas como exitosas estrategias vegetales para la adquisición de fósforo del suelo. La exudación de ácidos orgánicos y cambios de pH rizosférico son los más comunes entre las especies más eficientes. Debido a que la soja cubre gran parte de sus requerimientos de nitrógeno a partir de la fijación atmosférica, se produce un desbalance entre los nutrientes aniónicos y catiónicos absorbidos por la planta. El resultado es una elevada liberación de H⁺ desde la raíz (Nye, 1981). El pH resultante deriva de la regulación necesaria para mantener el pH interno de las células vegetales dentro de valores óptimos para el funcionamiento de las mismas. El mecanismo de regulación de pH está basado en la producción y consumo de H⁺ a través de la carboxilación y descarboxilación de ácidos orgánicos en el interior de las células radicales (Haynes, 1990). Este mecanismo conduce a que algunas leguminosas puedan incrementar la disponibilidad de fósforo del suelo al solubilizar fosfatos ligados al calcio (Aguilar y Van Diest, 1981; Trollove *et al.*, 2001). Se ha observado que la acidificación rizosférica aumenta el aprovechamiento de roca fosfórica agregada al suelo como fertilizante (Thomson *et al.*, 1993, Gahoonia y Nielsen, 1992). Puesto que los

suelos de la Región Pampeana son ricos en fosfatos cálcicos (Mizuno 1981, Zubillaga y Giuffre 1999), la acidificación rizosférica sería un mecanismo eficiente para la provisión de fósforo en estos suelos

Una de las limitaciones de los extractantes químicos utilizados para caracterizar la disponibilidad de fósforo de un suelo es que ignoran los cambios en la disponibilidad de fósforo que pueden ocurrir en la interfase suelo-raíz por acción de las raíces. Estas modificaciones pueden ser particularmente importantes para un nutriente de tan baja movilidad como es el fósforo. El movimiento del fósforo del suelo hacia las raíces ocurre en una pequeña área alrededor de las raíces, y esta transferencia de fósforo es afectada por las interacciones entre el suelo y la planta. Para poder caracterizar las transformaciones del fósforo en el suelo causadas por la acción de las raíces se debe contar con una metodología de fraccionamiento de fósforo donde las fracciones extraídas tengan relación con su disponibilidad y origen. La metodología de fraccionamiento secuencial propuesta por Hedley *et al.* (1982a) es una de las técnicas más difundidas para caracterizar las formas de fósforo del suelo de acuerdo a su grado de disponibilidad y asociación con distintos compuestos. Este fraccionamiento tiene por objetivo determinar el fósforo lábil (extraído con resinas de intercambio aniónico y NaHCO_3), fósforo asociado con hierro y aluminio (extraído con NaOH), fósforo asociado con calcio (extraído con HCl) y formas más resistentes extraídas por digestión.

En el capítulo 2 se evaluó comparativamente la concentración de fracciones de fósforo del suelo extraídas por las raíces de soja, maíz y girasol. Se puso a prueba la hipótesis que el cultivo de soja absorbe formas de fósforo del suelo de baja disponibilidad para otros cultivos y que el agotamiento de esas fracciones de fósforo de la rizósfera está directamente relacionado con las modificaciones rizosféricas de pH.

Para probar la hipótesis planteada se compararon las fracciones de fósforo (Hedley *et al.*, 1982) y el pH de suelo no rizosférico con el de la rizósfera de cada especie. Se realizaron 3 experimentos en los cuales el factor cultivo estuvo compuesto por soja, girasol, maíz y el suelo no rizosférico. Los suelos empleados para los experimentos tenían diferentes concentraciones de P Bray (Tabla 2.1). Uno de los experimentos se llevó a cabo en el campo. Los otros dos se realizaron en macetas en dos modos diferentes. En uno de los experimentos se emplearon 4 tipos de suelos y a las macetas se las completó en su totalidad con su respectivo suelo. El otro experimento tenía un tercio de suelo y el resto del volumen de la maceta se completó con arena fina (Figura 2.1) con la finalidad de exacerbar las diferencias de la variables en estudio entre el suelo rizosférico y el no rizosférico. Las muestras de rizósfera se extrajeron con un pincel (Figura 2.2). Se realizaron determinaciones de fósforo en la biomasa vegetal acumulada al momento de la extracción de las muestras de rizósfera.

Los resultados del capítulo 2 no fueron los esperados. En primer lugar, las fracciones de fósforo inorgánicas y orgánicas obtenidas a través de la metodología de Hedley *et al.* (1982a) no demostraron tener diferencias en su biodisponibilidad para las plantas. En la Figura 2.5 y Tabla 2.3 se observa que todas las fracciones fueron aprovechadas por las raíces de los tres cultivos. Si el supuesto de biodisponibilidad se hubiera cumplido las fracciones de fósforo más lábiles habrían mostrado grandes diferencias con el suelo no rizosférico. Por el contrario, se observó que las plantas cubrieron su demanda de fósforo independiente de la forma química del nutriente en el suelo. Por último, en todas las situaciones experimentales las raíces de girasol acidificaron

significativamente el suelo rizosférico (Figura 2.4 y Tabla 2.2). Las raíces de soja no ejercieron tanto efecto sobre el pH del suelo como las raíces de girasol.

La acidez del ambiente rizosférico no estuvo relacionada con la adquisición de fracciones de fósforo. En la Figura 2.6 se grafica la variación de la fracción soluble en medio ácido (fosfatos cálcicos) en función de las variaciones rizosféricas de pH. Se observa que el rango de aprovechamiento de esta fracción de fósforo no fue diferente en soja, girasol y maíz independientemente de los valores de pH medidos en la rizósfera. El fósforo absorbido por unidad de masa de suelo fue la variable que mejor explicó las variaciones rizosféricas de las formas de fósforo (Tabla 2.4). Los resultados muestran que cuánto mayor es la intensidad de extracción de fósforo por las raíces todas las fracciones tienen una alta probabilidad de modificar la concentración inicial del nutriente en su rizósfera.

Sobre la base de los resultados reunidos en el capítulo 2 se obtuvo evidencia suficiente como para rechazar la hipótesis planteada al iniciar el trabajo de investigación. En primer lugar, la soja no agotó fracciones de fósforo distintas que otros cultivos y, sumado a ello, el agotamiento de los fosfatos cálcicos no estuvo relacionado con la acidificación de la rizósfera en ninguna de las condiciones experimentales evaluadas.

En el capítulo 3 se estudió con mayor detalle la liberación de protones por las raíces de soja, girasol y maíz y el efecto que tiene el fósforo sobre dicho mecanismo. Se realizó para tal fin un ensayo en condiciones de hidroponía donde se cultivaron las tres especies con dos niveles de concentración de fósforo: 50 μM y 1 μM . Las plantas de soja crecieron en una solución nutritiva desprovista de nitrógeno a la cual se le agregaron cepas de *Bradyrhizobium japonicum* para promover la inoculación. A los 20 días de iniciado el experimento las plantas se extrajeron de la solución nutritiva y una porción de las raíces se colocaron en sobre una lámina de agar con púrpura de bromocresol para analizar la ubicación e intensidad de las zonas de producción de modificaciones de pH por las raíces. Las imágenes se analizaron con software específico. El resto de las raíces se colocó en una solución de pH y al cabo de 1 hora se midió el pH final de la misma y se estimó la tasa de liberación de protones de cada especie. Se efectuaron mediciones de la biomasa vegetal (aérea, radical y nódulos de soja) y su concentración de fósforo a la finalización del experimento.

Los resultados generales muestran que las raíces de soja, girasol y maíz modificaron el pH rizosférico (Figura 3.2). Desde 1,3 a 3,9 mm de distancia de la raíz el pH fue diferente entre especies (Figura 3.2 girasol < soja < maíz). Las raíces de girasol y soja presentaron valores de pH inferiores a las de maíz independientemente de la oferta fosforada de la solución nutritiva (Figura 3.1). En soja y girasol el área acidificada por unidad de superficie radical (AA:AR) superó a la de maíz (Tabla 3.4). Para esta variable las diferencias entre especies fueron significativas pero no se detectó diferencias entre +P y -P. No se detectaron zonas de liberación de H^+ específicas en el sistema radical (Figura 3.2). En la Tabla 3.5 se observa que la tasa de liberación de H^+ fue similar en soja y girasol y no dependió del nivel de fósforo del medio. En cambio las raíces de maíz incrementaron 2,5 veces su tasa de liberación de H^+ en la solución nutritiva con bajo nivel de fósforo (Tabla 3.5).

Los aportes más sobresalientes de esta tesis pueden enumerarse en los siguientes puntos:

1. *Comparación interespecífica de fenómenos rizosféricos:* la adquisición de diferentes formas químicas de fósforo del suelo y las modificaciones de pH inducidas por las raíces se han estudiado por lo general aplicando diferentes tratamientos a una misma especie. Esta tesis aporta información comparativa acerca de lo que ocurre en la rizósfera de los cultivos de verano que mayor superficie abarcan en nuestro país.
2. *Biodisponibilidad de fracciones de fósforo vs formas de fósforo de diferentes propiedades químicas:* los resultados obtenidos de los tres experimentos del capítulo 2 aportan una sólida evidencia que las fracciones de fósforo del suelo cuantificadas a través de la metodología de Hedley no poseen diferencias en su aprovechamiento por las raíces de soja, girasol y maíz. En éste sentido, se observó que todas las fracciones de fósforo pueden ser afectadas por la actividad de las raíces para cubrir la demanda de la planta.
3. *Efecto del girasol sobre el pH rizosférico:* el mayor efecto acidificante de las raíces de girasol en comparación con las de soja no ha sido reportado con anterioridad en otros trabajos científicos.
4. *Incidencia del fósforo sobre las modificaciones de pH rizosférico de soja, girasol y maíz:* los resultados obtenidos demuestran que la acidez hallada en el ambiente rizosférico de girasol y soja no fue afectada por la oferta de fósforo del medio. En cambio, el maíz respondió disminuyendo el pH de la rizósfera ante deficiencias de fósforo en la solución nutritiva.

Líneas de investigación que surgen de los resultados de esta tesis:

1. *Estudio de la dinámica de las fracciones de fósforo en la rizósfera y su biodisponibilidad:* la metodología de fraccionamiento secuencial propuesta por Hedley *et al.* (1982a) y las diversas variantes que surgieron posteriormente son hasta el momento la única forma de cuantificar las diferentes formas químicas de fósforo del suelo. Su empleo ha estado dirigido fundamentalmente a la comparación de suelos con diferente origen y/o manejo. Aún queda mucho por aprender acerca de la dinámica de las fracciones de fósforo en el ambiente rizosférico.
2. *Origen de la acidez rizosférica del girasol:* el efecto acidificante de las raíces de girasol quedó demostrado a través de cada una de las experiencias que se llevaron a cabo en esta tesis. No se hallaron antecedentes que expliquen el origen de este mecanismo. La liberación de ácidos orgánicos y/o la liberación de protones como resultado de un patrón de absorción alcalino de nutrientes son las dos causas que podrían originarlo. Las implicancias nutricionales que tienen son muy diferentes. La primera puede constituir una severa desventaja desde el punto de vista de la economía energética de la planta por una elevada liberación de hidratos de carbono desde la raíz. Sin embargo, los exudados radicales

pueden participar en la adquisición de un importante grupo de nutrientes del suelo. La liberación de protones originados por un patrón de absorción de aniones y cationes desbalanceado (exceso de cationes) no representa una pérdida de energía para la planta más que la necesaria para la expulsión de los protones desde la raíz. Conocer el origen de los bajos valores de pH observados en la rizósfera de girasol trasciende las fronteras de la adquisición de nutrientes del suelo porque está estrechamente vinculada con la asignación de fotoasimilados del cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, A. y A. Van Diest. 1981. Rock-phosphate mobilization induced by the alkaline uptake pattern of legumes utilizing symbiotically fixed nitrogen. *Plant Soil*, 61: 27-42.
- Abbot L.K y A.D. Robson. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 35: 121-150
- Andrade, H. y V.O. Sadras. 2002. Bases para el manejo del maíz, el girasol y la soja. EEA INTA Balcarce – FCA UNMP. Centro de Investigación. Argentina. 450pp
- Anuradha, M. y A. Narayanan. 1991. Promotion of root elongation by phosphorus deficiency. *Plant Soil*, 136 (2): 273 - 275
- Atkinson, D. 1973. Some general effects of phosphorus deficiency on growth and development. *New Phytol*. 72: 101 - 111
- Baigorri, H. 1999. Requerimientos nutricionales del cultivo de soja. En: "Fertilización de Soja" (INPOFOS) 39 pág.
- Barbagelata, P.A., R.J.M. Melchiori y O.P. Papparotti. 2001. Fertilización fosfatada del cultivo de soja en suelos vertisoles de la provincia de Entre Ríos. *Informaciones Agronómicas (INPOFOS)* 11: 11-12.
- Bar-Yosef, H. 1991. Root excretions and their environmental effects: Influence on availability of phosphorus. En Eds. Waisel Y, Eshel A y Kafkafi U. *Plant roots: The hidden half*. Marcel Dekker, New York. Pp. 581-605
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1989. Effect of root environment on proton efflux in wheat roots. *Plant Soil*, 119 (2): 191-197
- Bieleski, R.L. y I.B. Ferguson. 1983. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. En: *Inorganic Plant Nutrition*. Lauehli, A., R.L. Bieleski. Eds. Springer Verlag: New York. Pp 422 - 449
- Berardo, A. 2004. Manejo de la fertilización en una agricultura sustentable. *Informaciones Agronómicas (INPOFOS)* 23: 23-25.
- Berardo, A., S. Ehrt, F. Grattone y F. García. 2001. Corn yield response to phosphorus fertilization in the southern Pampas. *Better Crops Int*, 15(1): 3-5.
- Bertin, C., X. Yang y L.A. Weston. 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil*, 256: 67-83.
- Bertrand, I., P. Hinsinger, B. Jaillard y J.C. Arvieu. 1999. Dynamics of phosphorus in the rhizosphere of maize and rape grown on synthetic, phosphated calcite and goethite. *Plant Soil*, 211: 111-119
- Bollan, N.S., J. Elliot, P.E.H. Gregg y S. Well. 1997. Enhanced dissolution of phosphate rocks in the rhizosphere. *Biol. Fertil. Soils*, 24: 169-174
- Boschetti, N.G; R. Valenti; C. Vesco y M. Sione. 2000. Contenido de fósforo total en suelos con características vérticas de la provincia de Entre Ríos. *Revista Facultad de Agronomía*, 20:53-58.
- Bray, R.H. y L.T. Kurtz. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci*, 59: 39-45.
- Bucher.M. 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173: 11-26

- Cassman, K.G., A.S. Whitney y K.R. Stockinger. 1980. Root growth and dry matter distribution of soybean as affected by phosphorus stress, nodulation, and nitrogen source. *Crop Sci.* 20: 239 - 244
- Chang, S.C. y M.L. Jackson. 1957. Fractionation of soil phosphorus. *Soil Science*, 84: 133-144.
- Chen, C.R., L.M. Condron, M.R. Davis y R.R. Sherlock. 2002. Phosphorus dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biol. Biochem.*, 34: 487-499
- Chiera, J.M., J.F. Thomas y T.W. Ruffy. 2004. Growth and localized energy status in phosphorus stressed soybean. *J. Plant Nutrit.* 11 (27): 1875-1890
- Claassen, N. 1991. Extraction of soil phosphorus by plant roots. p.99–104. En: Johansen, K.K. Lee y K.L. Sahrawat (eds.) *Phosphorus nutrition of grain legumes in the semi-arid tropics*. ICRISAT, Patancheru, India.
- Cooperband, L.R. y T.J. Logan. 1994. Measuring in situ changes in labile phosphorus with anion exchange membranes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58: 105-114
- Coventry, D.R. y W.J. Slaterry. 1991. Acidification of soil associated with lupins grown in a crop rotation in north-eastern Victoria. *Austr. J. Agric. Res.* 42: 391-397.
- Cross, A.F. y W.H. Schlesinger. 1995. A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma*, 64: 197-214.
- Dakora, F.D. y D.A. Phillips. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil*, 245: 35-47
- Dalal, R. 1977. Soil organic phosphorus. *Adv. Agron.*, 29: 83-117
- Darrah, P.R. 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant Soil*, 155/156: 1-20
- Díaz Zorita, M. 2004. Importancia del fósforo en la nutrición mineral del girasol. En: www.fertilizar.org
- Díaz Zorita, M., F. García y R. Melgar. 2002. Fertilización en soja y trigo-soja: Respuesta de la fertilización en la región pampeana. *Boletín Proyecto Fertilizar*. EEA INTA Pergamino. 44 pág.
- Diez, A; E., Zamuner; L. Picone y A. Berardo. 2000. Efecto de la aplicación de dosis única o fraccionada de fertilizante fosfatado sobre el fósforo del suelo. En *Actas XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. AACCS. Mar del Plata.
- Dinkelaker, B., V. Römheld y H. Marschner. 1989. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ.* 12: 285-292
- Duff, S.M.G., G. Sarath y W.C. Plaxton. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant.*, 90: 791-800.
- Eaton, S.V. 1949. Effects of phosphorus deficiency on growth and metabolism of sunflower. *Bot. Gazette* 110 (3): 449 - 464
- Echeverría, H.E. y F.O. García. 1998. Guía para la fertilización fosfatada de trigo, maíz, girasol y soja. *Boletín técnico* 149, INTA EEA Balcarce.
- Echeverría, H.G., G. Ferraris, G. Gerster, F.H. Gutiérrez Boem y F. Salvagiotti. 2002. Fertilización en soja y trigo – soja: respuesta a la fertilización en la región

- pampeana. Resultados de la red de ensayos del Proyecto Fertilizar (INTA) Campaña 2000/2001 y 2001/2002. INTA EEA Pergamino, 44p.
- Ferrari, M., J. Ostojic, L. Ventimiglia, H. Carta y G. Ferraris. 2000. Fertilización de maíz: buscando una mayor eficiencia en el manejo del nitrógeno y el fósforo. Actas: "Fertilidad 2000" (INPOFOS) Rosario, pp. 23-37.
- Fontanetto, H. 2004. Nutrición de los cultivos y manejo de la fertilidad del suelo en la región central de Santa Fe. En: Actas Fertilidad de Suelos para una Agricultura Sustentable (INPOFOS) Pag. 19-25.
- Fragaria, N.K. y V.C. Baligar. 1997. Phosphorus use efficiency by corn genotypes. J. Plant Nutr. 20: 1267-1277.
- Fredeen, A.L., T.K. Raab, I.M. Rao y N. Terry. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in Glycine max. Plant Physiol., 89: 225 - 230
- Gahoonia, T.S. y N.E. Nielsen. 1992. The effects of root-induced pH changes on the depletion of inorganic and organic phosphorus in the rhizosphere. Plant Soil, 143: 185-191.
- Gahoonia, T.S. y N.E. Nielsen. 1996. Variation in acquisition of soil phosphorus among wheat and barley genotypes. Plant Soil, 178: 223-230.
- Gahoonia, T.S. y N.E. Nielsen. 2004. Roots traits as tools for creating phosphorus efficient crop varieties. Plant Soil, 260: 47-57.
- Gahoonia, T.S., N. Claassen y A. Jungk. 1992. Mobilization of residual phosphate of different phosphate fertilizers in relation to pH in the rhizosphere of ryegrass. Fert. Res., 33: 229-237.
- García F.O., Picone L.I., Berardo A. 2006. Fósforo. Pág. 99-121. En: H.E. Echeverría y F.O. García (eds.) Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. Ed. INTA, Bs. As. Arg.
- García, F. 2001. Balance de fósforo en los suelos de la región pampeana. Informaciones agronómicas (INPOFOS) 9: 1-3.
- García, F. 2002. Manejo de la fertilidad de suelos y fertilización de cultivos para altos rendimientos en la región pampeana argentina. En: www.inpofos.org
- García, F., K. Fabrizzi, M. Ruffo y P. Scarabicchi. 1997. Fertilización nitrogenada y fosfatada de maíz en el sudeste de Buenos Aires. Actas VI Congreso Nacional de Maíz. AIANBA. Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
- Gardner, W.K.; D.A. Barber y D.G. Parberry. 1983. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. Plant Soil, 70: 107-124.
- Gasparatos, D. y C. Haidouti. 2001. A comparison of wet methods for determination of total phosphorus in soils. J. Plant Nutr. Soil Sci., 164: 435-439.
- Gaume, A.; F. Märchler; C. De León; L. Narro y E. Frossard. 2001a. Low-P tolerance by maize (*Zea mays* L.) genotypes: Significance of root growth, and organic acids and acid phosphatase root exudation. Plant Soil, 228: 253-264.
- George, T.S., P.J. Gregory, J.S. Robinson y R.J. Buresh. 2002. Changes in phosphorus concentrations and pH in the rhizosphere of some agroforestry and crop species. Plant Soil, 246: 65-73

- George, T.S., B.L. Turner, P.J. Gregory, B.J. Cade-Menun y A.E. Richardson. 2006. Depletion of organic phosphorus from Oxisols in relation to phosphatase activities in the rhizosphere. *Europ. J. Soil Sci.* 57: 47-57.
- Gaume, A; F. Märchler y E. Frossard. 2001b. Aluminium resistance in two cultivars of *Zea mays* L.: Root exudation of organic acids and influence of phosphorus acquisition. *Plant Soil*, 234: 73-81.
- Gregory, P.J. y P. Hinsinger. 1999. New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere: an overview. *Plant Soil*, 211: 1-9
- Grinsted, M.J., M.J. Hedley, R.E. White y P.H. Nye. 1982. Plant induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* var. Esmerald). I. pH changes and the increase in P concentration in the soil solution. *New Phytol.*, 91: 19-29
- Guo, F. y R.S. Yost. 1998. Partitioning soil phosphorus into three discrete pools of differing availability. *Soil Sci.*, 163 (10): 822-833.
- Gutiérrez Boem, F.H., J.S. Scheiner, J. Moyano y R.S. Lavado. 2002a. Cambio en la disponibilidad de fósforo del suelo por el agregado de fertilizante. *Actas XVIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. Puerto Madryn. Versión CD.
- Gutiérrez Boem, F.H., J.S. Scheiner, L. Martín y R.S. Lavado. 2002b. Respuesta del cultivo de soja a la fertilización fosforada y nitrogenada. *Actas XVIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. Puerto Madryn. Versión CD.
- Hanway, J. y R. Olson. 1980. Phosphate nutrition of corn, sorghum, soybeans, and small grains. In *The role of phosphorus in agriculture*. F. Khasawneh et al.(ed) ASA – CSSA-SSSA. Madison, Wisconsin. USA. Pág. 681-691
- Hayes, J.E., A.E. Richardson y R. J. Simpson. 2000. Components of organic phosphorus in soil extracts that are hydrolysed by phytase and acid phosphatase. *Soil Fert. Soils*, 32: 279 – 286.
- Haynes, R.J. 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant Soil*; 126: 247-264
- He, Z., A.M. Fortuna, Z.N. Senwo, I.A. Tazisong, C.W. Honeycutt y T.S. Griffin. 2006. Hydrochloric fractions in Hedley fractionation may contain inorganic and organic phosphates. *Soil Sci. Am. J.*, 70: 893-899
- Hedley, M.J., J.W.B. Stewart y B.S. Chahuan. 1982a. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46: 970-976.
- Hedley, M.J., R.E. White y P.H. Nye. 1982b. Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus*) seedling. III. Change in L-value, soil phosphate fractions and phosphatase activity. *New Phytol.*, 91: 45-56.
- Hedley, M.J., P.H. Nye y R.E. White. 1982c. Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus*) seedling. II. Origin of the pH change. *New Phytol.*, 91: 31-34
- Hinsinger, P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron.*, 64: 225-265.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes. A review. *Plant Soil*, 237: 173-195.

- Hinsinger, P., C. Plassard, C. Tang y B. Jaillard. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constrains: A review. *Plant Soil*, 248: 43-59.
- Hinsinger, P., G.R. Gobran, P.J. Gregory y W.W. Wensel. 2005. Research review: Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.*, 168: 293-303
- Hoffland, E., G.R. Findenegg y J.A. Nelemans. 1989. Solubilization of rock phosphate by rape. II Local root exudation of organic acids as a response to P-starvation. *Plant Soil*, 113: 161-165
- Hoffland, E., J.A. Nelemans y G.R. Findeneeg. 1990. Origin of organic acids exuded by roots of phosphorus stressed rape (*Brassica napus*) plants. p. 179-183. En M.L. van Beusichem (ed.) *Plant nutrition – physiology and applications*. Kluwer Academic Publishers.
- Hoffland, E., R. van den Boogard, J. Nelemans y G. Findenegg. 1992. Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytol*, 122: 675-680.
- Hoffmann, C., E. Ladewin, N. Claassen y A. Jungk. 1994. Phosphorus uptake of maize as affected by ammonium and nitrate nitrogen – measurement and model calculations-. *Z. Pflanzanernähr. Bodenk.*, 157: 225-232.
- Israel, D.W. 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant Physiol.* 84: 835 – 840
- Jaillard, B., L. Ruiz y J.C. Arvieu. 1996. pH mapping in transparent gel using color indicator videodensitometry. *Plant Soil* 183: 85 - 95
- Jones, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 204: 25-44.
- Jones, D.L. y P.R. Darrah. 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant Soil*, 166: 247-257.
- Jungk, A., B. Seeling y J. Gerke. 1993. Mobilization of different phosphate fractions in the rhizosphere. *Plant Soil*, 155/156: 91-94.
- Kandeler, E., P. Marschner, D. Tscherkol, T.S. Gahoonia y E. Nielsen. 2002. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant Soil*, 238: 301-312.
- Kirk, G. 1999. A model of phosphate solubilization by organic anions from plant roots. *Eur. J. Soil Sci.*, 50: 369-378
- Kirk, G., E. Santos y M. Santos. 1999. Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice roots in aerobic soil: effects on rhizosphere pH and effects on phosphate solubility and uptake. *New Phytol.*, 142: 185-200
- Kuo, S. 1996. Phosphorus. p. 869-919. En D.L. Sparks, *Methods of soil analysis, part 3, chemical methods*. SSSA-ASA, Madison.
- Kuzyakov, Y., A. Raskatov y M. Kaupenjohann. 2003. Turnover and distribution of root exudates of *Zea mays*. *Plant Soil*, 254: 317-327.
- Lambers, H., M.W. Shane, M.D. Cramer, S.J. Pearse y E.J. Veneklaas. 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann. Bot. in press*

- Landsberg, E.C. 1991. Proton efflux and transfer cell formation as responses to Fe deficiency of soybean in nutrient solution culture. *Plant Soil*, 114 (1): 53-61
- Laurer, M.T. y D.G. Blevins. 1989. Dry matter accumulation and phosphate distribution in soybean grown in varying levels of phosphate nutrition. *J. Plant Nutr.* 12: 1045 - 1060
- Lee, KK; S.P. Wani; K.L. Sahrawat; N. Tritumurtulu y O. Ito. 1997. Nitrogen and /or phosphorus fertilization effects on organic carbon and mineral contents in the rhizosphere of field grown sorghum. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43 (1): 117-126
- Ligaba, A., M. Yamaguchi, H. Shen, T. Sasaki, Y. Yamamoto y H. Matsumoto. 2004. Phosphorus deficiency enhances plasma membrana H⁺-ATPase activity and citrate exudation in greater purple lupin (*Lupinus pilosus*). *Funct. Plant Biol.*, 31: 1075-1083
- Liu, Y., G. Mi, F. Chen, J. Zhang y F. Zhang. 2004. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability. *Plant Sci.* 167: 217-223
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London 2nd edition. 889 pag.
- Marschner, H. y V. Römheld. 1991. Root induces changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere. En Eds. Waisel Y, Eshel A y Kafkafi U. *Plant roots: The hidden half*. Marcel Dekker, New York. Pp. 557-579
- Marschner, H., H. Solaiman y Z. Rengel. 2006. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. *Plant Soil*, 283: 11-24
- McKenzie, R.H., J.F. Dormaar, G.B. Schaalje, and J.W.B. Stewart. 1995. Chemical and biochemical changes in the rhizosphere of wheat and canola. *Can. J. Soil Sci.*, 75: 439-447.
- Melchiori, R.J.M., O.P. Papparotti y P.A. Barbagelata. 2002. Fertilización fosfatada en soja: validación del nivel crítico. INTA EEA Paraná. En: www.parana.inta.gov.ar
- Melgar, R. y M. Díaz Zorita. 1997. La fertilización de cultivos y pasturas. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. 259 pp.
- Melgar, R.J., E. Frutos, M.L. Galetto y H. Vivas. 1995. El análisis de suelo como predictor de la respuesta de la soja a la fertilización fosfatada. I Congreso Nacional de Soja, II Reunión Nacional de Oleaginosos, octubre 1995, Pergamino, p. 167-174.
- Mengel, K. 1994. Symbiotic dinitrogen fixation – its dependence on plant nutrition and its ecophysiological impact. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 157: 233-241
- Minggang, L., M. Osaka, I.M. Rao y T. Tadano. 1997. Secretion of phytase from the roots of several plant species under phosphorus-deficient conditions. *Plant Soil*, 195: 161-169.
- Mistrorigo, D., R. De Carli, F. Aranguen, P. Beret y A. Lisasso. 2000. Fertilización de maíz en siembra directa en Entre Ríos. En *Jornadas de Intercambio Técnico de Maíz*. AAPRESID. Rosario, Argentina.
- Mizuno, I. 1981. Fósforo en suelos argentinos. *Ac. Nac. Agr. Vet.* 30: 6
- Mollier, A. y S. Pellerin. 1999. Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *J. Exp. Bot.* 50: 487 - 497

- Murphy, J. y J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31-36
- Neumann, G. y V. Römheld. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 211: 121-130
- Neumann, G., A. Massonneau, E. Martinoia y V. Römheld. 1999. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta*, 208: 373-382.
- Nguyen, C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. A review article. *Agronomie*, 23: 375-396
- Nguyen, C., C. Torodovic, C. Robin., A. Christophe y A. Guckert. 1999. Continuous monitoring of rhizosphere respiration after labelling of plant shoot with $^{14}\text{CO}_2$. *Plant Soil*, 212: 191-201
- Nurlaeny, N. H. Marschner y E. George. 1996. Effects of liming and mycorrhizal colonization on soil phosphate depletion and phosphate uptake by maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) grown in two tropical acids soils. *Plant Soil*, 181: 275-285.
- Nuruzzaman, M., H. Lambers, M. Bolland y E. Veneklass. 2005. Phosphorus benefits of different legume crops to subsequent wheat grown in different soils of Western Australia. *Plant Soil*, 271: 175-187
- Nuruzzaman, M., H. Lambers, M. Bolland y E. Veneklass. 2006. Distribution of carboxylates and acids phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant Soil*, 281: 109-120
- Nyatsanga, T. y W.H. Pierre. 1973. Effect of nitrogen fixation by legumes on soil acidity. *Agron. J*, 65: 936-940.
- Nye, P.H. 1981. Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant Soil*, 61: 7-26.
- Nziguheba, G., C.A. Palm, R.J. Buresch y P.C. Smithson. 1998. Soil phosphorus fractions and adsorption as affected by organic and inorganic sources. *Plant Soil*, 198: 159-168.
- Oehl, F., A. Oberson, M. Probst, A. Fliessbach, H.R. Roth y E. Frossard. 2001. Kinetics of microbial phosphorus uptake in cultivated soils. *Biol. Fert. Soils*, 34: 31 – 41.
- Ohwaki, Y. y H. Hirata. 1992. Differences in carboxylic acid contents exudation among P-starved leguminous crops in relation to carboxylic acid contents in plant tissues and phospholipid level in roots. *Soil Sci. Plant Nutrit.*, 38: 235-243.
- Otani, T. y N. Ae. 1996 Phosphorus (P) uptake mechanisms of crop grown in soils with low P status. I. Screening crops for efficient P uptake. *Soil Sci. Plant Nutr.* 42, 155–163.
- Parra, R. 1997. Fertilización fosfatada en el cultivo de soja y residualidad en una secuencia de cultivos en el norte santafesino. *Publ. Miscelánea N° 12. EEA INTA Reconquista*. Santa Fe, Argentina.
- Pascale C., O. Heredia y L. Giufré. 2000. Distintas fracciones de P en suelos de Entre Ríos. *Revista Facultad de Agronomía*, 20:59-62.
- Petersen W. y M. Böttger. 1991. Contribution of organic acids to the acidification of the rhizosphere of maize seedlings. *Plant Soil*, 132: 159-163

- Picone, L.I. y E. Zamuner. 2002. Fósforo orgánico y fertilidad fosforada. *Informaciones agronómicas (INPOFOS)* 16: 11-14.
- Qian, P. y J.J. Schoneau. 2002. Practical applications of ions exchange resins in agricultural and environmental soil research. *Can. J. Soil Sci.*, 82: 9-21.
- Radersma, S y P.F. Grierson. 2004. Phosphorus mobilization in agroforestry: organic anions, phosphatase activity and phosphorus fractions in the rhizosphere. *Plant Soil*, 259: 209-219.
- Raghothama, K.G. 1999. Phosphate acquisition. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50: 665-693.
- Raghothama, K.G. y A.S. Karthikeyan. 2005. Phosphate acquisition. *Plant Soil*, 274: 37-49
- Riley, D. y A. Barber. 1971. Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root-induced changes at the root-soil interface. *Soil Sc. Soc. Amer. Proc.*, 35: 301-306
- Römheld, V. y H. Marschner. 1981. Iron deficiency stress induced morphological and physiological changes in root tips on sunflower. *Physiol. Plant*; 53: 354-360
- Römheld, V., Ch. Müller y H. Marschner. 1984. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant. Physiol.* 76: 603-606
- Ryan, P.R., E. Delhaize y D.L. Jones. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 527-560.
- Saggar, S., M.J. Hedley y R.E. White. 1990. A simplified resin membrane technique for extracting phosphorus from soil. *Fertil. Res.* 24: 173-180.
- SAGPYA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos), 2006. Estimaciones Agrícolas, oleaginosas y cereales. En: www.sagpya.mecon.gov.ar
- Scheiner, J.D., D.F. Álvarez Renzi, R.S. Lavado y S.I. Torri. 1997. Efecto de la fertilización fosforada y nitrogenada en soja en el centro-oeste bonaerense (Argentina). *Ciencia del Suelo.* 15: 36-38.
- Scheiner, J.D., R.S. Lavado y R. Álvarez. 1996. Difficulties in recommending phosphorus fertilizers for soybean in Argentina, *Comm. Soil Sci. Plant Anal*, 178: 179-184.
- Schöttelndreier, M. y U. Falkengren-Grerup. 1999. Plant induced alteration in the rhizosphere and the utilisation of soil heterogeneity. *Plant Soil*, 209: 297-309.
- Schubert, S., E. Schubert y K. Mengel. 1990. Effect of low pH of the root medium on proton release, growth and nutrient uptake of field beans (*Vicia faba*). *Plant Soil*, 124 (2): 239-244
- Seeling, B. y A. Junk. 1996. Utilization of organic phosphorus in calcium chloride extract of soil by barley plants and hydrolysis by acid and alkaline phosphatases. *Plant Soil*, 178: 179-184.
- Shen, H., J. Chen. Z. Wang, C. Yang, T. Sasaki, Y. Yamamoto, H. Matsumoto y X. Yan. 2006. Root plasma membrane H⁺-ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* 57 (6) 1353-1362
- Solaiman, Z., P. Marschner y Z. Rengel. 2006. *Brassica* genotypes differ in growth, phosphorus uptake and rhizosphere properties under P-limiting conditions. *Soil Biol. Biochem.* *In press*

- Staunton, S y F. Leprince. 1996. Effect of pH and some organic anions on the solubility of soil phosphate: implications for P bioavailability. *Eur. J. Soil Sci.*, 47: 231-239.
- Ström, L.; A.G. Owen; D.L. Godbold y D.L. Jones. 2002. Organic acid mediates P mobilization in the rhizosphere and uptake by maize roots. *Soil Biol. Biochem.*, 34:703-710.
- Tadano, T. y H. Sakai. 1991. Secretion of acid phosphatase by roots of several species under phosphorus-deficient conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 37: 129-140
- Tadano, T., K. Ozawa, H. Sakai, M. Osaka y H. Matsui. 1993. Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupins roots. *Plant Soil*, 155/156: 95-98.
- Tang, C., C. McLay y L. Barton. 1997. A comparison of proton excretion of twelve pasture legumes grown in nutrient solution. *Aust. J. Exp. Agric.* 37: 563-570
- Tang, C., P. Hinsinger, J.J. Drevon y B. Jaillard. 2001. Effect of phosphorus deficiency on the growth, symbiotic N₂ fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie*, 21: 683-689
- Tarafdar, J.C. y A. Junk. 1987. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of organic phosphorus. *Biol. Fertil. Soils*, 3: 199-204.
- Tarafdar, J.C. y N. Claassen. 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biol. Fertil. Soils*, 5: 308-312.
- Theodorou, M.E. y W.C. Plaxton. 1993. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 101: 339-344
- Thibaud, J.B.; A. Sentenac y C. Grignon. 1994. The role of root apoplast acidification by the H⁺ pump in phosphorus mineral nutrition of terrestrial plants. Pag. 309-323. En: J.A. Manthey; D.E. Crowley y D.G. Luster. *Biochemistry of metal micronutrients in the rhizosphere*. Lewis publishers, Boca Raton.
- Thomsom, C.J., H. Marschner y V. Römheld. 1993. Effect of nitrogen fertilizer form on pH of the bulk soil and rhizosphere, and on the growth, phosphorus, and micronutrient uptake of soybean. *J. Plant Nutr.*, 16: 493-506.
- Tiessen, H. y J.O. Moir. 1993. Characterization of available P by sequential extraction. p. 75-86. En: M.R. Carter (ed.) *Soil Sampling and methods of analysis*. Can. Soc. Soil Sci, Lewis Publishers.
- Tiessen, H., J.W.B. Stewart y C.V. Cole. 1984. Pathways of phosphorus transformations in soils of differing pedogenesis. *Soil Soc. Am. J.*, 48: 853-858.
- Trolove, H., M.J. Hedley, J.R. Caradus y D. Mackay. 1996. Uptake of phosphorus from different sources by *Lotus pedunculatus* and three genotypes of *Trifolium repens*. 2. Forms of phosphate utilised and acidification of the rhizosphere. *Aust. J. Soil Res.*, 34: 1027-1040
- Trolove, S.N., M.J. Hedley, G.J.D. Kirk, N.S. Bolan y P. Loganathan. 2003. Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. *Austr. J. Soil Res.*, 41: 471-499.
- Universidad Nacional de Córdoba. 2004. InfoStat/P version 1.1. Software estadístico. FCA

- Vance, C.P; C. Uhde-Stone y D.L. Allan. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157: 423-447.
- Watt, M. y J.R. Evans. 2003. Phosphorus acquisition from soil by white lupin (*Lupinus albus* L.) and soybean (*Glycine max* L.), species with contrasting root development. *Plant Soil*, 248: 271-283.
- Wouterlood, M., G.R. Cawthray, T.T. Scanton, H. Lambers y E.H. Veneklaas. 2004. Carboxylate concentrations in the rhizosphere of root tips of chickpea increase during plant development, but are not correlated with P supply. *New Phytol.*, 162: 745-753
- Wouterlood, M., H. Lambers y E. Veneklaas. 2005. Plant phosphorus status has limited influence on the concentration of phosphorus-mobilising carboxylates in the rhizosphere of chickpea. *Func. Plant Biol.* 32: 153-159
- Yadav., R.S. y J.C. Tarafdar. 2001. Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biol. Fertil. Soils*, 34: 140-143.
- Yang, Z.M.; M. Sivaguru; W.J. Horst y H. Matsumoto. 2000. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.*, 110: 72-77.
- Youssef, R y Chino, M. 1989. Root-induced changes in the rhizosphere of plants. I. pH changes in relation to the bulk soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* 35: 29-40.
- Zamuner; E.C., L.I. Picone y H.E. Echeverría. 2003. Formas de fósforo en un suelo bajo labranza convencional y siembra directa. En *Actas de XIX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Entre Ríos. Versión CD.*
- Zhang, F; J. Shen; L. Li y X. Liu. 2004. An overview of rhizosphere processes related with plant nutrition in major cropping systems in China. *Plant Soil*, 260: 89-99.
- Zhu Y., F. Yan, C. Zörb y S. Schubert. 2005. A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions? *Plant Cell Physiol.*, 46: 892-901
- Zoysa, A.K.N., P. Loganathan y M.J. Hedley. 1997. A technique for studying rhizosphere processes in tree crops: soil phosphorus depletion around camellia (*Camellia japonica* L.) roots. *Plant Soil*, 190: 253-265.
- Zoysa, A.K.N., P. Loganathan y M.J. Hedley. 1998a. Effect of form of nitrogen supply on mobilisation of phosphorus from a phosphate rock and acidification in the rhizosphere of tea. *Aust. J. Soil Res.*, 36: 373-387
- Zoysa, A.K.N., P. Loganathan y M.J. Hedley. 1998b. Phosphate rock dissolution and transformation in the rhizosphere of tea (*Camellia sinensis* L.) compared with other plant species. *Europ. J. Soil Sci.*, 49: 477-486
- Zoysa, A.K.N., P. Loganathan y M.J. Hedley. 1999. Phosphorus utilisation efficiency and depletion of phosphate fractions in the rhizosphere of three tea (*Camellia sinensis* L.) clones. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 53: 189-201.
- Zubillaga, M.S y L. Giuffre. 1998. Pathways of native and fertilizer phosphorus in Argentine soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 51: 101-105.
- Zubillaga, M.S. y L. Giuffre. 1999. Soil phosphorus mobilization in different taxonomic orders. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162(2): 201-205.