

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



RESPUESTA DE EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA ASIMILACIÓN DE
HIERRO EN TOMATE DESARROLLADO SOBRE SUELO CÁLCICO CON LA
APLICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Tesis

Que presenta **FABIÁN PÉREZ LABRADA**
como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Agricultura Protegida

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



RESPUESTA DE EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA ASIMILACIÓN DE
HIERRO EN TOMATE DESARROLLADO SOBRE SUELO CÁLCICO CON LA
APLICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Artículos

Que presenta **FABIÁN PÉREZ LABRADA**
como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Agricultura Protegida

Dra. Susana González Morales

Director UAAAN

Dra. Susana Solís Gaona

Director Externo

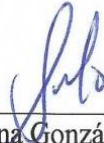
Saltillo, Coahuila

Diciembre 2017

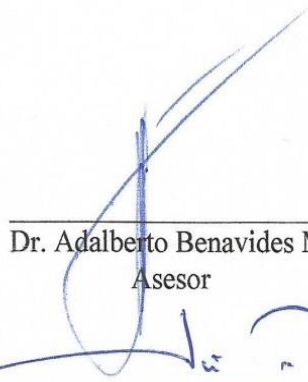
RESPUESTA DE EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A LA ASIMILACIÓN DE
HIERRO EN TOMATE DESARROLLADO SOBRE SUELO CÁLCICO CON LA
APLICACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Artículos


Elaborados por FABIÁN PÉREZ LABRADA como requisito parcial para obtener el
grado de Doctor en Ciencias en Agricultura Protegida con la supervisión y aprobación
del Comité de Asesoría



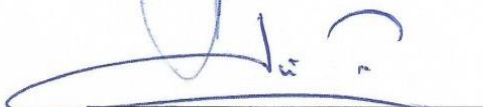
Dra. Susana González Morales
Asesor Principal




Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor



Dr. Antonio Juárez Maldonado
Asesor



Dr. Luis Alonso Valdez Aguilar
Asesor



Dra. Susana Solís Gaona
Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Subdirectora de Postgrado
UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Al programa del Doctorado en Ciencias en Agricultura Protegida.

Al CONACYT por el apoyo financiero brindado a través de la beca nacional.

A Arysta Lifescience por el apoyo brindado para realizar el presente proyecto.

A la Dra. Susana González Morales por brindarme la oportunidad y confianza de realizar esta investigación por compartir sus conocimientos, por el apoyo brindado en cada paso del proyecto.

A la Dra. Susana Solís Gaona por darme la oportunidad y confianza de realizar esta investigación y por el apoyo brindado durante el proyecto.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza por la asesoría oportuna, tiempo y apoyo brindado durante el proyecto.

Al Dr. Antonio Juárez Maldonado, por la asesoría oportuna, tiempo y apoyo brindado durante el proyecto.

Al Dr. Luis Alonso Valdez Aguilar, gracias por el apoyo y orientación académica durante el proyecto.

A todas las personas que directa o indirectamente participaron para llevar con éxito el presente trabajo.

DEDICATORIA

A mi familia.

CARTA DE ACEPTACIÓN DE ARTÍCULOS

3/12/2017

Correo - fabperlab@outlook.com

Correo de Outlook

Buscar en Correo y Conta...

 Nuevo |  Eliminar |  Archivar | Correo no deseado | Limpiar | Mover a | ...

1

^ Carpetas

Bandeja de entrada

Correo no deseado 3

Borradores

Elementos enviados

Elementos eliminados 48

Archivo

Conacyt

Conversation History

Journals

Scheduled

[JSSPN] Editor Decision

S Sistema SciELO Chile de Publicación <suporte.aplicacao@scielo.org>

mar 31/10/2017 01:55 p.m.

Para: Susana González Morales (qfb_sgm@hotmail.com)

Cc: Fabian Pérez Labrada (fabperlab@outlook.com); Adalberto Benavides Mendoza (abenmen@gmail.com); Antonio Juárez Maldonado (juma841025@hotmail.com); Susana Solís Gaona (susana.solis@arysta.com)

Dear Dr Susana González Morales,

I am pleased to inform you that your manuscript "ORGANIC ACIDS COMBINED WITH Fe-CHELATE IMPROVES FERRIC NUTRITION IN TOMATO GROWN IN CALCISOL SOIL" has been accepted for publication in Journal of Soil Science and Plant Nutrition (JSSPN).

To proceed with the publishing process, we will send you an electronic proof of your article which is scheduled to appear in a future issue of JSSPN.

Thank you for submitting your work to our journal.

With kind regards,

María de la Luz Mora
Editor-in-Chief
and
Alex Seguel
Managing Editor
Journal of Soil Science and Plant Nutrition

Actualizar a Premium



<https://outlook.live.com/owa/?path=/mail/inbox/rp>

1/1

3/12/2017

Correo - fabperlab@outlook.com

Correo de Outlook

Buscar en Correo y Conta...

 Nuevo | v

 Eliminar

 Archivar

Correo no deseado | v

Limpiar

Mover a | v

...

1

^ Carpetas

Bandeja de entrada

Correo no deseado 3

Borradores

Elementos enviados

Elementos eliminado

Archivo

Conacyt

Conversation History

Journals

Scheduled

Your recent submission to SBB

SB Soil Biology & Biochemistry <eesserver@eesmail.elsevier.com>
vie 22/09/2017 01:59 p.m.
Para: fabperlab@outlook.com

Dear Dr. Fabián Pérez-Labrada,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Soil Biology and Biochemistry
Corresponding Author: Susana Gonzalez
Co-Authors: Fabián Pérez-Labrada, PhD student; Adalberto Benavides-Mendoza, PhD; Antonio Juárez-Maldonado, PhD; Susan
Title: Organic acids increase iron content in a calcareous soil and its correlation with tomato plants growth

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at qfb_sgm@hotmail.com

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission

<https://eeslive.elsevier.com/sbb/l.asp?i=337202&l=EGKUUFU1>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Soil Biology and Biochemistry

Actualizar a Premium



<https://outlook.live.com/owa/?path=/mail/inbox/rp>

1/1

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
PRIMER ARTÍCULO: ORGANIC ACIDS COMBINED WITH Fe-CHELATE IMPROVES FERRIC NUTRITION IN TOMATO GROWN IN CALCISOL SOIL	11
SEGUNDO ARTÍCULO: Organic acids increase iron content in a calcareous soil and its correlation with tomato plants growth.....	37
TERCER ARTÍCULO: Organic Acids Modify Enzymatic Activity and Gene Expression Associated with Iron Absorption and Assimilation in Tomato Plants on Calcareous Soil	75
CONCLUSIONES GENERALES.....	108
REFERENCIAS.....	109

INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es un nutrimento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Waters *et al.*, 2012) puede presentarse como Fe^{3+} o Fe^{2+} , su importancia está en el papel primordial en la transferencia de electrones dentro del proceso fotosintético (Balk y Schaedler, 2014) y en la biosíntesis de la clorofila (Yadavalli *et al.*, 2012), entre otras. Cuando no se presentan concentraciones adecuadas en la planta se produce pérdida del fotosistema I y baja producción de clorofila, principalmente (Yadavalli *et al.*, 2012).

Para abastecer la demanda de Fe en la planta, estas desarrollaron estrategias a nivel genético (Vasconcelos *et al.*, 2014) siendo las estrategias I y II las más estudiadas. En la estrategia II la asimilación del hierro es mediada por quelación de fitosideróforos (ácido desoximugineico) (Nozoye *et al.*, 2014) que se une al Fe^{3+} para ser asimilado (Römheld y Schaaf, 2004). Mientras que en la estrategia I primeramente se acidifica la rizosfera por medio de excreción de protones por medio de una H^+ -ATPasa de la raíz, codificada por el gen HA1 (Hindt y Guerinot, 2012), posteriormente el Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} gracias a la quelato-reductasa férrica la cual es codificada por el gen FRO2 (Lucena *et al.*, 2007). Finalmente el Fe en estado ferroso es capturado por el transportador específico de Fe^{2+} IRT1 hacia el interior de la célula (Barberon *et al.*, 2014), dentro de las cuales es trasladado vía xilema o floema complejo (ya sea con nicotianamina, citrato y/o glutamato) (Kutrowska y Szlag, 2014), hacia los sumideros por una serie de transportadores como FRD, IREG1, IRT2, FRO, PIC1, VIT1 y NRAMP (Grillet *et al.*, 2014).

Ante deficiencia de Fe la planta genera una serie de señales transcripcionales y post-transcripcionales (Kobayashi y Nishizawa, 2014) que inducen cambios particularmente en la expresión de los genes AH1, FRO1 e IRT1 (Zanin *et al.*, 2014). Bajo suelos calcáreos la deficiencia de Fe es más notoria, ya que a pesar de estar presente en grandes cantidades no está disponible para la planta (Schmidt, 2003) debido a los altos contenidos de carbonatos (CaCO_3) y bicarbonatos (HCO_3^-) (Arizmendi *et al.*, 2011).

Tratando de suplir el déficit de Fe en estos suelos se recurre a aplicaciones de fertilizantes férricos y/o quelatos de hierro, sin embargo dichas aplicaciones además de su costo elevado conlleva a pérdidas por lixiviación, adsorción o fijación sobre el suelo

(Covarrubias *et al.*, 2014). Partiendo del hecho de que la exudación de ácidos orgánicos es uno de los mecanismos que las plantas utilizan para acceder al Fe en suelos (Yeasmin *et al.*, 2014) y considerando que las fuentes disponibles de Fe en la rizosfera son complejos Fe-ligandos orgánicos (Zanin *et al.*, 2014), aplicaciones exógenas de estos pudieran inducir cambios positivos en la adquisición del Fe (Sánchez-Rodríguez, *et al.*, 2014), tal y como lo reporta Aguirre *et al.*, (2009) quienes aplicando sustancia húmicas encontraron un aumento de la actividad H^+ -ATPasa y quelato reductasa, regulando transitoriamente la codificación de los genes FRO1, Ha1 y IRT1. Mientras que el ácido cítrico y oxálico incrementan el contenido de P, Fe y Cu y el contenido de clorofila en garbanzo (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2014), además de regular la transcripción del gen de la malato deshidrogenasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa en raíz (An *et al.*, 2014). Por su parte el ácido salicílico aumentó la concentración de Fe, modificando el contenido de clorofila y la actividad de la H^+ -ATPasa, así como el contenido de Ca, Mg y Zn y la tasa de fotosíntesis neta (Kong *et al.*, 2014c; Kong *et al.*, 2015) en *Arachis hypogaea* L.

Considerando que aplicaciones exógenas de ácidos orgánicos sobre suelo calcáreo pueden modificar la solubilidad, disponibilidad y absorción del Fe, aunado a cambios en la expresión de genes que codifican enzimas relacionadas con el metabolismo del Fe. Se plantea como objetivo del presente trabajo documentar el efecto de la aplicación de ácidos orgánicos sobre la respuesta de expresión de genes asociados con la asimilación de hierro en plantas de tomate desarrollado en suelo calcáreo.

REVISIÓN DE LITERATURA

El hierro (Fe) es un metal de transición (Hall y Williams, 2003) esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Waters *et al.*, 2012), este nutriente puede alternar entre dos estados de oxidación, Fe^{3+} (férrico) y Fe^{2+} (ferroso), siendo este último quien presenta mayor importancia metabólica (Thomine y Vert, 2013). La importancia del Fe radica en que interviene en una gran variedad de funciones celulares (Schmidt, 2003), teniendo un papel primordial en la transferencia de electrones en el proceso fotosintético (Kutrowska y Szelag, 2014), actúa como reservorio (ferritina) para ser utilizado por las enzimas implicadas en la fotosíntesis (Thomine y Vert, 2013), ya que el Fe es asignado a las membranas de los tilacoides en función con la expresión de los genes HvFRO1 y HvFRO2 en hojas de cebada (Mikami *et al.*, 2011). Además participa en la respiración mitocondrial, la asimilación de nitrógeno, la biosíntesis hormonal (etileno, ácido giberélico, ácido jasmónico), la producción y la compactación de las especies reactivas del oxígeno, osmoprotección y la defensa de patógenos (Hänsch y Mendel, 2009). De igual manera desempeña un papel fundamental en la biosíntesis de la clorofila (Yadavalli *et al.*, 2012), bajo presencia de oxígeno, el hierro participa en la química de Fenton que genera especies reactivas de oxígeno altamente tóxicos (Thomine y Vert, 2013). En las células vegetales, el Fe es distribuido hacia los cloroplastos y las mitocondrias o bien puede almacenarse de forma segura en la vacuola (Thomine y Vert, 2013), considerando su alta demanda en el proceso fotosintético, entre un 80-90% del Fe celular de la hoja se encuentra en los cloroplastos (Hänsch y Mendel, 2009) inclusive pudiendo ser almacenado como ferritina en el estroma (almacenándose hasta 4500 átomos de Fe) (Kim y Guerinot, 2007).

La deficiencia de Fe como estrés abiótico contribuye a una disminución de la calidad nutricional y a pérdidas en el rendimiento del cultivo (Yadavalli *et al.*, 2012), pues afectan el estado redox del fotosistema II, el complejo cyt b6f, induciendo la pérdida del fotosistema I y modificando el péptido LHC (Briat *et al.*, 2007; Yadavalli *et al.*, 2012), además de disminuir la producción de clorofila. Daños causados por déficit de Fe es reportado por Kong *et al.* (2014b) en plántulas de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) quienes encontraron una disminución de la concentración de clorofila soluble, además

de perturbaciones en el equilibrio iónico. Por su parte en plantas de pepino la deficiencia del Fe afecta la función de la cadena respiratoria, principalmente en los niveles del complejo I y complejo II, debido a un aumento en la actividad de la NAD(P)H deshidrogenasa mitocondrial (Vigani y Zocchi, 2010). Así mismo plantas de fresa mostraron un menor contenido de clorofila total tanto en las hojas jóvenes como en las maduras (Pestana *et al.*, 2012). Finalmente en arroz (*Oryza sativa*) el contenido de clorofila y la eficiencia fotosintética disminuyeron con deficiencia de hierro, las subunidades Lhca1 y Lhca2 disminuyeron en un 40 y 50%, respectivamente, mientras que Lhca3 y Lhca4 estaban completamente degradados, debido a un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (Yadavalli *et al.*, 2012).

Estrategias de adquisición. El Fe es asimilado por la planta en forma de Fe^{2+} (hierro ferroso) y Fe^{3+} (hierro férrico), en mayor medida por la forma ferrosa, sin embargo el Fe^{2+} se oxida fácilmente a Fe^{3+} , formando un grupo de óxidos férricos altamente insolubles, tales como hidróxido de goetita y hematita (Shenker y Chen, 2005), por lo cual las plantas inician respuestas en todos los niveles, desde la señalización hasta la regulación génica (Waters *et al.*, 2012; Vasconcelos *et al.*, 2014), dichas respuestas están en función a los ecotipos vegetales (Stein y Waters, 2012). Los resultados de estas respuestas son cambios fisiológicos y morfológicos que conducen a un aumento de la absorción de Fe de la rizosfera (Samira *et al.*, 2013), sin embargo considerando que el Fe es tóxico, las plantas controlan estrechamente la absorción de hierro en el nivel transcripcional y post-translacional (Thomine y Vert, 2013).

La baja biodisponibilidad de Fe en suelo fuerza a las plantas a desarrollar estrategias genéticas para mejorar la adquisición del Fe, de manera concreta dos principales estrategias: estrategia I y II (von Wiren, 2004; Abadía *et al.*, 2011). En la estrategia I se llevan a cabo tres procesos fundamentales para la adquisición del Fe, básicamente acidificación, reducción y transporte secuencial, inducido por la codificación de los genes HA1, FR02 y IRT1, respectivamente (Kobayashi y Nishizawa, 2012; Thomine y Vert, 2013). Hall y Williams (2003) mencionan que los sistemas de transporte de membrana desempeñan un papel central en la adquisición, transición y distribución del Fe, principalmente las ATPasas de metales pesados (HMAs), la familia Nramps, el facilitador de difusión de cationes (CDF), la familia ZIP y los antiporters catiónicos.

Inicialmente el gen FER codifica un factor de transcripción (bHLH) que se expresa en las raíces deficientes de Fe, presentándose en menor medida MYB10 y WRKY (Kim y Guerinot, 2007; Li *et al.*, 2014b), además de ser esenciales en la inducción de la transcripción de los genes LeFRO2 y LeIRT1 en tomate (Li *et al.*, 2004; Walker y Connolly, 2008). Por lo que el factor de transcripción bHLH probablemente actúa como un sensor de Fe para controlar las respuestas de la deficiencia de Fe en la raíz (Grotz y Guerinot, 2006). De manera particular las tres etapas de la estrategia I son a) Acidificación del pH de la rizosfera: primeramente las raíces bombean protones hacia la rizosfera por medio de una H⁺-ATPasa (excretándose de igual manera ácidos orgánicos y fenoles) disminuyendo el pH rizosférico (Gaxiola *et al.*, 2007; Santi y Schmidt, 2009; Hindt y Guerinot, 2012), por lo que el gen HA1 (LHA1 en tomate) que codifica dicha bomba de protones es expresado en las raíces (Morsomme y Boutry, 2000; Kim y Guerinot, 2007). b) Reducción del hierro férrico a ferroso: una vez acidificado el medio rizosférico el Fe³⁺ se reduce a Fe²⁺ en la superficie de la raíz (Robinson *et al.*, 1999; Hindt y Guerinot, 2012) para que pueda ser transportado a través de la membrana plasmática (Jeong y Connolly, 2009). Dicha reducción es mediada por la quelato-reductasa férrica ubicada en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz, la cual es codificada por el gen FR02 (Oki *et al.*, 2004), LeFRO1 en tomate (Lucena *et al.*, 2007). c) Absorción del hierro por la raíz de la planta: finalmente el Fe en estado ferroso es capturado por el transportador específico de Fe²⁺ IRT1 hacia el interior de la célula (LeIRT1 en tomate) y marginalmente por los transportadores NRAMP1 y ZIP (Krämer *et al.*, 2007; Lucena *et al.*, 2007; Baxter, 2009; Thomine y Vert, 2013; Barberon *et al.*, 2014).

Traslación hacia sumideros. Una vez que el Fe es absorbido por la raíz este tiene que ser distribuido a los tejidos de las plantas por el transporte de larga distancia, principalmente al cloroplasto donde el Fe representa 70-90% de hierro celular en las células del mesófilo (Thomine y Vert, 2013). El transporte del Fe²⁺ intracelular e intercelular es regulado por varios transportistas: FRD3 (transportador de citrato), PEZ (transportador de fenoles), YS1/YSL (transportador Fe³⁺ y Fe²⁺-NA) y IRT/NRAMP (transportador de traslocación), los cuales son codificados por los genes FRD3, PEZ1, YSL, respectivamente, siendo muy probable la existencia de transportistas específicos

para cada orgánulo: PIC1 (transportador de Fe-cloroplasto), FRO (transportador de Fe-quelato reductasa del transporte Fe-cloroplasto), MIT (transportador de Fe-mitocondrial), VIT1/FPN/IREG (transportador de Fe-hacia la vacuola), NRAMP (transportador de Fe hacia el citosol de la vacuola) (Briat *et al.*, 2007; Durret *et al.*, 2007; Aguado-Santacruz *et al.*, 2012; Kobayashi y Nishizawa, 2012; Xiong *et al.*, 2012; García-Mina *et al.*, 2013).

La translocación del Fe puede presentarse vía xilema o floema, el estado Fe^{2+} es transportado en la savia de xilema complejado con nicotianamina y/o citrato, mientras que por la savia del floema es complejado por nicotianamina, por su parte la forma Fe^{3+} es transportado en la savia de xilema complejado con ácido desoximugineico y/o citrato, y por la savia del floema se transporta complejado por glutamato, nicotianamina y citrato (Higuchi *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2009; Schuler *et al.*, 2012; Kutrowska y Szelag, 2014). Cabe remarcar que en ausencia de nicotianamina, el Fe se acumula en el floema (Schuler *et al.*, 2012). En el xilema depende en gran medida de la acción del transportador FRD3 (miembro de la familia MATE) el cual induce un flujo de salida de citrato expresado en el periciclo de la raíz, esta actividad se requiere para solubilizar hierro en la savia del xilema (Grillet *et al.*, 2014), de igual manera el transportador IREG1 parece regular el flujo de salida hacia el apoplasto y/o xilema (Kutrowska y Szelag, 2014). Ya en las hojas, la descarga del hierro de los vasos del xilema y la distribución en las células circundantes también es mediada por el FRD3, siendo la nicotianamina la segunda molécula orgánica que se muestran para formar complejos con el hierro (Grillet *et al.*, 2014). Pudiendo ser almacenado en las vacuolas en forma de globoides, siendo los genes AtVIT1, AtNRAMP3, AtNRAMP4 los principales transportadores que permite la absorción del Fe en vacuolas en *Arabidopsis*, así como los genes IREG2, FPN2, zif1, IRT2. Por su parte los genes PIC1, FRO7, IREG2 / FPN2 regula la alocaión del Fe en los plástidos y mitocondria (Thomine and Vert, 2013). Estudios en *Arabidopsis* sugieren que las FRO pueden funcionar en las membranas de los organelos, de manera particular la FRO7 juega un papel esencial en la entrega de hierro a los cloroplastos al igual que el importador PIC1 asociado al cloroplasto, mientras que FRO, FRO3 y FRO8 se localizan en las mitocondrias y por lo tanto pueden contribuir a la homeostasis del hierro mitocondrial, así como

transportadores de hierro vacuolar que importan hierro hacia la vacuola (VIT1) y que exportan hierro fuera de las vacuolas (NRAMP3 y NRAMP4) (Jeong y Connolly, 2009). La estrategia II básicamente implica la asimilación del hierro mediante quelación, gracias a la secreción y acumulación por parte de las raíces de fitosideróforos, ácido desoximugineico (Puig y Peñarrubia, 2009; Higuchi *et al.*, 2014; Nozoye *et al.*, 2014) los cuales se unen al Fe^{3+} y de esta manera son asimilados (Römheld y Schaaf, 2004). La secreción de dichos compuestos esta mediado por la expresión de los genes TOM1, YS3, bHLH y IRO2 (Walker y Connolly, 2008; Thomine y Vert, 2013; Li *et al.*, 2014b).

La respuesta de la deficiencia de Fe está mediada por una combinación del control transcripcional y pos-transcripcional (Kobayashi y Nishizawa, 2012) siendo el primero más pronunciado entre los genes relacionados con la adquisición de Fe (Kobayashi y Nishizawa, 2014). Cabe remarcar que ante un exceso en la absorción de Fe^{2+} se presenta ubiquitinación y degradación del transportador IRT1 (Kobayashi y Nishizawa, 2014). Bajo déficit de Fe las plantas muestran diferentes respuestas, en *Arabidopsis* se encontró una regulación masiva de los genes FIT, FRO2, IRT1 y AHA2 (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013), en *Pisum sativum* la actividad de la reductasa férrica se incrementó, aumentando la expresión de los genes FRO1, IRT1 y HA1 en las raíces (Kabir *et al.*, 2012), mientras que en tomate el gen LeFRO1 es acumulado en las raíces (Wang *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004), por su parte en raíces de arroz se observó una mayor expresión de los genes OsIRT1, OsYSL15, OsFRDL1 y OsZIP6 (Chen *et al.*, 2014), en raíces de *Cucumis sativus* L. se expresaron los genes CsHA1, FRO y IRT1 (Santi *et al.*, 2005; Zanin *et al.*, 2014).

Eventualmente en suelos calcáreos (calcisoles) donde el pH es elevado (Oki *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2009; Aguado-Santacruz *et al.*, 2012) y las condiciones redox son oxidantes (Sánchez-Alcalá *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2014), el hierro que está presente en grandes cantidades se encuentra en formas que no están disponibles para las plantas (Schmidt, 2003), al encontrarse como silicatos de ferromagnesio, hidróxidos u óxidos de hierro cuyas formas no son fácilmente asimilables por las plantas (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012), debido a los altos contenidos de carbonatos (CaCO_3), bicarbonatos (HCO_3^-) y conductividad eléctrica elevada (Rivera *et al.*, 2008; Arizmendi *et al.*, 2011). Las concentraciones altas de bicarbonato aumentan el pH del apoplasto de

la raíz inactivando el Fe dentro las células (Mengel, 1994) afectando la translocación hacia la parte aérea (Nikolic y Römheld, 2002) debido a la inhibición de la reductasa férrica (Lucena *et al.*, 2007) mediante la inhibición de los genes (FR01 en tomate) que codifican dicha enzima (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012) causando una disminución en el crecimiento vegetativo, así como pérdidas en rendimiento y calidad (López-Millán *et al.*, 2013). Rogers *et al.* (2009) reportan que en soja cultivada sobre suelo calcáreo la expresión del gen GmFRD3 es inducida por la carencia de hierro, lo que conlleva a un aumento del nivel de citrato xilemático lo cual conduce a una mayor solubilidad del hierro férrico.

Tratando de suplir el déficit de Fe en estos suelos se recurre a la aplicación de fertilizantes férricos (FeSO_4) y/o quelatos (FeEDDHA , FeEDTA y FeDTPA) (Rivera *et al.*, 2003; Ylivainio, 2010; Ortega y Molina, 2007; Rivera *et al.*, 2007; Covarrubias *et al.*, 2014), sin embargo dichas aplicaciones además de su costo elevado conlleva a pérdidas por lixiviación, adsorción o fijación sobre el suelo (Arizmendi *et al.*, 2011). Considerando que la exudación de ácidos orgánicos es uno de los mecanismos que las plantas utilizan para acceder al Fe en suelos con déficit de este (Bhattacharyya *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Khademi *et al.*, 2009; Carvalhais *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011; Duffner *et al.*, 2012; Kabir *et al.*, 2012; López-Millán *et al.*, 2012; Dotaniya *et al.*, 2013; Correia *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2014; Xiao y Wu, 2014; Yeasmin *et al.*, 2014) y dado que las fuentes disponibles de Fe para las plantas en la solución rizosférica son principalmente una mezcla de complejos entre el Fe y ligandos orgánicos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012; López-Millán *et al.*, 2012; Gramlich *et al.*, 2013; Pérez-Esteban *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Zanin *et al.*, 2014), misma que es mediada por la plasticidad radicular en función de la expresión de diversos genes (Giehl *et al.*, 2014) como el gen FRD3, cuya expresión implica mayor exudación de ácidos orgánicos (Durrett *et al.*, 2007). Aunado a que los ácidos orgánicos contribuyen a la disminución del pH rizosférico haciendo disponible el Fe, debido a que dichos ácidos compiten por los sitios de adsorción (Mimmo *et al.*, 2014) liberando el Fe para ser asimilado como un ligando (Hinsinger *et al.*, 2003; Donnini *et al.*, 2012). La aplicación exógena de ácidos orgánicos puede inducir cambios positivos en la adquisición del Fe por las plantas sobre

sobre suelos calcareos (Dotaniya *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2014; Sánchez-Rodríguez, *et al.*, 2014).

En ese sentido, aplicaciones de ácido cítrico sobre suelo alfisol, vertisol e inceptisol inducen mayor liberación de P, Al y Fe (Chatterjee *et al.*, 2015), mientras que en combinación con sulfato de hierro mejora el contenido de Fe en el Polianthes (Eidyan *et al.*, 2014). En frijol bajo estrés hídrico induce mayor contenido relativo de agua en hojas, así como un elevado contenido total de clorofila de las hojas (El-Tohamy *et al.*, 2013). Considerando que el ácido salicílico es una molécula señalizadora (Kawano *et al.*, 2004; Gunes *et al.*, 2005; Tufail *et al.*, 2013; He *et al.*, 2014) aplicaciones exógenas de este aumentó la concentración de Fe en los brotes y raíces, modificando el contenido de clorofila y Fe activo en las hojas, aumentó la actividad de la H⁺-ATPasa, así como el contenido de Ca, Mg y Zn y la tasa de fotosíntesis neta (Kong *et al.*, 2014c; Kong *et al.*, 2015) y disminuyendo el nivel de las concentraciones de especies reactivas del oxígeno y malondialdehído en *Arachis hypogaea* L. (Kong *et al.*, 2014b) y en pepino (*Cucumis sativus* L.) (Shi and Zhu, 2008). En lo que respecta a aplicaciones de ácido oxálico además de intervenir en las condiciones Fenton (Studenroth *et al.*, 2013) aumenta la movilización de nutrientes poco solubles en el suelo, ya sea quelatando los iones metálicos o reduciendo los metales (Wani *et al.*, 2012) en función de una reducción del pH del suelo (Xinmin *et al.*, 2004) y gracias a la activación cristalina Fe/Al y la prevención de la cristalización del amorfo Fe/Al (Wang *et al.*, 2012). Además de aumentar la actividad enzimática de plástidos implicados en la fotosíntesis (ribulosa bifosfato carboxilasa, gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa y la glucosa-1-fosfato adenilil-transferasa) en combinación con ácidos húmicos (El-Shabrawi *et al.*, 2015). Vaněk *et al.* (2012) reportan una tasa más altas de movilización del Al, Fe, K, Ca, Mn en suelo. De igual manera la combinación de ácido cítrico y salicílico induce una señalización que podría ser transmitida a la raíz influyendo en la adquisición de nutrientes minerales del medio (Ghazijahani *et al.*, 2014). Mientras que aplicaciones de una mezcla de ácidos orgánicos (cítrico-oxálico-málico) alivió la clorosis férrica del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) cultivado sobre suelo calcáreo, en función de la no cristalización de los óxidos de Fe, además de incrementar el contenido de P, K, Fe y Cu y el contenido de clorofila (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2014), por su parte en *Medicago*

sativa L. redujo la peroxidación lipídica de la membrana de la hoja, aumentando la concentración de Ca, K, Mg, Mn y Zn, de igual manera regularon la transcripción del gen de la malato deshidrogenasa (MDH) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en las raíces (An *et al.*, 2014). Por su parte aplicaciones de sustancias húmicas en *Arabidopsis thaliana* mostraron que cerca de 133 genes están tentativamente implicados en la interacción planta-sustancias húmicas, aumentando la transcripción del gen IAA19 (Trevisan *et al.*, 2010; Trevisan *et al.*, 2011), además inducen mejoras en la absorción de N sobre *Triticum aestivum* L. desarrollado en macetas con suelo calcáreo (Tahir *et al.*, 2011), en raíz de pepino provocan una mejora en la actividad de la H⁺-ATPasa induciendo cambios en la extracción y distribución de Fe, B, Mg, Cu, Mn y Zn (Mora *et al.*, 2010) gracias a su capacidad de complejar y/o quelatar cationes, debido a su alto contenido de grupos funcionales libres (Khaled y Fawy, 2011). De igual manera Aguirre *et al.*, (2009) reportan un aumento de la actividad H⁺-ATPasa y quelato reductasa, regulando transitoriamente la codificación de genes los CsFRO1 (quelato-reductasa), CsHa1 y CsHa2 (H⁺-ATPasa) y CsIRT1 (transportador), de manera similar ejercen efectos directos en la transcripción de genes en las raíces que codifican dos transportadores de nitrato (ZmNrt2.1 y ZmNrt1.1) y de dos isoformas H⁺-ATPasa (Mha1 y mHA2) en maíz (Quaggiotti *et al.*, 2004).

Considerando que aplicaciones exógenas de ácidos orgánicos sobre suelo calcáreo pueden modificar la solubilidad, disponibilidad y absorción del Fe aunado a la poca información existente sobre la expresión génica de las enzimas relacionadas con el metabolismo del Fe. Se plantea como objetivo del presente trabajo documentar el efecto de la aplicación de ácidos orgánicos combinado con un quelato férrico sobre la respuesta de la actividad enzimática y expresión de genes asociados con la asimilación de hierro en plantas de tomate desarrollado en suelo calcáreo.

ORGANIC ACIDS COMBINED WITH Fe-CHELATE IMPROVES FERRIC NUTRITION IN TOMATO GROWN IN CALCISOL SOIL

**Ácidos Orgánicos Combinado con Quelato Férrico Mejoran la Nutrición Férrica en
Tomate Cultivado en Suelo Calcisol**

**Fabián Pérez-Labrada¹; Adalberto Benavides-Mendoza¹; Antonio Juárez-
Maldonado²; Susana Solís-Gaona³; Susana González-Morales^{4§}**

¹Departamento de Horticultura, ²Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. ³Arysta Lifescience. ⁴CONACYT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Saltillo, Coahuila, 25315 México

§Corresponding author's email: sgonzalezmo@conacyt.mx

ABSTRACT

Plants developed in calcisol soils have limitations in iron nutrition, so exogenous applications of organic acids plus iron chelate can be an alternative. With the objective of knowing the answer of adding organic acids in the fertilizer solution plus a ferric chelate on the characteristics of the ferric nutrition of tomato plants developed in the calcisol soil the present experiment was established. We conducted the experiment in two stages, in the first stage studied different concentrations of some organic acids: citric acid (CA), oxalic acid (OA), salicylic acid (SA) and humic complexes (HC) combined with a FeEDDHA iron chelate, we included treatment control FeEDTA and FeEDDHA and treatment without iron in the fertilizer solution. In the second stage we compared the best concentrations of organic acids in combination with FeEDTA iron chelate; we used to treatment control FeEDTA and FeEDDHA, and a control treatment without iron in the fertilizer solution. The best concentrations were CA 10⁻⁴M, OA 10⁻⁴M, SA 10⁻⁵M and HC 0.4 ml/l. In the second stage, the addition of CA+FeEDTA and HC+FeEDTA increased SPAD units, chlorophyll and vitamin C contents and fruit quality improved. An increase content of Fe, Zn and Mn in leaves was presented with treatment CA+FeEDTA and HC+FeEDTA. Addition of CA+FeEDTA improved the oxidation-

reduction potential, pH and electrical conductivity of plant leachates, followed by HC+FeEDTA. Applications of CA and HC in the nutrient solution in combination with EDTA-type chelate improved the characteristics of the ferric nutrition of tomato plants developed in calcisol soil.

Key words: organic anions, humic complexes, FeEDDHA, FeEDTA, leachates.

INTRODUCTION

Iron is essential in growth and developed plants because participate in chlorophyll biosynthesis, e^- transport enzymatic process among others process (Briat *et al.*, 2015). A deficiency this ion in the plant induces interveinal yellowing of young leaves, leaf necrosis, limited growth and considerable reduction in yield (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2014).

To access the Fe from the soil and supply their demand the plants present two strategies: I and II, in the strategy I protons and organic acids are excreted into the rhizosphere inducing their acidification allowing Fe^{3+} to be reduced to Fe^{2+} by the enzyme iron chelate reductase, finally Fe^{2+} or Fe^{2+} -organic acid absorbed by a specific transport into the interior root cell (Brumbarova *et al.*, 2015). In the strategy II the Fe^{3+} binds to phytosiderophores (mainly deoximuginic acid) and is absorbed by a specific root canal (Nozoye *et al.*, 2014).

In calcisol (calcareous) soils present high pH, high levels of free $CO_3^{=}$ and HCO_3^- , elevated electrical conductivity (Arizmendi *et al.*, 2011) and oxidant redox conditions, the Fe is in forms little assimilable by the plants (silicates of ferromagnesium, hydroxides or oxides of iron) (Schmidt, 2003), the same authors indicate that these soils present low availability of P, Mn, Cu and Zn. Ferric fertilizers ($FeSO_4$) or synthetic chelates (Márquez-Quiroz *et al.*, 2015) i.e FeEDDHA, FeEDTA y FeDTPA, are used to manage fertility in these soils, however a lot of these salts and chelates are lost by leaching, adsorption or fixation on the soil (Ylivainio, 2010).

Exudation of organic acids is a mechanism that plants use to access Fe present in the soil, so that exogenous application of these acids can induce positive changes in the

acquisition of Fe in the plants developed on alkaline soils (Sánchez-Rodríguez, *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2015; Rengel, 2015). In this sense Ström *et al.* (2005) mentioned that the increase in the availability of nutrients by action of organic acids is due to a reaction between the cations present in the soil with the organic anion generating soluble complexes, besides inducing the dissolution of the insoluble forms (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2014) thanks to their functional groups (Khaled and Fawy, 2011).

The use of organic acids is reported by Chatterjee *et al.* (2015) who applied citric acid on alfisol, vertisol and inceptisol soils found a greater release of iron and phosphorus. Similarly the application of salicylic acid increased the concentration of iron in *Arachis hypogaea* L. (Kong *et al.*, 2015). On the other hand a mixture of organic acids (citric, oxalic, and malic) corrected the iron chlorosis of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivated on calcareous soil, increasing iron content and chlorophyll in leaf tissue, too (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2014). On the other hand the use of humic substances (humic and fulvic acids) induce changes in the extraction and distribution of Fe in root of cucumber (Mora *et al.*, 2010). Therefore the aim of the present work was to know the response of the added organic acids in fertilizer solution plus an iron chelate on the ferric nutrition of tomato plants developed on calcisol soil.

MATERIALS AND METHODS

The present study was carried out at the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (Saltillo, Coahuila) in a greenhouse with polyethylene cover, with 70% natural irradiance, a temperature range of 20-35°C, 50-60% relative humidity and CO₂ content of 430 ppm, proximally. It was carried out two stages for get the aim:

Stage 1. Preliminary study to determine the better concentrations of organic acids and a ferric chelate in ferric nutrition of tomato plants.

Transplantation was performed using seedlings cv. Rio Grande (Crow Seed) saladette kind in black polyethylene containers with 2 l of calcisol soil (pH= 8.5, 0.2% organic material and with an availability mineral concentration of 5 ppm of N-NO₃, 9 ppm of P,

285 ppm of K, 546 ppm of Mg, 3253 ppm of Ca, 42 ppm of Na, 10 ppm of S, 0.1 ppm of Zn, 2 ppm of Mn, 0.6 ppm of Cu, 0.8 ppm of B and 5 ppm of Fe).

Steiner nutrient solution was used (Steiner, 1961) with a targeted irrigation, we were used the following fertilizers in the nutrient solution: Ca (NO₃)₂•4H₂O (1.06g/l), MgSO₄ (0.487 g/l), KNO₃ (0.071 g/l), K₂SO₄ (0.347 g/l), KH₂PO₄ (0.211 g/l), the microelements of the nutrient solution were applied in the ionic form from a mother solution H₃BO₃ (2.86 g/l), MnSO₄•H₂O (2.15 g/l), ZnSO₄•7H₂O (0.39 g/l), CuSO₄•5H₂O (0.078 g/l), Na₂MoO₄•5H₂O (0.09 mg/l), except the iron which was applied as a chelate (at 3 mg/l). pH was adjusted with H₂SO₄ at 6.3, and electrical conductivity was ≈2.5 mS/m.

Treatments, were prepared in Steiner's nutrient solution, and consisted in different concentrations of citric acid (CA: 10⁻², 10⁻⁴ y 10⁻⁶ M), oxalic acid (OA: 10⁻², 10⁻⁴ y 10⁻⁶ M), salicylic acid (SA: 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ M) and humic complexes (HC: 0.2, 0.3 y 0.4 ml/l) where Fe was applied as EDDHA-type chelate. As well as control treatments FeEDTA and FeEDDHA, plus a control treatment without application of iron (for a total of fifteen treatments) were used. Treatments applications started immediately after transplantation through the irrigation system and continued all duration of the experiment, except the HC that were applied weekly. For determinate the impact of combination of the organic acids and the chelate were measurement next variables:

Leaves determinations.

On the physiologically mature leaf SPAD units were quantified with SPAD Konica Minolta 502 meter. Similarly total chlorophyll and total pheophytin content were determined according to Vernon (1960). Also vitamin C content was determined by the titration method with 2, 6-dichlorophenolindofenol (Padayatt *et al.*, 2001), the antioxidant capacity was quantified using the radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) modified technique cited by Guil-Guerrero and Reboloso-Fuentes (2009); briefly in a eppendorf plate a reaction mixture was taken by taking 240 µL of DPPH (0.1mM) and 10 µL of enzymatic extract (obtained by dissolving 250 mg of lyophilized leaf tissue in 25 ml of methanol, shaken at 150 rpm for 30 minutes) was incubated at

room temperature for 30 minutes and after the absorbance was measured at 540 nm in BioTek ELx8008 plate reader. Finally, the total content Fe was quantified on leaf tissue previously dehydrated and subjected to acid digestion with HNO₃:H₂O₂ (AOAC, 1990) using a plasma emission spectrophotometer (ICP-plasma).

Agronomic variables.

It was determine height plant, number of leaves, stem diameter, number of floral cluster, number of fruits and production of plant. Similarly the plants were collected, weighted fresh and dried in a dehydrating oven at 80°C for 72 h to determine the dry biomass (leaves plus stems).

Stage 2. Study of comparison between the better concentrations of organic acids in ferric nutrition of tomato plants.

Once selected the better concentration of each organic acid were compared to each other to determine the effect of these acids and a Fe-chelate on the ferric nutrition of tomato plants developed on calcisol soil. In this stage the transplantation was performed using seedlings cv. Rio Fuego (Crow Seed) saladette kind in black polyethylene containers with 9 l of calcisol soil. For this stage iron added in the EDTA-type chelate, derived from the results of stage 1. Variables considered for the evaluation effect of the treatments were leaves determinations, agronomic variables (described in stage 1) in addition to the following:

Leachates.

Collected 100 mL of leachates of the container and was measured *in situ* the oxidation-reduction potential and pH with potentiometer (HI 2211 Hanna Instruments), electrical conductivity with potentiometer (HI 98130 Hanna Instruments), while that the carbonates and bicarbonates content were quantified according to Nag and Gupta (2014).

Quality fruit.

The variables for fruit quality were determined in fully ripe tomato fruit, tomatoes with more than 90% of surface in red color (USDA, 1997) were harvested, and on the pulp were quantified: percentage soluble solids using a manual refractometer (Atago ATC1E), electrical conductivity with potentiometer (HI 98130 Hanna Instruments), pH and oxidation-reduction potential with potentiometer (HI 2211 Hanna Instruments). The titratable acidity (% citric acid) was quantified taking 10 ml of pulp, to which 2 drops of phenolphthalein (1%) were added and titrated with NaOH 0.1 N (AOAC, 1990). The vitamin C content was determined using the titration method with 2, 6-dichlorophenolindofenol (Padayatt *et al.*, 2001). Finally, the fruit lycopene content was quantified using the methodology cited by Fish *et al.* (2002).

In both stages the experiment was completely randomized design with eight replicates per treatment, the experimental unit was a one plant by container. Data of the first stage were analyzed one-way ANOVA and a multiple means comparison test using the Fisher Least Square Difference (LSD) with the InfoStat software (Balzarini *et al.*, 2008).

SPAD units and leachates data of the second stage were analyzed using a repeated-measures multivariate analysis of variance (RM-MANVA) following by multiple means comparison tests using Fisher Least Square Difference (LSD) with the STATISTICS 7.0 software (Hill and Lewicki, 2007). The remaining variables of second stage were analyzed one-way ANOVA and a multiple means comparison test using the Fisher Least Square Difference (LSD) with the InfoStat software.

RESULTS

Stage 1. Preliminary study to determine the better concentrations of organic acids and a ferric chelate in ferric nutrition of tomato plants.

There were statistical differences ($P \leq 0.05$) in all the agronomic variables and leaves determinations. Among the different concentrations of citric acid the treatment at 10^{-4} M induced a better response in the agronomic variables as well the higher leaves vitamin C content and an optimal content of total Fe in leaf. The different concentrations of oxalic acid induced a leaf content Fe lower than presented in the T0. However, OA at 10^{-4} M presented higher content chlorophyll and pheophytin, as well a height plant. Salicylic acid at 10^{-5} M induced a higher vitamin C and Fe leaf content, as well a higher yield per plant and a higher accumulation of fresh and dry biomass among the different salicylic acid concentrations.

Finally, the application of HC 0.4 ml/l improved SPAD units, pheophytin and vitamin C content, also induced an increase of stem diameter fresh and dry biomass with respect to the different concentrations studied. The different iron chelates-type was behaved statistically very similar to each other in all variables, except SPAD units and pheophytin content (Table 1 and 2).

Table 1

Table 2

As it was observed in Table 1 and 2 treatments that showed the best results in the variables mentioned and that were selected for the second stage were: CA 10^{-4} M, OA 10^{-4} M, SA 10^{-5} M and HC 0.4 ml/l. Selected the EDTA-type chelate for the stage 2 was considered, derived from statistically similar behavior among this chelate with the EDDHA-type chelate. In addition, chelate EDDHA-type induced values >150 ppm in the content of iron in leaf while EDTA-type chelate induced values <150 ppm.

Stage 2. Study of comparison between the better concentrations of organic acids in ferric nutrition of tomato plants.

Leaves determinations.

SPAD units. According to the RM-MANVA, there were statistically significant differences ($P \leq 0.01$) in the SPAD units (Figure 1). There was a 50% reduction in the readings under T0 treatment. All treatments showed a very similar dynamic, at 28 and

57 days after transplant there was a decrease of this variable, the CA showing higher values steadily during all measurements.

Figure 1

Chlorophyll, pheophytin and vitamin C content and antioxidant activity DPPH in leaves. There were statistically significant differences ($P \leq 0.05$) in the chlorophyll, pheophytin and vitamin C content. Plants corresponding at T0 showed a considerable reduction in the chlorophyll a, b and total content (-20%, -55% y -35%, respectively) compared with control treatments. Addition of CA, OA and HC increase the chlorophyll content compared with control treatments (FeEDDHA and FeEDTA).

OA treatment showed an increase of 31, 150 and 67% the chlorophyll a, b and total content, respectively, compared to T0 treatment. Similarly response was presented in the pheophytin content, where by applying HC showed an increase of 177% in the pheophytin a content (compared to T0 treatment), while the pheophytin b and total content showed an increase of 377 and 242% under FeEDDHA control treatment with respect to T0 (Table 3).

In the case of vitamin C content, plants developed on the FeEDDHA control treatment, HC and CA showed a higher accumulation of this antioxidant, while SA treatment showed similar vitamin C content to the T0. There were no differences significantly in DPPH antioxidant capacity, but appreciated increase of 21 and 24% on FeEDTA control treatment and SA treatment, respectively (Table 3).

Table 3

Mineral content. At 76 days after transplant (DAT) only significantly difference was observed in the Fe, Zn and Mn content, application of 0.4 ml/l of HC induced higher values in Zn and Mn concentrations, following by the inclusion of CA. Organic acids and control treatments increased P_2O_5 , K_2O , N, Fe, Zn, Mn and B content in foliar tissues, compared to the T0. With exception of P_2O_5 , Fe and B inclusion of organic acids showed higher values than those observed in control treatment (Figure 2).

The Fe of foliar tissue of plants developed without application of iron and under the OA treatment showed the lowest concentrations (42.0 and 49.8 ppm, respectively). Besides the CA, SA, HC, FeEDDHA and FeEDTA treatments presented values higher than those shown by T0, the FeEDTA control treatment presented the highest

concentration of Fe inducing an increase of up to 132%, followed by HC and SA treatments which increased Fe content by 121 and 119% compared to T0.

Figure 2

Leachates.

According of the RM-MANVA there were highly statistically significant differences ($P \leq 0.05$) in the variables determined in leachates and, according of the means comparison the addition CA showed lowest values of the oxidation-reduction potential and pH, besides increased electrical conductivity followed of the humic complexes and EDTA-type chelate.

Oxidation-reduction potential. It was appreciated a very marked and similarly dynamic among treatments in the behavior of the ORP, at 42 DAT the lowest values were presented in leachates, CA treatment showed lowest values of ORP (57.03 mV). During three subsequent samplings a gradual increase in values (>100 mV) was observed, application of HC induced lower values at 70 and 84 DAT (131.2 mV and 181 mV, respectively). For the last sampling application of treatments increase 6% the ORP values compared with the T0 (Figure 3).

pH. At 28 DAT the pH of leachates oscillated in 8.3 (except CA that showed a pH of 8.5), followed of a paulatine reduction under all treatments until 98, it were only observed that the OA and FeEDDHA treatments showed superiors values to the T0 at 84 DAT. Application of CA produced a consistent way a higher reduction of leachates pH (until 1.6 units), which could be result of the ability of the CA to deproton to a greater extent than the other organic acids applied.

Electrical conductivity. A highly changing dynamic was observed in this variable throughout samplings (Figure 3). Only addition of CA showed a more constant electrical conductivity (≈ 3.5 mS cm^{-1}), followed by the OA and FeEDDHA control treatment which showed a very marked decrease at 84 DAT, similarly EC in leachates

where was applied HC and FeEDTA treatments presented a decrease in the second sampling to stabilized later. For the last sampling (98 DAT) all treatments increased the EC respect to the T0 by up to 31%, which may be consequence of an accumulation of mineral salts in the soil as a consequence of a greater availability of nutrients.

Carbonates (CO_3^{2-}). CO_3^{2-} content increase in leachates until at 84 DAT in most of treatments, showed a decrease in the sampling last. T0 treatment showed highest values during the crop cycle, only being overcome with CA and SA addition (at 28 DAT), FeEDDHA (at 70 DAT) and OA treatments (84 DAT). Inclusion of HC and OA (except to the 84 DAT) showed lowest values in different readings.

Bicarbonates (HCO_3^-). During first two samplings a similar behavior was observed among treatments, while at 56 DAT the SA treatment induced a lower HCO_3^- content, finally at 84 and 98 DAT there was an increase in this variable (except FeEDDHA treatment), similarly observed at 98 DAT addition of organic acids and FeEDTA control treatment increased the bicarbonates content in leachates, in major proportion under OA and HC treatments.

Figure 3

Agronomic variables.

All variables showed statistically significant differences ($P \leq 0.05$), the means comparison showed that the application of different organic acids there were similarly to control treatments (FeEDDHA and FeEDTA), only showed an increase in the number of fruit per plant under CA treatment (Table 4).

Table 4

Quality fruit.

Only were presented statistically significant differences ($P \leq 0.05$) in the oxidation-reduction potential, titratable acidity, vitamin C and fruit lycopene content (Table 5). In

the case of ORP all treatments increased this variable respect to the T0, and up to 25 mV under application of FeEDDHA control treatment. Titratable acidity increased by 71% under SA and HC treatments compared to T0.

Vitamin C content showed a major accumulation of this antioxidant in fruits developed in plants grown under iron deficiency, only CA treatment induced an increase in this variable compared to the FeEDTA control treatment. While that the fruit lycopene content was showed a considerable decreased in content of this antioxidant in fruits of plants developed under different treatments, the lowest concentration of lycopene was observed in the FeEDDHA control treatment and with addition of CA.

Table 5

DISCUSSION

SPAD units. The increment shown with CA and OA seem to be homologous with that cited by Sánchez-Rodríguez *et al.* (2014), who applying a mixture of organic acids (citric and oxalic acid) in combination with P under poor soils Fe report an increase in the SPAD units of chickpea plants.

Chlorophyll content in leaves. The decrease in chlorophyll content found in this work (T0 treatment) could be derivative of alterations in synthesis of this pigment by deficit of iron (Briat *et al.*, 2015). On the other hand the increment of chlorophyll content as consequence of addition CA, OA and HC in the nutrient solution suggests that the functional groups that shape them (Khaled and Fawy, 2011) improve the behavior the FeEDTA-type chelate which induces a greater efficiency in the metabolism of iron. Sánchez-Rodríguez *et al.* (2014) cited an increase of the chlorophyll content in *Cicer arietinum* L. applying a mixture of citric acid, oxalic acid and phosphorus, which coincides with the responses obtained here. Similarly Kong *et al.* (2015) cited an increase in chlorophyll a, b and a+b content applying salicylic acid or salicylic acid + FeEDTA about *Arachis hypogaea* L.

Mineral content. The solubilizing capacity of insoluble complex present in soil by organic acids it is due to their functional groups (Khaled and Fawy, 2011) could have originate availability of nutrients (Yong-liang *et al.*, 2002; Rengel, 2015) in this case P_2O_5 , K_2O , N, Fe, Zn, Mn and B inducing this way an increase in foliar concentration. The Fe of foliar tissue of plants developed without application of iron and under the OA treatment plus FeEDTA showed the lowest concentrations, these values are below the minimum content of Fe recommending in tomato leaf tissue that is 60 mg Fe kg^{-1} dry biomass (Atherton and Rudish, 1986). EDTA-type ferric chelate was similarly effective in promoting Fe absorption in respect of EDDHA-type chelate, which contrasts with that found by Ylivainio (2010) who reported that the EDDHA ligand was more effective in maintaining the Fe soluble form in water form in calcareous soil compared to EDTA-type chelate. Likewise Márquez-Quiroz *et al.* (2015) reported that application of Fe-EDDHA ($50 \mu\text{M/l}$) shown the major iron concentration in the seed of cowpea bean.

Favorable response to application of SA is similar with cited by Kong *et al.* (2015) who applied SA at higher concentration (0.2 mM) reported an increase in the Fe content in leaves of peanut plants developed in Fe-deficiency solution, same authors found that the combination SA+Fe^{III}EDTA showed a concentration of iron lower that observed with the SA addition, which does not agree with was found in this work since the combination showed values statistically similarly to those under EDTA-type chelate.

According to Redel *et al.* (2016) iron plays an important role in the accumulation of recalcitrant P in the soil andisol, this assertion could explain to increase in P_2O_5 content of foliar tissue of tomato plants as a response to the addition of Fe on calcareous soil (in greater proportion under the treatment HC+FeEDTA and with the control FeEDTA) by inducing a greater availability of this nutrient.

Leachates.

Oxidation-reduction potential. If we consider that a low ORP values in the soil pore water induced high concentrations of Fe²⁺ (Frohne *et al.*, 2011) it's could be generated optimum concentrations of this ion in the leaf tissue, readings of the oxidation-reduction potential performed in leachates doesn't seem this follow trend,

since ORP values was higher under all treatments (+180 and +200 mV, at 70 and 84 DAT), this reflected higher concentration of Fe than T0 (Figure 5) which at the same time presented lower ORP values.

pH. Acidification of leachates could be indirectly an increase in the mobilization of micronutrients in the rhizosphere of the alkaline soil (Rengel, 2015). The decrease of pH of leachates observed under all treatments of organic acids differs with reported by Sánchez-Rodríguez *et al.* (2014) who mentioned an increase of 0.3 unit's pH in the soil solution when applied an organic acids mixture (citric, oxalic, and malic acid to 10 mM) in *Cicer arietinum* L. developed in calcareous soil poor of iron. The application of CA produced a consistent way a higher reduction of leachates pH which could be result of the ability of the CA to deproton to a greater extent than the other organic acids applied, derived from its derived from its properties (Rengel, 2015) as are its three carboxylic groups.

Electrical conductivity. Variation in the dynamic of this variable could be due to the irregular washing of mineral salts presents in the container and the other products of the reaction in the soil (Orndorff *et al.*, 2010) caused by the addition of treatments, besides of leaching fractions that were present, and the environmental conditions (Torres *et al.*, 2010). Increase of the EC where organic acids were added could have originated to the reactions among different organic anions and the soils components (Ström *et al.*, 2005; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2014), whereas in the case of increase of this variable in FeEDDHA treatment could be a consequence of loss and/or leaching of this chelate as reported by Arizmendi *et al.* (2011).

Carbonates ($CO_3^{=}$). The response observed under OA treatment can be result of its anion (oxalate) tends to precipitate easily in Ca^{2+} presence (Ström *et al.*, 2001), which could drift in a reduction of the active carbonates content presents in the calcareous soil since oxalic acid excretion leads to $CaCO_3$ dissolution and the precipitation of oxalate-Ca in the plant's root zone (Moradi *et al.*, 2012), whereas other organic acids (i.e citric

and malic acid) are rapidly biodegraded in calcareous soils (Ström *et al.*, 2001) so would not be able to dissolve carbonates present in this soil type.

Bicarbonates (HCO_3^-). The increase in the HCO_3^- content in leachates could indicate the dissolution of the same in the soil volume used derived from the chemical groups of organic acids (Khaled and Fawy, 2011), which would lessen the possible effects of bicarbonates on the iron nutrition on plants grown on calcareous soils, such as reduced nutrient availability and the vegetative growth (Briat *et al.*, 2015).

Agronomic variables.

Reduction in the agronomic variables under without iron treatment could be derivate an alterations in the photosynthetic process (Briat *et al.*, 2015). Favorable responses to the addition of CA is similarly with cited by Ehsan *et al.* (2014) who applied concentration 2.5 mM of CA improved fresh and dry weight of root, stem and leaves of *Brassica napus* L.

Quality fruit.

Considering that the ripening fruit causes a loos in value acidity (Mujtaba and Masud, 2014), high values found with SA and HC could induce a greater anaquel life. Response of fruit lycopene content of T0 treatment could be a consequence of a higher ripening rate (Nour *et al.*, 2013) derivate of stress by iron deficiency. When we comparing the observed values with reported by Nour *et al.* (2013) who developed different cultivar tomato in cambic chernozems soil, it can be seen that total soluble solids, titratable acidity, vitamin C and fruit lycopene content are within ranges reported by these authors.

CONCLUSIONS

A significantly higher behavior was presented with the concentrations 10^{-4} M AC, 10^{-4} M AO, 10^{-5} M AS and the application of 0.4 ml/l of CH weekly plus FeEDTA. The treatments CA+FeEDTA and the application of HC+FeEDTA increased the SPAD units, chlorophylls content, vitamin C, Fe, Zn and Mn content in leaf, besides improving the quality of the fruits. Likewise, these treatments reduced the ORP and pH of leachate and increased EC. EDTA-type ferric chelate behaved statistically similar to EDDHA and the combination with the different organic acids improved the studied variables.

ACKNOWLEDGEMENTS

Author Pérez-Labrada thanks CONACYT and Arysta LifeScience for the financial support.

REFERENCES

- Arizmendi, G.N., Rivera, O.P., De la Cruz, S.F., Castro, M.B., De la Garza, R.F. 2011.** Leaching of Chelated Iron in Calcareous Soils. *TERRA Latinoamericana* 29(3), 231-237.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990.** Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed. Arlington, Virginia, USA. pp. 384.
- Atherton J.G., Rudisch J. 1986.** The tomato crop. Chapman and Hall. London, New York, 281-334.
- Balzarini, M., Di Rienzo, A., Cazanoves, F., González, I., Tablada, M., Guzmán, W., Robledo, W. 2008.** InfoStat software estadístico InfoStat versión 2008, Manual de usuario, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Briat, J.F., Dubos, C., Gaymard, F. 2015.** Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends in Plant Science*, 20, 33-40.
- Brumbarova, T., Bauer, P., & Ivanov, R. 2015.** Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake. *Trends in Plant Science*, 20(2): 124-133.

- Chatterjee, D., Datta, S.C., Manjaiah, K.M. 2015.** Effect of citric acid treatment on release of phosphorus, aluminium and iron from three dissimilar soils of India. *Arch Agron Soil Sc.*, 61, 105-117.
- Ehsan, S., Ali, S., Noureen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W., Rizwan, M. 2014.** Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotox Environ Safe*, 106, 164-172.
- Fish, W.W., Perkins-Veazie, P., Collins, J.J. 2002.** A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *J. Food Composit. Ann.* 15, 309-317.
- Frohne, T., Rinklebe, J., Diaz-Bone, R.A., Du Laing, G. 2011.** Controlled variation of redox conditions in a floodplain soil: Impact on metal mobilization and biomethylation of arsenic and antimony. *Geoderma* 160, 414-424.
- Guil-Guerrero, J.L., Reboloso-Fuentes, M.M. 2009.** Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *J. Food Composition and Analysis*, 22(2), 123-129.
- Hill, T., P. Lewicki. 2007.** STATISTICS: Methods and Applications. StatSoft Inc. Tulsa, OK.
- Khaled, H., Fawy, H.A. 2011.** Effect of Different Levels of Humic Acids on the Nutrient Content, Plant Growth, and Soil Properties under Conditions of Salinity. *Soil & Water Res.*, 6, 21-29.
- Kong, J., Dong, Y., Zhang, X., Wang, Q., Xu, L., Liu, S., Hou, J., Fan, Z. 2015.** Effects of Exogenous Salicylic Acid on Physiological Characteristics of Peanut Seedlings under Iron-Deficiency Stress. *J. Plant Nutrition* 38, 127-144
- Márquez-Quiroz, C., De-la-Cruz-Lázaro, E., Osorio-Osorio, R., & Sánchez-Chávez, E. 2015.** Biofortification of cowpea beans with iron: iron's influence on mineral content and yield. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 15(4): 839-847.
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A.M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M., García-Mina, J.M. 2010:** Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *J Plant Physiol.* 167(8), 633-642.

- Moradi, N., Sadaghiani, M.R., Sepehr, E., MandoulakanI, B.A. 2012.** Effects of low-molecular-weight organic acids on phosphorus sorption characteristics in some calcareous soils. *Turk. J. Agric. For.*, 36(4), 459-468.
- Mujtaba, A., Masud, T. (2014.** Enhancing post harvest storage life of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Rio Grandi using calcium chloride. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 14(2), 143-149.
- Nag, A., Gupta, H. 2014.** Physicochemical analysis of some water ponds in and around Santiniketan, West Bengal, India. *International J Environmental Sciences*, 4(5), 676-682.
- Nour, V., Trandafir, I., Ionica, M.E. 2013.** Antioxidant compounds, mineral content and antioxidant activity of several tomato cultivars grown in Southwestern Romania. *Not Bot Horti Agrobo*, 41, 136-142.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Bashir, K., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. 2014.** Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXXf or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice. *The Plant Journal*, 77(2), 246-260.
- Orndorff, Z.W., Daniels, W.L., Beck, M., Eick, M.J. 2010.** Leaching potentials of coal spoil and refuse: Acid-base interactions and electrical conductivity. p. 736-766. In: R.I. Barnhisel (ed.) *Proc. Am. Soc. Min. Reclam.*, Pittsburgh, PA. 5-11 Jun. 2010. ASMR, Lexington, KY.
- Padayatt, S.J., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, P.K., Song, J., Koh, W.S., Levine, M. 2001.** Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. pp. 117-145. In: E. Cadenas and L. Packer (eds.). *Handbook of antioxidants*. CRC Press. Washington, DC, USA.
- Redel, Y., Cartes, P., Demanet, R., Velásquez, G., Poblete-Grant, P., Bol, R., & Mora, M. L. 2016.** Assessment of phosphorus status influenced by Al and Fe compounds in volcanic grassland soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 16(2): 490-506.
- Rengel, Z. 2015.** Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 15(2): 397-409.

- Sánchez-Rodríguez, A.R.; del Campillo, M.C.; Torrent, J., Jones, D.L. 2014.** Organic acids alleviate iron chlorosis in chickpea grown on two p-fertilized soils. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 14(2): 292-303.
- Schmidt, W. 2003.** Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *TRENDS Plant Science*, 8(4), 188-193.
- Steiner, A.A. 1961.** A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*. 15, 134-154.
- Ström, L., Owen, A.G., Godbold, D.L. and Jones, D.L. 2005.** Organic acid behaviour in a calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biol Biochem*, 37(11), 2046-2054.
- Ström, L., Owen, A.G., Godbold, D.L., Jones, D.L. 2001.** Organic acid behavior in calcareous soil: sorption and biodegradation rates. *Soil Biol Biochem*. 33, 2125-2133.
- Torres, A.P., Mickelbart, M.V., Lopez, R.G. 2010.** Leachate volume effects on pH and electrical conductivity measurements in containers obtained using the pour-through method. *HortTechnology*, 20(3), 608-611.
- USDA. 1997.** United States Department of Agriculture. Agricultural marketing Service. United States standards for grades of fresh tomatoes.
- Vernon, P. 1960,** Spectrophotometric Determinations of Chlorophylls and Pheophtins in Plantas Extracts. *Analytical Chemistry*, 32(9), 1144-1150.
- Ylivainio, K. 2010.** Effects of iron(III)chelates on the solubility of heavy metals in calcareous soils. *Environ. Pollut.*, 158(10), 3194-3200.
- Yong-liang, C., Yu-qiang, G., Shi-jie, H., Chun-jing, Z., Yu-mei, Z., Guo-ling, C. 2002.** Effect of root derived organic acids on the activation of nutrients in the rhizosphere soil. *J Forestry Research*, 13(2), 115-118.

Table 1. Means of leaves determinations of tomato plants grown on calcisol soil with different concentrations of organic acids.

Treatments	SPAD	TC	TP	VC	AC	Fe
CA 10 ⁻⁶ M	50.6 ab [‡]	19.2 de	29.4 cde	228.8 bcd	9.4 e	96.5 cdefg
CA 10 ⁻⁴ M	49.8 b	63.7 abc	30.9 cde	322.7 a	13.4 bcde	119.3 bcde
CA 10 ⁻² M	51.2 ab	80.6 a	45.3 bc	228.8 bcd	19.6 a	269.5 a
OA 10 ⁻⁶ M	52.8 a	31.0 cde	21.5 de	293.3 abc	11.9 cde	58.5 g
OA 10 ⁻⁴ M	52.1 a	77.1 ab	56.7 b	275.7 abc	11.8 cde	58.3 g
OA 10 ⁻² M	51.1 ab	46.3 abcde	29.7 cde	293.3 abc	11.1 de	56.0 g
SA 10 ⁻⁶ M	49.8 b	43.2 abcde	24.5 cde	193.6 de	17.5 ab	74.0 efg
SA 10 ⁻⁵ M	50.8 ab	34.4 cde	19.2 e	305.1 ab	15.4 abcd	120.0 bcde
SA 10 ⁻⁴ M	51.5 ab	63.5 abc	32.8 cde	187.7 de	16.6 abc	120.0 bcde
HC 0.2 ml/l	49.8 b	41.5 bcde	19.4 e	222.9 cd	10.4 de	84.0 defg
HC 0.3 ml/l	40.5 b	18.1 de	27.8 cde	217.1 cd	11.2 de	121.7 bcd
HC 0.4 ml/l	51.4 ab	28.8 cde	44.8 bc	234.7 bcd	12.2 cde	110.0 bcdef
FeEDDHA	50.7 ab	57.0 abc	16.2 e	217.1 cd	14.0 bcde	154.7 b
FeEDTA	45.1 c	48.7 abcd	82.7 a	258.1 abcd	11.2 de	131.5 bc
T0	27.5 d	10.2 e	42.5 bcd	129.1 e	14.4 bcde	69.3 fg

[‡]=Means with different letters within same column are significantly different (LSD, P≤0.05). C= total chlorophyll (µg·g⁻¹), F= total pheophytin (µg·g⁻¹), VC=vitamin C (mg 100 g FW⁻¹), AC= antioxidant capacity (DPPH· scavenging capacity %), Fe=total Fe in leaves (ppm).

Table 2. Means of agronomic variables of tomato plants grown on calcisol soil with different concentrations of organic acids.

Treatments	HP	NL	SD	NFC	NFP	PP	FWS	DWS
CA 10 ⁻⁶ M	126.1 bc [‡]	22.4 ab	12.3 bc	8.4 b	37.3 ab	2372.8 ab	767.4 abc	108.0 ab
CA 10 ⁻⁴ M	117.9 c	21.9 b	14.1 a	8.6 ab	38.5 ab	2389.3 ab	836.1 a	107.8 ab
CA 10 ⁻² M	93.4 d	16.6 c	11.4 cde	6.3 c	25.4 c	1125.4 d	249.5 f	43.2 e
OA 10 ⁻⁶ M	127.1 abc	22.4 ab	10.3 efg	9.5 ab	40.0 a	1917.6 c	735.1 abcd	100.8 abc
OA 10 ⁻⁴ M	140.3 a	22.8 ab	9.4 gh	9.8 ab	42.4 a	2170.6 bc	718.3 bcd	99.3 bc
OA 10 ⁻² M	125.3 bc	21.8 b	10.2 fgh	8.5 ab	39.8 ab	2189.3 bc	677.5 cd	96.9 bc
SA 10 ⁻⁶ M	133.0 ab	24.1 ab	10.3 efg	9.9 ab	43.9 a	2377.9 ab	793.9 ab	92.3 bc
SA 10 ⁻⁵ M	129.1 abc	25.0 a	10.8 def	9.9 ab	42.6 a	2678.9 a	817.3 ab	107.6 ab
SA 10 ⁻⁴ M	123.5 bc	24.5 ab	10.4 efg	9.9 ab	43.6 a	2071.5 bc	668.8 cd	86.4 c
HC 0.2 ml/l	132.1 ab	22.4 ab	10.9 def	10.1 a	40.6 a	1899.1 c	738.4 abcd	99.7 abc
HC 0.3 ml/l	127.4 abc	24.1 ab	10.5 efg	8.6 ab	35.6 ab	2033.9 bc	664.9 cd	91.3 bc
HC 0.4 ml/l	125.6 bc	23.4 ab	12.9 b	9.4 ab	40.0 a	1839.3 c	793.4 ab	117.9 a
FeEDDHA	123.3 bc	22.5 ab	10.3 efg	8.5 ab	36.4 ab	2148.7 bc	626.5 de	85.7 cd
FeEDTA	115.6 c	24.5 ab	11.7 cd	9.8 ab	31.1 bc	1809.8 c	546.9 e	68.0 d
T0	81.8 d	18.3 c	9.0 h	6.6 c	24.5 c	1089.1 d	322.2 f	48.5 e

[‡]=Means with different letters within same column are significantly different (LSD, P≤0.05). HP= height plant (cm), NL= number of leaves, SD= stem diameter (mm), NFC= number of floral cluster, NFP= number of fruits per plant, PP= production of plant (kg plant⁻¹), FWS= fresh weight shoot (g), DWS= dry weight shoot (g).

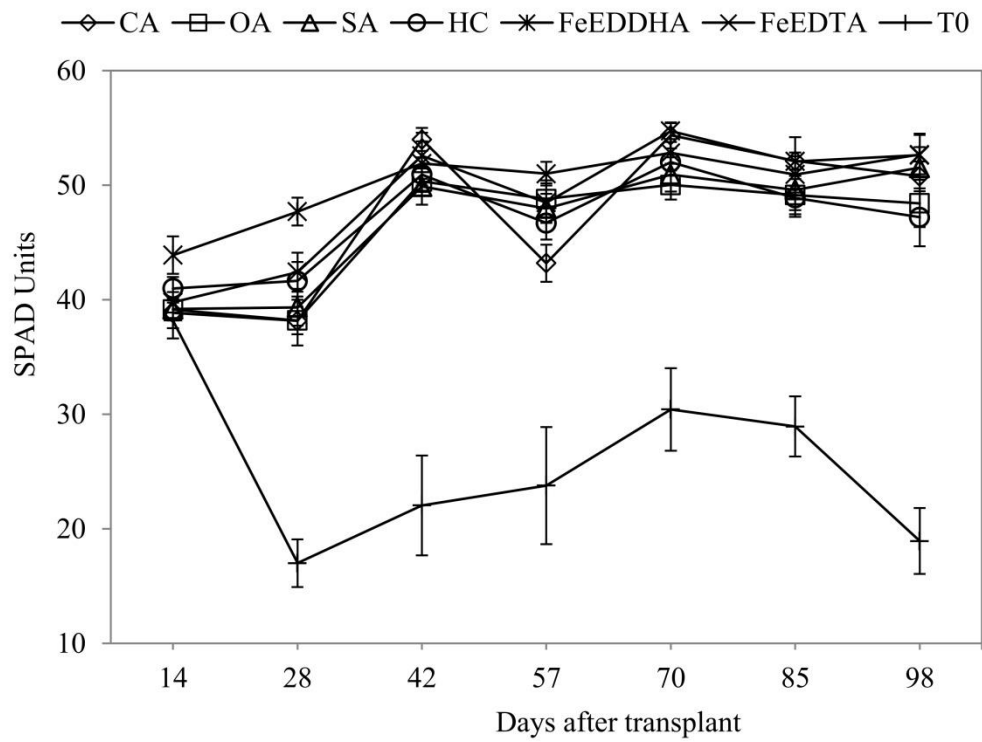


Figure 1. Dynamics of the SPAD units in leaves tomato plants grown on calcisol soil with different of organic acids.

Table 3. Means of chlorophyll, pheophytin, vitamin C content and antioxidant DPPH in leaves of tomato plants grown on calcisol soil with different organic acids.

Trat	Chlorophyll (mg g ⁻¹)			Pheophytin (mg g ⁻¹)			DPPH	VC
	a	b	total	a	b	total		
CA	88.3 a [‡]	66.8 a	155.1 a	44.3 a	40.2 ab	85.5 ab	14.0 a	123.2 ab
OA	90.0 a	73.8 a	163.8 a	44.1 a	32.8 b	77.8 b	14.3 a	114.4 c
SA	86.0 a	60.6 a	146.6 a	46.6 a	36.1 b	83.6 ab	16.3 a	108.5 c
HC	89.0 a	71.3 a	160.3 a	46.7 a	38.7 ab	86.5 ab	12.1 a	146.7 ab
FeEDDHA	87.6 a	63.4 a	151.0 a	46.5 a	49.0 a	96.5 a	10.9 a	152.5 a
FeEDTA	84.4 a	66.9 a	151.3 a	45.1 a	38.7 ab	84.8 ab	16.7 a	117.3 bc
T0	68.7 b	29.4 b	98.1 b	26.4 b	13.0 c	39.8 c	13.4 a	108.5 c

[‡]=Means with different letters within same column are significantly different (LSD, P≤0.05). Trat= treatments, DPPH= scavenging capacity (%), VC= vitamin C content (mg/100 g of fresh weight)

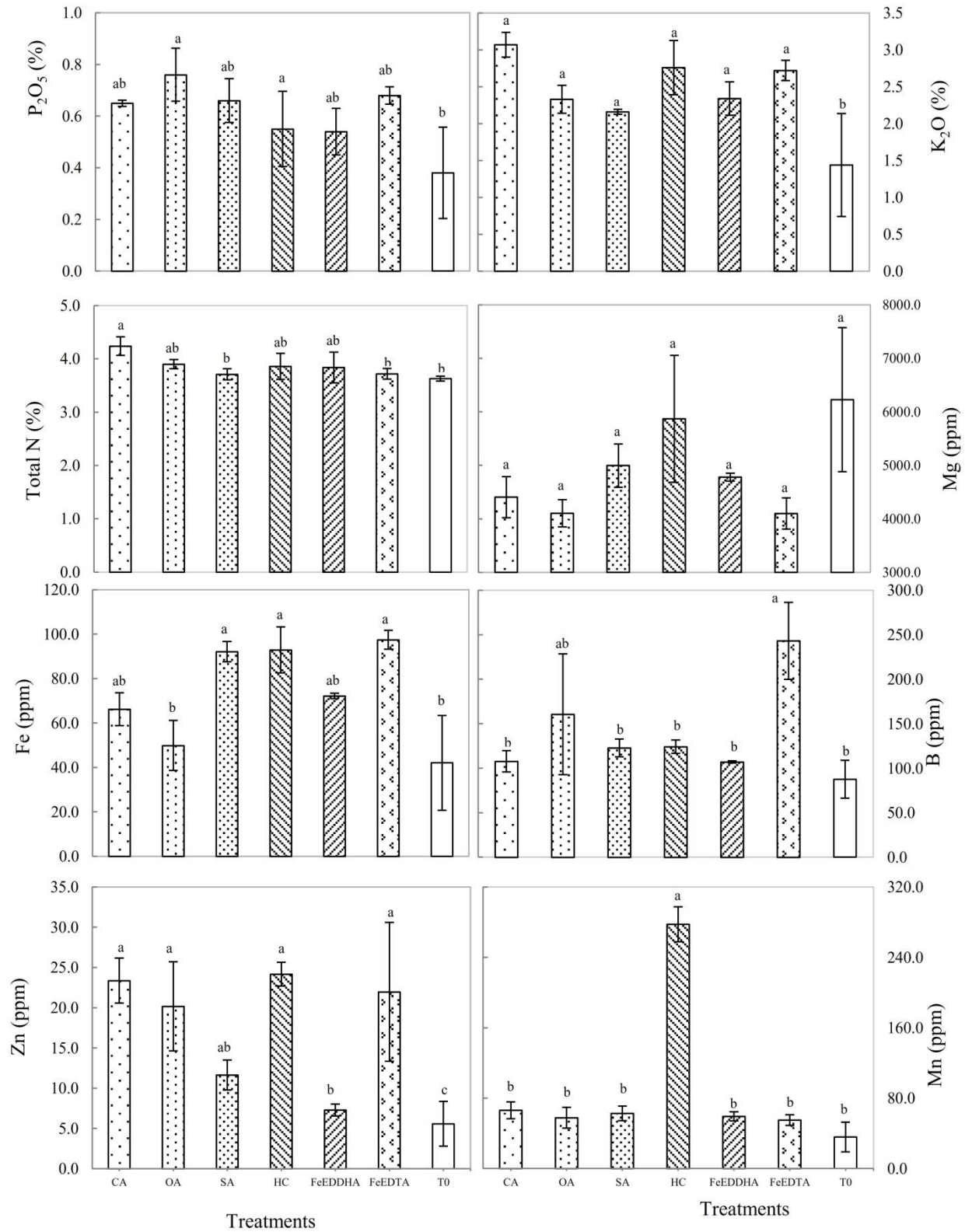


Figure 2. Mineral content in leaves tomato plants grown on calcisol soil with different of organic acids at 76 days after transplant.

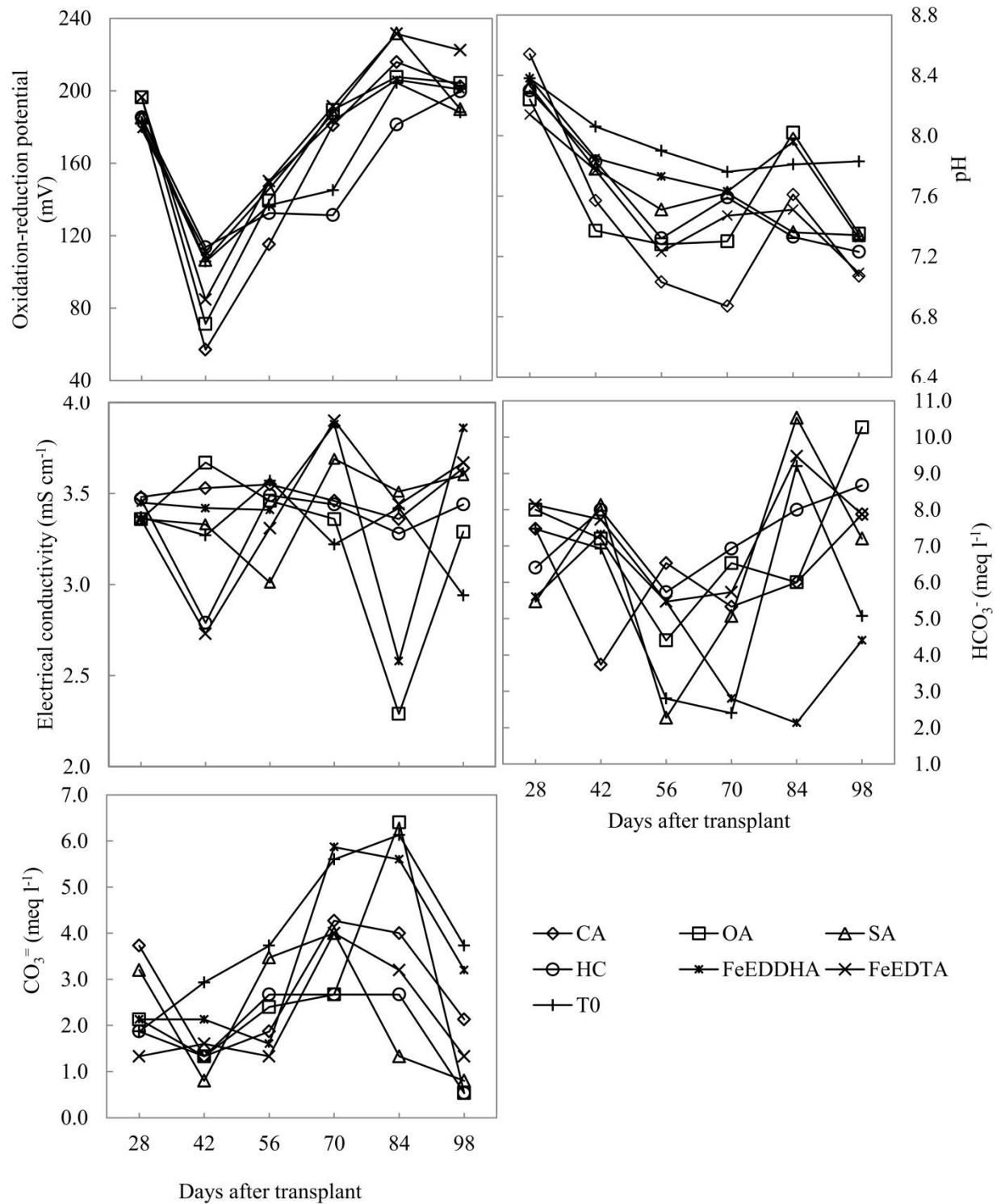


Figure 3. Dynamics of variables determined in leachates of plants grown on calcisol soil with different of organic acids.

Table 4. Means of agronomic variables of tomato plants grown on calcisol soil with different organic acids.

Treatments	HP	NL	SD	NFC	NFP	PP	FWS	DWS	ASC
CA	71.6 b [‡]	19.9 ab	11.5 b	10.1 a	30.9 a	1409.1 ab	295.9 b	68.4 b	345.1 a
OA	77.7 ab	17.7 bc	12.2 ab	9.2 a	23.22 ab	1074.2 abc	371.9 ab	75.6 ab	330.9 a
SA	83.4 ab	21.0 a	12.2 ab	9.4 a	19.9 b	913.1 bc	346.2 ab	71.5 b	348.2 a
HC	78.3 ab	18.4 ab	13.1 a	10.0 a	22.1 ab	797.6 c	379.7 ab	73.8 ab	326.1 a
FeEDDHA	78.8 ab	18.0 b	11.9 ab	9.3 a	27.9 ab	1392.1 ab	378.8 ab	79.0 ab	327.5 a
FeEDTA	89.1 a	20.3 ab	12.7 ab	10.6 a	28.8 ab	1615.1 a	412.6 a	90.2 a	341.5 a
T0	55.0 c	15.0 c	8.42 c	5.8 b	5.9 c	191.3 d	106.8 c	24.0 c	257.2 b

[‡]=Means with different letters within same column are significantly different (LSD, $P \leq 0.05$). CA=citric acid 10^{-4} M, OA=oxalic acid 10^{-4} M, SA=salicylic acid 10^{-5} M, HC=humic complex 0.4 ml/l weekly. HP= height plant (cm), NL= number of leaves, SD= stem diameter (mm), NFC= number of floral cluster, NFP= number of fruits per plant, PP= production of plant (kg planta^{-1}), FWS= fresh weight shoot (g), DWS= dry weight shoot (g), ASC= abaxial stomatal conductance ($\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$).

Table 5. Means of quality fruit variables of tomato plants grown on calcisol soil with different organic acids.

Treatments	ORP	EC	pH	PSS	TA	FVC	FLC
CA	72.06 a [‡]	2.31 ab	3.91 a	4.70 a	0.07 c	30.2 ab	2.85 d
OA	74.36 a	1.91 b	3.90 a	4.17 a	0.11 ab	24.9 bc	4.74 bc
SA	70.30 a	2.38 ab	3.93 a	4.36 a	0.12 a	13.2 d	4.06 bcd
HC	79.19 a	2.24 ab	3.93 a	4.19 a	0.12 a	21.1 c	4.92 b
FeEDDHA	81.14 a	2.56 a	3.88 a	4.78 a	0.10 abc	27.6 ab	2.65d
FeEDTA	69.42 a	2.24 ab	3.96 a	4.62 a	0.08 bc	24.1 bc	3.45 cd
T0	55.98 b	2.11 ab	3.94 a	4.14 a	0.07 c	32.9 a	6.94 a

[‡]=Means with different letters within same column are significantly different (LSD, $P \leq 0.05$). CA=citric acid 10^{-4} M, OA=oxalic acid 10^{-4} M, SA=salicylic acid 10^{-5} M, HC=humic complex 0.4 ml/l weekly. ORP= oxidation-reduction potential (mV), EC= electrical conductivity (mS cm^{-1}), PSS=percentage soluble solids ($^{\circ}\text{Brix}$), TA=titratable acidity (% of citric acid), FVC= fruit vitamin C content (mg/100 g of fresh weight), FLC= fruit lycopene content ($\mu\text{g mg}^{-1}$).

Organic acids increase iron content in a calcareous soil and its correlation with tomato plants growth

Fabián Pérez-Labrada^a; Adalberto Benavides-Mendoza^a; Antonio Juárez-Maldonado^b; Susana Solís-Gaona^c; Susana González-Morales^{d*}

^a Departamento de Horticultura, ^b Departamento de Botánica, ^d CONACYT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro No. 1923, Saltillo 25315, Coahuila, México.

^c Arysta Lifescience, Blvd. Jesús Valdés Sánchez No. 2369, Saltillo 25290, Coahuila, México.

* Corresponding author

E-mail addresses:

fabperlab@outlook.com (Pérez-Labrada, F.), abenmen@gmail.com (Benavides-Mendoza, A), juma841025@hotmail.com (Juárez-Maldonado, A), susana.solis@arysta.com (Solís-Gaona, S.), qfb_sgm@hotmail.com (González-Morales, S).

Abstract

The objective of this work was to determine the response of adding organic acids along with an iron chelate in the nutrient solution on the iron content in a calcareous soil and its correlation with the growth of tomato plants. Citric acid (CA), oxalic acid (OA), salicylic acid (SA) and humic complexes (HC) combined with a Fe Gluconate-EDTA (FeG-EDTA) ferric chelate were studied. The addition of HC+FeG-EDTA increased Fe^{2+} content by 39%, followed by OA+FeG-EDTA (29%), Fe^{3+} was reduced by $0.09 \mu\text{g g}^{-1}$ of dry soil with OA+FeG-EDTA. Total Fe increased 34 and 30% with SA+FeG-EDTA and HC+FeG-EDTA, respectively. With the treatment CA+FeG-EDTA the pH of the soil and leachates were reduced 0.02 and 0.5 units of pH, respectively, and increasing 0.7 mS m^{-1} of the electrical conductivity of the leachates. Chlorophylls (a, b and total) increased 47, 257 and 96%, respectively, with the application of HC+FeG-EDTA. Chlorophylls (a, b, and total) increased 47, 257, and 96%, respectively, with the application of HC+FeG-EDTA. The treatments CA+FeG-EDTA, SA+FeG-EDTA and HC+FeG-EDTA increased the variables stem diameter, plant height, number of leaves per plant, number of flower clusters per plant, total harvested fruits, fresh weight of plant aerial part and fruit production per plant. Spearman correlation was found ($p < 0.05$) between pH and total soil Fe ($\rho = 0.44$), leachate oxidation-potential reduction and total Fe ($\rho = -0.34$), leachate electrical conductivity with Fe^{2+} ($\rho = 0.21$), SPAD units with soil Fe^{2+} ($\rho = 0.38$) and chlorophyll content (a, b, and total) with soil Fe^{2+} and leachate pH ($\rho \approx 0.24$). The inclusion of organic acids with FeG-EDTA chelate on tomato plants grown on calcareous soil improved Fe content in soil as well as plant growth.

Key words: organic anions, humic complexes, chelates, leachates.

1. Introduction

Iron (Fe) is an essential transition metal in cell metabolism (Briat et al., 2015), Mori (1999) mentions that plants require between $\sim 10^{-4}$ - 10^{-8} M Fe^{3+} ions at the cellular level for optimal development, however, in calcareous soils, under pH 7.0 conditions, Fe is barely soluble, with a content of up to 10^{-17} M, resulting in a deficit condition manifested by interveinal chlorosis of young leaves and inadequate root growth (Rout and Sahoo, 2015). Calcareous soils (or calcisols) cover about $\approx 30\%$ of the agricultural area cultivated in the world and they are characterized by having a $\text{pH} > 7$, oxidizing conditions in the redox balance, high content of CO_3^{2-} and HCO_3^- and high electrical conductivity. Such conditions induce Fe deficiency in the plants developed in these soils (Zuo and Zhang, 2011; Colombo et al., 2014). Given these circumstances the plants developed several mechanisms that allow them to access this element, known as strategies I and II (Mori, 1999; Abadía et al., 2011). Plants with strategy I are characterized by the excretion of protons and low molecular weight compounds (mainly organic acids) into the rhizosphere for acidification (Ryan et al., 2014; Yeasmin et al., 2014), allowing the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} together with the enzyme iron chelate reductase (Lucena et al., 2007), Fe^{2+} or Fe^{2+} -organic acid is captured and absorbed by specific transporters towards the root (Barberon et al., 2014). In plants with strategy II Fe^{3+} binds to phytosiderophores and is absorbed by specific channels of high affinity uptake (Nozoye et al., 2014; Römheld and Schaaf, 2004).

In order to prevent and/or remedy iron deficiency in plants grown in calcareous soils, the most common practice is the use of synthetic chelates, whose primary characteristic is the increase of Fe concentration in the soil solution, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic acid) (EDDHA) are the most commonly used (Colombo et al., 2014; Covarrubias et al., 2014; Schenkeveld et al., 2014). However, due to the prevailing conditions in this type of soils, a considerable percentage of the chelate applied is leached and/or absorbed in the soil (Ylivainio, 2010; Arizmendi-Galicia *et al.*, 2011). In view of

this problem the use of organic acids can improve the availability of iron and/or optimize the efficiency of the synthetic chelates in calcareous soils thanks to the reaction between the cations of the soil with the organic anion, which induces the rupture of insoluble forms and generates bioavailable complexes (Ryan and Delhaize, 2001; Ström et al., 2005; Khaled and Fawy, 2011). In this context, Mora et al. (2010), Chen et al.(2014), Sánchez-Rodríguez et al. (2014), Chatterjee et al. (2015) y Kong et al. (2015) mention that the exogenous application of low and high molecular weight compounds (citric acid, oxalic acid, malic acid, salicylic acid and humic substances) to plants grown in different types of soil (calcareous, alfisols, vertisols, and inceptisols) increase and/or improve Fe absorption in plants. The combined use of synthetic iron chelates (EDTA) and organic acids (citric acid, oxalic acid, malic acid, salicylic acid) have been reported as chelating agents in phytoremediation of soils contaminated with Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn (Wu et al., 2003; Hsiao et al., 2007; Kaur et al., 2015; Guo et al., 2017; Singh et al., 2017) whereas in the present work was studied the effect of the combination of a ferric chelate synthesized with Gluconate-EDTA and organic acids on the availability of Fe in a calcareous soil and its impact on the growth of the plant.

Therefore, in the present work the inclusion of organic acids plus a ferric chelate in the fertilizer solution was studied in order to (i) quantify the iron content of a calcareous soil during the development of the crop and (ii) to determine the degree of correlation between Fe content and the variables determined in soil and leachate and the growth and production of tomato plants.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental design.

2.1.1. Study site.

The present work was carried out in a greenhouse (located in the facilities of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, Mexico) with polyethylene cover with 70% natural irradiance and 50-60% relative humidity. During the course of the experiment an average temperature of 32°C, 736.5 $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation and an average concentration of 430 ppm of CO_2 were presented. Tomato seedlings var. Rio Grande variety were used as plant material, which were transplanted (40 days after sowing) into black polyethylene containers with 9 L of previously analyzed calcareous soil (Table1).

A Steiner's solution (Steiner, 1961) at 100% was prepared with the characterized irrigation water (Table 1) to fertilize the plants from transplant to the end of the experiment. As source of macroelements were used $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.06 g L^{-1}), MgSO_4 (0.487 g L^{-1}), KNO_3 (0.071 g L^{-1}), K_2SO_4 (0.347 g L^{-1}), KH_2PO_4 (0.211 g L^{-1}) and microelements in ionic form (629.2 mg L^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (473.0 mg L^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (85.8 mg L^{-1}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (17.2 mg L^{-1}), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (19.8 mg L^{-1}), and also Fe (3 mg L^{-1}) applied as a chelate. The pH of the solution was adjusted to 6.3 with H_2SO_4 and an average electrical conductivity of $\approx 2.5 \text{ mS m}^{-1}$.

With the nutrient solution, seven treatments consisting of different organic acids were prepared: 1) 0.1 mM of CA, 2) 0.1 mM of OA, 3) 0.01 mM of SA, and 4) HC of 0.4 ml L^{-1} (properties in Table 1), iron was applied in all treatments as FeG-EDTA). Also, control treatments were used, 5) FeG-EDTA, 6) FeEDDHA, and 7) an absolute control without Fe in the nutrient solution (T0). The treatments were applied daily through a localized irrigation system, from the transplant to the end of the experiment, using a total solution volume per plant per day of 670 mL [1-28 days after transplantation (dat)], 1.4 L (29-63 dat), and 1.68 L (64-110 dat). The HC were applied weekly in the volume of irrigation corresponding to the dat.

2.2 Iron content in soil (Fe^{2+} , Fe^{3+} , and total Fe).

Four samplings (27, 49, 84, and 110 dat) were carried out and the Fe content was determined by modifying the techniques cited by Lovley and Phillips (1987) and Jeon et al. (2001); 100 mg of soil (extracted from the base of the plant stem and at 10 cm of depth from the container) were collected, slightly moistened with deionized water, 5 mL of HCl (0.5 M) added, and stirred intermittently for one hour, then centrifuged for 10 minutes at 6000 rpm, and the supernatant was extracted to determine Fe^{2+} and total Fe. The quantification of Fe^{2+} was carried out by taking 200 μL of the supernatant, adding 1 mL of 0.25% o-phenanthroline solution ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$), and 1 mL of sodium acetate buffer ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\cdot\text{Na}$, 10% a pH 4), this mixture was brought to a total volume of 10 ml with deionized water, vortexed and allowed to stand for 20 minutes, and the absorbance read at 510 nm in UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific Model G10S). Total Fe was quantified from 200 μL of the supernatant by adding 1 mL of $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0.25 M) and allowed to stand for one hour, later 1 mL of 0.25% o-phenanthroline solution and 1 mL of sodium acetate buffer were added, brought to a total volume of 10 ml with deionized water, vortexed and allowed to stand for 20 minutes, and the absorbance read at 510 nm in UV-Vis spectrophotometer.

The concentration of Fe^{2+} and total Fe in the extract obtained from the soil was calculated from the equation of a line of a standard curve of $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. On the other hand, the final concentration of Fe^{2+} and total Fe of the soil sample was determined with the equation: Fe concentration in soil ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil) = (extract concentration * extractive solution volume) / (g soil*moisture correction factor) (Fernández Linares et al., 2006). The concentration of Fe^{3+} was calculated from the subtraction of total Fe - Fe^{2+} .

2.3. Soil pH.

At 27, 49, 84, and 110 dat, 1 g of soil was collected at a depth of 10 cm from the container which was dehydrated and dissolved in 10 mL of distilled water, shaking for 1 hr, then allowed

to stand 10 minutes. Subsequently the pH was measured in the soil + water paste with a potentiometer (Hanna HI) (Hanlon and Bartos, 1993).

2.4. *Microbial soil respiration (MSR).*

The determination of MSR was carried out by modifying the technique cited by Álvarez-Solís and Anzueto-Martínez (2004), in which 25 g of soil (obtained at 27, 49, 84, and 110 dat extracted from the base of the plant stem and at 10 cm of depth from the container) were brought to 55% field capacity with distilled water and placed in a flask containing a vial with 5 mL of NaOH (1 N) and a filter paper strip, incubated at 28 ° C for 24 h. Finally the vial content was poured into a flask, 2 mL of BaCl₂ (2%) and phenolphthalein (1%) was added, and titrated with HCl (0.1 N). Microbial soil respiration was calculated according to Stotzky (1965).

2.5. *Leachate.*

During the second irrigation of the day, 100 mL of leachate was collected from the containers to which the oxidation-reduction potential (ORP) and pH was measured *in situ* with a potentiometer HI 2211 pH/ORP (Hanna Instruments), and electrical conductivity (EC) with a potentiometer HI 98130, whereas the content of carbonates (CO₃²⁻) and bicarbonates (HCO₃⁻) was quantified according to Nag and Gupta (2014). These measurements were made at 27, 49, and 84 dat.

2.6. *Chlorophyll content and SPAD units.*

At 27, 49, 84, and 110 dat on a physiologically mature leaf, the SPAD units were quantified with a Konica Minolta 502 meter and the chlorophyll content (Vernon, 1960; Munira et al., 2015).

2.7. *Growth and production variables.*

On tomato plants was measured stem diameter (SD), plant height (PH), number of leaves per plant (NL), number of flower clusters per plant (NFC), number of flowers per plant (NFP), number of mooring fruits per plant (NMF), and at the end of the experiment the total harvested fruits (THF), fruit production per plant (total of seven pickings) (Y) and fresh weight of plant aerial part (PFW) was measured.

2.8. Data analysis.

A completely randomized design with twenty replicates was used, the experimental unit consisted of one plant per container. The data were subjected to analysis of variance ($p \leq 0.05$) and means test according to Fisher's least significant difference (LSD) ($\alpha \leq 0.05$), in addition a Spearman's rank correlation analysis was carried ($p \leq 0.05$) out with the software STATISTICA 7 (Hill and Lewicki, 2006).

3 Results

3.1 Iron content in soil.

Differences ($p \leq 0.05$) in Fe^{2+} content were observed during the sampling. Concentration of Fe^{2+} fluctuated between 0.5 and 1.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry soil. In the soil with the control treatment T0 the lowest values were presented, however the Fe^{2+} content increased gradually and constantly towards 110 dat. On the other hand, the addition of OA increased the Fe^{2+} content to 27 and 84 dat (58 and 34% compared to T0, respectively). Likewise HC increased Fe^{2+} at 48 and 110 dat by 54 and 12% compared to T0, followed by CA, which only induced a 25% increase at 84 dat. At the end of the experiment, the HC and the FeG-EDTA control were higher than the T0, whereas the CA, OA, SA, and FeEDDHA treatments were lower (4, 1, 12, and 10%, respectively) (Fig. 1a).

Figure 1b shows the dynamics in the Fe^{3+} content, which presented differences ($p \leq 0.05$) in all the samplings, values remained below $1.6 \mu\text{g g}^{-1}$ of dry soil, whereas at the end of the experiment, treatment with SA showed an increase of 492%, with respect to T0, which may suggest that the addition of SA failed to maintain the stability of G-EDTA chelate. At 27, 48, and 110 days, the addition of CA, SA, HC, and FeEDTA increased the Fe^{3+} content with respect to T0, whereas a decrease was observed with the inclusion of OA during the different samplings, while the HC and the FeG-EDTA control reduced the content by 9 and 72% respectively, at 48 and 84 dat, compared to the T0. The FeEDDHA control showed a lower Fe^{3+} content at 27 and 84 dat. There were differences ($p \leq 0.05$) in the total Fe content at 27, 49, and 110 dat (Fig. 1c), wherein the content was higher with the application of HC, CA, OA and SA at 27, 49, 84, and 110 dat generating an increase of 34, 57, 11, and 87% compared to T0. The application of the EDDHA chelate showed a lower content of total Fe during 27 and 84 dat, in contrast to the response observed with the FeG-EDTA control, which showed higher content at 27, 48, and 110 dat.

3.2 Soil pH.

The pH of the soil showed differences ($p \leq 0.05$) at 27, 84, and 110 dat, presenting a very similar dynamic between treatments (Fig 2a). At 27 dat, a reduction of 1.81 units was observed in the CA treatment, afterwards the pH was reduced in all treatments at 49 dat. In the third sampling a dramatically increase (> 8.70) occurred, with the FeG-EDTA control being the lowest pH (8.78), while the CA and OA obtained a pH higher than T0. At the end of the experiment the T0 soil presented a pH of 8.85, the SA and HC applications induced a lower pH, while the rest of the treatments presented pH values above T0.

3.3 Microbial soil respiration.

There were statistical differences ($p \leq 0.05$) in microbial respiration in the different samplings (Fig. 2b). It was observed that at 27 dat organic acids and control treatments increased microbial respiration by up to 50% compared to T0. At 49 dat only the inclusion of CA and SA showed higher C-CO₂ production, while at 84 dat the SA along with the HC increased the microbial respiration by 3.5 and 2.3%. At 110 dat the treatments presented a decrease ranging from 6.5-11.5 mg C-CO₂ per g of soil.

3.4 Leachate.

Oxidation-reduction potential (ORP) showed differences ($p \leq 0.05$) at 27, 49, and 84 dat. During the first sampling, more oxidized values were observed in the treatments of organic acids and control treatments compared to the T0, while at 49 dat the values increased, the addition of OA showed more reduced values (134.67 mV), followed by the CA and SA (148.40 and 150.03 mV, respectively). HC and control treatments induced more oxidized values compared to T0 (ORP > 153.97 mV). Finally, at 84 dat the ORP decreased considerably, for this sampling date treatments of SA, CA, and the FeG-EDTA control induced lower values than those obtained with T0 (Fig. 3a).

The pH values ranged from 7.2 - 9.0 (Fig. 3b), with differences ($p \leq 0.05$) between samplings. At 27 dat there was a decrease in the treatments compared to the T0, the addition of CA reduced the pH of the leachates in 1.26 units. At 49 dat the ORP values decreased to a greater extent with the CA and FeG-EDTA treatments. Finally at 84 dat the CA reduced the pH in a higher proportion compared to the T0, whereas the FeG-EDTA control induced an increase.

In the electrical conductivity differences ($p \leq 0.05$) were found, it was observed that the dynamics was similar between treatments (Fig. 3c). The T0 showed a constant behavior of EC, starting at 1.52 until reaching 4.13 mS m⁻¹. During the first two samplings the addition of organic acids and control treatments showed an EC higher than T0, wherein the FeG-EDTA

control induced a higher EC value at 27 and 49 dat, followed by the inclusion of CA. At the last sampling, only the addition of CA showed an EC (4.68 mS m^{-1}) higher than T0, whereas the remaining treatments showed a lower EC than the T0 in greater proportion with OA (3.17 mS m^{-1}).

In the variable of CO_3^{2-} content in leachates were found differences ($p \leq 0.05$). As shown in Figure 3d the dynamics of this variable differed with the addition of OA, which presented the highest values during the three samplings, whereas the lowest content was obtained with the SA treatment.

There were differences ($p \leq 0.05$) in the HCO_3^- (Fig. 3e), obtaining a dynamics very similar to that of EC. The FeG-EDTA control treatment induced higher values of bicarbonates at 27 and 84 dat, whereas the lower content was obtained with OA whose response contrasts with the dynamics presented in the CO_3^{2-} . At 49 dat the maximum increase (25%) in the HCO_3^- content was observed under the SA treatment.

3.5 Correlation analysis: Fe content - Soil and leachate variables.

The pH of the soil presented correlation ($p \leq 0.05$) with Fe^{3+} content and total Fe in the soil ($\rho = 0.37$ and 0.44 , respectively). On the other hand, microbial soil respiration correlated positively with Fe^{3+} ($\rho = 0.31$), total Fe ($\rho = 0.31$), and soil pH ($\rho = 0.50$). Regarding the leachates, it was observed that the ORP of these was negatively correlated with the Fe^{3+} content ($\rho = -0.31$), total Fe ($\rho = -0.34$), soil pH ($\rho = -0.76$), and soil microbial respiration ($\rho = -0.48$), whereas the pH of the leachates was only correlated with soil microbial respiration ($\rho = -0.45$). On the other hand, the EC of leachates showed a low correlation with Fe^{2+} ($\rho = 0.21$), in addition it presented correlation with MSR ($\rho = 0.45$) and to a higher extent with leachate pH ($\rho = -0.73$). In regards of the CO_3^{2-} and HCO_3^- content in the leachates, correlation was observed with the pH and CE of the leachates (Table 2).

3.6 Chlorophyll content and SPAD units.

The chlorophyll content (a, b, and total) showed differences ($p \leq 0.05$) throughout the development of the plants. It was observed a drastic decrease in the content of these pigments in plants grown without the application of Fe in the nutrient solution, also giving low values in the SPAD units of the T0 compared to the rest of the treatments. As shown in Figure 4, the chlorophyll content decreased as the crop developed. There was a higher content of chlorophyll a, b, and total (27 and 49 dat) in treatments $CA \geq OA \geq SA \geq HC \geq FeEDDHA \geq FeG-EDTA > T0$, whereas at 84 dat the content responded to treatments $FeEDDHA \geq HC \geq SA \geq OA > CA \geq FeG-EDTA > T0$. In spite of fluctuations in chlorophyll content, in general treatments SA, HC, and FeEDDHA control induced a higher content of chlorophyll a, b, and total.

SPAD units provided similar evidence on chlorophyll content, their dynamics were similar to those observed with total chlorophyll content, according to the comparison of means during the first sampling, the behavior of the treatments was: $FeEDDHA \geq CA \geq FeG-EDTA \geq HC \geq OA \geq SA > T0$, for the second sampling $HC \geq FeEDDHA \geq OA \geq CA \geq FeG-EDTA \geq SA > T0$, and for the last sampling $SA \geq HC \geq OA \geq CA \geq FeEDDHA \geq FeG-EDTA \geq T0$.

3.7 Growth and production variables.

According to the analysis of variance, there were differences ($p \leq 0.05$) in most of the growth variables (Table 3, 4, and 5), with exception for stem diameter (84 dat), number of floral clusters (49 dat), number of flowers, and fruit mooring (49 dat). Plants grown on soil where no Fe was applied in the nutrient solution (T0) showed a considerable decrease in most of the growth variables when compared to the other treatments, which highlights the importance of Fe in the metabolism of plants. The application of CA, SA, and HC resulted in an increase in most variables, compared to T0. Regarding the control treatments, FeG-EDTA showed a similar statistical behavior with the FeEDDHA control, except for the PH (49 dat), NFC (84 dat), and THF (84 dat) variables.

3.8 Correlation analysis: soil variables - growth and production variables.

According to the Spearman correlation analysis the growth variables SD, PH, NL, NFC, and NFP showed high correlation values ($p < 0.05$) with EC and HCO_3^- content of leachates and to a lesser extent with pH of leachates, CO_3^{2-} content on leachates, microbial soil respiration, soil pH, and Fe^{2+} (Table 6). Whereas NMF presented higher correlation with soil microbial respiration ($\rho = -0.61$) and with soil pH ($\rho = -0.59$). On the other hand, the SPAD units presented correlation with Fe^{2+} content of the soil ($\rho = 0.38$). In chlorophyll a, b, and total contents, correlation with Fe^{2+} of the soil and pH of the leachates ($\rho = 0.22, 0.28, \text{ and } 0.22$, respectively) was found. Microbial respiration was positively correlated with THF and PFW ($\rho = 0.46$ and 0.43 , respectively). Finally, the production per plant showed a higher correlation with the pH of the leachate ($\rho = -0.46$).

4 Discussion

4.1 Iron content in soil.

The increase in the Fe^{2+} content observed in the T0 soil at 110 dat (Fig. 1a) could be due to the fact that the low solubility of the crystalline-Fe (Colombo et al., 2014) complex gradually release this ion due to the possible participation of microorganisms and/or by the increase of the root enzymatic activity associated to the assimilation and absorption of Fe (Kim and Guerinot, 2007; López-Millán et al., 2009). Considering that the mechanism to mobilize Fe from the soil is based on a reductive reaction, the increase of the iron by action of the ferric chelate and the organic acids can be due to these anions (CA, OA, and SA) react with the soil cations inducing the dissolution of the iron complexes along with the chelating properties (Ryan and Delhaize, 2001; Ström et al., 2005) or through the formation of soluble ferric complexes (Colombo et al., 2014). The configuration of the carboxylic groups of citric acid confer the ability of their anion (the citrate) to form stable complexes with the trivalent iron cation (Clarholm et al., 2015) and

consequently to induce greater Fe^{2+} release, or the probable induction of a greater chelate complexation, regarding this Chatterjee et al. (2015) mentioned that when applying 40 mg L^{-1} of CA on alfisoles, inceptisoles, and vertisoles were found to have higher Fe release, suggesting that CA improves the availability of Fe for the plant, thus the combination with the chelate ferric would maximize the stability of Fe.

Saini *et al.* (1995) indicate that the content of organic matter as well as the clay and silt fractions of the soil have a high impact on the distribution of the different forms of Fe, indicating that the fluctuations in Fe^{2+} and Fe^{3+} of the calcareous soil studied may be the result of the interactions between the different organic acids (combined with the FeG-EDTA chelate) with the aforementioned components in addition to plant metabolism (Kim and Guerinot, 2007; López-Millán et al., 2009).

The response induced by the humic complexes in the increase of the Fe^{2+} content is probably due to the fact that these substances acting as chelators increased the availability of Fe (Khaled and Fawy, 2011; Muscolo et al., 2013), in addition to that their reduced form can induce the transfer of e^- to Fe^{3+} (Chen et al., 2014). Likewise, the chemical groups that the HC have, could improve the behavior of the chelate FeG-EDTA avoiding its loss. The fact that FeG-EDTA showed a higher Fe^{2+} content (27, 84, and 110 $\mu\text{g kg}^{-1}$) suggests that this type of chelate was more efficient in maintaining a constant Fe content available in the soil due to the characteristics of its chelating agent gluconate since the plants make a more efficient use of the Fe of less stable chelates (Lucena, 2003), as it is the EDTA. The response found in this work differs with that reported by Garcia-Mina et al. (2003) who in a study of calcareous soil incubation applying 10 mg kg^{-1} of Fe in dry soil found that the EDDHA chelate had greater capacity to maintain the iron fraction chelated with respect to the EDTA chelate, this discrepancy may be derived from the dose used in addition to the study time.

4.2 Soil pH.

The increase in pH in CA and OA treatments may be due to the fact that their anions (citrate and oxalate, respectively) reacted with the CaCO_3 in soil, generating Ca-citrate or Ca-oxalate complexes, releasing CO_3^{2-} . On the other hand, the decrease in pH observed with the combination of organic acids and FeG-EDTA at 27 dat may be due to the contribution of H^+ by these anions, from their carboxylic groups. As for the response observed with the application of HC, it may be due to its acidifying potential, thanks to its diversity of functional groups and acceptor capacity of electrons (Khaled and Fawy, 2011; Chen et al., 2014) in addition to its preponderant role as organic component of the soil.

4.3 Microbial soil respiration.

The differences found in microbial soil respiration dynamics may be due to the fact that activation of the microbial load played a role in the redox dynamics of iron (Weber et al., 2006; Silver et al., 2013), such activation could be due to the inclusion of the organic acids in the soil provided skeletons easy assimilation carbon (Dungait et al., 2013). In this regard Pii et al. (2015) mention that the inoculation of *Azospirillum brasilense* in calcareous soil can induce a recovery response to symptoms of Fe deficiency, it should be noted that in the present study microbial respiration grouped the total microbiome of the calcareous soil used, however the charge is typified by the plant species as well as by the Fe content of the soil (Pii et al., 2016).

4.4 Leachate.

Since fluctuations in ORP can infer in the iron redox cycle by altering the crystallinity of Fe minerals and the sorption and reactivity of the resulting minerals (Thompson et al., 2006), reduced values would be adequate from the fact that the decrease in ORP values may suggest a mechanism of mobilization of Fe in the soil (Terzano et al., 2015). Mansfeldt (2004) mentions that a decrease in ORP values between 0 and 50 mV in the soil solution could improve the

concentration of Fe^{2+} , so that reduced values in the leachate could suggest a tendency similar to the soil solution, in this sense, the treatments with OA, CA, SA, and FeG-EDTA seem to favor slightly reduced values compared to T0 in the dynamics of this variable (Fig 4a).

The reduction of the pH with CA can be due to the deprotonation of its three carboxylic groups (due to its low pKa) gave a higher content of H^+ in the soil solution, inducing a greater acidifying capacity in addition to its anion, citrate, is characterized by its high acidity regulating capacity (Ström et al., 2005; Colombo et al., 2014). The increase of the EC with the application of organic acids can be derived, in addition to the accumulation of salts as a consequence of the irrigations, by the dissolution of salts of the soil by the organic anions of the treatments (Colombo et al., 2014).

The increase in the CO_3^{2-} content in leachate by action of OA may be due to its anion reacting in greater proportion with the carbonates present in the soil, generating the Ca-oxalate complex and thus releasing CO_3^{2-} (Ström et al., 2005) which were concentrated and washed in the leachates by the action of the constant irrigations.

According to Lucena et al. (2007) the HCO_3^- present in the soil can induce Fe deficiency derived from the inhibition of genes involved in the acquisition of Fe, therefore, the high concentrations of HCO_3^- found in the leachates of the FeG-EDTA control treatment, SA, and HC could indicate a high concentration of HCO_3^- in the soil or to that these treatments dissolved and induced to a greater extent the washing of excess HCO_3^- rhizospheric, generating a favorable environment for an improved absorption and assimilation of Fe.

3.5 Correlation analysis: Fe content - Soil and leachate variables.

The positive correlation between soil pH and Fe content may suggest that a low pH soil condition can improve the detachment of Fe(III) ligand complexes from the surface of the oxide, thanks to the protonation of OH groups on the surface of the oxide, which would weaken the

structural Fe-O bonds releasing the Fe in the solution (Chatterjee et al., 2015), the same authors also indicate that the Fe release can be maximized with the application of organic acids on soils type alfisol, vertisol, and inceptisol.

The positive correlation found between Fe^{3+} and total Fe content with MSR may be due to a promoting effect of soil microbial activity by organic acids, since the carbon skeletons provided by these could increase the participation of the microorganisms in the dynamics of the redox cycle of iron in soil (Weber et al., 2006; Dungait et al., 2013).

Mansfeldt (2004) reports that a decrease of ORP in soil solution may favor an appropriate concentration of Fe^{2+} in calcareous soils, the results found in the present work could suggest that the Fe^{3+} and Fe content in soil tend to a close correlation with the leachate ORP. This can be due to the fact that the fluctuations of the ORP induce favorable conditions for the redox cycle of Fe so that when the reduction of Fe^{3+} occurs, it becomes an electron acceptor producing Fe^{2+} and CO_2 consuming organic C (Silver et al., 2013) which could be provided by the carboxylic groups of organic acids supplied in the fertilizer solution.

The correlation between the EC and the pH of the leachates as well as the Fe content of the soil suggests that the EC is directly associated with the concentration of salts and ions found in the soil (do Carmo et al., 2016). The same authors, when studying EC in soils (inceptisol, humic ferrasol, and haplic cambisol), point out that the EC changes are inversely correlated with the pH of the solution during the period of its study, which is similar to that found in the present work in these same parameters but determined in the leachates of a calcareous soil.

4.6 Chlorophyll content and SPAD units.

The low content of chlorophyll (a, b, and total) in plants developed without the application of Fe in the nutrient solution (Fig. 4) can be explained by the low presence and stability of this element in the leaves (Rout and Sahoo, 2015), while the decrease of these pigments during the

development of the plant can be caused by the decrease in chlorophyll synthesis and dilution derived from the continuous expansion of the leaf (Miller et al., 1982) as a result of the fact that the Fe in this case is presented as limiting.

Data from the portable chlorophyll meter provided similar evidence for chlorophyll content as mentioned by Radhamani et al. (2016) who found a high correlation in SPAD readings and chlorophyll content, therefore their use in monitoring the Fe content in plants grown in calcareous soils seems to be adequate and reliable.

4.7 Growth and production.

There was a greater increase of the growth and production variables with the application of organic acids plus the FeG-EDTA chelate, in the case of SA this may be due to its exogenous application in the nutrient solution that could induce a modulating response of the plants (Shen et al., 2016). The application of HC have shown favorable responses in the agronomic development of plants (Asal et al., 2015). This response depends to a great extent on the chemical composition of these plants, which can act on the composition of the soil or as bio-stimulants in the plant (Canellas et al., 2015; Kazemi et al., 2016). According to Lucena (2003) the response shown by plants to the combination between organic acids and FeG-EDTA chelate is the ability of these to remain in solution, so that their combination could increase the permanence and transferability of Fe to the plant. The homologous response obtained with the control treatments (FeG-EDTA and FeEDDHA) may be due to a similarity in the delivery of Fe by the different chelates or because the FeEDDHA contribution mechanism is controlled by the complexation with Al, Mn, and Cu (Schenkeveld et al., 2014) the FeG-EDTA chelate improved its behavior in this type of soil.

4.8 Correlation analysis: soil variables - growth variables and plant production.

The high correlation presented by the growth variables SD, PH, NL, NFC, and NFP with the EC and HCO_3^- of the leachates (and to a lesser degree with the pH and CO_3^{2-} of the leachates, and soil pH) as well as the low correlation observed between the soil Fe^{2+} content and the growth and production variables suggests that these parameters alter the soil ionic conditions (do Carmo et al., 2016) with a direct influence on the growth and development of the plants (Bertoni et al., 1992; Nikolic et al., 2000; Zuo et al., 2007).

The correlation between the soil Fe^{2+} content with the SPAD units and the chlorophyll content (a, b, and total) highlights the metabolic importance of this ion in plants (Briat et al., 2015) and suggests that iron is vital for the synthesis of chlorophyll as it stimulates 6-aminolevulinic acid (ALA) and conversion of protochlorophyll into chlorophyll (Miller et al., 1982).

5. Conclusions

The addition of HC+FeG-EDTA and OA+FeG-EDTA increased the Fe^{2+} content in the soil by 39% and 29%, respectively. Likewise, total soil Fe increased 34% and 30% with SA+FeG-EDTA and CH+FeG-EDTA, respectively, while Fe^{3+} was reduced with OA+FeG-EDTA. While CA+FeG-EDTA reduced the pH of the soil and of the leachates, increasing in turn the EC of the leachates. Chlorophyll content increased with the application of HC+FeG-EDTA, whereas CA+FeG-EDTA, SA+FeG-EDTA, and HC+FeG-EDTA treatments improved SD, PH, NL, NFC, NMF, THF, Y, and PFW.

The highest Spearman correlations were between pH and total soil Fe ($\rho = 0.44$), leachate ORP and total Fe ($\rho = -0.34$), leachate CE with Fe^{2+} ($\rho = 0.21$), SPAD units with soil Fe^{2+} ($\rho = 0.38$) and chlorophyll content with soil Fe^{2+} and pH of the leachate.

The inclusion of organic acids plus FeG-EDTA chelate on tomato plants developed in calcareous soil improved the Fe content in the soil as well as the growth of the plants.

Acknowledgements

To CONACYT and Arysta Lifescience for the economic support of this project.

References

- Abadía, J., Vázquez, S., Rellán-Álvarez, R., El-Jendoubi, H., Abadía, A., Álvarez-Fernández, A., López-Millán, A.F., 2011. Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 471–482. doi:10.1016/j.plaphy.2011.01.026
- Álvarez-Solís, J.D., Anzueto-Martínez, M. de J., 2004. Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapa, México. *Agrociencia* 38, 13–22.
- Arizmendi-Galicia, N., Rivera-ortiz, P., Cruz-salazar, F. De, Castro-meza, B.I., Garza-Requena, F. de la, 2011. Lixiviación De Hierro Quelatado En Suelos Calcáreos. *Terra Latinoamericana* 29, 321–237.
- Asal, M.W., Elham, A.B., Ibrahim, O.M., Ghalab, E.G., 2015. Can humic acid replace part of the applied mineral fertilizers? A study on two wheat cultivars grown under calcareous soil conditions. *International Journal of ChemTech Research* 8, 20–26.
- Barberon, M., Dubeaux, G., Kolb, C., Isono, E., Zelazny, E., Vert, G., 2014. Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 8293–8298. doi:10.1073/pnas.1402262111
- Bertoni, G.M., Pissaloux, A., Morard, P., Sayag, D.R., 1992. Bicarbonate-pH relationship with iron chlorosis in white lupine. *Journal of Plant Nutrition* 15, 1509–1518. doi:10.1080/01904169209364417
- Briat, J.F., Dubos, C., Gaymard, F., 2015. Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends in Plant Science* 20, 33–40. doi:10.1016/j.tplants.2014.07.005

- Canellas, L.P., Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Jones, D.L., Nebbioso, A., Mazzei, P., Piccolo, A., 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196, 15–27. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.013
- Chatterjee, D., Datta, S.C., Manjaiah, K.M., 2015. Effect of citric acid treatment on release of phosphorus, aluminium and iron from three dissimilar soils of India. *Archives of Agronomy and Soil Science* 61, 105–117. doi:10.1080/03650340.2014.919449
- Chen, M., Liu, C., Li, X., Huang, W., Li, F., 2014. Iron Reduction Coupled to Reductive Dechlorination in Red Soil. *Soil Science* 179, 457–467. doi:10.1097/SS.0000000000000095
- Clarholm, M., Skjellberg, U., Rosling, A., 2015. Organic acid induced release of nutrients from metal-stabilized soil organic matter - The unbutton model. *Soil Biology and Biochemistry* 84, 168–176. doi:10.1016/j.soilbio.2015.02.019
- Colombo, C., Palumbo, G., He, J.Z., Pinton, R., Cesco, S., 2014. Review on iron availability in soil: Interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments* 14, 538–548. doi:10.1007/s11368-013-0814-z
- Covarrubias, J.I., Pisi, A., Rombolà, A.D., 2014. Evaluation of sustainable management techniques for preventing iron chlorosis in the grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, 149–159. doi:10.1111/ajgw.12055
- do Carmo, D.L., Silva, C.A., de Lima, J.M., Pinheiro, G.L., 2016. Electrical conductivity and chemical composition of soil solution: Comparison of solution samplers in tropical soils. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo* 40, 1–17. doi:10.1590/18069657rbc20140795
- Dungait, J.A.J., Kemmitt, S.J., Michallon, L., Guo, S., Wen, Q., Brookes, P.C., Evershed, R.P., 2013. The variable response of soil microorganisms to trace concentrations of low molecular weight organic substrates of increasing complexity. *Soil Biology and Biochemistry* 64, 57–64. doi:10.1016/j.soilbio.2013.03.036
- Fernández Linares, L.C., Rojas Avelizapa, N.G., Roldán Carrillo, T.G., Ramírez Islas, M.E.,

- Zegarra Martínez, H.G., Uribe Hernández, R., Reyes Ávila, R.J., Flores Hernández, D., Arce Ortega, J.M., 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados, Instituto Mexicano del Petróleo Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Garcia-Mina, J., Cantera, R., Zamarreño, A., 2003. Interaction of Different Iron Chelates with an Alkaline and Calcareous Soil: A Complementary Methodology to Evaluate the Performance of Iron Compounds in the Correction of Iron Chlorosis. *Journal of Plant Nutrition* 26, 1943–1954. doi:10.1081/PLN-120024255
- Guo, X., Zhang, G., Wei, Z., Zhang, L., He, Q., Wu, Q., Qian, T., 2017. Mixed chelators of EDTA, GLDA, and citric acid as washing agent effectively remove Cd, Zn, Pb, and Cu from soils. *Journal of Soils and Sediments*. doi:10.1007/s11368-017-1781-6
- Hanlon, E.A., Bartos, J.M., 1993. Soil pH and electrical conductivity: a country extension soil laboratory manual. Circular (USA). No. 1081.
- Hill, T., Lewicki, P., 2006. *Statistics: methods and applications: a comprehensive reference for science, industry, and data mining*. StatSoft, Inc.
- Hsiao, K.H., Kao, P.H., Hseu, Z.Y., 2007. Effects of chelators on chromium and nickel uptake by *Brassica juncea* on serpentine-mine tailings for phytoextraction. *Journal of Hazardous Materials* 148, 366–376. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.02.049
- Jeon, B.H., Dempsey, B.A., Burgos, W.D., Royer, R.A., 2001. Reactions of ferrous iron with hematite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 191, 41–55. doi:10.1016/S0927-7757(01)00762-2
- Kaur, L., Gadgil, K., Sharma, S., 2015. Comparative evaluation of salicylic acid and EDTA chelant induced phytoremediation of lead and nickel using *Lemna minor* L. *Tropical Plant Research* 2, 264–270.
- Kazemi, R., Karimian, N., Ronaghi, A., Yasrebi, J., 2016. The effect of two humic substances on

- the growth and lead uptake of corn in calcareous soil. *Iran Agricultural Research* 35, 39–48.
- Khaled, H., Fawy, H.A., 2011. Effect of Different Levels of Humic Acids on the Nutrient Content , Plant Growth , and Soil Properties under Conditions of Salinity. *Soil & Water Res.* 2011, 21–29.
- Kim, S.A., Guerinot, M. Lou, 2007. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters* 581, 2273–2280. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.043
- Kong, J., Dong, Y., Zhang, X., Wang, Q., Xu, L., Liu, S., Hou, J., Fan, Z., 2015. Effects of Exogenous Salicylic Acid on Physiological Characteristics of Peanut Seedlings under Iron-Deficiency Stress. *Journal of Plant Nutrition* 38, 127–144. doi:10.1080/01904167.2014.920391
- López-Millán, A.F., Morales, F., Gogorcena, Y., Abadía, A., Abadía, J., 2009. Metabolic responses in iron deficient tomato plants. *Journal of Plant Physiology* 166, 375–384. doi:10.1016/j.jplph.2008.06.011
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., 1987. Rapid assay for microbially reducible ferric iron in aquatic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1536–1540. doi:10.1007/BF01611203
- Lucena, C., Romera, F.J., Rojas, C.L., García, M.J., Alcántara, E., Pérez-Vicente, R., 2007. Bicarbonate blocks the expression of several genes involved in the physiological responses to Fe deficiency of Strategy I plants. *Functional Plant Biology* 34, 1002–1009. doi:10.1071/FP07136
- Lucena, J.J., 2003. Fe Chelates for Remediation of Fe Chlorosis in Strategy I Plants. *Journal of Plant Nutrition* 26, 1969–1984. doi:10.1081/PLN-120024257
- Mansfeldt, T., 2004. Redox potential of bulk soil and soil solution concentration of nitrate, manganese, iron, and sulfate in two Gleysols. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 167, 7–16. doi:10.1002/jpln.200321204

- Miller, G.W., Denney, A., Pushnik, J., Yu, M., 1982. The formation of delta-Aminolevulinate a precursor of chlorophyll, in barley and the role of iron. *Journal of Plant Nutrition* 5, 289–300. doi:10.1080/01904168209362958
- Mora, V., Bacaicoa, E., Zamarreño, A.M., Aguirre, E., Garnica, M., Fuentes, M., García-Mina, J.M., 2010. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology* 167, 633–642. doi:10.1016/j.jplph.2009.11.018
- Mori, S., 1999. Iron acquisition by plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 250–253. doi:10.1016/S1369-5266(99)80043-0
- Munira, S., Hossain, M.M., Zakaria, M., Ahmed, J.U., Islam, M.M., 2015. Evaluation of Potato Varieties against Salinity Stress in Bangladesh. *International Journal of Plant & Soil Science* 6, 73–81. doi:10.9734/IJPSS/2015/15879
- Muscolo, A., Sidari, M., Nardi, S., 2013. Humic substance: Relationship between structure and activity. deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration* 129, 57–63. doi:10.1016/j.gexplo.2012.10.012
- Nag, A., Gupta, H., 2014. Physicochemical analysis of some water ponds in and around Santiniketan, west Bengal, India. *International Journal of Environmental Sciences* 4, 676–682. doi:10.6088/ijes.2014040404507
- Nikolic, M., Römheld, V., Merkt, N., 2000. Effect of bicarbonate on uptake and translocation of ⁵⁹Fe in two grapevine rootstocks differing in their resistance to Fe deficiency chlorosis. *Vitis* 39, 145–149.
- Nozoye, T., Nagasaka, S., Bashir, K., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., 2014. Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXXφ or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice. *Plant Journal* 77, 246–260. doi:10.1111/tpj.12383

- Pii, Y., Borruso, L., Brusetti, L., Crecchio, C., Cesco, S., Mimmo, T., 2016. The interaction between iron nutrition, plant species and soil type shapes the rhizosphere microbiome. *Plant Physiology and Biochemistry* 99, 39–48. doi:10.1016/j.plaphy.2015.12.002
- Pii, Y., Penn, A., Terzano, R., Crecchio, C., Mimmo, T., Cesco, S., 2015. Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 87, 45–52. doi:10.1016/j.plaphy.2014.12.014
- Radhamani, R., Kannan, R., Rakkiyappan, P., 2016. Leaf Chlorophyll Meter Readings as an Indicator for Sugarcane Yield Under Iron Deficient Typic Haplustert. *Sugar Tech* 18, 61–66. doi:10.1007/s12355-014-0363-9
- Römheld, V., Schaaf, G., 2004. Iron transport in plants: Future research in view of a plant nutritionist and a molecular biologist. *Soil Science and Plant Nutrition* 50, 1003–1012. doi:10.1080/00380768.2004.10408567
- Rout, G.R., Sahoo, S., 2015. Role of Iron in Plant Growth and Metabolism. *Reviews in Agricultural Science* 3, 1–24. doi:10.7831/ras.3.1
- Ryan, P.R., Delhaize, E., 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Biology* 52, 527–560.
- Ryan, P.R., James, R.A., Weligama, C., Delhaize, E., Rattey, A., Lewis, D.C., Bovill, W.D., McDonald, G., Rathjen, T.M., Wang, E., Fettell, N.A., Richardson, A.E., 2014. Can citrate efflux from roots improve phosphorus uptake by plants? Testing the hypothesis with near-isogenic lines of wheat. *Physiologia Plantarum* 151, 230–242. doi:10.1111/ppl.12150
- Saini, R.S., Chahal, D.S., Sharma, B.D., 1995. Distribution of different forms of iron in arid zone soils of punjab, india. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 9, 177–186. doi:10.1080/15324989509385884
- Sánchez-Rodríguez, A.R., del Campillo, M.C., Torrent, J., Jones, D.L., 2014. Organic acids alleviate iron chlorosis in chickpea grown on two p-fertilized soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14, 292–303. doi:10.4067/S0718-95162014005000024

- Schenkeveld, W.D.C., Reichwein, A.M., Temminghoff, E.J.M., van Riemsdijk, W.H., 2014. Considerations on the shuttle mechanism of FeEDDHA chelates at the soil-root interface in case of Fe deficiency. *Plant and Soil* 379, 373–387. doi:10.1007/s11104-014-2057-1
- Schenkeveld, W.D.C., Temminghoff, E.J.M., Reichwein, A.M., van Riemsdijk, W.H., 2010. FeEDDHA-facilitated Fe uptake in relation to the behaviour of FeEDDHA components in the soil-plant system as a function of time and dosage. *Plant and Soil* 332, 69–85. doi:10.1007/s11104-009-0274-9
- Shen, C., Yang, Y., Liu, K., Zhang, L., Guo, H., Sun, T., Wang, H., 2016. Involvement of endogenous salicylic acid in iron-deficiency responses in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 67, 4179–4193. doi:10.1093/jxb/erw196
- Silver, W.L., Liptzin, D., Almaraz, M., 2013. Soil redox dynamics and biogeochemistry along a tropical elevation gradient. *Ecological Bulletins* 1–16.
- Singh, D., Agnihotri, A., Seth, C.S., 2017. Interactive effects of EDTA and oxalic acid on chromium uptake , translocation and photosynthetic attributes in Indian mustard (*Brassica juncea* L . var . Varuna). *Current Science* 112, 2034–2042.
- Steiner, A. a., 1961. A Universal Method for Preparing Nutrient Solutions of a Certain Desired Composition. *Plant and Soil* XV 134–154. doi:10.1007/BF01347224
- Stotzky, G., 1965. Microbial respiration. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties* 1550–1572.
- Ström, L., Owen, A.G., Godbold, D.L., Jones, D.L., 2005. Organic acid behaviour in a calcareous soil implications for rhizosphere nutrient cycling. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 2046–2054. doi:10.1016/j.soilbio.2005.03.009
- Terzano, R., Cuccovillo, G., Gattullo, C.E., Medici, L., Tomasi, N., Pinton, R., Mimmo, T., Cesco, S., 2015. Combined effect of organic acids and flavonoids on the mobilization of major and trace elements from soil. *Biology and Fertility of Soils* 51, 685–695. doi:10.1007/s00374-015-1009-0

- Thompson, A., Chadwick, O.A., Rancourt, D.G., Chorover, J., 2006. Iron-oxide crystallinity increases during soil redox oscillations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, 1710–1727. doi:10.1016/j.gca.2005.12.005
- Vernon, L.P., 1960. Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts. *Analytical Chemistry* 32, 1144–1150. doi:10.1021/ac60165a029
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* 4, 752–764. doi:10.1038/nrmicro1490
- Wu, L.H., Luo, Y.M., Christie, P., Wong, M.H., 2003. Effects of EDTA and low molecular weight organic acids on soil solution properties of a heavy metal polluted soil. *Chemosphere* 50, 819–822. doi:10.1016/S0045-6535(02)00225-4
- Yeasmin, S., Singh, B., Kookana, R.S., Farrell, M., Sparks, D.L., Johnston, C.T., 2014. Influence of mineral characteristics on the retention of low molecular weight organic compounds: A batch sorption-desorption and ATR-FTIR study. *Journal of Colloid and Interface Science* 432, 246–257. doi:10.1016/j.jcis.2014.06.036
- Ylivainio, K., 2010. Effects of iron(III)chelates on the solubility of heavy metals in calcareous soils. *Environmental Pollution* 158, 3194–3200. doi:10.1016/j.envpol.2010.07.004
- Zuo, Y., Ren, L., Zhang, F., Jiang, R.F., 2007. Bicarbonate concentration as affected by soil water content controls iron nutrition of peanut plants in a calcareous soil. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 357–364. doi:10.1016/j.plaphy.2007.03.017
- Zuo, Y., Zhang, F., 2011. Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. *Plant and Soil* 339, 83–95. doi:10.1007/s11104-010-0566-0

Table 1. Physicochemical properties of the soil, water, and humic complex chemical properties used in the present investigation (mineral content in mg kg⁻¹, mg L⁻¹, and g L⁻¹ respectively)

Variable	Soil	Water	Variable	Soil	Water	Variables	Humic complex
% organic matter	0.2	-	S-SO ₄	10	94.1	C-Humic acid	10
pH	8.5	7.94	HCO ₃	-	309	C-Fulvic acid	90
EC (dS m ⁻¹)	-	0.97	CO ₃	-	0	N total	6
N-NO ₃	5	3.92	Cl	-	87.5	K ₂ O	38
P	9	-	Zn	0.1	0.0025	pH	9.2
K	285	2.73	Mn	2	0.0007		
Mg	546	22.3	Cu	0.6	0.0033		
Ca	3253	77.6	B	0.8	0.51		
Na	42	90.9	Fe	5	0.0059		

Table 2. Spearman's matrix correlations (ρ) between soil variables and leachate of tomato plants grown in calcareous soil with application of organic acids combined with FeG-EDTA.

Var.	Fe ²⁺	Fe ³⁺	FeT	pHs	MSR	ORP-L	pH-L	EC-L	C-L	B-L
Fe ²⁺	1.00									
Fe ³⁺	-0.17	1.00								
FeT	0.34**	0.75**	1.00							
pHS	0.12	0.37**	0.44**	1.00						
RM	0.07	0.31**	0.31**	0.50**	1.00					
ORP-L	0.04	-0.31**	-0.34**	-0.76**	-0.48**	1.00				
pH-L	-0.14	-0.07	-0.06	-0.04	-0.45**	-0.02	1.00			
CE-L	0.21**	-0.01	0.02	0.02	0.45**	0.03	-0.73**	1.00		
C-L	0.03	0.00	0.15	0.24	-0.19	-0.32**	0.50**	-0.46**	1.00	
B-L	0.11	-0.03	-0.05	0.16	0.58**	-0.10	-0.64**	0.71**	-0.63**	1.00

** = significant statistical difference ($p \leq 0.05$), Var.=variables, pHs= pH of soil, MSR= microbial soil respiration (mg C-CO₂ g of soil), ORP-L= leachate oxidation-reduction potential (mV), pH-L= pH of leachate, EC-L= electrical conductivity of leachate (mS m⁻¹), C-L= CO₃²⁻=carbonates en leachate (meq L⁻¹), B-L= HCO₃⁻ bicarbonates in leachate (meq L⁻¹).

Table 3. Mean of growth variables determined in tomato plants grown in calcareous soil with application of organic acids combined with FeG-EDTA.

Trat	SD			PH			NL		
	27	49	84	27	49	84	27	49	84
CA	10.8±0.2 ^{ab}	11.7±0.5 ^a	13.0±0.6 ^{abc}	45.7±1.5 ^a	71.2±1.6 ^{ab}	101.6±4.9 ^{ab}	13.2±0.2 ^a	18.0±1.0 ^a	23.0±1.0 ^{ab}
OA	11.5±0.5 ^a	12.9±0.7 ^a	13.3±0.6 ^{ab}	38.6±0.9 ^c	63.4±3.0 ^b	96.8±4.3 ^b	12.4±0.4 ^a	16.4±0.4 ^{ab}	21.6±1.4 ^{ab}
SA	10.8±0.5 ^{ab}	12.5±0.8 ^a	13.2±0.8 ^{ab}	44.0±1.9 ^{ab}	71.2±3.0 ^{ab}	111.0±6.6 ^a	12.6±0.2 ^a	16.2±0.7 ^{ab}	24.4±0.5 ^a
HC	10.2±0.4 ^{ab}	12.5±0.5 ^a	13.8±0.6 ^a	39.4±2.0 ^{bc}	68.2±3.7 ^{ab}	102.6±6.0 ^{ab}	13.4±0.4 ^a	15.2±1.0 ^b	23.8±0.9 ^{ab}
FeG-EDTA	10.0±0.1 ^b	12.0±0.2 ^a	11.9±0.3 ^{bc}	45.5±1.7 ^a	73.4±2.7 ^a	103.4±1.8 ^{ab}	12.6±0.4 ^a	18.0±0.3 ^a	21.2±0.7 ^b
FeEDDHA	10.1±0.4 ^{ab}	12.1±0.2 ^a	12.3±0.5 ^{abc}	42.2±1.3 ^{abc}	65.0±3.7 ^b	100.6±4.5 ^{ab}	13.2±0.4 ^a	16.4±0.4 ^{ab}	24.0±0.8 ^{ab}
T0	8.2±0.8 ^c	9.7±0.3 ^b	11.4±0.5 ^c	32.8±2.5 ^d	53.4±1.0 ^c	64.6±4.2 ^c	10.8±1.0 ^b	12.6±0.7 ^c	17.0±1.5 ^c

^{ab}= Medias with the same letter are statistically equal between treatments (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Mean \pm standard error of the mean (n = 5), Trat = Treatments, CA + FeG-EDTA, OA+FeG-EDTA, SA+FeG-EDTA, HC+FeG-EDTA, FeG-EDTA, SD = stem diameter (mm), PH = plant height (cm), NL = number of leaves per plant.

Table 4. Means of agronomic variables determined in tomato plants developed in calcareous soil with application of organic acids combined with FeG-EDTA.

Trat	NCF			NFC			NMF	
	27	49	84	27	49	84	49	84
CA	4.6±0.4 ^{ab‡}	8.2±0.7 ^a	13.4±0.9 ^{ab}	12.2±1.5 ^{ab}	10.8±1.6 ^{ab}	5.6±3.2 ^a	12.0±2.0 ^{abc}	40.4±3.5 ^{bc}
OA	3.6±0.2 ^c	7.8±0.4 ^{ab}	12.6±1.4 ^{ab}	9.4±1.1 ^{ab}	12.2±0.9 ^{ab}	4.8±1.0 ^a	8.8±0.5 ^{bc}	46.4±4.3 ^{abc}
SA	4.6±0.4 ^{ab}	9.0±0.7 ^a	14.2±1.7 ^a	12.8±1.3 ^a	15.2±1.5 ^a	5.4±0.5 ^a	12.4±1.3 ^{ab}	42.6±4.4 ^{abc}
HC	5.4±0.2 ^a	8.6±0.6 ^a	13.6±1.0 ^{ab}	11.0±1.0 ^{ab}	15.6±3.0 ^a	1.8±0.6 ^b	8.4±1.2 ^c	51.8±4.5 ^a
FeG-EDTA	4.0±0.0 ^{bc}	8.0±0.8 ^a	11.0±0.4 ^{bc}	9.8±0.6 ^{ab}	11.8±2.2 ^{ab}	1.0±0.4 ^b	12.6±1.0 ^a	37.4±2.6 ^c
FeEDDHA	4.2±0.2 ^{bc}	8.8±0.9 ^a	13.0±1.0 ^{ab}	9.2±0.8 ^b	15.0±0.9 ^{ab}	2.8±0.6 ^a	12.4±1.2 ^{ab}	49.0±5.0 ^{ab}
T0	3.8±0.4 ^{bc}	6.0±0.4 ^b	9.0±0.6 ^c	9.8±1.8 ^{ab}	10.0±0.8 ^b	3.8±2.4 ^a	9.2±1.2 ^{abc}	20.0±1.6 ^d

[‡]= Medias with the same letter are statistically equal between treatments (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Mean \pm standard error of the mean (n = 5), Trat = treatments, CA + FeG-EDTA, OA + FeG-EDTA, SA + FeG-EDTA, HA + FeG-EDTA, FeG-EDTA, NCF = number of clusters floral per plant, NFC = number of flowers per plant, NMF = number of fruits per plant.

Table 5. Means of agronomic variables determined in tomato plants developed in calcareous soil with application of organic acids combined with FeG-EDTA.

Trat	THF	Y	PFW
CA	57.75 \pm 2.9 ^{ab‡}	2.757 \pm 125.2 ^{ab}	708.7 \pm 90.8 ^{ab}
OA	57.85 \pm 2.5 ^{ab}	2.856 \pm 62.1 ^{ab}	684.0 \pm 68.9 ^{ab}
SA	62.2 \pm 2.2 ^a	3.009 \pm 79.1 ^a	871.0 \pm 79.5 ^a
CH	61.95 \pm 3.0 ^a	2.817 \pm 120.8 ^{ab}	795.9 \pm 50.5 ^{ab}
FeG-EDTA	53.4 \pm 2.0 ^b	2.668 \pm 35.4 ^b	672.9 \pm 69.5 ^b
FeEDDHA	59.6 \pm 1.0 ^{ab}	2.875 \pm 145.1 ^{ab}	669.3 \pm 46.6 ^b
T0	32.05 \pm 1.4 ^c	0.771 \pm 66.2 ^c	251.5 \pm 52.3 ^c

‡ = Medias with same letter are statistically equal between treatments (LSD, $\alpha \leq 0.05$), means \pm standard error of the mean. Mean \pm standard deviation of the mean (n = 5), Trat = treatments, CA+FeG-EDTA, OA+FeG-EDTA, SA+FeG-EDTA, HC+FeG-EDTA, FeG-EDTA, THF = total harvested fruits (seven cuts), Y = yield per plant (kg), PFW = fresh shoot weight (g).

Table 6. Spearman's matrix correlations (ρ) between soil variables and growth and production variables of tomato plants grown in calcareous soil with application of organic acids combined with FeG-EDTA.

	SD	PH	NL	NFC	NFP	NMF	SPAD	Ca	Cb	Ct	THF	Y	PFW
Fe ⁺²	0.44**	0.29**	0.30**	0.36**	0.26**	-0.06	0.38**	0.15	0.15	0.16	0.27	0.22	0.02
Fe ⁺³	-0.03	0.05	0.09	0.06	0.10	-0.21**	-0.07	0.22**	0.17	0.17	-0.04	0.03	-0.23
FeT	0.21**	0.16	0.20**	0.20**	0.19	-0.21**	0.17	0.20**	0.15	0.15	0.08	0.17	-0.21
pHS	0.21**	0.30**	0.40**	0.37**	0.42**	-0.59**	-0.15	0.13	0.03	0.05	0.28	0.22	0.07
MSR	0.33**	0.67**	0.64**	0.62**	0.70**	-0.61**	-0.04	0.14	-0.05	0.01	0.46**	0.45**	0.43**
ORP-L	-0.09	-0.21**	-0.26**	-0.24**	-0.29**	0.58**	0.21**	-0.07	0.03	0.00	-0.18	-0.03	-0.13
pH-L	-0.43**	-0.69**	-0.60**	-0.63**	-0.65**	0.22**	-0.12	0.10	0.28**	0.22**	-0.23	-0.46**	-0.14
EC-L	0.54**	0.72**	0.68**	0.71**	0.70**	-0.22**	0.16	-0.09	-0.24**	-0.19	0.28	0.42**	0.26
C-L	-0.19**	-0.41**	-0.31**	-0.38**	-0.41**	-0.07	0.01	0.09	0.21**	0.16	-0.05	-0.14	0.06
B-L	0.49**	0.78**	0.69**	0.74**	0.77**	-0.36**	0.04	-0.03	-0.24**	-0.16	0.15	0.26	0.13

**= Significant statistical difference ($p \leq 0.05$), Var.=variables, CO₃⁼-L=carbonates in leachate (meq L⁻¹), HCO₃⁼L=bicarbonates in leachates (meq L⁻¹), pHs= pH of soil, MSR= microbial soil respiration (mg C-CO₂ g of soil), ORPL= leachate oxidation-reduction (mV), pHL= pH of leachates, ECL= leachates electrical conductivity (mS m⁻¹). SD=stem diameter (mm), PH=plant height (cm), NL=number of leaves per plant, NFC=number of floral clusters, NFP=number of flowers per plant, NMF= Number of moored fruits per plant, Ca=chlorophyll a ($\mu\text{g g}^{-1}$), Cb=chlorophyll b ($\mu\text{g g}^{-1}$), Ct= total chlorophyll ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Figures legend

Fig. 1. Fe content dynamics in calcareous soil where tomato plants were grown with application of organic acids combined with FeG-EDTA. * = (p<0.05), ** = (p<0.001), *** = (p<0.0001).

Fig. 2. Dynamics of pH (a) and microbial respiration (b) of the calcareous soil where tomato plants were grown with application of organic acids combined with FeG-EDTA. * = (p<0.05), ** = (p<0.001), *** = (p<0.0001).

Fig. 3. Dynamics of the variables determined in leachate from the calcareous soil where tomato plants were grown with application of organic acids combined with FeG-EDTA. * = (p<0.05), ** = (p<0.001), *** = (p<0.0001).

Fig. 4. Chlorophyll content dynamics in leaves of tomato plants grown on calcareous soil with application of organic acids combined with FeG-EDTA. * = (p<0.05), ** = (p<0.001), *** = (p<0.0001)

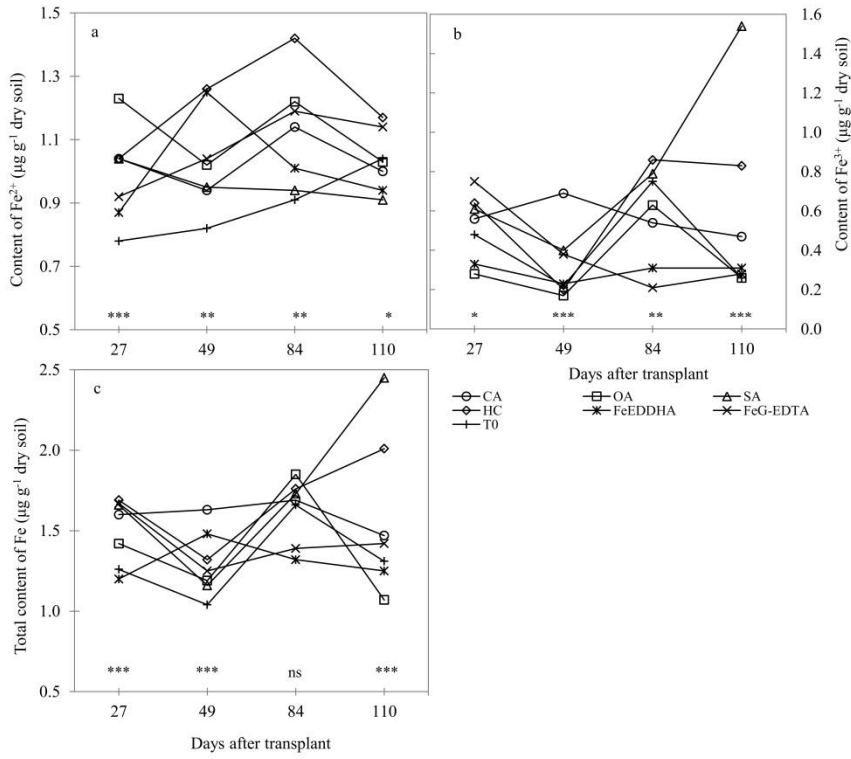


Fig. 1. Fe content dynamics in calcareous soil where tomato plants were grown with application of organic acids combined with FeG-EDTA. * = (p<0.05), ** = (p<0.001), *** = (p<0.0001).

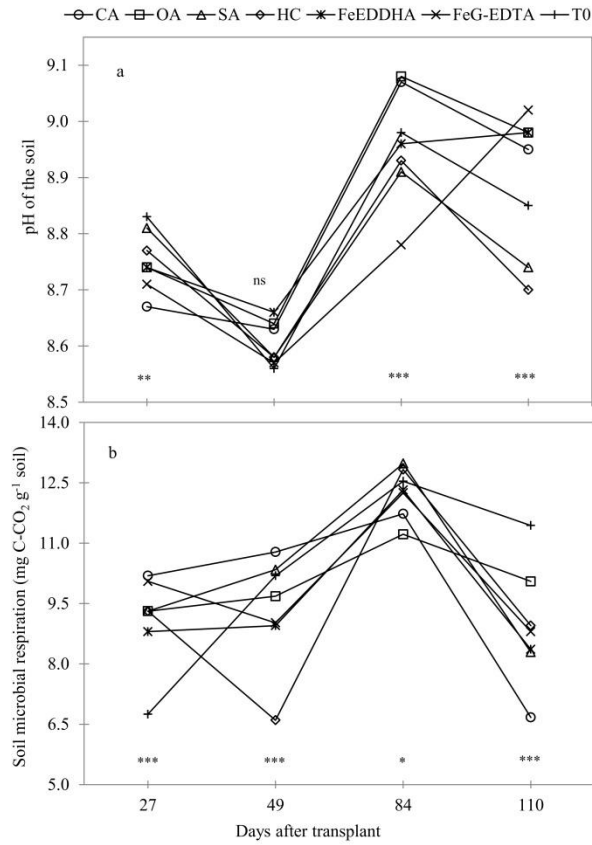


Fig. 2. Dynamics of pH (a) and microbial respiration (b) of the calcareous soil where tomato plants were grown with application of organic acids combined with FeG-EDTA. * = ($p < 0.05$), ** = ($p < 0.001$), *** = ($p < 0.0001$).

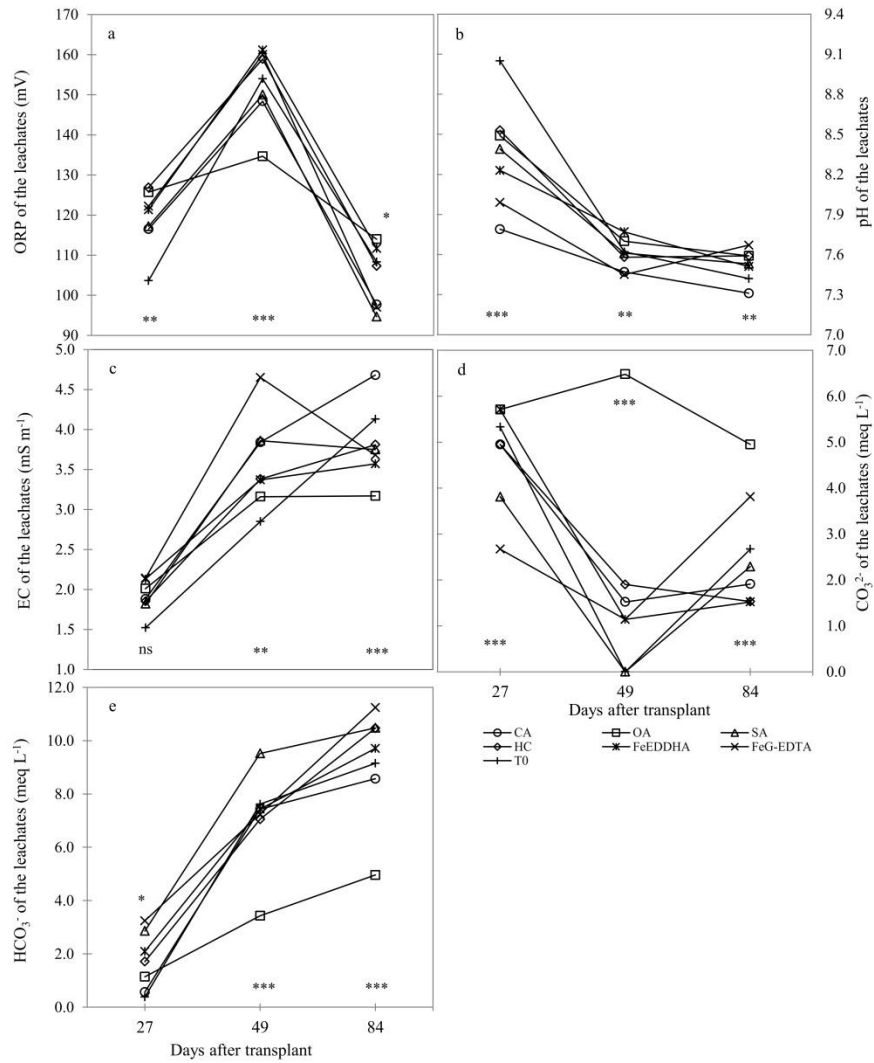


Fig. 3. Dynamics of the variables determined in leachate from the calcareous soil where tomato plants were grown with application of organic acids combined with FeG-EDTA. * = ($p < 0.05$), ** = ($p < 0.001$), *** = ($p < 0.0001$).

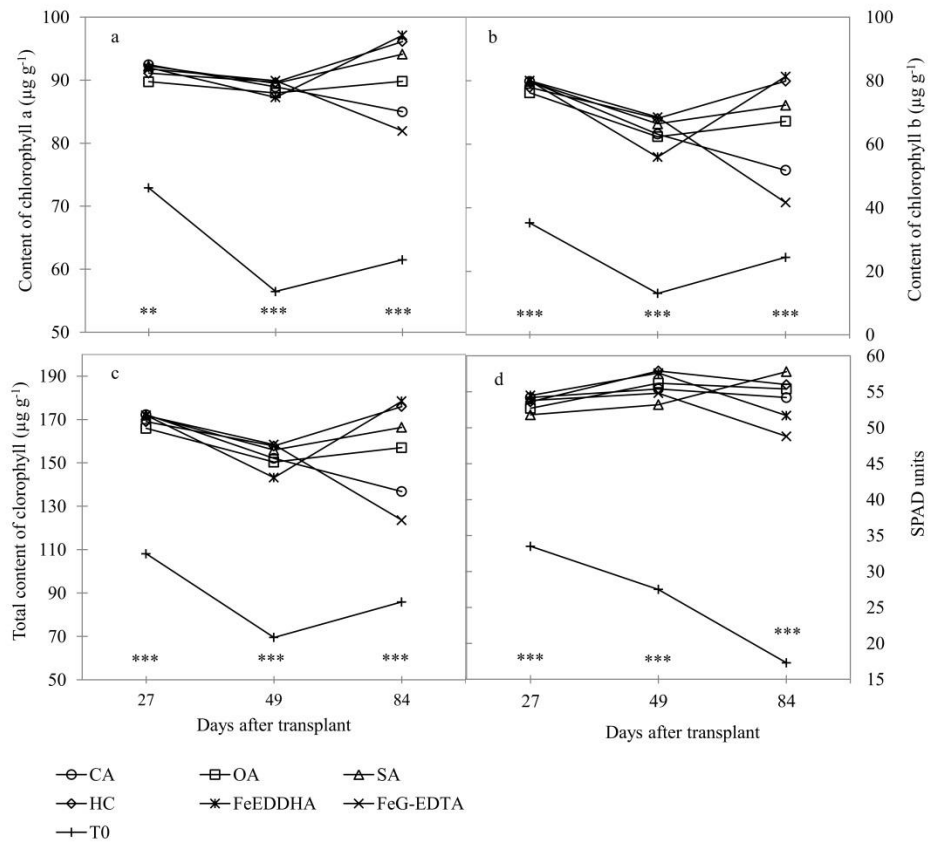


Fig. 4. Chlorophyll content dynamics in leaves of tomato plants grown on calcareous soil with application of organic acids combined with FeG-EDTA. * = (p<0.05), ** = (p<0.001), *** = (p<0.0001)

Organic Acids Modify Enzymatic Activity and Gene Expression Associated with Iron Absorption and Assimilation in Tomato Plants on Calcareous Soil

Fabián Pérez-Labrada¹; Adalberto Benavides-Mendoza¹; Luis Alonso Valdez-Aguilar¹; Antonio Juárez-Maldonado²; Susana Solís-Gaona³; Susana González-Morales^{4§}

¹Departamento de Horticultura, ²Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. ³ Arysta Lifescience. ⁴Cátedras CONACYT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

§Autor para correspondencia: qfb_sgm@hotmail.com

RESUMEN

El buen manejo del Fe en suelos calcáreos puede mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que aplicaciones exógenas de ácidos orgánicos se presentan como una alternativa. El presente experimento tuvo como objetivo cuantificar la respuesta en la actividad enzimática y expresión de genes asociados con la asimilación de hierro en plantas de tomate bajo suelo calcáreo con aplicación de ácidos orgánicos combinados con un quelato férrico. Se utilizó un suelo calcáreo para desarrollar plantas de tomate y sobre la solución fertilizante (aplicada desde el trasplante y hasta finalizar el experimento) se prepararon los tratamientos utilizando un quelato Fe Gluconato-EDTA (FG) en combinación con diferentes ácidos orgánicos: ácido cítrico (CA+FG), ácido salicílico (SA+FG), ácido oxálico (OA+FG), complejos húmicos (HC+FG), así como tratamientos relativos FG, FeEDDHA (FH) más un control sin Fe en la solución (-Fe). La actividad enzimática FCR foliar < FCR radicular, SA+FG incremento la actividad de manera homogénea, FH mostró el máximo incremento en la actividad foliar (65.9%) seguido de CA+FG (59.6%). En la raíz FH incrementó (25%) la actividad en el primer muestreo, en el segundo muestreo la actividad se redujo 12% con CA+FG, FG y FH. Para el tercer muestreo OA+FG

incrementó 27.7% la actividad FCR. La enzimática H^+ -ATPasa en hoja < raíz, en el primer caso la actividad fue menor en -Fe, SA+FG y CA+FG incrementaron 42.9y 35.7% su actividad, respectivamente, en el último muestreo HC+FG mostraron 33% más actividad H^+ -ATPasa. En raíz la H^+ -ATPasa incremento la actividad en los tres tiempos de muestreo con SA+FG (1.4, 2.0 y 0.4%), CA+FG mostró la máxima reducción en la actividad (-7.2%) seguido por FH (-6.7%) en el primer y tercer muestreo. PEPCasa presentó valores similares entre la hoja y raíz, CA+FG incrementó 56.9 y 45.9 unidades la actividad en el primer y segundo muestreo, en raíz el mismo tratamiento redujo la actividad 18.1, 3.2 y 28.2 unidades en los tres muestreos. El análisis de expresión de genes por qPCR arrojó que en hoja LeFRO1 fue reprimido con CA+FG y FG (primer y tercer muestro), HC+FG sobreexpresó 193 veces el gen a los 27 ddt. En el tejido radicular este gen fue reprimido consistentemente a los 49 y 84 ddt en todos los tratamientos en mayor proporción con HC+FG. LeHA1 en hoja fue reprimido con FG y CA+FG, mientras que en raíz se sobre expresó en mayor proporción con HC+FG. LePEPC1 en hoja fue reprimido por CA+FG (0.8 veces a los 27 y 49 ddt) el mismo tratamiento sobreexpresó 32 veces este gen a los 84 ddt, en raíz fue reprimido en mayor proporción con CA+FG. La adición de hierro como Fe Gluconato-EDTA en combinación CA, OA, SA y HC en la solución fertilizante modificaron la actividad enzimática FCR, H^+ -ATPasa y PEPCasa en hoja y raíz, así como los niveles de expresión de los genes LeFRO1, LeHA1 y LePEPC1 tanto en hoja como en raíz.

Palabras clave: complejos húmicos, quelato férrico reductasa, H^+ -ATPasa, PEPCarboxilasa.

1. Introducción

El hierro (Fe) es un es un metal de transición esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas pues interviene en diversos procesos de oxidación-reducción (Balk y Schaedler, 2014). Este nutriente puede alternar entre Fe^{3+} (férrico) o Fe^{2+} (ferroso) siendo el estado ferroso de mayor importancia metabólica (Thomine y Vert, 2013), sin embargo la forma

termodinámicamente más estable del Fe es Fe^{3+} por lo que el Fe^{2+} que esté presente en el medio tiende a oxidarse fácilmente lo cual genera óxidos férricos altamente insolubles (Shenker y Chen, 2005). Estas características son exacerbadas bajo suelos calcáreos que presentan un pH elevado (>7.5), potencial redox oxidante, alto contenido de $\text{CO}_3^{=}$ y HCO_3^- así como conductividad eléctrica elevada, condiciones que inducen aun mas la formación de silicatos de ferromagnesio o hidróxidos u óxidos de hierro (Colombo et al., 2014; Doubnerová y Ryšlavá, 2011; Aguado-Santacruz et al., 2012).

Ante tales circunstancias las plantas desarrollaron mecanismos para poder acceder al Fe que está presente en el suelo, siendo las más estudiadas la estrategia I y II. La absorción del hierro en la estrategia II se lleva a cabo por quelación, gracias a la secreción y acumulación por parte de las raíces de fitosideróforos como el ácido desoximugineico el cual se unen a Fe^{3+} y de esta manera es asimilado (Nozoye et al., 2014)). La secreción de dichos compuestos esta mediado por la expresión de los genes TOM1, YS3 y IRO2 (Walker y Connolly, 2008; Thomine y Vert, 2013; Li et al., 2014). En plantas que presentan la estrategia I (como *Solanum lycopersicum*) las raíces bombean protones hacia la rizosfera por medio de una H^+ -ATPasa, excretándose de igual manera ácidos orgánicos (mediante el incremento de la actividad fosfoenol piruvato carboxilasa) y fenoles, por lo que el pH rizosférico disminuye (Doubnerová y Ryšlavá, 2011; Yeasmin et al., 2014), esta enzima es codificada por el gen HA (LeHA1 en tomate) (Kim y Guerinot, 2007). Una vez acidificado el medio rizosférico Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} en la superficie de la raíz, dicha reducción se lleva a cabo por la enzima quelato férrico reductasa que es codificada por el gen LeFRO1 en tomate (Lucena et al., 2007). Finalmente el Fe^{2+} es capturado por el transportador específico IRT1 hacia el interior de la célula (codificado por el gen LeIRT1 en tomate) (Barberon et al., 2014) y marginalmente por los transportadores NRAMP1 y ZIP (Thomine y Vert, 2013; Barberon et al., 2014). Una vez dentro de la planta el transporte del Fe^{2+} intracelular e intercelular es regulado por varios transportistas como PIC1 (transportador de Fe-cloroplasto),

FRO (transportador de Fe-quelato reductasa-cloroplasto), MIT (transportador de Fe-mitocondrial), VIT1/FPN/IREG (transportador de Fe-hacia la vacuola), NRAMP (transportador de Fe hacia el citosol de la vacuola) (Aguado-Santacruz et al., 2012; Kobayashi y Nishizawa, 2012; Xiong et al., 2012; García-Mina et al., 2013).

Kobayashi y Nishizawa (2012, 2014) mencionan que la respuesta de la deficiencia de Fe está mediada por una combinación transcripcional y pos-transcripcional, siendo el primero más pronunciado entre los genes relacionados con la adquisición de Fe, en ese sentido el factor de transcripción bHLH codificado por FER es el principal sensor de Fe en la raíz (Grotz y Guerinot, 2006) y en menor medida MYB10 y WRKY (Kim y Guerinot, 2007; Li et al., 2014), además estos factores son esenciales en la inducción de la transcripción de los genes LeFRO2 y LeIRT1 en tomate (Ling et al., 2002; Walker y Connolly, 2008).

Bajo déficit de Fe las plantas muestran diferentes respuestas, en *Arabidopsis* se encontró una regulación masiva de los genes FIT, FRO2, IRT1 y AHA2 (Rodríguez-Celma et al., 2013), en *Pisum sativum* la actividad de la reductasa férrica se incrementó y aumentó la expresión de los genes FRO1, IRT1 y HA1 en las raíces (Kabir et al., 2012), mientras que en raíces de arroz se observó una mayor expresión de los genes OsIRT1, OsYSL15, OsFRDL1 y OsZIP6 (Chen et al., 2014), y en raíces de *Cucumis sativus* L. se expresaron los genes CsHA1, FRO y IRT1 (Santi et al., 2005; Zanin et al., 2014). Así mismo se observó un incremento de la actividad PEPCasa en la raíz de plantas de la estrategia I (Jelali et al., 2010; Jiménez et al., 2011; Martínez-Cuenca et al., 2013).

Dentro del manejo más común de la nutrición férrica en suelos calcáreos es la aplicación de fertilizantes férricos y/o quelatos sintéticos (Ylivainio, 2010; Covarrubias et al., 2014), sin embargo dichas aplicaciones son costosas y presentan pérdida por lixiviación o adsorción sobre el suelo (Arizmendi et al., 2011). Considerando que la exudación de ácidos orgánicos es uno de

los mecanismos que las plantas utilizan para acceder al Fe (Yeasmin et al., 2014) además de que las fuentes disponibles de Fe en la solución rizosférica son principalmente una mezcla de Fe y ligandos orgánicos (Wang et al., 2014; Zanin et al., 2014), la aplicación exógena de ácidos orgánicos puede inducir cambios positivos en la adquisición del Fe por las plantas sobre suelos calcáreos. Al respecto Kong et al. (2014) y Kong et al. (2015) reportan que el ácido salicílico aumentó la actividad de la H⁺-ATPasa, así como la tasa de fotosíntesis neta. Por su parte el ácido oxálico en combinación con ácidos húmicos aumentan la actividad enzimática de plástidos implicados en la fotosíntesis (El-Shabrawi et al., 2015). De igual manera una mezcla de ácidos orgánicos en *Medicago sativa* L. regularon la transcripción del gen de la malato deshidrogenasa (MDH) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en las raíces (An et al., 2014). En raíz de pepino provocan una mejora en la actividad de la H⁺-ATPasa induciendo cambios en la extracción y distribución de Fe (Mora et al., 2010). De igual manera Aguirre et al., (2009) reportan un aumento de la actividad H⁺-ATPasa y quelato reductasa, regulando transitoriamente los genes los CsFRO1, CsHa1 y CsHa2 y CsIRT1.

Considerando el uso potencial de ácidos orgánicos aunado al poco conocimiento en la dinámica de la actividad enzimática y expresión de genes relacionados con la absorción y asimilación de Fe en plantas desarrolladas en un ciclo de producción y bajo la aplicación combinada de quelato férrico y ácidos orgánicos, el presente trabajo se planteó con el objetivo de: i) cuantificar la respuesta de la actividad enzimática asociados con la asimilación de hierro en plantas de tomate bajo suelo calcáreo con la aplicación de ácidos orgánicos combinados con un quelato férrico y ii) verificar los niveles de expresión de genes asociados con dichas enzimas.

2. Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo en un invernadero (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila, México) con cubierta de polietileno con 70% de irradiancia natural y 50-60% de humedad relativa. Durante el transcurso del experimento se presentó en promedio una temperatura de 32°C, 736.5 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa y una concentración de 430 ppm de CO_2 .

Como material vegetal se utilizaron plántulas de tomate variedad Rio Grande que fueron transplantadas (40 días después de la siembra) sobre contenedores de polietileno color negro que contenían 9 L de suelo calcáreo previamente analizado (Tabla 1).

Con el agua de riego caracterizada (Tabla 1) se preparó una solución nutritiva Steiner al 100% (Steiner, 1961) para fertilizar las plantas desde el trasplante y hasta el final del experimento. Se utilizaron como fuentes macroelementos $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.06 g L^{-1}), MgSO_4 (0.487 g L^{-1}), KNO_3 (0.071 g L^{-1}), K_2SO_4 (0.347 g L^{-1}), KH_2PO_4 (0.211 g L^{-1}) y microelementos en forma iónica H_3BO_3 (629.2 mg L^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (473.0 mg L^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (85.8 mg L^{-1}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (17.2 mg L^{-1}), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (19.8 mg L^{-1}) y 3 mg L^{-1} de Fe (aplicado en forma de quelato).

Table 1. Physicochemical properties of the soil, water, and humic complex chemical properties used in the present investigation (mineral content in mg kg^{-1} , mg L^{-1} , and g L^{-1} respectively)

Variable	Soil	Water	Variable	Soil	Water
% organic matter	0.2	-	S-SO ₄	10	94.1
pH	8.5	7.94	HCO ₃	-	309
EC (dS m^{-1})	-	0.97	CO ₃	-	0
N-NO ₃	5	3.92	Cl	-	87.5
P	9	-	Zn	0.1	0.0025

K	285	2.73	Mn	2	0.0007
Mg	546	22.3	Cu	0.6	0.0033
Ca	3253	77.6	B	0.8	0.51
Na	42	90.9	Fe	5	0.0059

2.2 Tratamientos

Con la solución nutritiva se prepararon los tratamientos que consistieron en diferentes ácidos orgánicos en combinación con un quelato de hierro en forma de Fe Gluconato-EDTA (FG). Antes de adicionar los ácidos orgánicos el pH de la solución se ajustó a 6.3 con H₂SO₄.

Tabla 2. Tratamientos aplicados sobre plantas de tomate desarrolladas en un suelo calcáreo.

Tratamiento	Fuente de Fe	Abreviación
Citric acid (0.1 mM)	Fe Gluconato-EDTA	CA+FG
Oxalic acid (0.1 mM)	Fe Gluconato-EDTA	OA+FG
Salicylic acid (0.01 mM)	Fe Gluconato-EDTA	SA+FG
Humic complexes (0.4 ml L ⁻¹)	Fe Gluconato-EDTA	HC+FG
Control relativo 1	Fe Gluconato-EDTA	FG
Control relativo 2	FeEDDHA	FH
Control absoluto	Sin Fe	-Fe

Los tratamientos se aplicaron diariamente por medio de riego localizado, desde el transplante y hasta finalizar el experimento, empleando un volumen de solución total por planta por día de

670 mL [1-28 días después del trasplante (ddt)], 1.4 L (29-63 ddt) y 1.68 L (64-110 ddt). Los CH solo se aplicaron semanalmente en el volumen de riego correspondiente con los ddt.

2.3 Actividad enzimática en raíz y hoja.

A los 27, 49 y 84 ddt se colectó la hoja fisiológicamente madura de la planta colocándose inmediatamente en N₂ líquido, de igual manera se colectaron raíces secundarias a una profundidad de 10 cm y a 5 cm de distancia del tallo lavándose rápidamente con agua desionizada y colocándose en N₂ líquido. Las muestras de hoja y raíz fueron almacenadas -80°C.

2.3.1 *Quelato férrico reductasa (FCR).*

Se determinó midiendo la formación del complejo Fe(II)-BPDS a partir de Fe(III)-EDTA modificando la técnica citada por Chaney et al. (1972). Brevemente, se tomaron 20 mg de muestra y se colocaron en tubo eppendorf agregando 2 mL de CaSO₄·7H₂O (0.2 mM) se dejó reposar durante 5 min posteriormente se centrifugó durante 5 min a 10 000 rpm a 4°C en microcentrífuga, se recuperó el precipitado y se colocó en tubo nuevo añadiendo 10 mL de solución nutritiva fresca (sin Fe) suplementada con 0.3 mM de BPDS (Sigma) y 100 µM de Fe(III)-EDTA (Sigma), el pH de esta solución fue previamente ajustada a 5.5 con 5 mM de MES-NaOH (Sigma). Se incubó durante 1 hr en la oscuridad a temperatura ambiente y finalmente se midió la absorbancia a 535 nm con un espectrofotómetro (Lambda 25, Perkin Elmer Shelton). Ya que el BPDS forma un complejo rojo soluble en agua con el Fe²⁺ y solo un débil complejo con el Fe³⁺, la cantidad de hierro reducido se calculó por la concentración del complejo Fe²⁺-(BPDS) utilizando un coeficiente de extinción de 22.14 mM cm⁻¹.

2.3.2 *H⁺-ATPasa.*

Se determinó modificando la metodología citada por Rabotti y Zocchi (1994). Brevemente, inicialmente se llevó a cabo la extracción enzimática del tejido vegetal el cual se molió en un

mortero con N₂ líquido, posteriormente 100 mg se homogenizaron en un 1 mL de tampón que contenía 50 mM de Tris-HCL (pH 7.5), 10% de glicerol, 20% de PVPP, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA y 14 mM de β-mercaptoetanol (todos de Sigma). También se añadió 1 mM de PMSF y 10 µg mL⁻¹ de leupeptina (Sigma) para evitar o minimizar la proteólisis. Posteriormente se filtró a través de una membrana de nylon (con un tamaño de poro de 0.45 µm) y el homogeneizado obtenido se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min, se recuperó sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 30 min. El precipitado final fue resuspendido en 1 mL del mismo medio tampón de homogenización, el cual fue utilizado para las determinaciones de la actividad H⁺ ATPasa. Para su conservación estas muestras se almacenaron a -80°C. La actividad enzimática H⁺-ATPasa se determinó acoplando la hidrólisis del ATP a la oxidación del NADH (Rabotti y Zocchi, 1994) para lo cual en un volumen final de 2 mL de un tampón 25 mM de MOPS-BTP (pH 6.5), que contenía 250 mM de sacarosa, 50 mM de KCl, 1 mM de ATP, 1 mM de PEP, 0.25 mM de NADH, 15 µg mL⁻¹ de lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), 30 µg mL⁻¹ de piruvato quinasa (EC 2.7.1.40) y 0.015% de Brij[®] 58 (todos de Sigma). Las reacciones se iniciaron por la adición de 100 µL de la fracción microsomal, los cambios en la absorbancia se midieron en espectrofotómetro (Lambda 25, Perkin Elmer Shelton) a 340 nm durante un periodo de 5 min. La actividad de la H⁺-ATPasa se calculó al extrapolar las absorbancias en una curva patrón de NADH previamente estandarizada.

2.3.3 Fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPCasa).

La actividad PEPCasa se determinó mediante el acoplamiento de su actividad a la malato deshidrogenasa catalizada por la oxidación de NADH, siguiendo la técnica citada por (De Nissi y Zocchi, 2000) con algunas modificaciones: brevemente, se obtuvo el extracto enzimático: 50 mg de tejido vegetal se colocaron en tubo eppendorf y se agregó 1 mL de tampón que contenía Tris-HCl pH 7.5 (50 mM), MgCl₂ (10 mM), glicerol (10% v/v), EDTA (1 mM) y β-mercaptoetanol (14 mM), de igual manera se añadió PMSF (1 mM) y leupeptina (10 µg mL⁻¹),

con la intención de evitar o minimizar la proteólisis. Posteriormente el homogeneizado se microcentrifugó durante 15 min a 13 000 rpm a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente durante 30 min a 13 500 rpm a 4 °C, el extracto obtenido se almacenó -80 °C en ultracongelador. La actividad enzimática PEPCasa se cuantificó en un volumen final de 1.5 mL de un tapón estándar que contenía Tris-HCl pH 8 (100 mM), MgCl₂ (5 mM), PEP (2.5 mM), NADH (0.2 mM), NaHCO₃ (10 mM) y MDH (15 µg mL⁻¹) donde se añadió 100 µL de extracto enzimático para iniciar la reacción, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y finalmente se cuantificó midiendo la absorbancia a 340 nm en espectrofotómetro. La actividad enzimática se calculó al extrapolar las absorbancias en una curva patrón de NADH previamente estandarizada.

El contenido en proteínas de la fracción microsomal de las membranas se determinó utilizando 5 µL del extracto enzimático y 250 µL del reactivo Bradford incubado a temperatura ambiente durante 5 min, después de lo cual se midió la absorbancia a 630 nm en un lector de placa ELISA (BioTek ELx808), como estándar de proteínas se utilizó BSA (Bradford, 1976).

2.4 Expresión relativa de genes por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

A los 49 y 84 ddt se colectó la hoja más joven de la planta colocándose inmediatamente en N₂ líquido, de igual manera se colectaron raíces secundarias a una profundidad de 10 cm y a 5 cm de distancia del tallo, se lavaron rápidamente con agua desionizada y se colocaron N₂ líquido. Las muestras de hoja y raíz fueron almacenadas -80°C.

2.4.1 Extracción de ARN

El ARN total se extrajo por medio del método del Trizol utilizando 100 mg de tejido. El ARN obtenido fue tratado con DNase I (Sigma Aldrich) para eliminar contaminación con ADN. La cuantificación del ARN extraído se determinó a través de la relación A260/A280 en

espectrofotómetro, mientras que la calidad del ARN fue determinada por medio de electroforesis desnaturalizante.

2.4.2 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) usando 2 µg de ARN y bajo condiciones de termociclado de 25°C por 5 min, 42°C por 60 min, 70°C por 15 min y 4°C de HOLD en termociclador (AXYGEN modelo Maxigene II). El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

2.4.3 qPCR

Las reacciones de qPCR se realizaron en un volumen final de 20 µL que constan del cDNA de la muestra, primer forward (F), primer reverse (R), 10 µL 2x de SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) aforado con agua grado biología molecular. La qPCR se corrió en equipo StepOne qPCR system de Applied Biosystems bajo las condiciones 95°C por 10 min, 40 ciclos: 95°C por 15 seg, temperatura iniciador 60°C por 1 min, 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min y 95°C por 15 seg.

Los genes problema fueron LeHA1, LeFRO1 y LePEPC1, los primers utilizados fueron LeHA1 (F 5'-GAACCCTTCATGGGCTCCAA-3', R 5'-GCAACTCACGTAGCCTAGCA-3'), LeFRO1 (F 5'-GCGGTGTTGAATATGCTAATC-3', R 5'-AAACTTTCCATCTCCCTATCG-3'), LePEPC1 (F 5'-TGCTGCATTGTTTCGACAAGC-3', R 5'-CAAAAGTTCGCCGAAAGACAAC-3'). Como gen de referencia se utilizó actina (ACT1) (F 5'-CCCAGGCACACAGGT-3', R 5'-CAGGAGCAACTCGAA-3'). Las concentraciones de los primers fueron: 100 nM F-R para LeHA1 y LeFRO1, 100-200 nM F-R para LePEPC1 y 72-60 nM F-R para ACT1. Para la cuantificación de los genes LePEP1, LeFRO1 se utilizaron 2 µl de cDNA mientras que para LeHA1 se utilizó 2 µl de cDNA diluido 1:5. Se analizó el tejido foliar

y radicular de los tratamientos CA+FG, HC+FG y FG, el tratamiento –Fe fue utilizado como control calibrador, se utilizaron cinco replicas por tratamiento. La expresión relativa fue determinada por el método de curva estándar relativa a partir de diluciones seriadas.

2.5 Análisis estadístico

Los datos correspondientes con las variables de actividad enzimática fueron analizados bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones, además de realizar un análisis de varianza se aplicó una prueba de medias según LSD con el programa InfoStat (Balzarini et al., 2008).

3 Resultados

3.1 Actividad enzimática.

3.1.1 *Quelato férrico reductasa.*

La actividad enzimática FCR observada en el tejido foliar fue menor respecto al tejido radicular, en el primer caso la actividad se redujo 20% bajo la aplicación de los tratamientos a los 27 ddt, la adición de OA+FG indujo una reducción del 26.1% en la actividad de esta enzima respecto del tratamiento –Fe. Por otro lado hacia los 49 y 84 ddt la actividad FCR se incrementó paulatinamente con la aplicación de los tratamientos, en el segundo muestreo la adición de SA+FG y FG incrementaron los valores de esta enzima en un 35.9 y 36.2%, respectivamente. En el último muestreo la actividad enzimática fue mayor en las plantas suplementadas con Fe siendo el tratamiento FH quien logró inducir mayor actividad FCR (65.9% más respecto a –Fe), seguido del tratamiento CA+FG y FG (59.6 y 56.8% más actividad, respectivamente) mientras que la FCR fue menor en las plantas bajo déficit de Fe, 49 y 84 ddt (Figura 1A).

En lo que respecta a la actividad enzimática FCR en raíz se apreció que el comportamiento dinámico fue muy similar entre tratamientos. Hubo un incremento de esta enzima hacia los 49 ddt reduciéndose 20% en el último muestreo. A los 27 ddt se logra apreciar un incremento en la actividad de esta enzima en todos los tratamientos siendo la aplicación del quelato FeEDDHA quien indujo el mayor incremento (25%) seguido del tratamiento OA+FG (21.7%) comparadas con el tratamiento deficitario de Fe en la solución nutritiva. Al segundo muestreo hubo una respuesta contrastante en el comportamiento de esta enzima ya que en las plantas donde no se aplicó Fe en la solución nutritiva las plantas mostraron la máxima actividad FCR [25.3 nmol Fe²⁺ reducido (g FW raíz)⁻¹ h⁻¹] mientras que la adición de Fe, solo o en combinación con ácidos orgánicos, redujeron la actividad hasta en un 12% bajo la aplicación de CA+FG, FG y FH) en tanto que con OA+FG la actividad solo descendió un 4.6%. Finalmente a los 84 ddt la adición de SA+FG y HC+FG indujeron una respuesta similar con el tratamiento -Fe, para este muestreo el tratamiento OA+FG indujo un incremento del 27.7% en la actividad FCR (Figura 1B).

3.1.2 H⁺-ATPasa.

La actividad enzimática H⁺-ATPasa en hoja mostró un comportamiento muy análogo entre tratamientos reduciéndose a los 49 ddt e incrementado su actividad a los 84 ddt. En la etapa de floración (27 ddt) se observó una actividad enzimática promedio de 0.29 nmol NADH min⁻¹ mg⁻¹ prot, en este muestreo el tratamiento FH redujo la actividad en un 7% respecto a las plantas del tratamiento -Fe, mientras que la aplicación de OA+FG y HC+FG propiciaron un incremento del 10.7% en la actividad H⁺-ATPasa seguido de los tratamientos SA+FG (7.1%) y FG (3.6%), en tanto que CA+FG se comportó de manera similar que -Fe. A los 49 ddt se presentó una reducción del 40% en la actividad enzimática bajo todos los tratamientos, sin embargo se apreció un incremento del 42.9% al aplicar SA+FG seguido por CA+FG (35.7%), FG y FH (28.6%), HC+FG (21.4%) y OA+FG (7.1%) comparado con plantas deficientes de Fe en la solución nutritiva. Finalmente a los 84 ddt se apreció un incremento en la actividad de esta enzima (44%

aproximadamente). Todos los tratamientos lograron inducir un aumento respecto a plantas del tratamiento -Fe. SA+FG y HC+FG incrementaron en un 33% la actividad H⁺-ATPasa seguido por FH (23.8%). De igual manera la aplicación del tratamiento CA+FG indujo un aumento del 19% y en menor medida al aplicar OA+FG y FG (Figura 1C).

En el caso de la actividad enzimática H⁺-ATPasa en raíz esta fue mayor que en hoja, en este caso hacia los 27 ddt se apreció una actividad promedio de 46.70 nmol NADH min⁻¹ mg⁻¹ prot en raíces de plantas desarrolladas sin Fe en la solución nutritiva, siendo los tratamientos HC+FG y SA+FG quienes incrementaron la actividad en un 2.1 y 1.4%, respectivamente, por otro lado FG, OA+FG, FH y CA+FG redujeron la actividad en la raíz (1.6, 4.1, 4.5 y 7.2%, respectivamente). Hacia los 49 ddt la actividad enzimática radicular incrementó 36%, en esta etapa los tratamientos HC+FG, FG y FH indujeron una reducción (0.9, 1.4 y 1.6%, respectivamente) mientras que la aplicación de OA+FG, CA+FG y SA+FG presentaron una respuesta contraria, esto al incrementar 0.6, 0.8 y 2% la actividad enzimática. A los 84 ddt la enzima se mantuvo bajo los mismos niveles que se apreciaron a los 49 ddt, CA+FG y SA+FG indujeron un ligero aumento en la actividad enzimática en tanto que el resto de los tratamientos mostraron una reducción en mayor proporción con los tratamientos FH (6.7%) y OA+FG (6.1%) (Figura 1D).

3.1.3 Fosfoenol piruvato carboxilasa.

En el caso de la actividad enzimática PEPCasa en el tejido foliar se apreció un comportamiento muy similar entre todos los tratamientos durante los diferentes tiempos de muestreo. A los 27 ddt las hojas de plantas de tomate sin la adición de Fe en solución nutritiva presentaron una actividad promedio de 95.25 nmol NADH mg⁻¹ prot min⁻¹ mientras que la aplicación de HC+FG redujo en 9 unidades su actividad, en tanto que el resto de los tratamientos incrementaron la actividad de esta enzima en mayor medida con FG y CA+FG (77.1 y 56.9

unidades superiores al tratamiento $-Fe$). A los 49 ddt hubo un ligero aumento en la actividad de esta enzima respecto a los 27 ddt, en esta etapa la aplicación de OA+FG redujo 10.9 nmol NADH $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$ la actividad PEPCasa en tanto que el resto de los tratamientos incrementaron su actividad, es ese sentido CA+FG presentó un aumento de 45.9 unidades en esta enzima seguido de FH con 40.4 unidades, respecto de $-Fe$. A los 84 ddt la actividad PEPCasa decreció cerca de 31%, para este muestreo la aplicación de FG redujo la actividad en 5 unidades respecto a $-Fe$, por otra parte FH y HC+FG incrementaron en 108 y 107.5 unidades la actividad enzimática (Figura 1E).

La actividad PEPCasa en raíz mostró un comportamiento muy similar entre los diferentes tratamientos, apreciándose una reducción del 11% aproximadamente a los 49 ddt respecto al primer muestreo, mientras que a los 84 ddt la actividad incremento 13% respecto al segundo muestreo. La aplicación de CA+FG redujo la actividad PEPCasa en mayor proporción durante los tres muestreos (18.1, 3.2 y 28.2 unidades menos que $-Fe$, respectivamente), excepto a los 84 ddt donde FG mostró una reducción de 29 unidades. De manera similar OA+FG redujo la actividad enzimática a lo largo del experimento (8.5, 1.2 y 7.8 unidades menos que $-Fe$, respectivamente). Por su parte HC+FG solo redujo la actividad PEPCasa a los 27 y 84 ddt. De igual forma se lograron apreciar incrementos ligeros en esta enzima a los 27 ddt al aplicar solo FG induciendo 4.9 unidades más que $-Fe$, de igual forma SA+FG y FH aumentaron la actividad PEPCasa en 1.9 y 4.7 unidades por arriba de $-Fe$ (Figura 1F).

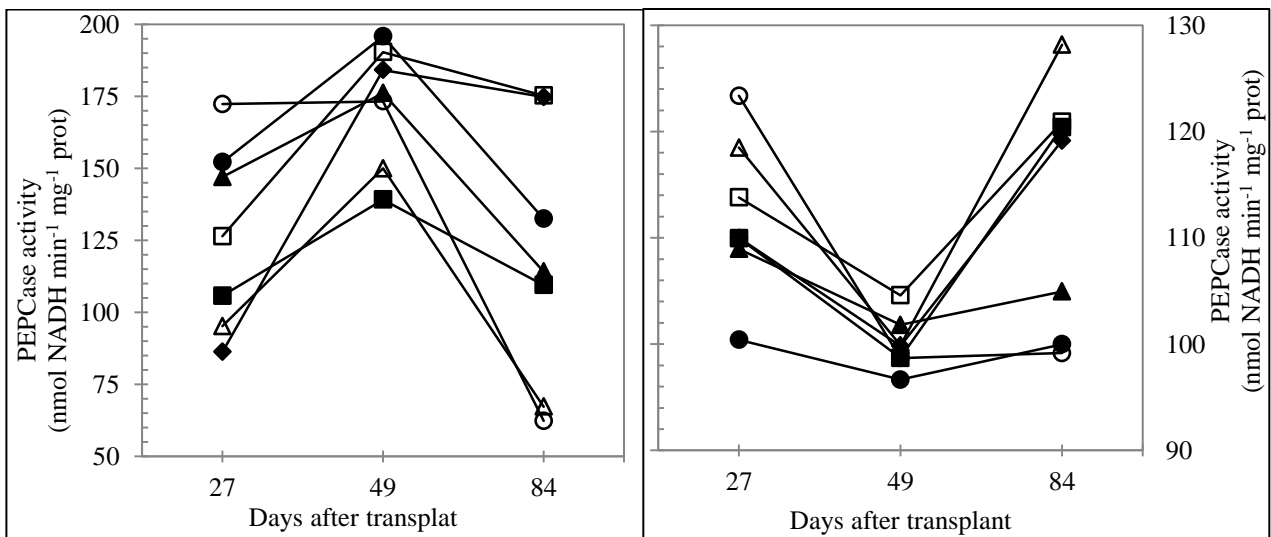
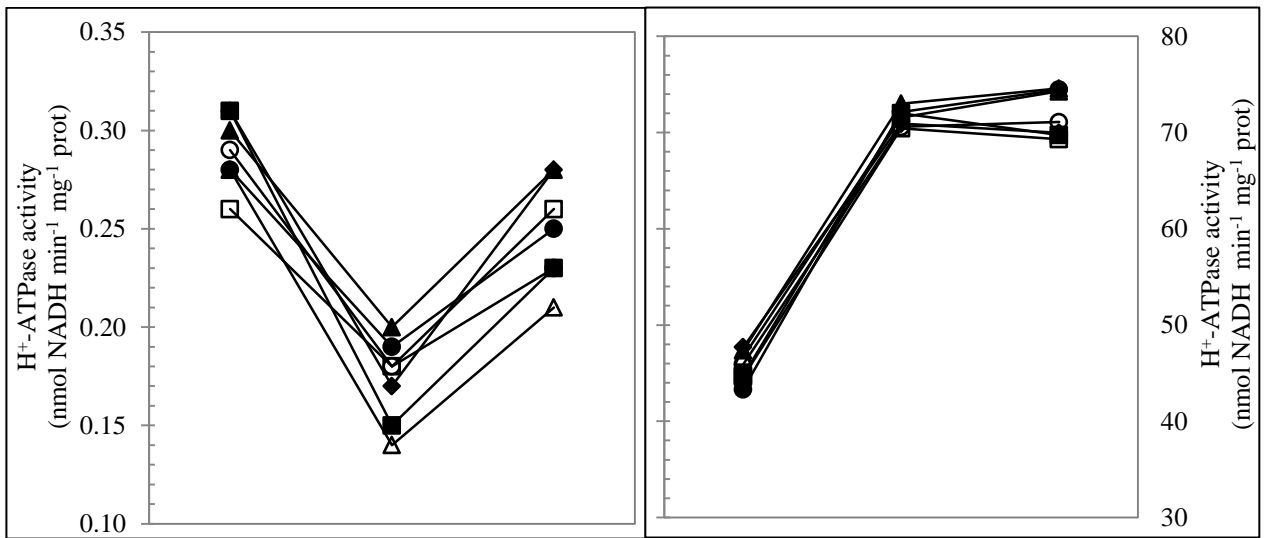
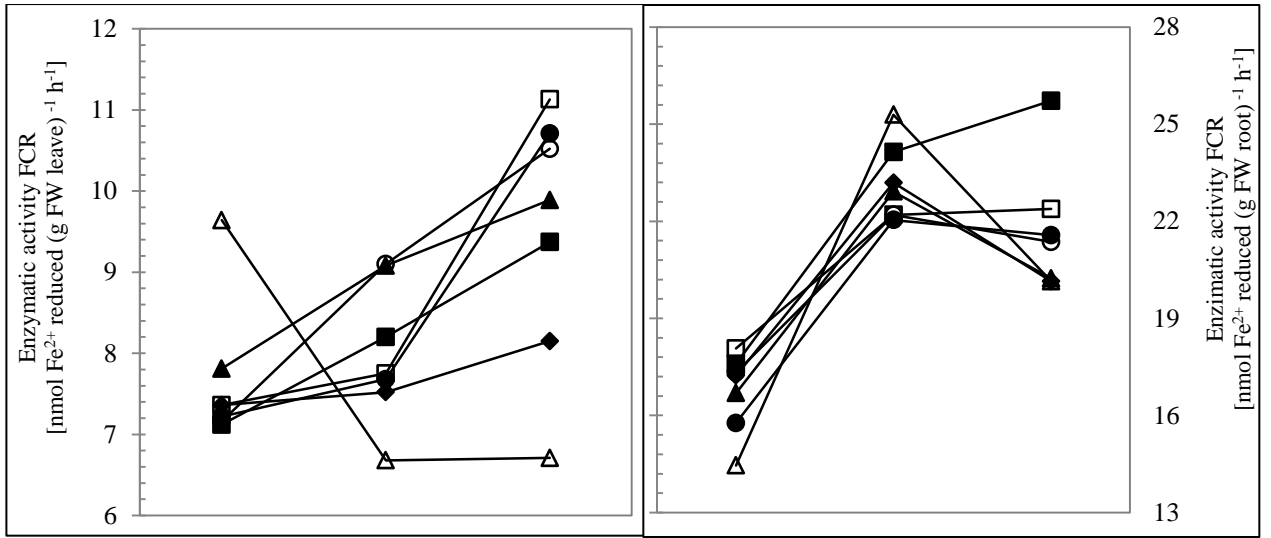


Figura 1.- Dinámica de la activada enzimática FC-R hoja (A), FCR raíz (B), H⁺-ATPasa hoja (C), H⁺-ATPasa raíz (D), PEPCasa hoja (E) y PEPCasa raíz (F) de plantas de tomate bajo aplicación de ácidos orgánicos combinado con un quelato férrico en condiciones de suelo calcáreo. CA+FG=círculo negro, OA+FG=cuadro negro, SA+FG=triángulo negro, HC+FG=romboide negro, FG=círculo, FH=cuadro y -Fe=triángulo.

3.2 Expresión relativa de genes

En el tejido foliar se apreció que el gen LeFRO1, codificante de la enzima FCR, fue reprimido a los 27 ddt con CA+FG y a los 49 y 84 ddt por FG, siendo sobre expresado con la aplicación de HC+FG y FG a los 27 ddt así como por HC+FG y CA+FG durante los 49 y 84 ddt, en ese sentido la máxima sobreexpresión (193 veces superior a -Fe) se presentó a los 27 ddt en el tratamiento HC+FG (Figura 2A). De manera contrastante el gen LeFRO1 en el tejido radicular fue reprimido consistentemente a los 49 y 84 ddt en todos los tratamientos en mayor proporción con HC+FG (Figura 2B).

Los transcritos del tejido foliar del gen LeHA1, codificante de la enzima H⁺-ATPasa, fue reprimido de manera considerable bajo todos los tratamientos en los tres diferentes tiempos de muestreo, los tratamiento FG y CA+FG presentaron una mayor represión del gen respecto del tratamiento -Fe, así mismo a los 49 ddt los tratamientos HC+FG y FG mostraron una RQ ligeramente menor pudiendo considerarse una expresión similar al tratamiento de -Fe (Figura 2C). En el caso de la expresión de este gen en el tejido radicular se logró apreciar una sobre expresión de este gen en los dos muestreos bajo todos los tratamientos, a los 49 ddt se manifestó la mayor sobre expresión del gen en mayor proporción con la aplicación de HC+FG mientras que a los 84 ddt la sobreexpresión fue menor respecto al segundo muestreo (Figura 2D).

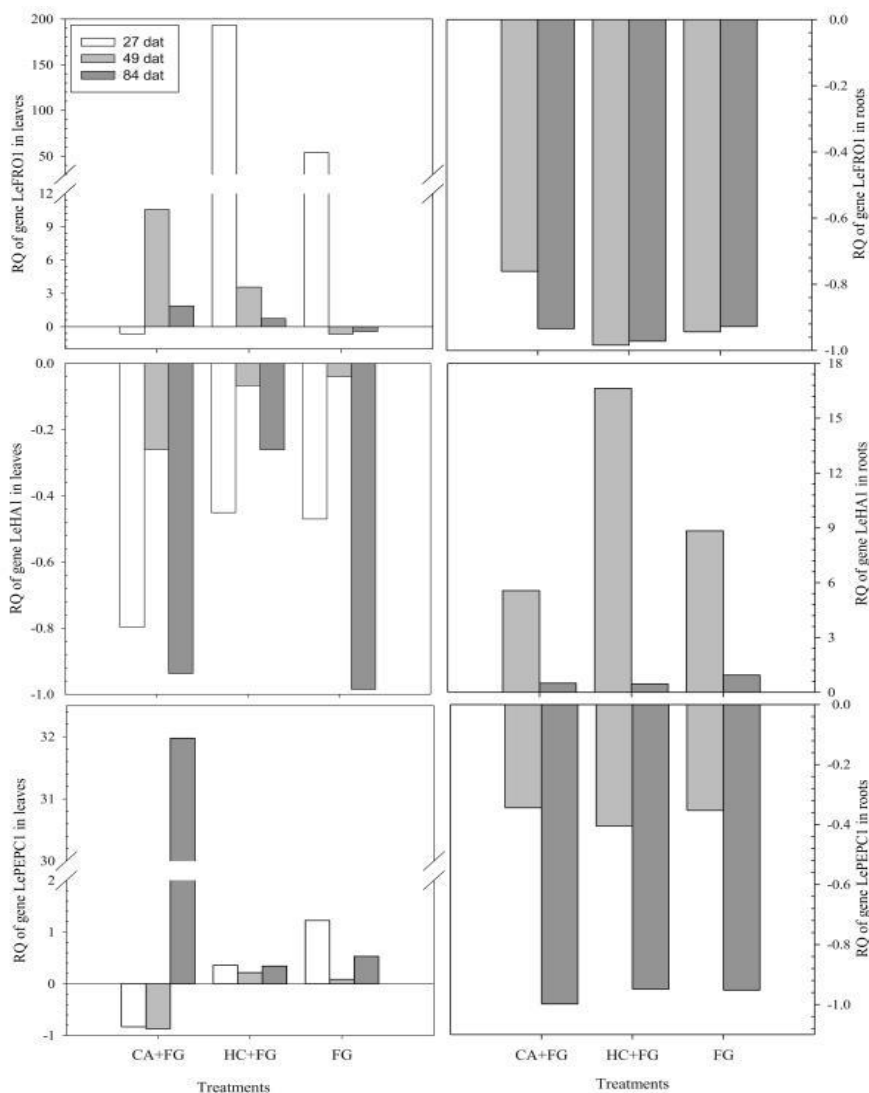


Figura 2.- Dinámica de la expresión relativa (RQ) de genes de hoja y raíz de plantas de tomate bajo aplicación de ácidos orgánicos combinado con un quelato férrico en condiciones de suelo calcáreo.

El análisis de expresión del gen LePEPC1, codificante de la enzima PEPCasa, en hojas de plantas de tomate mostró que al aplicar CA+FG este gen fue reprimido 0.8 veces a los 27 y 49 ddt respecto a -Fe, sin embargo a los 84 ddt el mismo tratamiento indujo una sobre expresión del gen 32 veces superior al tratamiento -Fe, en tanto que los tratamientos HC+FG y FG indujeron una sobreexpresión en todos los muestreos en mayor medida con la aplicación de FG (Figura

2E). Por su parte en el tejido radicular el gen LePEPC1 fue reprimido en los dos muestreos y bajo todos los tratamientos, hubo una mayor represión a los 84 ddt siendo el tratamiento CA+FG quien mostro una RQ menor (Figura 2F).

4 Discusión

4.1 Actividad enzimática.

4.1.1 *Quelato férrico reductasa.*

El Fe^{2+} absorbido por la planta puede ser transportado como Fe^{2+} -citrato o Fe^{2+} - $^{3+}$ -nicotianamina sin embargo su estado de oxidación tiende a cambiar a Fe^{3+} siendo necesario nuevamente su reducción a Fe^{2+} para poder ser traslocado en los distintos compartimentos foliares (Abadía et al., 2002), en ese sentido la actividad FCR debe mantener un nivel adecuado que permita la reducción del Fe, en el presente trabajo la actividad osciló entre los 7-11 nmol Fe^{2+} reducido $(\text{g FW leave})^{-1} \text{h}^{-1}$. El mantenimiento y/o incremento de la actividad FCR en la hoja dependen en gran medida del contenido de Fe en la solución citoplasmática, al respecto Larbi et al (2010) mencionan que la actividad FCR incrementa en las hojas de manera gradual después de suplementar Fe a plantas deficientes, esta afirmación fue consistente con lo apreciado a los 84 ddt.

Cuando se presentan condiciones deficitarias de Fe la actividad FCR de los compartimentos celulares de la hoja puede llegar a disminuir intensamente (Abadía et al., 2002) esta respuesta se logró apreciar hacia los 49 y 84 ddt (Figura 1A) ya que la actividad FCR decreció aproximadamente 1 unidad en el tratamiento -Fe respecto a los tratamientos suplementados con Fe, lo anterior puede estar asociado con una reducción en el contenido de Fe en el apoplasto o bien a cambios en el pH apoplástico de la hoja (Abadía et al., 2002), bajo estas condiciones las plantas se ven obligadas a priorizar reacciones anapleróticas para poder supervivir en un corto

plazo (Rellán-Álvarez et al., 2011) (en esta caso a los 27 ddt). De igual manera la actividad enzimática pudo decrecer derivado del alto contenido de HCO_3^- presentes en el suelo del tratamiento deficitario de Fe que pudieron inducir una alcalinización de los tejidos celulares. Cabe señalar que a los 27 ddt la actividad incremento más del 20% en $-\text{Fe}$ respecto a los tratamientos con Fe derivado probablemente a que la planta implementó mecanismos para acceder al Fe disponible en el suelo conllevando a un alto contenido de Fe^{3+} en el tejido foliar (Lucena et al., 2007; Doubnerová y Ryšlavá, 2011; Yeasmin et al., 2014). La reducción de la actividad con la aplicación de ácidos orgánicos más el quelato, así como bajo los controles relativos, a los 27 ddt puede sugerir que el Fe^{2+} transportado hacia las hojas se logró mantener en un estado reducido gracias a la complejación con citrato, nicotianamina o glutamato (Schuler et al., 2012; Kutrowska y Szelag, 2014).

Considerando que la FCR es una de las proteínas críticas en la homeostasis del hierro en las plantas de la estrategia I (Kong et al., 2013) su comportamiento a nivel radicular puede marcar una pauta en la tolerancia de las plantas a déficit de Fe. De acuerdo con López-Millán et al. (2009), Jelali et al. (2010) y Paolacci et al (2014) la actividad FCR se incrementa cuando se presentan condiciones de deficiencia de Fe, en mayor proporción en las puntas radiculares, tal y como se observó a los 49 ddt en este trabajo. El incremento en la actividad FCR apreciado a los 27 y 84 ddt bajo los tratamientos puede sugerir un aumento en la concentración de Fe^{3+} en la solución del suelo como consecuencia del pH alcalino del suelo estudiado, en este muestreo la máxima actividad FCR se presentó con FH lo cual sugiere un mal comportamiento de este tipo de quelato bajo suelo calcáreo al no mantener estable el Fe^{2+} en la solución comparado con FG, al menos durante la etapa de floración y cosecha de frutos de tomate. La reducción presentada hacia los 49 ddt en los mismos tratamientos puede sugerir una mayor proporción de Fe^{2+} respecto de Fe^{3+} o bien a una adecuada quelación por parte de los ácidos orgánicos adicionados a la solución nutritiva en mayor proporción con CA+FG (Figura 1B).

De manera muy estrecha el alto contenido de HCO_3^- en conjunto con un incremento del pH rizosférico pueden reducir la actividad FCR e inducir una acidificación del apoplasto así como un probable efecto de mineralización lo cual puede conllevar a una lenta acumulación de partículas de Fe extraplasmáticas, induciendo la generación de una placa de Fe, la cual puede capturar Fe y minerales y no hacerlos disponibles para la planta (Fodor et al., 2012; Alhendawi y Mohamed, 2015; Incesu et al., 2015). Sin embargo la adición de OA+FG incremento la FCR, esta respuesta puede sugerir que el aporte de aniones orgánicos sobre el suelo calcáreo pudo inducir cierto grado de acidificación del suelo (Zhi-An et al., 2008) mejorando probablemente la actividad enzimática. La respuesta presentada por HC+FG a los 84 ddt es similar con lo citado por Zamboni et al., (2016) los cuales no encontraron diferencia en la actividad FCR en raíces de tomate deficitarias de Fe y con aplicación de sustancias húmicas extraíbles de agua.

4.1.2 H^+ -ATPasa.

Si bien la extrusión de protones en plantas de la estrategia I es atribuido con un incremento en la actividad H^+ -ATPasa, tal parece que este mecanismo es similar en plantas bajo déficit de Fe como aquellas desarrolladas con aporte de Fe (Schmidt et al., 2003) por lo que solo comprende una parte del proceso de acidificación de la rizosfera, en ese sentido los datos aquí obtenido parecen validar este supuesto. La ligera reducción en la actividad H^+ -ATPasa de la raíz con la suplementación de Fe puede sugerir un aumento en el contenido de este ion en la zona rizosférica por lo que la extrusión no fue necesaria para su absorción, esta respuesta es similar a lo reportado por Jelali et al. (2010) quienes citan una disminución en la actividad de esta enzima en raíces de *Pisum sativum* bajo déficit de Fe. La actividad de esta enzima puede estar estrechamente relacionada con la FCR ya que de acuerdo con Doubnerová y Ryšlavá (2011) el proceso de extrusión activo de protones presente en la raíz de plantas deficientes de Fe puede conducir inherentemente a la alcalinización del citoplasma, por lo que la actividad FCR puede ver mermada su actividad.

4.1.3 Fosfoenol piruvato carboxilasa.

Como se logra apreciar en la Figura 1E el incremento que se apreció en el tejido foliar de la enzima PEPCasa (FH y HC+FG) puede derivarse con la inducción de cambios en el pH citoplasmático en función a que el pH óptimo de esta enzima es alto (Andaluz et al., 2002), esta respuesta contrasta con la tendencia reportada por López-Millán et al. (2009) en hojas de plantas de tomate deficientes de Fe. Andaluz et al., (2002) mencionan que el incremento del metabolismo del PEP puede fungir como un generador de C el cual probablemente coadyuve en la exportación de ácidos orgánicos a las hojas para lograr mantener procesos como la respiración, lo cual puede ser plausible en el presente trabajo ya que el aporte de ácidos orgánicos en la solución nutritiva pudo inducir una oferta de compuestos carbónicos en el suelo por lo que la actividad enzimática sería localizada en hojas.

Diversos trabajos sugieren que las raíces de plantas de la estrategia I (como *Solanum lycopersicum*) deficientes de Fe tienden a incrementar la actividad PEPCasa (López-Millán et al., 2009; Abadía et al., 2002; Andaluz et al., 2002, 2009; Jelali et al., 2010; Jiménez et al., 2011; Martínez-Cuenca et al., 2013), en el presente trabajo esta condición fue consistente con excepción de la respuesta presentada por SA+FG y FH a los 49 ddt. El incremento de esta enzima puede deberse parcialmente a la capacidad de fijar HCO_3^- para generar una producción anaplerótica de compuestos orgánicos (citrato y malato, principalmente) en las raíces (Chollet et al., 1996; Abadía et al., 2002; O'Leary et al., 2011; Alhendawi y Mohamed, 2015) los cuales pueden ser secretados para aumentar la absorción de Fe (Schmidt et al., 2003) o bien como se mencionó con anterioridad a un aumento en el pH citoplasmático radicular (Andaluz et al., 2002). En ese sentido la reducción en la actividad de esta enzima por acción de los tratamientos combinado con Fe, particularmente en CA+FG, puede sugerir una disminución en el metabolismo de la PEP (Andaluz et al., 2002) derivado de una alta oferta de compuestos carbónicos aportados por el CA sobre la solución del suelo. Finalmente, la actividad PEPCasa

moderada puede sugerir que las plantas de tomate no son tan eficientes bajo condiciones deficitarias de Fe (Figura 1F).

4.2 Expresión relativa de genes

De acuerdo con Donnini et al (2010) el grado de expresión o represión del gen LeFRO1 está en función del tiempo de exposición de la planta a condiciones de déficit de Fe, lo cual contrasta con lo encontrado en el presente trabajo derivado a que este gen fue reprimido en raíz de los tratamientos donde se aportó Fe en la solución nutritiva, sin embargo concuerdan con lo encontrado por Andaluz et al. (2009), lo anterior manifiesta la variabilidad en las respuestas genéticas en función a los diversos genotipos y grados de privación de Fe. Mientras que la respuesta observada en la represión del gen LeFRO1 bajo aporte de Fe puede no solo depender del contenido óptimo de este ion en la solución rizosférica sino también puede deberse a efectos del contenido de HCO_3^- , en ese sentido Hsieh y Waters (2016) mencionan que un contenido de 10 μM de HCO_3^- puede inducir un incremento en los transcritos del gen FRO1 en mayor proporción cuando se presentan condiciones deficiente de Fe. Por otro lado Kong et al. (2013) encontraron que el gen LeFRO1 puede presentar tres formas distintas (LeFRO1^{MM}, LeFRO1^{Ailsa} y LeFRO1^{Monita}) que a su vez tienen cinco variaciones de aminoácidos en las posiciones 21, 24, 112, 195 y 582, y estas formas poseen diferente actividad reductasa (LeFRO1^{Ailsa} > LeFRO1^{MM} > LeFRO1^{Monita}), este hecho puede manifestar el amplio grado que las plantas de tomate han desarrollado para adecuarse a condiciones de privación de Fe. De igual forma Satbhai et al. (2017) mencionan que variaciones alélicas en el locus FRO2 asociado con la longitud de la raíz bajo déficit de Fe en *Arabidopsis thaliana* pueden inducir variaciones en los transcritos de FRO2 al igual que en la actividad FCR.

La sobreexpresión del gen LeHA1 en la raíz bajo la aplicación de Fe por medio de la solución nutritiva discrepa con lo reportado por Andaluz et al. (2009) quienes en raíces de plantas de

Medicago truncatula encontraron una reducción en la expresión de este gen al suplementar Fe. Al igual que el gen LeFRO1, el grado de expresión o represión de LeHA1 puede depender en gran medida del tiempo de exposición de la planta al déficit de Fe (Donnini et al., 2010). De igual manera la respuesta encontrada en la represión del gen LePEPC1 en la raíz bajo la aplicación de Fe es similar con lo reportado por Andaluz et al. (2009) en raíces de plantas de *Medicago truncatula* y por Martínez-Cuenca et al. (2013) en raíz de *Carrizo citrange*.

La expresión de los genes correspondientes a las enzimas estudiadas, LeFRO1, LePEPC1 y LeHA1, parecen ser reguladas marcadamente como respuesta a la deficiencia de Fe tal y como lo reportan Andaluz et al. (2009), los mismos autores señalan que la presencia de una regulación transcripcional y postranscripcional en la expresión de estos genes así como sus respectivas actividades fisiológicas derivado del patrón diferencial entre ellas a lo largo del tiempo (tal y como se aprecia en el presente trabajo), en ese sentido la regulación postraduccional del gen PEPC1 en raíz parece ser mediada por fosforilación (Andaluz et al., 2002).

Zamboni et al., (2016) al llevar a cabo un estudio transcripcional en *Solanum lycopersicum* en respuesta al suministro de Fe con diferentes agentes quelantes, encontraron que en el tejido radicular después de 1 h de suministrar Fe las sustancias húmicas extraíbles en agua (WEHS) solo modularon dos transcripciones, dejando el transcriptoma muy similar al de plantas con deficiencia de Fe, mientras que la aplicación de Fe-citrato y Fe-fitosideróforos tuvieron efecto en 728 y 408 transcripciones 728 y 408, respectivamente, mostrando a su vez una rápida regulación molecular. Estos resultados contrastan con lo aquí reportado en gran medida por el tiempo de exposición de los HC ya que se aplicaron durante todo el experimento, lo cual pudo inducir una respuesta en la expresión de los genes LeFRO1, LeHA1 y LePEPC1, al respecto Aguirre et al. (200) mencionan que la aplicación de 250 mg L⁻¹ de ácido húmico purificado de leonardita sobre plantas de *Cucumis sativus* regulan transitoria y temporalmente la expresión de los genes CsHa2 y CsFRO1. Por otro lado El-Shabrawi et al. (2015) mencionan que al aplicar ácido húmico sobre

plantas de trigo encontraron una inducción en los genes codificantes de enzimas plasmáticas involucradas en metabolismo de los carbohidratos en las hojas, por lo anterior es plausible que HC+FG presenten efectos en el perfil genético de plantas de tomate bajo condiciones de privación de Fe.

Los cambios en el perfil genético de plantas bajo déficit de Fe también es reportado por Donnini et al. (2010) en plantas de *Cucumis sativus* donde hubo cambios en el perfil proteómico espacial, particularmente en el flujo glucolítico, metabolismo anaeróbico, biosíntesis de carbohidratos y recambio de proteínas, lo anterior demuestra una reprogramación espacio-temporal en la expresión de genes asociados al metabolismo energético lo cual conlleva inherentemente a un gasto metabólico por parte de la planta dicho gasto y reprogramación parecen ser menores y/o bajo otro perfil cuando se aplica Fe combinado con diferentes compuestos de bajo y alto peso molecular en la solución nutritiva durante el desarrollo de la planta de tomate mejorando así la homeostasis del Fe.

3 Conclusión

La adición de hierro como quelato Fe Gluconato-EDTA en combinación con compuestos de bajo (CA, OA y SA) y alto peso molecular (HC) en la solución fertilizante aplicada sobre plantas de tomate desarrolladas bajo un suelo calcáreo modificaron la actividad enzimática FCR, H⁺-ATPasa y PEPCasa en hoja y raíz, de igual forma hubo modificaciones en los niveles de expresión de los genes LeFRO1, LeHA1 y LePEPC1 tanto en hoja como en raíz.

4 Referencias

Abadía, J., López-Millán, A. F., Rombolà, A., & Abadía, A. (2002). Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant and Soil*, 241(1), 75-86.

- Aguado-Santacruz, G.A.; Moreno-Gómez, B.; Jiménez-Francisco, B.; García-Moya, E. y Preciado-Ortiz, R.E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidóforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev. Fitotec. Mex.* 35(1): 9-21.
- Aguirre, E.; Leménager, D.; Bacaicoa, E.; Fuentes, M.; Baigorri, R.; Zamarren, A.M.; Garcia-Mina, J.M. (2009). The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.* 47(3): 215-223. doi:10.1016/j.plaphy.2008.11.013
- Alhendawi, A.M.R and Mohamed, A.M.A (2015). The Influence of High pH on Maize Growth and Utilization of Micronutrients under Various Concentrations of Bicarbonates. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 15 (2): 259-264. DOI: 10.5829/idosi.aejaes.2015.15.2.12532.
- An, Y.; Zhou, P.; Xiao, Q. and Shi, D. (2014). Effects of foliar application of organic acids on alleviation of aluminum toxicity in alfalfa. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 177(3): 421-430. doi: 10.1002/jpln.201200445
- Andaluz, S., López-Millán, A. F., Peleato, M. L., Abadía, J., & Abadía, A. (2002). Increases in phosphoenolpyruvate carboxylase activity in iron-deficient sugar beet roots: Analysis of spatial localization and post-translational modification. *Plant and soil*, 241(1), 43-48.
- Andaluz, S., Rodríguez-Celma, J., Abadía, A., Abadía, J., & López-Millán, A. F. (2009). Time course induction of several key enzymes in *Medicago truncatula* roots in response to Fe deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(11), 1082-1088.
- Arizmendi, G.N., Rivera, O.P., De la Cruz, S.F., Castro, M.B. and De la Garza, R.F. (2011). Leaching of Chelated Iron in Calcareous Soils. *TERRA Latinoamericana* 29(3): 231-237.
- Balk, J. and Schaedler, T.A. 2014. Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65:125-153.

- Balzarini, M., Di Rienzo, A., Cazanoves, F., González, I., Tablada, M., Guzmán, W., Robledo, W. (2008). InfoStat software estadístico InfoStat versión 2008, Manual de usuario, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Barberon, M.; Dubeaux, G.; Kolb, C.; Isono, E.; Zelazny, E. and Vert, G. (2014). Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *PNAS*, 111 (22): 8293-8298.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Chaney, L.R.; Brown, J.C. and Tiffin, L.O. (1972). Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol* 50:208-213.
- Chen, L.; Zhao, X.; Ding, C.; Wang, S. and Ding, Y. (2014). Physiological and Molecular Responses Under Fe Deficiency in Two Rice (*Oryza sativa*) Genotypes Differing in Iron Accumulation Ability in Seeds. *J Plant Growth Regul.*, 33(4): 769-777. doi: 10.1007/s00344-014-9424-2
- Chollet, R., Vidal, J., & O'Leary, M. H. (1996). Phospho enol pyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 273-298
- Colombo, C.; Palumbo, G.; He, J.Z.; Pinton, R. and Cesco, S. (2014). Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *J. Soils Sediments*, 14(3): 538-548.
- Covarrubias, J.I.; Pisi, A.; Rombolà, A.D. (2014). Evaluation of sustainable management techniques for preventing iron chlorosis in the grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20(1): 149-159.

- De Nissi, P. and Zocchi, G. (2000). Phosphoenolpyruvate carboxylase in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots under iron deficiency: activity and kinetic characterization. *J. Experimental Botany*, 51(352): 1903-1909.
- Donnini, S., Prinsi, B., Negri, A. S., Vigani, G., Espen, L., & Zocchi, G. (2010). Proteomic characterization of iron deficiency responses in *Cucumis sativus* L. roots. *BMC plant biology*, 10(1), 268.
- Doubnerová, V., & Ryšlavá, H. (2011). What can enzymes of C₄ photosynthesis do for C₃ plants under stress?. *Plant science*, 180(4), 575-583.
- El-Shabrawi, H.; Bakry, A.B.; Ahmed, M. and Abou-El-Lail, M. (2015). Humic and Oxalic Acid Stimulates Grain Yield and Induces Accumulation of Plastidial Carbohydrate Metabolism Enzymes in Wheat Grown under Sandy Soil Conditions. *Agricultural Sciences*, 6: 175-185. doi: 10.4236/as.2015.61016.
- Fodor, F., Kovács, K., Czech, V., Solti, Á., Tóth, B., Lévai, L., ... & Vértes, A. (2012). Effects of short term iron citrate treatments at different pH values on roots of iron-deficient cucumber: a Mössbauer analysis. *Journal of plant physiology*, 169(16), 1615-1622.
- García-Mina, J.M.; Bacaicoa, E.; Fuentes, M.; Casanova, E. (2013). Fine regulation of leaf iron use efficiency and iron root uptake under limited iron bioavailability. *Plant Sci.* 198: 39-45.
- Grotz, N. and Guerinot, M.L. (2006). Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* . 1763(7): 595-608.
- Hsieh, E. J., & Waters, B. M. (2016). Alkaline stress and iron deficiency regulate iron uptake and riboflavin synthesis gene expression differently in root and leaf tissue: implications for iron deficiency chlorosis. *Journal of experimental botany*, 67(19), 5671-5685.
- Incesu, M., Yeşiloğlu, T., Cimen, B., & Yilmaz, B. (2015). Influences of different iron levels on plant growth and photosynthesis of W. Murcott mandarin grafted on two rootstocks under high pH conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(5), 838-844.

- Jelali, N., Dell'orto, M., Abdelly, C., Gharsalli, M., & Zocchi, G. (2010). Changes of metabolic responses to direct and induced Fe deficiency of two *Pisum sativum* cultivars. *Environmental and experimental botany*, 68(3), 238-246.
- Jiménez, S., Ollat, N., Deborde, C., Maucourt, M., Rellán-Álvarez, R., Moreno, M. Á., & Gogorcena, Y. (2011). Metabolic response in roots of *Prunus* rootstocks submitted to iron chlorosis. *Journal of plant physiology*, 168(5), 415-423.
- Kabir, A.H.; Able, A.J.; Paltridge, N.G.; Paull, J.G. and Stangoulis, J.C.R. (2012). Natural variation for Fe-efficiency is associated with upregulation of Strategy I mechanisms and enhanced citrate and ethylene synthesis in *Pisum sativum* L. *Planta* 235(6):1409-1419. Doi:10.1007/s00425-011-1583-9
- Kim, S.A. and Guerinot, M.L. (2007). Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters* 581(12): 2273-2280.
- Kobayashi, T. and Nishizawa, N.K. (2012). Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012. 63:131-152.
- Kobayashi, T. and Nishizawa, N.K. (2014). Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant Science*, 224: 36-43.
- Kong, D., Chen, C., Wu, H., Li, Y., Li, J., & Ling, H. Q. (2013). Sequence diversity and enzyme activity of ferric-chelate reductase LeFRO1 in tomato. *Journal of genetics and genomics*, 40(11), 565-573.
- Kong, J.; Dong, Y.; Xu, L.; Liu, S. and Bai, X. (2014). Effects of foliar application of salicylic acid and nitric oxide in alleviating iron deficiency induced chlorosis of *Arachis hypogaea* L. *Botanical Studies*, 55:9. doi:10.1186/1999-3110-55-9.
- Kong, J.; Dong, Y.; Zhang, X.; Wang, Q.; Xu, L.; Liu, S.; Hou, J. and Fan, Z. (2015). Effects of Exogenous Salicylic Acid on Physiological Characteristics of Peanut Seedlings under Iron-Deficiency Stress, *J. Plant Nutrition* 38(1): 127-144. doi: 10.1080/01904167.2014.920391

- Kutrowska, A. and Szlag, M. (2014). Low-molecular weight organic acids and peptides involved in the long-distance transport of trace metals. *Acta Physiol Plant.* 36(8):1957- 1968. doi: 10.1007/s11738-014-1576-y
- Larbi, A., Morales, F., Abadía, A., & Abadía, J. (2010). Changes in iron and organic acid concentrations in xylem sap and apoplastic fluid of iron-deficient *Beta vulgaris* plants in response to iron resupply. *Journal of plant physiology*, 167(4), 255-260.
- Li, Y.; Wang, N.; Zhao, F.; Song, X.; Yin, Z.; Huang, R.; Zhang, C. (2014). Changes in the transcriptomic profiles of maize roots in response to iron-deficiency stress. *Plant Mol Biol.* 85(4-5):349-363. doi: 10.1007/s11103-014-0189-6.
- Ling, H.Q.; Bauer, P.; Berczky, Z.; Keller, B. and Ganai, M. (2002). The tomato *fer* gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13938-13943.
- López-Millán, A. F., Morales, F., Gogorcena, Y., Abadía, A., & Abadía, J. (2009). Metabolic responses in iron deficient tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 166(4), 375-384.
- Lucena, C.; Romera, F.J.; Rojas, C.L.; García, M.J.; Alcántara, E. and Pérez-Vicente, R. (2007). Bicarbonate blocks the expresión of several genes envolved in the physiological responses to Fe deficiency of Strategy I plants. *Funct. Plant Biol.* 34:1002-1009.
- Martínez-Cuenca, M. R., Iglesias, D. J., Talón, M., Abadía, J., López-Millán, A. F., Primo-Millo, E., & Legaz, F. (2013). Metabolic responses to iron deficiency in roots of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.× *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]. *Tree physiology*, 33(3), 320-329.
- Mora, V.; Bacaicoa, E.; Zamarreño, A.M.; Aguirre, E.; Garnica, M.; Fuentes, M.; García-Mina, J.M. (2010). Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *J Plant Physiol.* 167(8):633-642. doi: 10.1016/j.jplph.2009.11.018.

- Nozoye, T.; Nagasaka, S.; Bashir, K.; Takahashi, M.; Kobayashi, T.; Nakanishi, H.; Nishizawa, N.K. (2014). Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXXf or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice. *The Plant Journal*, 77(2): 246-260.
- O'Leary, B., Park, J., & Plaxton, W. C. (2011). The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochemical Journal*, 436(1), 15-34.
- Paolacci, A. R., Celletti, S., Catarcione, G., Hawkesford, M. J., Astolfi, S., & Ciaffi, M. (2014). Iron deprivation results in a rapid but not sustained increase of the expression of genes involved in iron metabolism and sulfate uptake in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings. *Journal of integrative plant biology*, 56(1), 88-100.
- Rabotti, G. and Zocchi, G. (1994). Plasma membrane-bound H⁺-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiol. Plant.* 90: 779-785.
- Rellán-Álvarez, R., El-Jendoubi, H., Wohlgemuth, G., Abadía, A., Fiehn, O., Abadía, J., & Álvarez-Fernández, A. (2011). Metabolite profile changes in xylem sap and leaf extracts of strategy I plants in response to iron deficiency and resupply. *Frontiers in plant science*, 2.
- Rodríguez-Celma, J.; Lin, W.D.; Fu, G.M.; Abadía, J.; López-Millán, A.F. and Schmidt, W. (2013). Mutually Exclusive Alterations in Secondary Metabolism Are Critical for the Uptake of Insoluble Iron Compounds by *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 162(3): 1473-1485.
- Santi, S.; Cesco, S.; Varanini, Z. and Pinton, R. (2005). Two plasma membrane H⁺-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(3): 287-292.
- Satbhai, S. B., Setzer, C., Freynschlag, F., Slovak, R., Kerdaffrec, E., & Busch, W. (2017). Natural allelic variation of FRO2 modulates *Arabidopsis* root growth under iron deficiency. *Nature Communications*, 8, ncomms15603.

- Schmidt, W., Michalke, W., & Schikora, A. (2003). Proton pumping by tomato roots. Effect of Fe deficiency and hormones on the activity and distribution of plasma membrane H⁺-ATPase in rhizodermal cells. *Plant, Cell & Environment*, 26(3), 361-370
- Schuler, M.; Rellán-Álvarez, R.; Fink-Straube, C.; Abadía, J. and Bauer, P. (2012). Nicotianamine Functions in the Phloem-Based Transport of Iron to Sink Organs, in Pollen Development and Pollen Tube Growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(6): 2380-2400.
- Shenker, M. and Chen, Y. (2005). Increasing Iron Availability to Crops: Fertilizers, Organofertilizers, and Biological Approaches. *Soil Science and Plant Nutrition*, 51(1): 1-17.
- Steiner, A.A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant Soil*. 15, 134-154.
- Thomine, S. and Vert, G. (2013). Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3):322-327. doi:10.1016/j.pbi.2013.01.003
- Walker, E.L. and Connolly, E.L. (2008). Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5): 530-535.
- Wang, Z.; Xu, Z.; Zhao, J.; Pan, B.; Song, X. and Xing, B. (2014). Effects of Low-Molecular-Weight Organic Acids on Soil Micropores and Implication for Organic Contaminant Availability, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45(8): 1120-1132, doi: 10.1080/00103624.2013.867062
- Xiong, H.; Kobayashi, T.; Kakei, Y.; Senoura, T.; Nakazono, M.; Takahashi, H.; Nakanishi, H.; Shen, H.; Duan, P.; Guo, X.; Nishizawa, N.K. and Zuo, Y. (2012). AhNRAMP1 iron transporter is involved in iron acquisition in peanut. *J. Exp. Bot.*, 63(2): 695-709. doi: 10.1093/jxb/ers117.
- Yeasmin, S.; Singh, B.; Kookana, R.S.; Farrell, M.; Sparks, D.L. and Johnston, C.T. (2014). Influence of mineral characteristics on the retention of low molecular weight organic compounds: A batch sorption–desorption and ATR-FTIR study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 432: 246-257.

- Ylivainio, K. (2010). Effects of iron(III)chelates on the solubility of heavy metals in calcareous soils. *Environmental Pollution*, 158(10): 3194-3200. doi:10.1016/j.envpol.2010.07.004
- Zamboni, A., Zanin, L., Tomasi, N., Avesani, L., Pinton, R., Varanini, Z., & Cesco, S. (2016). Early transcriptomic response to Fe supply in Fe-deficient tomato plants is strongly influenced by the nature of the chelating agent. *BMC Genomics*, 17(1), 35.
- Zanin, L.; Tomasi, N.; Rizzardo, C.; Gottardi, S; Terzano, R.; Alfeld, M.; Janssens, K.; Nobili De, M.; Mimmo, T. and Cesco, S. (2014). Iron allocation in leaves of Fe-deficient cucumber plants fed with natural Fe complexes. *Physiol. Plant.* doi: 10.1111/ppl.12296.
- Zhi-An, L. I., Bi, Z. O. U., Han-Ping, X. I. A., Yong-Zhen, D. I. N. G., Wan-Neng, T. A. N., & Sheng-Lei, F. U. (2008). Role of low-molecule-weight organic acids and their salts in regulating soil pH. *Pedosphere*, 18(2), 137-148.

CONCLUSIONES GENERALES

Un comportamiento significativamente mayor se presentó con las concentraciones 10^{-4} M AC, 10^{-4} M AO, 10^{-5} M AS y la aplicación de 0.4 ml/l de CH semanalmente. Los tratamientos AC+FeEDTA y la aplicación de CH+FeEDTA incrementaron las unidades SPAD, contenido de clorofilas, vitamina C, contenido de Fe, Zn y Mn en hoja, además de mejorar la calidad de los frutos. De igual forma estos tratamientos redujeron el ORP y pH de lixiviados e incrementaron la CE. El quelato férrico tipo EDTA se comportó estadísticamente similar al EDDHA y la combinación con los distintos ácidos orgánicos mejoró las variables estudiadas.

La adición de CH+FeG-EDTA y AO+FeG-EDTA aumentó el contenido de Fe^{2+} en el suelo en un 39% y 29%, respectivamente. Asimismo, el Fe total del suelo aumentó 34% y 30% con AS+FeG-EDTA y CH+FeG-EDTA, respectivamente, mientras que Fe^{3+} se redujo con AO+FeG-EDTA. Mientras que AC+FeG-EDTA redujo el pH del suelo y de los lixiviados, aumentando a su vez la CE de los lixiviados. El contenido de clorofila aumentó con la aplicación de CH+FeG-EDTA, mientras que los tratamientos AC+FeG-EDTA, AS+FeG-EDTA y CH+FeG-EDTA mejoraron SD, PH, NL, NFC, NMF, THF, Y y PFW.

Las mayores correlaciones de Spearman fueron entre pH y Fe total del suelo ($\rho = 0,44$), ORP de lixiviado y Fe total ($\rho = -0,34$), CE de lixiviado con Fe^{2+} ($\rho = 0,21$), unidades SPAD con Fe^{2+} del suelo ($\rho = 0,38$) y contenido de clorofila con suelo Fe^{2+} y pH del lixiviado.

La inclusión de ácidos orgánicos más quelato de FeG-EDTA en plantas de tomate desarrolladas en suelos calcáreos mejoró el contenido de Fe en el suelo y el crecimiento de las plantas.

La adición de hierro como quelato Fe Gluconato-EDTA en combinación con compuestos de bajo (CA, OA y SA) y alto peso molecular (HC) en la solución fertilizante aplicada sobre plantas de tomate desarrolladas bajo un suelo calcáreo modificaron la actividad enzimática FCR, H^+ -ATPasa y PEPCasa en hoja y raíz, de igual forma hubo modificaciones en los niveles de expresión de los genes LeFRO1, LeHA1 y LePEPC1 tanto en hoja como en raíz.

REFERENCIAS

- Abadía, J.; Vázquez, S.; Rellán-Álvarez, R.; El-Jendoubi, H.; Abadía, A.; Álvarez-Fernández, A. and López-Millán, A.F. 2011. Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiol Biochem* 49: 471-482.
- Aguado-Santacruz, G.A.; Moreno-Gómez, B.; Jiménez-Francisco, B.; García-Moya, E. y Preciado-Ortiz, R.E. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev. Fitotec. Mex.* 35(1): 9-21.
- Aguirre, E.; Leménager, D.; Bacaicoa, E.; Fuentes, M.; Baigorri, R.; Zamarren, A.M.; Garcia-Mina, J.M. 2009. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.* 47(3): 215-223. doi:10.1016/j.plaphy.2008.11.013
- An, Y.; Zhou, P.; Xiao, Q. and Shi, D. 2014. Effects of foliar application of organic acids on alleviation of aluminum toxicity in alfalfa. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 177(3): 421-430. doi: 10.1002/jpln.201200445
- Arizmendi, G.N., Rivera, O.P., De la Cruz, S.F., Castro, M.B. and De la Garza, R.F. 2011. Leaching of Chelated Iron in Calcareous Soils. *TERRA Latinoamericana* 29(3): 231-237.
- Bhattacharyya, P.; Datta, S.C. and Dureja, P. 2003. Interrelationship of pH, Organic Acids, and Phosphorus Concentration in Soil Solution of Rhizosphere and Non-rhizosphere of Wheat and Rice Crops. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34(1-2): 231-245. doi: 10.1081/CSS-120017428.
- Balk, J. and Schaedler, T.A. 2014. Iron Cofactor Assembly in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65:125-153.
- Barberon, M.; Dubeaux, G.; Kolb, C.; Isono, E.; Zelazny, E. and Vert, G. 2004. Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *PNAS*, 111 (22): 8293-8298.
- Baxter, I. 2009. Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12:381-386.
- Briat, J.F.; Curie, C. and Gaymard, F. 2007. Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 276-282.
- Carvalhais, L.C.; Dennis, P.G.; Fedoseyenko, D.; Hajirezaei, M-R.; Borriss, R. and von Wirén, N. 2010. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174(1):3-11. doi: 10.1002/jpln.201000085
- Chatterjee, D.; Datta, S.C. and Manjaiah, K.M. 2015. Effect of citric acid treatment on release of phosphorus, aluminium and iron from three dissimilar soils of India. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(1): 105-117. doi: 10.1080/03650340.2014.919449.
- Chen, L.; Zhao, X.; Ding, C.; Wang, S. and Ding, Y. 2014. Physiological and Molecular Responses Under Fe Deficiency in Two Rice (*Oryza sativa*) Genotypes Differing in Iron Accumulation Ability in Seeds. *J Plant Growth Regul.*, 33(4): 769-777. doi: 10.1007/s00344-014-9424-2
- Colombo, C.; Palumbo, G.; He, J.Z.; Pinton, R. and Cesco, S. 2014. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *J. Soils Sediments*, 14(3): 538-548.

- Correia, P.J.; Gama, F.; Saavedra, T.; Miguel, M.G.; Da Silva, J.P.; Abadía, A.; de Verennes, A.; Pestana, M. 2014. Changes in the concentration of organic acids in roots and leaves of carob-tree under Fe deficiency. *Functional Plant Biology*, 41(5): 496-504.
- Covarrubias, J.I.; Pisi, A.; Rombolà, A.D. 2014. Evaluation of sustainable management techniques for preventing iron chlorosis in the grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20(1): 149-159.
- Donnini, S.; De Nisi, P.; Gabotti, D.; Tato, L. and Zocchi, G. 2012. Adaptive strategies of *Parietaria diffusa* (M.&K.) to calcareous habitat with limited iron availability. *Plant Cell Environ.* 35(6): 1171-1184.
- Dotaniya, M.L.; Datta, S.C.; Biswas, D.R. and Meena, B.P. 2013. Effect of Solution Phosphorus Concentration on the Exudation of Oxalate Ions by Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.* 83(3): 305-309. doi: 10.1007/s40011-012-0153-7.
- Dotaniya, M.L.; Datta, S.C.; Biswas, D.R.; Meena, H.M. and Kumar, K. 2014. Production of Oxalic Acid as Influenced by the Application of Organic Residue and Its Effect on Phosphorus Uptake by Wheat (*Triticum aestivum* L.) in an Inceptisol of North India. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 37(5):401–405
- Duffner, A.; Hoffland, E. and Temminghoff, J.M.E. 2012. Bioavailability of zinc and phosphorus in calcareous soils as affected by citrate exudation. *Plant Soil* 361(1):165–175.
- Durrett, T.P.; Gassmann, W. and Rogers, E.E. 2007. The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature Is Necessary for Efficient Iron Translocation. *Plant Physiology*, 144: 197-205.
- Eidyan, B.; Hadavi, E. and Moalemi, N. 2014. Pre-harvest Foliar Application of Iron Sulfate and Citric Acid Combined with Urea Fertigation Affects Growth and Vase Life of Tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) ‘Por-Par’. *Hort. Environ. Biotechnol.* 55(1):9-13. doi: 10.1007/s13580-014-0061-2.
- El-Shabrawi, H.; Bakry, A.B.; Ahmed, M. and Abou-El-Lail, M. 2015. Humic and Oxalic Acid Stimulates Grain Yield and Induces Accumulation of Plastidial Carbohydrate Metabolism Enzymes in Wheat Grown under Sandy Soil Conditions. *Agricultural Sciences*, 6: 175-185. doi: 10.4236/as.2015.61016.
- El-Tohamy, W.A.; El-Abagy, H.M.; Badr, M.A. and Gruda, N. 2013. Drought tolerance and water status of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by citric acid application. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 86: 212-216. doi: 10.5073/JABFQ.2013.086.029.
- García-Mina, J.M.; Bacaicoa, E.; Fuentes, M.; Casanova, E. 2013. Fine regulation of leaf iron use efficiency and iron root uptake under limited iron bioavailability. *Plant Sci.* 198: 39-45.
- Ghazijahani, N.; Hadavi, E. and Jeong, B.R. 2014. Foliar sprays of citric acid and salicylic acid alter the pattern of root acquisition of some minerals in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Front. Plant Sci.* 5:573. doi: 10.3389/fpls.2014.00573.
- Gaxiola, R.A.; Palmgren, M.G. and Schumacher, K. 2007. Plant proton pumps. *Febs Letters*. 581(12): 2204-2214.
- Giehl, R.F.H.; Gruber, B.D. and von Wirén, N. 2014. It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *J. Experimental Botany*, 65(3): 769-778.
- Gramlich, A.; Tandy, S.; Frossard, E.; Eikenberg, J. and Schulin, R. 2013. Availability of Zinc and the Ligands Citrate and Histidine to Wheat: Does Uptake of Entire Complexes Play a Role? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44): 10409-10417. doi: 10.1021/jf401117d.

- Grillet, L.; Ouerdane, L.; Flis, P.; Hoang, M.T.T.; Isaure, M.P.; Curie, C. and Mari, S. 2014. Ascorbate Efflux as a New Strategy for Iron Reduction and Transport in Plants. *J. Biol. Chem.* 289(5): 2515-2525.
- Grotz, N. and Guerinot, M.L. 2006. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* . 1763(7): 595-608.
- Gunes, A.; Inal, A.; Alpaslan, M.; Cicek, N.; Guneri, E.; Eraslan, F. and Guzelordu, T. 2005. Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.). *Arch. Agron. Soil Sci.*, 51(6): 687-695.
- Hall, J.L. and Williams, L.E. 2003. Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Bot.*, 54(393): 2601-2613. doi: 10.1093/jxb/erg303
- Hänsch, R. and Mendel, R.R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12(3):259-266.
- He, Q.; Zhao, S.; Ma, Q.; Zhang, Y.; Huang, L.; Li, G. and Hao, L. 2014. Endogenous Salicylic Acid Levels and Signaling Positively Regulate Arabidopsis Response to Polyethylene Glycol-Simulated Drought Stress. *J Plant Growth Regul.* 33(4): 871-880 . doi: 10.1007/s00344-014-9438-9
- Higuchi, K.; Iwase, J.; Tsukiori, Y.; Nakura, D.; Kobayashi, N.; Ohashi, H.; Saito, A. and Miwa, E. 2014. Early senescence of the oldest leaves of Fe-deficient barley plants may contribute to phytosiderophore release from the roots. *Physiologia Plantarum*, 151(3): 313-322. DOI: 10.1111/ppl.12175.
- Higuchi, K.; Watanabe, S.; Takahashi, M.; Kawasaki S.; Nakanishi, H.; Nishizawa, N.K. and Mori, S. 2001. Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. *The Plant Journal* 25(2): 159-167.
- Hinsinger, P.; Plassard, C.; Tang, C.; and Jaillard, B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 248:43-59.
- Jeong, J. and Connolly, E.L. 2009. Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant science.* 176 (6): 709-714.
- Kabir, A.H.; Able, A.J.; Paltridge, N.G.; Paull, J.G. and Stangoulis, J.C.R. 2012. Natural variation for Fe-efficiency is associated with upregulation of Strategy I mechanisms and enhanced citrate and ethylene synthesis in *Pisum sativum* L. *Planta* 235(6):1409-1419. Doi:10.1007/s00425-011-1583-9
- Kawano, T.; Furuichi, T. and Muto, S. 2004. Controlled salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. *Plant Biotechnology* 21(5): 319-335. doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.319
- Khademi, Z.; Jones, D.L.; Malakouti, M.J.; Asadi, F. and Ardebili, M. 2009. Organic acid mediated nutrient extraction efficiency in three calcareous soils. *Aust J Soil Res.* 47(2):213-220.
- Khaled, H. and Fawy, H.A. 2011. Effect of Different Levels of Humic Acids on the Nutrient Content, Plant Growth, and Soil Properties under Conditions of Salinity. *Soil & Water Res.*, 6(1): 21-29.
- Kim, S.A. and Guerinot, M.L. 2007. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters* 581(12): 2273-2280.
- Kobayashi, T. and Nishizawa, N.K. 2012. Iron Uptake, Translocation, and Regulation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012. 63:131-152.
- Kobayashi, T. and Nishizawa, N.K. 2014. Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant Science*, 224: 36-43.

- Kong, J.; Dong, Y.; Xu, L.; Liu, S. and Bai, X. 2014b. Effects of Exogenous Salicylic Acid on Alleviating Chlorosis Induced by Iron Deficiency in Peanut Seedlings (*Arachis hypogaea* L.) *J Plant Growth Regul.* 33(4): 715-729. doi:10.1007/s00344-014-9418-0
- Kong, J.; Dong, Y.; Xu, L.; Liu, S. and Bai, X. 2014c. Effects of foliar application of salicylic acid and nitric oxide in alleviating iron deficiency induced chlorosis of *Arachis hypogaea* L. *Botanical Studies*, 55:9. doi:10.1186/1999-3110-55-9.
- Kong, J.; Dong, Y.; Zhang, X.; Wang, Q.; Xu, L.; Liu, S.; Hou, J. and Fan, Z. 2015. Effects of Exogenous Salicylic Acid on Physiological Characteristics of Peanut Seedlings under Iron-Deficiency Stress, *J. Plant Nutrition* 38(1): 127-144. doi: 10.1080/01904167.2014.920391
- Kong, M.; Huang, L.; Li, L.; Zhang, Z.; Zheng, S. and Wang, M.K. 2014. Effects of oxalic and citric acids on three clay minerals after incubation. *Applied Clay Science*, 99: 207-214.
- Kutrowska, A. and Szlag, M. 2014. Low-molecular weight organic acids and peptides involved in the long-distance transport of trace metals. *Acta Physiol Plant.* 36(8):1957-1968. doi: 10.1007/s11738-014-1576-y
- Krämer, U.; Talke, I.N. and Hanikenne, M. 2007. Transition metal transport. *FEBS Letters* 581(12): 2263-2272.
- Li, J.; Liu, B.; Cheng, F.; Wang, X.; Aarts, M.G.M. and Wu, J. 2014. Expression profiling reveals functionally redundant multiple-copy genes related to zinc, iron and cadmium responses in *Brassica rapa*. *New Phytologist*, 203(1): 182-194.
- Li, J.; Xu, R.; Tiwari, D. and Ji, G. 2006. Effect of low-molecular-weight organic acids on the distribution of mobilized Al between soil solution and solid phase. *Applied Geochemistry* 21: 1750-1759.
- Li, L.H.; Cheng, X.D.; Ling, H.Q. 2004. Isolation and characterization of Fe(III)chelate reductase gene *LeFROI* in tomato. *Plant Molecular Biology* 54: 125-136.
- Ling, H.Q.; Bauer, P.; Berezky, Z.; Keller, B. and Ganai, M. 2002. The tomato *fer* gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13938-13943.
- Li, Y.; Wang, N.; Zhao, F.; Song, X.; Yin, Z.; Huang, R.; Zhang, C. 2014b. Changes in the transcriptomic profiles of maize roots in response to iron-deficiency stress. *Plant Mol Biol.* 85(4-5):349-363. doi: 10.1007/s11103-014-0189-6.
- López-Millán, A.F.; Grusak, M.A.; Abadía, A.; and Abadía, J. 2013. Iron deficiency in plants: an insight from proteomic approaches. *Front. Plant Sci.* 4: 254. doi: 10.3389/fpls.2013.00254
- López-Millán, A.F.; Grusak, M.A. and Abadía, J. 2012. Carboxylate metabolism changes induced by Fe deficiency in barley, A Strategy II plant species. *Journal of Plant Physiology* 169(11): 1121-1124.
- Lucena, C.; Romera, F.J.; Rojas, C.L.; García, M.J.; Alcántara, E. and Pérez-Vicente, R. 2007. Bicarbonate blocks the expresión of several genes envolved in the physiological responses to Fe deficiency of Strategy I plants. *Funct. Plant Biol.* 34:1002-1009.
- Mengel, K. 1994. Iron availability in plant tissues - iron chlorosis on calcareous soils. *Plant and Soil* 165(2): 275-283.
- Mikami, Y.; Saito, A.; Miwa, E. and Higuchi, K. 2011. Allocation of Fe and ferric chelate reductase activities in mesophyll cells of barley and sorghum under Fe-deficient conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(5): 513-519.
- Mimmo, T.; Del Buono, D.; Terzano, R.; Tomasi, N.; Vigani, G.; Crecchio, C.; Pinton, R.; Zocchi, G. and Cesco, S. 2014. Rhizospheric organic compounds in the soil-

- microorganism–plant system: their role in iron availability. *European J Soil Science*. 65(5): 629-642.
- Mora, V.; Bacaicoa, E.; Zamarreño, A.M.; Aguirre, E.; Garnica, M.; Fuentes, M.; García-Mina, J.M. 2010. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *J Plant Physiol*. 167(8):633-642. doi: 10.1016/j.jplph.2009.11.018.
- Morsomme, P. and Boutry, M. 2000. The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1-2): 1-16.
- Nikolic, M., and Römheld, V. 2002. Does high bicarbonate supply to roots change availability of iron in the leaf apoplast? *Plant Soil* 241(1): 67-74.
- Nozoye, T.; Nagasaka, S.; Bashir, K.; Takahashi, M.; Kobayashi, T.; Nakanishi, H.; Nishizawa, N.K. 2014. Nicotianamine synthase 2 localizes to the vesicles of iron-deficient rice roots, and its mutation in the YXXf or LL motif causes the disruption of vesicle formation or movement in rice. *The Plant Journal*, 77(2): 246-260.
- Oki, H.; Kim, S.; Nakanishi, H.; Takahashi, M.; Yamaguchi, H.; Mori, S. and Nishizawa, N.K. 2004. Directed evolution of yeast ferric reductase to produce plants with tolerance to iron deficiency in alkaline soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(7): 1159-1165.
- Ortega, B.R. and Molina, R.M. 2007. Comparison between sulfates and chelated compounds as sources of zinc and iron in calcareous soils. *Agrociencia* 41: 491-502.
- Pérez-Esteban, J.; Escolástico, C.; Moliner, A. and Masaguer, A. 2013. Chemical speciation and mobilization of copper and zinc in naturally contaminated mine soils with citric and tartaric acids. *Chemosphere*. 90(2): 276-283. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.06.065.
- Pestana, M.; Correia, P.J.; Saavedra, T.; Gama, F.; Abadía, A. and de Varennes, A. 2012. Development and recovery of iron deficiency by iron resupply to roots or leaves of strawberry plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 1-5.
- Puig, S. and Peñarrubia, L. 2009. Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3): 299-306.
- Quaggiotti, S.; Ruperti, B.; Pizzeghello, D.; Francioso, O.; Tugnoli, V. and Nardi, S. 2004. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 55(398): 803-813. doi: 10.1093/jxb/erh085
- Rivera, O.P.; Castro M.B.I.; de la Garza, R.F.R.; Mendoza, F.G. and Etchevers, B.J.D. 2007. Evaluation of different iron compounds in chlorotic Italian lemon trees (*Citrus lemon*). *Plant Physiol. Biochem.* 45(5): 330-334.
- Rivera, O.P.; Etchevers, B.J.; Hidalgo, M.C.; Castro, M.B.; De la Garza, R.F.; Rodríguez, A.J.; Martínez, G.A. 2008. Acid-iron fertigation of citrus established in calcareous soils. *Terra Latinoamericana*, 26(2): 119-125.
- Rivera, O.P.; Etchevers, B.J.; Hidalgo, M.C.; Castro, M.B.I.; Rodríguez, A.J.; Martínez, G.A. 2003. Dinámica de hierro y zinc aplicados en soluciones ácidas a suelos calcáreos. *Terra Latinoamericana*, 21(3): 341-350
- Robinson, N.J.; Procter, C.M.; Connolly, E.L. and Guerinot, M.L. 1999. A ferric-chelatereductase for iron uptake from soils. *Nature* 397: 694-697.
- Rodríguez-Celma, J.; Lin, W.D.; Fu, G.M.; Abadía, J.; López-Millán, A.F. and Schmidt, W. 2013. Mutually Exclusive Alterations in Secondary Metabolism Are Critical for the Uptake of Insoluble Iron Compounds by Arabidopsis and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 162(3): 1473-1485.

- Rogers, E.E.; Wu, X.; Stacey, G. and Nguyen, H.T. 2009. Two MATE proteins play a role in iron efficiency in soybean. *J. Plant Physiology*. 166(13): 1453-1459. doi:10.1016/j.jplph.2009.02.009.
- Römheld, O. and Schaaf, G. 2004. Iron transport in plants: Future research in view of a plant nutritionist and a molecular biologist. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(7): 1003-1012. doi: 10.1080/00380768.2004.10408567.
- Ryan, P.R.; James, R.A.; Weligama, C.; Delhaize, E.; Rattey, A.; Lewis, D.C.; Bovill, W.D.; McDonald, G.; Rathjen, T.M.; Wang, E.; Fettell, N.A. and Richardson, A.E. 2014. Can citrate efflux from roots improve phosphorus uptake by plants? Testing the hypothesis with near-isogenic lines of wheat. *Physiologia Plantarum*. 151(3): 230-242. doi: 10.1111/ppl.12150.
- Samira, R.; Stallmann, A.; Massenbun, L.N. and Long, T.A. 2013. Ironing out the issues: Integrated approaches to understanding iron homeostasis in plants. *Plant Science*. 210: 250-259.
- Sánchez-Alcalá, I.; del Campillo, M.C.; Barrón, V. and Torrent, J. 2013. Evaluation of preflooding effects on iron extractability and phytoavailability in highly calcareous soil in containers. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 177(2): 150-158.
- Sánchez-Rodríguez, A.R.; del Campillo, M.C.; Torrent, J. and Jones, D.L. 2014. Organic acids alleviate iron chlorosis in chickpea grown on two p-fertilized soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(2): 292-303.
- Santi, S. and Schmidt, W. 2009. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol* 183: 1072-1084.
- Santi, S.; Cesco, S.; Varanini, Z. and Pinton, R. 2005. Two plasma membrane H⁺-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(3): 287-292.
- Schmidt, A. and Buckhout, T.J. 1997. The response of tomato roots (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to iron deficiency stress: alterations in the pattern of protein synthesis. *J. Exp.* 48(11): 1909-1918. doi: 10.1093/jxb/48.11.1909.
- Schmidt, W. 2003. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *TRENDS in Plant Science*, 8(4): 188-193.
- Schuler, M.; Rellán-Álvarez, R.; Fink-Straube, C.; Abadía, J. and Bauer, P. 2012. Nicotianamine Functions in the Phloem-Based Transport of Iron to Sink Organs, in *Pollen Development and Pollen Tube Growth in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(6): 2380-2400.
- Shenker, M. and Chen, Y. 2005. Increasing Iron Availability to Crops: Fertilizers, Organofertilizers, and Biological Approaches. *Soil Science and Plant Nutrition*, 51(1): 1-17.
- Shi, Q. and Zhu, Z. 2008. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environmental and Experimental Botany* 63(1-3): 317-326.
- Stein, R.J. and Waters, B.M. 2012. Use of natural variation reveals core genes in the transcriptome of iron-deficient *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Exp. Bot.* 63(2): 1039-1055. doi: 10.1093/jxb/err343
- Studenroth, S.; Huber, S.G.; Kotte, K. and Schöler, H.Z. 2013. Natural Abiotic Formation of Oxalic Acid in Soils: Results from Aromatic Model Compounds and Soil Samples. *Environ. Sci. Technol.* 47(3): 1323-1329.
- Tahir, M.M.; Khurshid, M.; Khan, M.Z.; Abbasi, M.K. and Kazmi, M.H. 2011. Lignite-Derived Humic Acid Effect on Growth of Wheat Plants in Different Soils. *Pedosphere* 21(1): 124-131.

- Thomine, S. and Vert, G. 2013. Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3):322-327. doi:10.1016/j.pbi.2013.01.003
- Tufail, A.; Arfan, M.; Gurmani, A.R.; Khan, A. and Bano, A. 2013. Salicylic acid induced salinity tolerance in maize (*Zea mays*). *Pak. J. Bot.*, 45(S1): 75-82.
- Trevisan, S.; Botton, A.; Vaccaro, S.; Vezzaro, A.; Quaggiotti, S. and Nardi, S. 2011. Humic substances affect *Arabidopsis* physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany*, 74(1): 45-55.
- Trevisan S.; Pizzeghello, D.; Ruperti, B.; Francioso, O.; Sassi, A.; Palme, K.; Quaggiotti, S.; and Nardi, S. 2010. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 12(4): 604-614. doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00248.x
- Vasconcelos, M.W.; Clemente, T.E. and Grusak, M.A. 2014. Evaluation of constitutive iron reductase (AtFRO2) expression on mineral accumulation and distribution in soybean (*Glycine max.* L). *Front. Plant Sci.* 5:112. doi: 10.3389/fpls.2014.00112.
- Vaněk, A.; Komárek, M.; Chrastný, V.; Galušková, I.; Mihaljevič, M.; Šebek, O.; Drahotka, P.; Tejnecký, V. and Vokurková, P. 2012. Effect of low-molecular-weight organic acids on the leaching of thallium and accompanying cations from soil – A model rhizosphere solution approach. *Journal of Geochemical Exploration*, 112: 212-217. doi:10.1016/j.gexplo.2011.08.010
- Vigani, G. and Zocchi, G. 2010. Effect of Fe deficiency on mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in cucumber roots. *J. Plant Physiology* 167(8): 666-669. doi:10.1016/j.jplph.2009.12.006
- von Wirén, N. 2004. Progress in research on iron nutrition and interactions in plants, *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(7): 955-964.
- Walker, E.L. and Connolly, E.L. 2008. Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5): 530-535.
- Wang, C.; Wang, Z.; Lin, L.; Tian, B. and Pei, Y. 2012. Effect of low molecular weight organic acids on phosphorus adsorption by ferric-alum water treatment residuals. *Journal of Hazardous Materials*. 203-204: 145-150. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.11.084
- Wang, Y.H.; Garvin, D.F. and Kochian, L.V. 2002. Rapid Induction of Regulatory and Transporter Genes in Response to Phosphorus, Potassium, and Iron Deficiencies in Tomato Roots. Evidence for Cross Talk and Root/Rhizosphere-Mediated Signals. *Plant Physiology*, 130(3): 1361-1370. doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.008854.
- Wang, Z.; Xu, Z.; Zhao, J.; Pan, B.; Song, X. and Xing, B. 2014. Effects of Low-Molecular-Weight Organic Acids on Soil Micropores and Implication for Organic Contaminant Availability, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45(8): 1120-1132, doi: 10.1080/00103624.2013.867062
- Wani, M.A. 2012. Oxalic Acid Effect on Potassium Release from Typical Rice Soils of Kashmir. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43(8): 1136-1148.
- Waters, B.M.; McInturf, S.A. and Ricardo J. Stein, J.R. 2012. Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 63(2): 695-709. doi:10.1093/jxb/err313.
- Xiao, M. and Wu, F. 2014. A review of environmental characteristics and effects of low-molecular weight organic acids in the surface ecosystem. *J. Environmental Sciences* 26(5): 935-954.
- Xiao, M.; Wu, F.; Liao, H.; Li, W.; Lee, X. and Huang, R. 2010. Characteristics and distribution of low molecular weight organic acids in the sediment porewaters in Bosten

- Lake, China. *J. Environmental Sciences*, 22(3): 328-337. doi:10.1016/S1001-0742(09)60112-1
- Xiao, M.; Wu, F.; Zhang, R.; Wang, L.; Li, X. and Huang, R. 2011. Temporal and spatial variations of low-molecular-weight organic acids in Dianchi Lake, China. *J. Environmental Sciences*, 23(8): 1249-1256. doi:10.1016/S1001-0742(10)60567-0
- Xinmin, W.; Yanlin, H. and Xiaolei, J. 2004. Citric and Oxalic Acids Effect on Pb and Zn Uptake by Maize and Winter Wheat, *Chinese Journal of Population Resources and Environment*, 2(4): 37-40, doi:10.1080/10042857.2004.10677388.
- Xiong, H.; Kobayashi, T.; Kakei, Y.; Senoura, T.; Nakazono, M.; Takahashi, H.; Nakanishi, H.; Shen, H.; Duan, P.; Guo, X.; Nishizawa, N.K. and Zuo, Y. 2012. AhNRAMP1 iron transporter is involved in iron acquisition in peanut. *J. Exp. Bot.*, 63(2): 695-709. doi: 10.1093/jxb/ers117.
- Yadavalli, V.; Neelam, S.; Rao, A.S.V.C.; Reddy, A.R. and Subramanyam, R. 2012. Differential degradation of photosystem I subunits under iron deficiency in rice. *Journal of Plant Physiology*, 169(8): 753-759.
- Yeasmin, S.; Singh, B.; Kookana, R.S.; Farrell, M.; Sparks, D.L. and Johnston, C.T. 2014. Influence of mineral characteristics on the retention of low molecular weight organic compounds: A batch sorption–desorption and ATR-FTIR study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 432: 246-257.
- Ylivainio, K. 2010. Effects of iron(III)chelates on the solubility of heavy metals in calcareous soils. *Environmental Pollution*, 158(10): 3194-3200. doi:10.1016/j.envpol.2010.07.004
- Zanin, L.; Tomasi, N.; Rizzardo, C.; Gottardi, S; Terzano, R.; Alfeld, M.; Janssens, K.; Nobili De, M.; Mimmo, T. and Cesco, S. 2014. Iron allocation in leaves of Fe-deficient cucumber plants fed with natural Fe complexes. *Physiol. Plant.* doi: 10.1111/ppl.12296.