



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

**NUTRICIÓN CON BORO EN AGUACATE
cv. HASS: ASPECTOS FISIOLÓGICOS,
MORFOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS EN UN
ANDOSOL DE MICHOACÁN**

ANDREA CASTILLO VEGA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2007

La presente tesis, titulada: **NUTRICIÓN CON BORO EN AGUACATE cv. HASS: ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS EN UN ANDOSOL DE MICHOACÁN**, realizada por la alumna: **Andrea Castillo Vega**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR:

CONSEJERO: _____

DR. PROMETEO SANCHEZ GARCÍA

ASESOR: _____

DR. GABRIEL E. ALCÁNTAR GONZÁLEZ

ASESOR: _____

DR. HEINER E. GOLDBACH

ASESOR: _____

DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESORA: _____

DRA. ELIZABETH CÁRDENAS SORIANO

NUTRICIÓN CON BORO EN AGUACATE cv. HASS: ASPECTOS FISIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS EN UN ANDOSOL DE MICHOACÁN

**Andrea Castillo Vega, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2007**

El cultivo de aguacate cv. Hass es una actividad en constante expansión debido a la demanda de exportación del fruto. La nutrición con B es uno de los factores de producción determinantes para la obtención de frutos tanto en la cantidad como de la calidad requerida para cumplir con los estándares internacionales. La obtención de este fruto en huertos comerciales de Michoacán, principal región productora del mundo, no ha sido caracterizada en cuanto a nutrición con B englobando aspectos de planta y suelo debido al número y a la complejidad de factores que intervienen en el cultivo. Además, la confusión incrementa por la investigación llevada a cabo con resultados erráticos. La presente contribución presenta resultados derivados de investigación en plantas cv. Hass con patrón mexicano, como las convencionalmente cultivadas en esta zona, y sobre andosoles, incluyendo un estudio del efecto de los hongos endófitos radicales característicos de este cv. En conclusión, con esta aportación se pretende contribuir a la comprensión del comportamiento del B en la producción de aguacate de Uruapan, Michoacán y sus alrededores.

Palabras clave: curcumina, tisular, *Glomus intraradices*, firmeza, nivel crítico.

**BORON NUTRITION ON CV. HASS AVOCADO: PHYSIOLOGICAL,
MORPHOLOGICAL AND ECHOLOGICAL ASPECTS ON AN
ANDISOL FROM MICHOACAN**

**Andrea Castillo Vega, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2007**

Hass avocado growth is a constant expansion activity due to increase exporting demand of the fruit. B nutrition is one of the production factors determining the required quality and quantity in other to be on international standards. The cultivate of this fruit in Michoacan commercial orchards, first world grower region, has not being characterized regarding B nutrition including plant and soil aspects, due to the number and complexity of the factors that take place in the cultivation. More over, the confusion is increased by research performed with failed results. This contribution shows results derived from research in cv. plants on Mexican rootstocks, alike the ones growing on this area, and on andisols including a research about the effect of root endophytic fungi, characteristic from this cv. In conclusion, this contribution pretends to give comprehension to the B behavior in avocado production in Uruapan, Michoacan and surrounding places.

Key words: curcumin, tissular, *Glomus intraradices*, tightness, critical level.

Dedico esta tesis a:

Mis padres: Amado Castillo Estrada y Delta Vega de Castillo, a quienes debo este logro.

Mis queridos hijos: Andrea Anayatzin y Amado Aramís Viveros Castillo, por quienes vale este y cualquier otro esfuerzo.

Mis hermanas y hermanos: Ana, Irene, Lucy, Lula, Toto y Rorra por su amor, confianza, apoyo y compañía.

Mis amigos y compañeros, por compartir conmigo en todo momento esta etapa de mi vida y por brindarme su apoyo tanto intelectual como emocional.

Agradezco a:

Los millones de mexicanos (as) que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación;

Los integrantes de mi Consejo Particular por el esfuerzo, la dedicación, el tiempo y el apoyo que me han brindado, pero sobre todo por la infinita paciencia para conmigo y mis problemas;

Todos los individuos, llámense familia, profesor (a), compañero (a) o amigo (a) quienes de alguna manera me han acompañado y apoyado hasta hoy, aun en la distancia.

A la Dra. Monika Wimmer, al Dr. Tom Etchert y a la M.C. Alicia Franco, por brindarme su apoyo experto y eficiente para la realización de esta contribución y su amistad incondicional en cada día de labor compartido. De igual forma, al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato agradezco las facilidades otorgadas para el trabajo requerido en los laboratorios a su cargo.

Este trabajo de investigación fue financiado por CONACYT, US BORAX, COSMOCEL S. A. y por el Instituto de Nutrición Vegetal de la Universidad de Bonn, Alemania, a quienes expreso mi agradecimiento.

Contenido

	Pág.
Aprobación del Consejo Particular.....	i
Resumen.....	ii
Abstract.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Contenido.....	v
Lista de cuadros.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Anexos.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. Planteamiento del problema.....	3
2. Revisión de literatura.....	4
3. Objetivos.....	7
4. Hipótesis.....	7
5. Literatura Citada.....	8
CAPÍTULO I. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO MINIATURIZADO DE CURCUMINA (Wimmer y Goldbach, 1998) PARA LA DETERMINACIÓN DE B SOLUBLE Y B TOTAL EN AGUACATE cv. HASS (Resumen).....	13
1.1. Introducción.....	13
1.2. Materiales y métodos.....	13
1.2.1. Descripción simplificada del método miniaturizado de curcumina para la determinación de B en soluciones y muestras biológicas (Wimmer y Goldbach, 1998).....	13
1.2.2. Preparación del material vegetal para la determinación de B total.....	14
1.3. Resultados.....	15
1.3.1 Determinación de B total en aguacate cv. Hass.....	16
1.3.2 Determinación del B soluble en aguacate cv. Hass.....	16
1.3.3. Determinación de B soluble en suelo.....	24

1.4. Conclusiones.....	26
1.5. Literatura citada.....	27

CAPÍTULO II. NUTRICIÓN CON BORO EN AGUACATE (*Persea americana* Mill.) CV.
HASS: EFECTO EN CÉLULAS Y TEJIDOS DE RAÍZ, BROTE DEL VÁSTAGO Y
NERVADURA DE HOJAS (Resumen).....

30	
2.1. Introducción.....	32
2.2. Materiales y métodos.....	33
2.2.1. Material vegetal.....	33
2.2.2. Transplante y sitio experimental.....	34
2.2.3. Diseño de tratamientos.....	34
2.2.4. Boro total (Bt)	34
2.2.5. Técnica de inclusión en parafina.....	34
2.2.6. Tinción de los cortes para microscopía de luz.....	35
2.2.7. Análisis estadístico.....	35
2.3. Resultados y discusión.....	36
2.4. Conclusiones.....	42
2.5. Literatura citada.....	42

CAPÍTULO III. FACTOR DE CONCENTRACIÓN DE BORO EN AGUACATE CV.
HASS: INDICADOR DEL NIVEL CRÍTICO (Resumen).....

46	
3.1. Introducción.....	47
3.2. Materiales y métodos.....	49
3.2.1. Material Vegetal.....	49
3.2.2. Transplante y Sitio Experimental.....	49
3.2.3. Diseño de Tratamientos.....	49
3.2.4. Boro Soluble (Bs).....	50
3.2.5. Boro Total (Bt).....	50
3.2.6. Cálculo del Factor de Concentración de B (FCB).....	50
3.2.7. Análisis Estadístico.....	51
3.3. Resultados y discusión.....	51
3.3.1. B soluble (Bs) y B total (Bt)	51
3.4. Conclusiones.....	54

3.5. Literatura citada.....	55
-----------------------------	----

CAPÍTULO IV. HONGOS ENDÓFITOS RADICALES EN LA NUTRICIÓN CON BORO DEL AGUACATE (*Persea americana* Mill.): EFECTO EN PLANTA CV. HASS Y EN UN

ANDOSOL (Resumen).....	59
4.1. Introducción.....	60
4.2. Materiales y métodos.....	61
4.2.1. Material vegetal.....	61
4.2.2. Suelo utilizado.....	62
4.2.3. Transplante y sitio experimental.....	62
4.2.4. Métodos de cuantificación del hongo.....	62
4.2.5. Diseño de tratamientos.....	63
4.2.6. Boro total (Bt) en material vegetal y Boro soluble (Bs) en suelo.	63
4.2.7. Hongos endófitos nativos (EN) en rizósfera de aguacate cv. Hass	64
4.3. Resultados y discusión.....	64
4.4. Conclusiones.....	72
4.5. Literatura citada.....	73
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....	77
1. Conclusiones.....	77
2. Recomendaciones.....	78
3. Sugerencias de investigación.....	78

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 2.1. Estadística básica para grosor de coña y número de capas celulares en el meristemo de raíz de de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) cultivadas en tres niveles de B en solución nutritiva (0.01, 0.63 y 1.53 mg L ⁻¹).....	38
Cuadro 2.2. Estadística básica para brote del vástago y nervadura central de hojas maduras de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) cultivadas en seis niveles de B en solución nutritiva (0.01, 0.21, 0.43, 0.63, 0.83 y 1.53 mg L ⁻¹).....	40
Cuadro 3.1. Contenido de B soluble (Bs) y total (Bt) en la 6 ^a y 7 ^a hojas de aguacate cv. Hass.....	51
Cuadro 3.2. Factor de Concentración de B soluble (FCBs) y total (FCBt) en hojas de aguacate cv. Hass.....	54
Cuadro 4.1. Concentración de B total por estructuras de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) cv. Hass después de un año de la inoculación con hongos endófitos radicales.....	64
Cuadro 4.2. Concentración de B total en tallos de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) cv. Hass después de un año de la inoculación con hongos endófitos radicales cultivados en 3 niveles de B en suelo.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Concentración de B total en 3 árboles de aguacate cultivados un año, en 3 diferentes niveles de B en solución nutritiva. El No. inicial de la leyenda de cada columna indica el No. de árbol; e= No. de extracción; L=lecturas por extracto; cada 6 barras representan un árbol.....	16
Figura 1.2. Concentración de B soluble determinado en materia fresca, en 3 árboles de aguacate. El No. inicial de la leyenda de cada columna indica el No. de árbol; e= No. de extracción; L=lecturas por extracto; cada 4 barras representan un árbol.....	18
Figura 1.3. Concentración de B soluble cuantificado en materia seca, en 3 árboles de aguacate. El No. inicial de la leyenda de cada columna indica el No. de árbol; e= No. de extracción; L=lecturas por extracto; cada 6 barras representan un árbol.....	20
Figura 1.4. Relación entre el contenido de B soluble extraído a partir de material vegetal fresco y el B extraído a partir de material vegetal seco en árboles de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) cultivados en 3 niveles de B en solución nutritiva. MF= material vegetal fresco; MS= material vegetal seco; No. inicial de la leyenda de cada columna indica el No. de árbol; e= No. de extracción; L=lecturas por extracto; cada 4 barras representan un árbol.....	22
Figura 1.5. Correlación el contenido de B soluble extraído a partir de material vegetal fresco y el B extraído a partir de material vegetal seco en árboles de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) cultivados en 3 niveles de B en solución nutritiva. MF= material vegetal fresco; MS= material vegetal seco.....	23
Figura 2.1. Fotonumerografías de cortes histológicos de raíz de aguacate cv. Hass (<i>Persea americana</i> Mill.) provenientes de plantas que se desarrollaron por un periodo de un año con el efecto de los tratamientos de B en solución nutritiva de 0.01, 0.63 y 1.53 mg L ⁻¹ (de la A a la C de izquierda a derecha, respectivamente en cada fila).....	34
Figura 2.2. Cortes histológicos de estructuras de aguacate cv. Hass (<i>Persea americana</i> Mill.) provenientes de plantas que crecieron un año en 0.01 (A y C) y 1.53 (B y D) mg L ⁻¹ de B en solución nutritiva. A y B brotes del vástago; C y D haces vasculares centrales de la lámina foliar en hojas maduras.....	41
Figura 4.1. Firmeza en tallos y contenido de B total de plantas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) que crecieron un año con inoculación de hongos endófitos radicales con	

nivel bajo de B en suelo. T= plantas testigo (sin inóculo); Gi= plantas inoculadas con *Glomus intrarradices*; EN= plantas inoculadas con endófitos nativos; letras diferentes sobre las columnas indican diferencias estadísticas entre tipos de inóculo ($\alpha \leq 0.05$)..... 66

Figura 4.2. Dinámica de acumulación de B total en los tallos de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) que crecieron un año con o sin inoculación de hongos endófitos radicales al momento de la inoculación (0 meses), antes de la aplicación de 0.13 y 0.25 mg kg⁻¹ de B en suelo deficiente (6 meses posteriores a la inoculación) y al final del experimento (12 meses). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tipos de inóculo ($\alpha \leq 0.05$)... 68

Figura 4.3. Segunda evaluación de B soluble (Bs) realizada 6 meses después de la inoculación de los árboles de aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.). En este período las raíces ya estaban colonizadas con hongos endófitos e inmediatamente después de esta evaluación se adicionaron los diferentes niveles de B al suelo. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias estadísticas entre tipos de inóculo ($\alpha \leq 0.05$)..... 69

Figura 4.4. Plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass 6 meses después del trasplante e inoculación con hongos endófitos radicales: a) Planta testigo (sin hongos inoculados) y, b) Planta inoculada con el complejo de endófitos nativos de huertos de aguacate..... 70

Figura 4.5. Efecto del tipo de inóculo con diferentes HER sobre la concentración de B soluble (Bs) en suelo seco de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) después de 1 año de la inoculación. Letras distintas sobre las columnas significan valores distintos (Tukey, $\alpha = 0.01$, DMS = 0.049)..... 70

ANEXOS

	Pág.
Anexo 3.1. Relación entre la concentración de B en solución nutritiva y la concentración de B total en hojas de aguacate cv. Hass con base en peso de materia seca.....	80
Anexo 3.2. Relación entre la concentración de B en solución nutritiva y la concentración de B soluble en hojas de aguacate cv. Hass con base en peso de materia fresca.....	80
Anexo 3.3. Relación entre la concentración de B en solución nutritiva y el factor de concentración de B soluble (FCB soluble) en hojas de aguacate cv. Hass con base en peso de materia fresca (MF).....	81
Anexo 3.4. Relación entre la concentración de B en solución nutritiva y el factor de concentración de B total (FCB total) en hojas de aguacate cv. Hass con base en peso de materia seca (MS).....	81
Anexo 4.1. A) <i>Scutellospora nigra</i> Espora rota mostrando la ornamentación y la hifa sustentora (H) 10x; B) acercamiento de la ornamentación de pared 40x; C) espora globosa con tubo germinativo (10 X).....	82
Anexo 4.2. <i>Gigaspora</i> aff. <i>gigantea</i> A) Espora subglobosa mostrando la hifa (H), y la pared (L2) 10x; B) Espora rota mostrando la hifa sustentora (H) y las dos paredes (L1 y L2) 40x. Barra = 30 μ m.....	83
Anexo 4.3. <i>Glomus</i> aff. <i>Aggregatum</i> A) Espora globosa mostrando la hifa curvada (H) y las paredes (L2 y L3); B) Espora madura mostrando la hifa ligeramente constreñida (H) 40x. Barra = 30 μ m.....	84
Anexo 4.4. <i>Scutellospora</i> sp A) Espora globosa (10x); B) Espora rota mostrando la hifa sustentora (H) y la pared (L) (10x); C) Acercamiento de la espora y la hifa sustentora (H) (40x).....	85
Anexo 4.5. Estructuras de Dark Septed Fungi A) hifas; B) inicio del desarrollo de una mórula dentro de una célula; C) células con mórulas y conexiones hifales; y D) tejido sano con hifas y mórulas.....	86

Anexo 4.6. Estructuras de <i>G. intrarradices</i> en células sanas de raíz de aguacate cv. Hass. Imágenes tomadas a los 6 meses posteriores a la inoculación: A) vesícula y su conexión hifal dentro de células, B) hifas, C) arbuscúlos, y D) tejido sano mostrando arbuscúlos, vesículas e hifas.....	87
Anexo 4.7. Correlación de B total en material vegetal de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) cv. Hass (por partes y con planta completa) con el B soluble del suelo.....	88

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo del aguacate es una actividad de gran expansión en diversas partes del mundo; en el ciclo 2001-2002 los cinco países más productores aportaron 1, 284,500 miles de toneladas (México con 74.11 %, Chile 9.77 %, Sudáfrica 6.54 %, España 5.29 % e Israel 4.28 %) (APEAM, 2003).

La Asociación de Empacadores y Exportadores de Aguacate del estado de Michoacán (ASEEAM, 1998) estimó que el estado participó con un 84.6 % de la producción nacional en 21 municipios, esto hace de la entidad la región más productora del mundo. Romero (2007) reporta que la principal área productora es la que rodea a la región de Uruapan. De la producción del ciclo 2003-2004, México exportó más del 30 % de su producción nacional. Esta asociación, ahora llamada Asociación de Productores y Empacadores de Aguacate de Michoacán (APEAM, 2003) publica que la esta entidad es conocido como “La capital mundial del aguacate”, debido a que produjo 1 millón de toneladas del aguacate del mundo en 100 mil huertos. Actualmente la derrama económica aumentó de 34.5 millones de dólares en 1995 hasta los 407.6 millones en 2005 (World Trade Atlas, 2006, citado por Aragon *et al.*, 2007) lo que hace del cultivo de aguacate una actividad económica importante en el Estado de Michoacán y en el país.

El incremento en comercialización de aguacate Michoacano, tanto para mercado nacional como de exportación, ha propiciado la expansión del cultivo en los seis años anteriores. A la par, se ha incrementado la demanda de calidad y cantidad del fruto generando diversas estrategias que eviten el alto costo (tanto económico como ecológico) del exceso de aplicación de insumos requeridos (Salazar, 2002).

Entre los factores que afectan la producción del árbol (cultivar, temperatura, humedad, luminosidad, tipo de suelo, fertilización y manejo de cultivo), la nutrición es uno de los aspectos principales que se requiere atender para obtener cosechas abundantes y con frutos de calidad de exportación.

La eficiencia de recuperación del B por las raíces depende del tipo de suelo, del pH, de su adsorción en las arcillas y en la materia orgánica, de la fuerza iónica y de la cantidad de agua presente. La aplicación de este nutriente se realiza como una práctica habitual en huertos comerciales con fines preventivos de deficiencia de B (Sparks *et al.*, 1996; Santacruz, 2002). El manejo de la fertilización debe realizarse considerando aspectos edáficos,

climáticos, ecológicos y económicos ya que los árboles de aguacate han sido considerados por varios autores como sensibles, tanto al exceso como a la deficiencia de B.

La presente investigación pretende abordar algunos aspectos fisiológicos, morfológicos y ecológicos relacionados con la nutrición con B en aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.) en un andosol de Michoacán.

1. Planteamiento del problema

El cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass en el estado de Michoacán es una de las principales actividades económicas de la entidad, principalmente en la región de Uruapan y sus alrededores, lo que la coloca como la principal zona productora de este fruto a nivel mundial. La nutrición es una de las actividades más importantes en el manejo agrotécnico del aguacate, ya que representa el 33 % de los costos de producción.

La deficiencia de B ocasiona árboles con escaso número de hojas y frutos deformes, por lo que la producción de aguacate, bajo estas condiciones, resulta ser una actividad incosteable. La nutrición con B en aguacate requiere una atención especial, debido a que este proceso no se ha entendido completamente. En la región aguacatera del estado de Michoacán se estima que el 30 % de huertos están deficientes en este nutrimento y la aplicación de fertilizantes foliares con B es insuficiente para solventar este problema. Por lo tanto, debido al desconocimiento del manejo integral de la nutrición con B en huertos con aguacate y los factores involucrados en la absorción de B vía radical, se usa la prácticas de la fertilización foliar y edáfica como actividades preventivas de la deficiencia en huertos comerciales.

Las consecuencias físicas, químicas y biológicas de la deficiencia de B en aguacate y las estrategias para evitarla requieren ser caracterizadas a niveles celular, tisular y visual para poder aplicar criterios de manejo apropiados, referentes a la nutrición. Aunque el boro es considerado como un micronutrimento, por la cantidad requerida por las plantas, tiene una macrofunción en la producción y calidad de frutos.

2. Revisión de literatura

La esencialidad del B para las plantas fue demostrada por Warington en 1923. A partir de entonces, se han dado a conocer respuestas tanto anatómicas como fisiológicas de la planta a la deficiencia de este micronutriente.

La relación entre las respuestas primarias y la expresión visual de los síntomas es casi desconocida (Yu *et al.*, 2001). Para algunos nutrientes los límites entre suficiencia y deficiencia son estrechos y, peor aún, ocurren traslapes debido a que los requerimientos varían dependiendo de la especie y cultivar (Gupta, 1993) y también varían éstos, dependiendo del estado fisiológico de la planta. En el caso específico del B, el intervalo entre deficiencia y toxicidad es más pequeño que el de ningún otro elemento (Goldberg *et al.*, 2002). Por tal motivo es de vital importancia aportar los niveles óptimos de este nutriente para favorecer el desarrollo del cultivo.

Para algunos investigadores el nivel crítico es aquel que se necesita para obtener 90 % del máximo rendimiento (Davis *et al.*, 1978; Kluge y Podlesak, 1985). Otros autores consideran el nivel crítico como el rango bajo o marginal que demerita 5 – 10 % el rendimiento máximo (Sánchez *et al.*, 2007). Por otro lado, existen cultivos en los que la deficiencia de B no disminuye la cantidad, sino la calidad de cosecha (Téliz, 2000; Maldonado, 2002).

Los tejidos en diferenciación son los más sensibles a la deficiencia de B, especialmente los de la zona de extensión de la raíz en la que se inhibe el alargamiento y la división celular (Marschner, 1995; Shelp, 1993; Dell y Huang, 1997).

El efecto morfológico de la deficiencia de B en brotes incluye, en general, la inhibición del crecimiento, quemaduras y necrosis del brote, muerte regresiva, tejido quebradizo, paredes celulares irregulares, grietas y rompimiento de tallos y pecíolos (Goldbach, 1997). Cuando la deficiencia de este nutriente no se manifiesta morfológicamente en los brotes del vástago, éstos pueden diferenciarse como órganos reproductivos y, dependiendo del nivel de deficiencia, se presenta un retardo o inhibición de la floración, aborto de flores y frutos, inhibición del crecimiento de tubos polínicos, bronceado y deformación de frutos, además de la reducción del tamaño de fruto (Goldbach, 1997). No obstante, hasta entonces no existía investigación sistemática referente a la participación del B en la diferenciación de tejidos vasculares: xilema, floema, raíces, tallos u hojas (Dell y Huang, 1997).

Huang *et al.* (2001) obtuvieron resultados interesantes del efecto de B en diferenciación y órganos florales; Lovatt (1999) realizó un trabajo en el que reporta resultados erráticos del efecto de la fertilización foliar en amarre de frutos y Behrendt y Zoglauer (1996) describen el efecto de este micronutriente en la embriogénesis.

Existen diferentes enfoques para evaluar la suficiencia de B en los árboles de aguacate en campo. Uno de ellos es la cuantificación de la concentración de B total en hojas maduras (6ª y 7ª) a partir del brote del vástago (Téliz, 2000; Salazar, 2002). Este método de evaluación nutricional es particularmente importante en aguacate debido a que es incosteable la evaluación del árbol completo en campo.

Se pueden evaluar dos formas de B dentro de la planta, una es el B soluble (Bs) que comprende el B libre, en forma de H_3BO_3 y otra es el ligeramente acomplejado. Shuxiang *et al.* (2002) concluyeron que la concentración de Bs es el mejor indicador para evaluar el nivel disponible de este nutriente para el desarrollo de la planta. Este parámetro evidencia en minutos la deficiencia inducida en tejido en etapa de diferenciación (Goldbach *et al.*, 2000).

El tipo de absorción que realiza la planta está en función de la concentración de B en el medio radical. Gassert *et al.* (2002) evidenciaron un mecanismo de absorción activa en las plantas que actúa a niveles bajos de concentración de B. Este mecanismo se detecta cuantificando la concentración de B en el extracto celular fresco, dividido entre la concentración de B en el medio exterior y sirve para caracterizar la absorción de B en plantas superiores. Estos autores concluyeron que el factor de concentración de B (FCB) varía entre especies y cultivares. Además, explicaron las diferencias de absorción de B proveniente de la solución nutritiva (SN) por la planta completa mediante un FCB. Con base en experimentos realizados con avena y trigo (Nable *et al.*, 1997), girasol (Pfeffer *et al.*, 1999), *Desmodium ovalifolium* y *Arabidopsis thaliana* (Gassert *et al.*, 2002), el valor del FCB puede ser ≤ 1 .

El transporte pasivo a través de la membrana plasmática puede explicarse por simple difusión a través de su bicapa lipídica y por transporte mediante canales, dependiendo de la composición de las capas lipídicas y de la composición de las proteínas que contiene. En cambio, la permeabilidad restringida del ácido bórico puede explicar los FCB menores que 1 y se manifiesta cuando la concentración del medio externo es alta para la especie o variedad (Brown *et al.*, 2002).

Stangoulis *et al.* (2001) describieron el transporte bifásico de ácido bórico a través de membranas de *Chara corallina*, dependiendo de la concentración del medio externo. Este es facilitado (dependiente de energía o activo) y se satura a 5 μM , y después de esto, la penetración se lleva a cabo por simple difusión con una fase lineal. Este mecanismo también

puede explicar las enormes diferencias de absorción de B entre especies y genotipos (Bellaloui y Brown, 1998). La traslocación de B dentro de plantas bien nutridas es baja (Leite *et al.*, 2007) mostrando que también la concentración dentro de la planta influye en la movilidad de este nutrimento.

Los métodos espectrofotométricos utilizando reacciones colorimétricas han sido los más comunes en el análisis de la concentración de B en extractos de suelos y plantas (Goldberg, 1997). Desde 1959 el método de curcumina propuesto por Johnson y Ulrich se ha utilizado para determinar la concentración de B en soluciones. Actualmente el método miniaturizado de curcumina propuesto por Wimmer y Goldbach (1998) se ha aplicado exitosamente para determinar boro en aguas, soluciones nutritivas, diferentes partes de la planta (raíces, tallos y hojas) así como también en polen, savia y fluido del lavado apoplástico. Los resultados muestran buena reproducibilidad con una desviación estándar de 1-5 % en concentraciones de 0.05 a 0.4 mg de B L⁻¹. El porcentaje de recuperación es del rango de 99 %. Además, tiene una desviación estándar de 4.5 %. El B que se determina con este método es el libre como ácido bórico. La acidificación una hora previa a la extracción permite determinar también el boro ligeramente acomplejado.

Los árboles de aguacate han sido considerados sensibles tanto al exceso como a la deficiencia de B (Téliz, 2000; Salazar, 2002; Pais y Jones, 2000). La medición del contenido total de B se realiza usualmente mediante una digestión seca del material vegetal (Johnson y Ulrich, 1959) proveniente de hojas maduras completas (Téliz, 2000; Goodall *et al.*, 1981; Maldonado, 2002). Sin embargo, este parámetro en campo no siempre refleja el estado nutrimental real del árbol, ya que se pueden encontrar niveles altos de B total (Bt) en árboles que muestran deficiencia visible de este micronutrimento.

El rendimiento promedio de aguacate en el estado de Michoacán es de 9.94 t ha⁻¹. Éste, comparado con el rendimiento potencial que puede ser de hasta 20 t ha⁻¹ o más, indica que la nutrición es uno de los temas que más interesa a los técnicos y productores ya que se cuenta con información inconsistente de la respuesta del árbol a la fertilización (Maldonado, 2002).

Aunado a esta problemática, la raíz de aguacate carece de pelos radicales, característica que parece ser intrínseca del género *Persea*, ya que no se han observado estas estructuras en diferentes genotipos de *P. americana* y *P. schiedeana* (Velasco-Cárdenas, 2001, citado por Salazar, 2002). La participación de los hongos endófitos radicales (HER) en la nutrición con B ha sido reportada por pocos autores como promotora de la absorción vía raíz de este micronutrimento (Lehto *et al.*, 2004; Lehto y Laova, citados por Lehto *et al.*,

2004). En cambio, el efecto opuesto ha sido ampliamente publicado (Clark, 2002; Akhilesh y Upadhyay, 1999; Estrada-Luna y Davies, 2001; Clark y Zetto, 2000).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar aspectos fisiológicos, morfológicos y ecológicos relacionados con la nutrición con B en aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.) en andosoles de Michoacán.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Adaptar el método miniaturizado de curcumina (Wimmer y Goldbach, 1998) para analizar el contenido de B en aguacate.

3.2.2. Caracterizar los síntomas de deficiencia de B en aguacate cv. Hass a nivel celular, tisular y visual.

3.2.3. Conocer la distribución del B en árboles de aguacate cv. Hass, desarrollados en diferentes concentraciones externas del nutrimento en cuestión.

3.2.4. Definir el requerimiento de B para aguacate cv. Hass en árboles de 2.5 años de edad.

3.2.5. Evaluar si los hongos endófitos radicales incrementan la absorción de B en aguacate cv. Hass.

4. Hipótesis

4.1. El método miniaturizado de curcumina (Wimmer y Goldbach, 1998) usado para determinación de la concentración de B en solución de muestras biológicas de

aguacate es más económico y tiene la misma confiabilidad que el método de curcumina convencional.

4.2. Los síntomas de deficiencia de B en aguacate cv. Hass se identifican a nivel celular y tisular en brotes de raíz y del vástago.

4.3. El nivel crítico de B para aguacate cv. Hass es de 0.5 mg kg^{-1} de B en solución nutritiva.

4.4. El gradiente de concentración de B en plantas de aguacate es: hojas apicales > hojas maduras > hojas basales > tallos > raíces gruesas > raíces delgadas en aguacate.

4.5. Los hongos endófitos radicales incrementan la absorción de B vía radical en aguacate cv. Hass.

5. Literatura citada

Akhilesh KN y RS Upadhyay. 1999. VA mycorrhizae and revegetation of coal mine spoils: a review. *Tropical Ecology* 40:1-10.

ASEEAM (Asociación de Empacadores y Exportadores de Aguacate del Estado de Michoacán). 1998. El aguacate mexicano: Producción y destino. Uruapan, Michoacán. México.

APEAM (Asociación de Productores y Empacadores de Aguacate del Estado de Michoacán). 2003. Mexican avocados: the world's finest. Michoacán. México.

Aragón E, Campos M y A Bouquet. 2007. The emergence of new successful export activities in Mexico. EGAP, ITESM. México.

Behrendt U y K Zoglauer. 1996. Boron controls suspensor development in embryogenic cultures of *Larix decidua*. *Physiol. Plant.* 97: 321-326.

Bellaloui N y PH Brown. 1998. Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Soil.* 198:153-158.

Brown PH, Bellaloui N, Wimmer MA, Bassil ES, Ruiz J, Hu H, Pfeffer H, Dannel F y V Roemheld. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology.* 4:205-223.

- Clark RB. 2002. Differences among mycorrhizal fungi for mineral uptake per root length of switchgrass grown in acidic soil. *Journal of Plant Nutrition* 25:1753-1772.
- Clark RB y SK Zeto. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition*. 23: 867-902.
- Davis RD, Beckett PHT y E Wolland. 1978. Critical levels of 20 potentially toxic elements in young spring barley. *Plant and Soil*. 29(2):395-408.
- Dell B y L Huang 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil* 193: 103–120.
- Estrada-Luna AA y FT Jr. Davies. 2001. Micorrhizal fungi enhance growth and nutrient uptake of prickly-pear cactus (*Opuntia albicarpa* Scheinvar ‘Reyna’) plantlets after *ex vitro* transplantation. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76:739-745.
- Gassert B, Sprich E, Pfeffer H, Dannel F, Wirén NV y V Römheld. 2002. Characterization of boron uptake in higher plants. In *Boron in Plant and Animal Nutrition*. Goldbach HE, B Rerkasem, MA Wimmer, PH Brown, M Thellier and RW Bell. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. p 119-126.
- Goldbach HE 1997. A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants: suggestions for further research and methodological requirements. *J. Trace and Microprobe Techn.* 15: 51-91.
- Goldbach EH, AM Wimmer y P Findelee. 2000. Discussion paper: Boron- How can critical level be defined? *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162: 115.121.
- Goldberg S. 1997. Reactions of boron with soils. *Plant and Soil*. 193:35-48.
- Goldberg S, Corwin DL, Shouse PJ y DL Suarez. 2005. Prediction of boron adsorption by field samples of diverse textures. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69:1379-1388.
- Goodall GE, Embleton TW y RG Platt. 1981. Avocado fertilization. Division of Agricultural Sciences. University of California.
- Gupta CU. 1993. Boron and its role in crop production. CRC Press. Boca Raton, Florida. 237 p.
- Huang L, Dell B y RW Bell. 2001. Seasonal conditions modify pollen viability responses to B deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Wilgoyne). In: Goldbach EH, Rerkasem B, Wimmer AM, Brown HP, Thellier M y WR Bell. *Boron in plant and animal nutrition*. Luwer Academic/ Plenum Publishers. New York. p.137-142.
- Johnson CM y A Ulrich. 1959. Analytical methods for use in plant analysis. *California Agric. Exp. Stn. Bull.* 26-78 p.

- Kluge R y W Podlesak. 1985. Plant critical levels of boron for the evaluation of toxicity in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant and Soil*. 83(3):381-388.
- Lehto T, Lavola A, Kallio E y PJ Aphalo. 2004. Boron uptake by ectomycorrhizas of silver birch. *Mycorrhiza*. 14:209-212.
- Leite MV, Brown HP y CA Rosolem. 2007. Boron translocation in coffee trees. *Plant and Soil*. 290: 221-229.
- Lovatt C J. 1999. Management of foliar fertilization. *Terra*. 17:257-264.
- Maldonado T R. 2002. Diagnóstico nutrimental para la producción de aguacate Hass (Aguacatl). Ed. Fundación Produce de Michoacán A.C. México. 74 p.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press. London. 885 p.
- Nable RO, Lance RCM y B Cartwright. 1997. Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. *Ann Bot*. 66:83-90.
- Pais I y BJ Jones Jr. 2000. The handbook of trace elements. St. Lucie Press. Boca Raton, Florida. USA.
- Pfeffer H, Dannel F y V Römheld. 1999. Are there two mechanisms for boron uptake in sunflower? *Plant Physiol*. 155: 34-40.
- Romero PJ. 2007. Contact farming and producer participation in the avocado industry in Michoacán: the case of CALAVO de México. Tesis de Maestría en Artes. Universidad de Simon Fraser. EUA.
- Salazar GS. 2002. Nutrición del aguacate, principios y aplicaciones. Instituto de la Potasa y el Fósforo. Querétaro, Qro. México.
- Sánchez GP, Molinos DaSilva Ch, Alcántar GG, Manuel SV 2007. Diagnóstico nutrimental en plantas. In: Nutrición de cultivos. Alcántar GEG y TLI Trejo. 2007. Mundiprensa. 440 p.
- Santacruz UH. 2002. Fertilización del aguacate. Curso nacional del cultivo del aguacate. Proyecto de desarrollo de la fruticultura y la agroindustria "PROFRUTA". Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán. México.
- Shelp BJ. 1993. Physiology and biochemistry of boron in plants. In *Boron and its role in crop production*. Ed. UC Gupta. CRC Press, Boca Raton, FL. EUA. 53-85 p.

- Shuxiang Z, L Chunhua y HE Goldbach. 2002. Determining the extractable fraction as a diagnostic criterion for the assessment of plant's boron status. In *Boron in Plant and Animal Nutrition*. Goldbach HE, B. Rerkasem, MA Wimmer, PH Brown, M Thellier and RW Bell. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. p 319-125.
- Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnston CT y ME Summer. 1996. Methods of soil analysis. Part 3, Chemical methods. Soil Science society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Stangoulis CRJ, Reid JR, Brown HP y DR Graham. 2001. Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. *Planta*. 213:142-146.
- Téliz OD. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Mundi Prensa México, S.A. de C.V. México. 219 p.
- Warrington K. 1923. The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann. Bot.* 37: 629-6 72.
- Wimmer AM y EH Goldbach. 1998. A miniaturized curcumin method for determination of boron in solutions and biological samples. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162:15-18
- Yu Q, Wingender R, Schultz M, Baluška F, y H Goldbach. 2001. Short-term boron deprivation induces increased levels of cytoskeletal proteins in *Arabidopsis* roots. *Plant Biol.* 3:335-340.

CAPÍTULO I. ADAPTACIÓN DEL MÉTODO MINIATURIZADO DE CURCUMINA (WIMMER Y GOLDBACH, 1998) PARA LA DETERMINACIÓN DE B SOLUBLE Y B TOTAL EN AGUACATE CV. HASS. (Miniaturized curcumin method (Wimmer and Goldbach, 1998) adaptation to determine soluble and total B in avocado cv. Hass).

1.1. Introducción

Los métodos espectrofotométricos, basados en reacciones colorimétricas son los que comúnmente se utilizan para el análisis de suelos y plantas (Goldberg, 1997). El método miniaturizado de curcumina ha sido aplicado exitosamente para determinar boro en aguas, soluciones nutritivas, diferentes partes de la planta (raíces, tallos y hojas) así como también en polen, savia y fluido del lavado apoplástico (Wimmer y Goldbach, 1998).

Entre otras características, el método permite la determinación de B en volúmenes pequeños de solución (50-150 μl para muestras con alta o baja concentración de B, respectivamente) y con un límite de detección de 0.01 mg de B L^{-1} . La curva de calibración es lineal a concentraciones superiores a 3 mg de B L^{-1} . Las interferencias con otros iones se eliminan mediante la extracción con 2-etil-hexanodiol en cloroformo.

Los resultados muestran buena reproducibilidad con una desviación estándar de 1-5 % en concentraciones de 0.05 a 0.4 mg de B L^{-1} . El porcentaje de recuperación es del rango de 99 %. Además, tiene una desviación estándar de 4.5 %.

El B que se determina con este método es el libre como ácido bórico. La acidificación de una hora previa a la extracción permite determinar también el B ligeramente complejoado.

El objetivo de adaptar el método miniaturizado a muestras de aguacate cv. Hass fue obtener una medida apta para conocer el estado del B en el árbol, mediante la verificación del resultado obtenido de la cuantificación del B soluble y del B total.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Descripción simplificada del método miniaturizado de curcumina para la determinación de B en soluciones y muestras biológicas (Wimmer y Goldbach, 1998)

Reactivos requeridos: 0.1 N HCl

2-Etil-1,3-hexanodiol/Cloroformo (10 %)

H₂SO₄/Ácido acético (1:1, v/v)

Curcumina en Metil-Isobutil-Cetona (25 mg/50 mL)

El agua desionizada es tratada con una resina fuertemente aniónica para liberar completamente el agua de B

Estándares adecuados: 0, 10, 25, 50 y 100 μM H_3BO_3 en agua pasada por resina Millipore

Procedimiento:

1. Pipetear 50 μl (sin factor de concentración) o 100 μl (doble de la concentración) de estándares y muestras dentro de tubos Eppendorf de 1.5 mL; hacer dos blancos (estándares 0);
2. Agregar el mismo volumen de 0.1 N HCl;
3. Agregar 50 μl de mezcla de Diol/Cloroformo, agitar en el vortex 2 veces x 30 segundos, centrifugar a aproximadamente 1000 rpm por 2-4 minutos (dependiendo de la muestra, las muestras de savia requieren más tiempo que las de agua);
4. Pipetear 20 μl de la fase inferior (orgánica) dentro de tubos Eppendorf;
5. Agregar 200 μl de H_2SO_4 /Ácido acético concentrado y 250 μl de la mezcla de curcumina/Cloroformo (utilizando micropipeta) y agite manualmente;
6. Esperar al menos una hora (más está bien); centrifugue manualmente a 700 rpm para remover gotas de la tapa;
7. Parar la reacción agregando 0.5 mL de agua pasada por resina;
8. Centrifugar para una buena separación de fases (o espere aproximadamente de 0.5 a 1 hora);
9. Medir la absorbancia de la parte superior (orgánica) en el espectrómetro a 550 nm de longitud de onda, utilizando una microcubeta de cuarzo (volumen aproximado de 140 μl). Utilizar el primer blanco para ajustar a cero;
10. Colectar los residuos separadamente.

1.2.2. Preparación del material vegetal para la determinación de B total

La preparación del material vegetal recomendado para el método Wimmer y Goldbach (1998) es el siguiente:

1. Pesar 10-100 mg de muestra vegetal, secada y molida previamente y se coloca ésta en una cápsula de teflón.
2. Agregar 1 ml de HNO_3 (concentrado).

3. Cerrar las cápsulas de teflón y colocárlas en su contenedor (juego de 6 cápsulas) en el que se fijan, apretando ligeramente las roscas y verificando que cada tapa quede nivelada para evitar pérdida de ácido. Colocar éstas en un horno por un período de 6 horas. La temperatura del horno estará a 90° C, para evitar pérdidas de B. Los ciclos programados de calentamiento son: 1 hora de encendido, apagar una hora para evitar acelerar demasiado la reacción, encender otras 5 horas y finalmente esperar a que se enfríe 4-6 horas. Las muestras se retiran del horno para terminar el enfriamiento y, una vez obtenida la temperatura ambiente, se destapan las cápsulas bajo una campana de extracción.
4. Vaciar los extractos cuidadosamente en recipientes de plástico de 20 mL, auxiliándose con golpecitos para reunir en el fondo, las gotas de ácido adheridas a las paredes de la cápsula. La cápsula aparentemente limpia se enjuaga recuperando el agua de enjuague en el mismo recipiente. El volumen final debe ser de entre 5 y 10 mL, dependiendo de la concentración de la muestra (sin exceder los 10 mL).
5. Tomar una alícuota de 100 a 150 μL para análisis subsecuentes.

1.3 Resultados

1.3.1 Determinación de B total en aguacate cv. Hass

La determinación de B total en muestras de diferentes partes de aguacate cv. Hass requirió las siguientes modificaciones para la extracción:

1. Se molió el material vegetal proveniente de aguacate cv. Hass hasta obtener un polvo fino, utilizando canicas metálicas en frasquitos de plástico.
2. Se pesaron 20 mg de material vegetal seco debido a la alta concentración de B que se esperaba en las muestras (más de 300 mg kg^{-1} de B en las de mayor concentración). Cada medición del peso se realizó con una precisión de ± 0.0005 mg y se consideró al momento de calcular la concentración final para cada muestra.
3. Se diluyó en 2 mL de HNO_3 concentrado debido a que algunas muestras de tallo, algunas de raíz delgada y todas las de raíz gruesa presentaban precipitados blancos y/u oscuros a menor cantidad de ácido.
4. Se aforó a 5 mL en la recuperación de la muestra de las cápsulas de digestión.

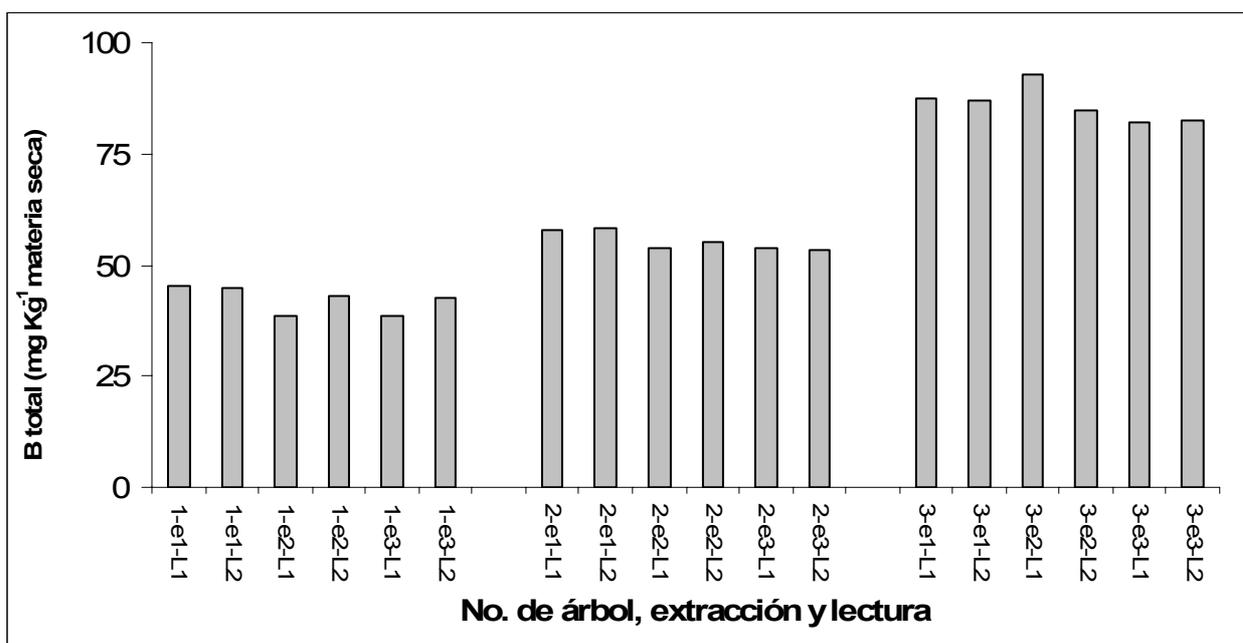


Figura 1.1. Concentración de B total en 3 árboles de aguacate cultivados un año, en 3 diferentes niveles de B en solución nutritiva. El No. inicial de la leyenda de cada columna indica el No. de árbol; e= No. de extracción; L=lecturas por extracto; cada 6 barras representan un árbol.

Con base en estas consideraciones se hizo posible la determinación exitosa de BT en muestras vegetales de aguacate disminuyendo la variación en extracciones y en lecturas (Figura 1.1).

1.3.2 Determinación del B soluble en aguacate cv. Hass

La determinación de boro soluble en aguacate cv. Hass también requirió de modificaciones debido a que no se contaba con muestras de material vegetal fresco para la determinación de este parámetro.

El procedimiento fue el siguiente:

Se analizó el B soluble de forma convencional, proveniente de la 6^a y 7^a hojas de 3 árboles con diferentes niveles de B. El resumen de este procedimiento se describe a continuación:

- a) Se recortan círculos de 0.5 cm de diámetro provenientes de la parte intervenal de la lámina foliar (aproximadamente 5 hojas de tamaño normal sin deficiencia de B) y se colocan en un frasco de 120 mL. Las hojas provenientes de árboles de aguacate cv. Hass con deficiencia severa de B son delgadas y ligeras, por consiguiente, se requiere un mayor número de hojas (hasta 12, dependiendo del grado de deficiencia) para completar el gramo de material vegetal intervenal.
- b) Se agregan 10 mL de agua desionizada.
- c) Se agita 1 minuto al inicio e igual tiempo cada 30 minutos.
- d) Se filtra con papel Wattman No. 2 y del filtrado se toma una alícuota para la determinación de B soluble.

Los inconvenientes para la determinación de B soluble en material vegetal fresco para aguacate cv. Hass son: 1) el número de hojas requeridas para la extracción es escaso o nulo a medida que se incrementa la deficiencia de B; 2) no es posible hacer la extracción en campo con hojas frescas, que es lo recomendable. El transporte de hojas frescas al laboratorio para hacer la extracción debe hacerse a 5° C para evitar cambios en el metabolismo, esto puede resultar en variaciones por manejo heterogéneo de muestras, desde la colecta hasta la determinación; 3) el tamaño de recipientes requiere un gran espacio para el manejo de muestras; 4) se requiere gran cantidad de agua desionizada; y 5) se requiere filtrar el extracto resultando en un elevado costo de tiempo, económico y de recipientes para el manejo de muestras.

Con base en los inconvenientes enumerados, el B soluble a partir de material vegetal fresco de aguacate requiere ser probado y estandarizado para hacer de este parámetro un indicador accesible del estado del B en aguacate (Figura 1.2).

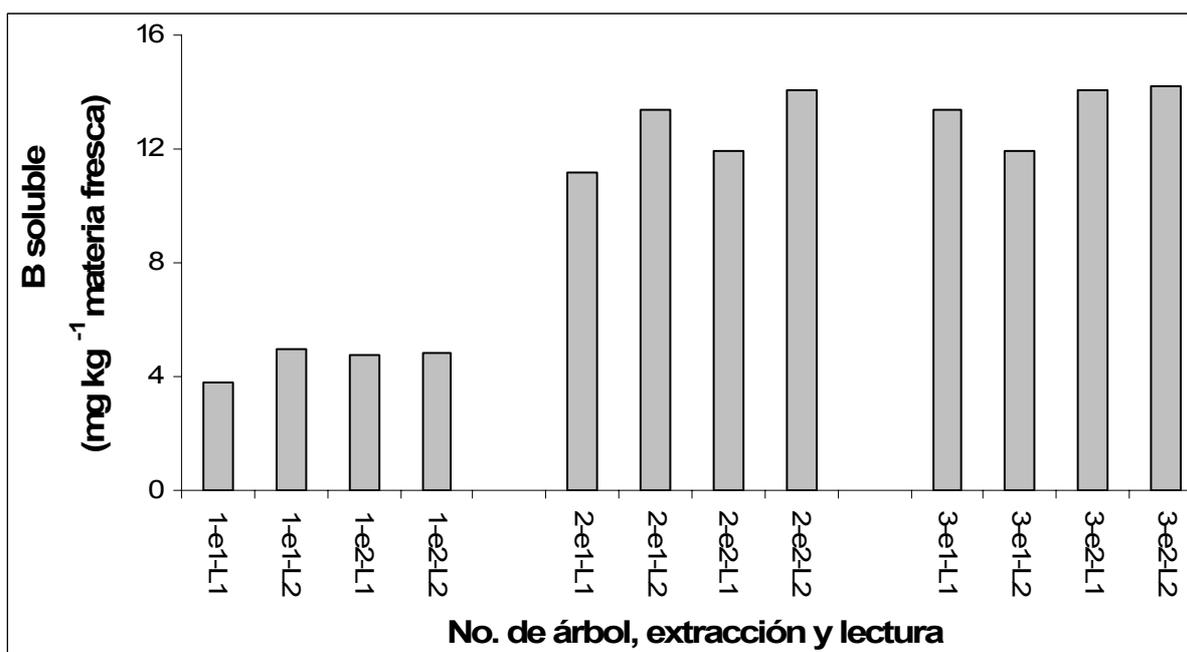


Figura 1.2. Concentración de B soluble determinado en materia fresca, en 3 árboles de aguacate. El No. inicial de la leyenda de cada columna indica el No. de árbol; e= No. de extracción; L=lecturas por extracto; cada 4 barras representan un árbol.

Modificación del método para determinar B soluble a partir de material vegetal seco de aguacate cv. Hass

La extracción de B soluble a partir de material vegetal seco se resume en los siguientes pasos:

- e) Se prepararon muestras vegetales secas y molidas de la 6^a y 7^a hojas, provenientes de los mismos tres árboles utilizados para la determinación de B soluble a partir del material vegetal fresco. Se requirió el peso de materia fresca de las hojas para el siguiente paso.
- f) Se pesaron los gramos necesarios de material vegetal seco por muestra para mantener la proporción de 1:10 del peso de material vegetal fresco: volumen de agua para extracto en tubos Eppendorf de 1.5 mL.
- g) Se agitó horizontalmente 3 veces por 1 minuto c/u cada 30 minutos. Con esto se consiguió que el material vegetal quedara mezclado con el extracto.
- h) Después de las 2 horas se centrifugó y se tomó inmediatamente la alícuota de la parte superior para la determinación de BS en tubos Eppendorf y se desechó el residuo.
- i) Se procedió a determinar B mediante el método miniaturizado utilizando la modificación de acidificar una hora previa a la extracción de B.

Pruebas de dilución:

Las muestras de material vegetal provinieron de un experimento en el que se manejaron diferentes niveles de B en solución nutritiva, así como también diferentes tratamientos de aplicación foliar y al sustrato. Las concentraciones esperadas en algunas de las muestras fueron hasta de más de 300 mg kg^{-1} de materia seca. Por consiguiente, previo a la determinación de B total y B soluble, se realizó una prueba para verificar que la concentración de B en los extractos quedara dentro de los límites de la curva de calibración, permisibles por el método.

Pruebas derivadas de la extracción de BS a partir de material vegetal seco en aguacate cv. Hass:

El material vegetal se obtuvo de 3 árboles de aguacate, desarrollados en invernadero y que crecieron un año en diferentes niveles de B en solución nutritiva. Posteriormente se abastecieron un mes con la solución nutritiva Steiner completa al 50 % de concentración, misma que contenía 0.5 ppm de B. Se colectó la 6^a y 7^a hojas y se consideraron 3 muestras de cada árbol para B soluble a partir de material vegetal fresco. También se secó y molió material vegetal proveniente de éstas hojas para realizar las pruebas de correlación de B soluble a partir de material vegetal seco.

- 1) Se probaron los métodos de agitación con el vortex a una velocidad de 1 y 2, y se observó que no se mezcla completamente el material vegetal con el solvente y solamente se humedece el material vegetal remanente en la punta inferior del tubo Eppendorf de 1.5 mL. El inconveniente de las velocidades 3, 4 y 5 es que se obtiene una extracción semejante a la del BT, pero ésta tiene una baja correlación con el B soluble, que es la forma de B requerida para esta prueba. Como conclusión, se obtuvo que la agitación con el vortex extrae demasiado B del material vegetal seco y no correlaciona con el B soluble de la planta.
- 2) La agitación manual de las muestras de material vegetal seco con el solvente dentro de los tubos Eppendorf colocados horizontalmente tuvo una correlación de 0.72 con el B soluble extraído a partir de material vegetal fresco. En

cambio, el B soluble extraído mediante este método tiene una correlación de 0.16 con el B total de la planta.

La agitación manual se realizó en tres ocasiones de la siguiente manera: 1 minuto a una velocidad de 2 vaivenes por segundo y dejar reposar media hora. Al cabo de 2 horas, centrifugar a 1000 rpm e inmediatamente después, con cuidado de no agitar el extracto, tomar la alícuota de la parte superior del sobrenadante para la determinación del B.

Los resultados en mg de B soluble kg^{-1} de materia seca (Figura 1.3) son aproximadamente 3-4 veces mayores que los obtenidos de material vegetal fresco (Figura 1.2). Este resultado es prometedor para determinar B soluble en hojas. El B soluble obtenido a partir de material vegetal seco presenta una correlación que nos permite inferir cuánto B soluble tiene la planta. Para cuantificar la correlación del B soluble extraído a partir de ambos tipos de material vegetal (fresco o seco), se realizó la siguiente prueba.

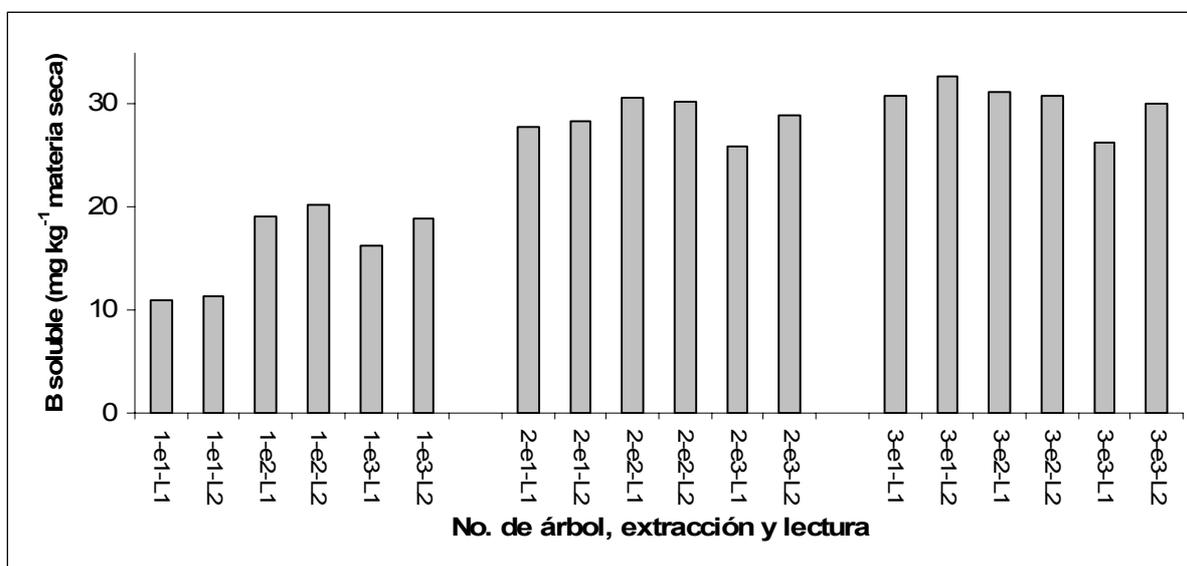


Figura 1.3. Concentración de B soluble cuantificado en materia seca, en 3 árboles de aguacate. El No. inicial de la leyenda de cada columna indica el No. de árbol; e= No. de extracción; L=lecturas por extracto; cada 6 barras representan un árbol.

La extracción de B soluble a partir de material vegetal seco es rápida (25 muestras por hora) comparada contra la convencional a partir de material vegetal fresco (8 muestras por hora), además de la homogeneidad del manejo y preparación de las muestras hasta el

momento de agregar la solución extractora. Adicionalmente, la cantidad de agua y material vegetal requerida es 10 veces menor. Con base en las ventajas mencionadas respecto a la rapidez de la obtención del extracto, del ahorro de materiales y de agua desionizada, la determinación de B soluble a partir de material vegetal seco es eficiente en aguacate cv. Hass. No obstante, debe probarse y estandarizarse para ser usado en otros tipos de plantas.

Correlación entre el B soluble de material vegetal fresco contra el obtenido a partir de material vegetal seco y molido

El material vegetal se obtuvo de 3 árboles de aguacate, cultivados en hidroponía con arena de sílice como sustrato y abastecidas con una solución nutritiva de Steiner al 30 %, durante un año, la variación entre estas plantas fue que la concentración de B se suministró en niveles bajo, medio y alto, identificadas como árbol número 1, 2 y 3, respectivamente. Con esto aseguramos que las hojas indicadoras (6^a y 7^a) tuvieran diferentes niveles de B total, que nos indica la cantidad de este nutrimento que acumuló la planta a través del año en la construcción de sus estructuras, además del B ligeramente complejo y el libre como ácido bórico. Posteriormente, se aplicó a los 3 árboles de aguacate la misma solución Steiner al 30 % pero con el nivel medio de B. Con este suministro homogéneo aseguramos que el B total no correlacione con el B soluble de la planta debido a que el B soluble corresponde únicamente al que se encuentra libre y ligeramente complejo en la planta y refleja el suministro reciente.

La precisión en la extracción y desarrollo del color hasta lectura de la adaptación del método miniaturizado de curcumina se observa en la Figura 1.1. Esta regularidad permite utilizar muestras pequeñas de material vegetal seco. La relación entre la concentración de B soluble determinado a partir de material vegetal fresco contra el determinado de material vegetal seco muestra una tendencia y una proporción semejante (Figura 1.4). Con base en esta tendencia se concluye que ambos métodos de extracción de B soluble son útiles para determinar la concentración de B en extractos de plantas, previa calibración del B soluble obtenido a partir del material vegetal seco para evitar sobreestimar el resultado.

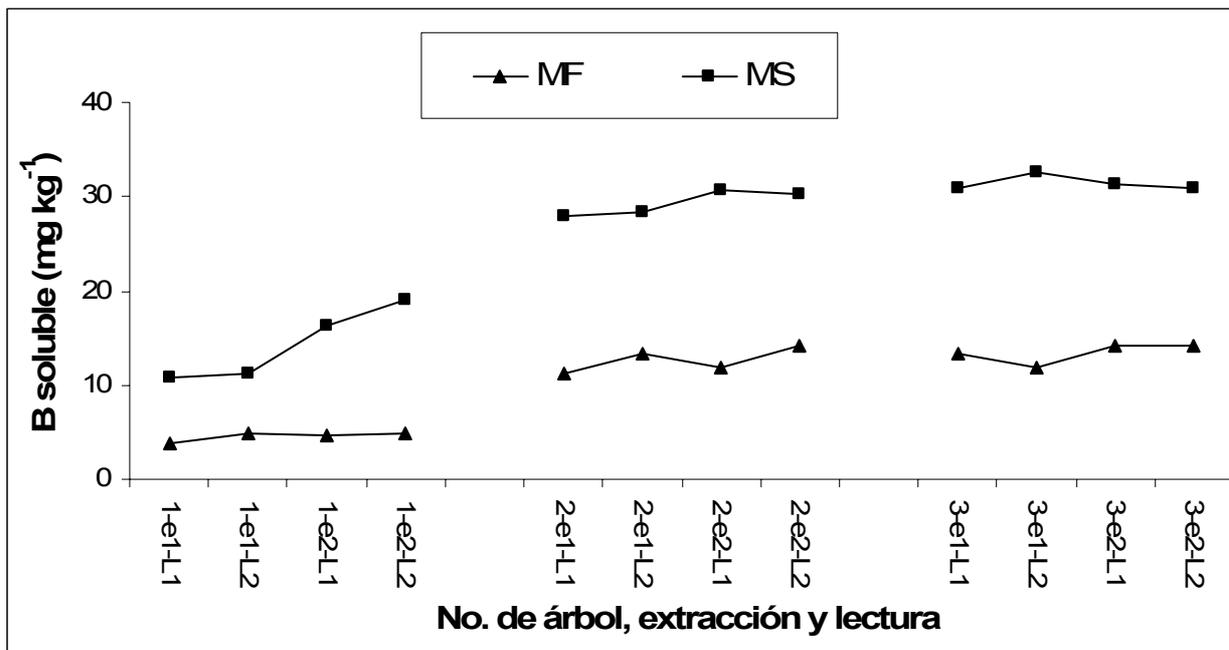


Figura 1.4. Relación entre el contenido de B soluble extraído a partir de material vegetal fresco y el B extraído a partir de material vegetal seco en árboles de aguacate (*Persea americana* Mill.) cultivados en 3 niveles de B en solución nutritiva. MF= material vegetal fresco; MS= material vegetal seco; No. inicial de la leyenda de cada columna indica el No. de árbol; e= No. de extracción; L=lecturas por extracto; cada 4 barras representan un árbol.

La correlación del B soluble extraído a partir de de material vegetal fresco (extracción convencional) contra el B total es de 0.6. En cambio, la correlación obtenida entre el B soluble a partir de material vegetal seco contra el proveniente de material vegetal fresco es de 0.894 (Figura 1.5). Este hecho evidencia la confiabilidad de ambos métodos de extracción de B soluble (proveniente de material vegetal seco y de fresco).

Con base en la correlación de B soluble de material vegetal fresco contra el de material vegetal seco (Figura 1.5) se concluye que es posible determinar B soluble a partir de material vegetal seco y molido.

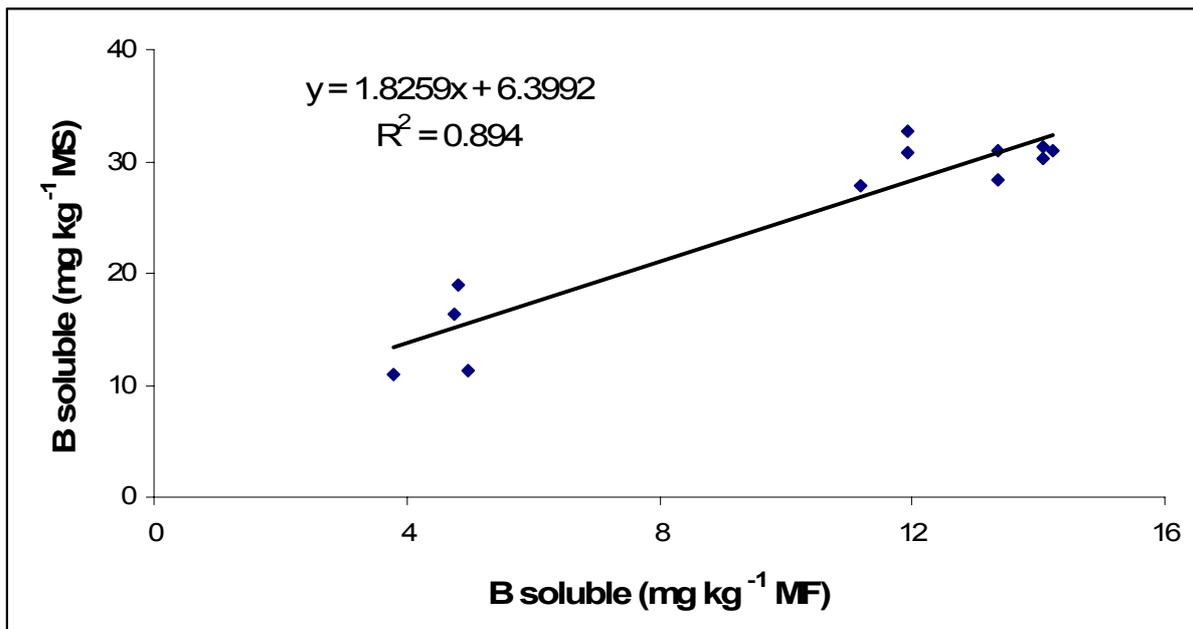


Figura 1.5. Correlación el contenido de B soluble extraído a partir de material vegetal fresco y el B extraído a partir de material vegetal seco en árboles de aguacate (*Persea americana Mill.*) cultivados en 3 niveles de B en solución nutritiva. MF= material vegetal fresco; MS= material vegetal seco.

- 3) Se verificó el efecto de la solución extractora que contiene una dilución de Tritión: agua desionizada (7 mL L⁻¹) comparado contra la extracción con agua desionizada. El resultado mostró concentraciones semejantes de B soluble extraído mediante ambas extracciones. Como conclusión, resulta igual la extracción de B soluble en material vegetal de aguacate cv. Hass con o sin Tritión en la solución extractora. La diferencia visible entre la extracción con ambos solventes es que cuando se utiliza Tritión, éste extrae también clorofila, comparado contra el método de extracción con agua en el que la solución es incolora. Esta coloración en los extractos planteó una nueva pregunta ¿la clorofila interfiere con la lectura final del espectrómetro en la determinación de B a 550 nm o en el desarrollo del color del método miniaturizado de curcumina?

Verificación de la interferencia de clorofila en el desarrollo del color en el método miniaturizado.

Se realizó una prueba para verificar si el color del extracto obtenido con Tritión interfiere en el desarrollo del color o en la lectura del espectrómetro. Para probar esto, se llevó a cabo

un ensayo con 3 muestras provenientes de hojas medias de árboles con diferente contenido de B y se procedió de la manera siguiente:

1. Se extrajo B soluble de material vegetal proveniente de una misma muestra. Los extractantes fueron: 1) Tritión: agua deionizada (7:1000 v/v) (para obtener extractos de color verde claro) y con agua desionizada (extractos incoloros). Se determinaron 6 repeticiones de cada extracto.
2. Se les acidificó por una hora con HCl 0.1 N.
3. Se procedió a la determinación de B en 3 de las muestras mediante el método miniaturizado descrito anteriormente.
4. A las otras 3 muestras se les analizó de igual manera pero sin agregarles curcumina.
5. Se leyeron todas las muestras en el espectrómetro para verificar si hay interferencia de la clorofila en la lectura del extracto.

Los resultados de la lectura de extractos sin la adición de curcumina muestran que la clorofila se diluye con los solventes utilizados en éste método miniaturizado de determinación de B y no interfiere en el desarrollo del color ni en la lectura final en el espectrómetro a 550 nm.

1.3.3. Determinación de B soluble en suelo

El B presente en los suelos está dividido comúnmente en 3 categorías: (1) B total, (2) B soluble en ácido y (3) B soluble en agua. De estas fracciones, solamente el B soluble en agua caliente por 5 minutos (Berger y Truog, 1940) frecuentemente correlaciona con la absorción de B por la planta (Suman *et al.*, 1992; Self y Gupta 1993). La única limitante para el uso del B soluble en agua caliente es que para algunos tipos de suelo, las condiciones de manejo provocan una baja correlación entre el B soluble en agua y la respuesta del cultivo.

Los inconvenientes del método de Berger y Truog, (1940) son resumidos por Sah y Brown (1997), mismos que se enumeran a continuación: a) este método es difícil de estandarizar; b) tardado y tedioso por la rutina y repeticiones requeridas; c) la cantidad de B extraída es afectada por el tiempo de reflujó; d) el tiempo de extracción; e) la temperatura y puede ser reabsorbido durante el periodo de enfriamiento y; f) el color del suelo puede teñir el extracto y afectar la determinación colorimétrica. Además, los mismos autores mencionan

varios métodos para la extracción de B disponible para la planta en la solución del suelo mediante el uso de diferentes reactivos y diferentes temperaturas de extracción.

Una elevada concentración de sales, compuestos orgánicos y otras especies químicas pueden provocar interferencias en la determinación de B. Si la concentración de B es baja y se requiere de la eliminación de las sustancias que interfieren con la lectura, entonces se procede a hacer una preconcentración de la muestra y posteriormente una separación de los analitos en una nueva matriz. Estos métodos se clasifican en: 1) separación de intercambio (Smith *et al.*, 1991), 2) quelatación (Gregoire, 1987), 3) separación gaseosa como metilborato (Castillo *et al.*, 1985) y 4) extracción mediante un solvente (García *et al.*, 1985). Este último se utiliza en el método miniaturizado de Wimmer y Goldbach (1998). Particularmente para este fin se extrae el complejo B-2-etil-1,3-hexanodiol con cloroformo (Agazzi, 1967).

Considerando los argumentos anteriores, la extracción de B soluble en suelo se realizó mediante el método recomendado por Handreck (1990), el cual consiste en la extracción del B disponible para la planta con agua a temperatura ambiente.

Las adaptaciones para la determinación del B soluble en agua fueron las siguientes:

1. Se pesaron 0.5 g de suelo seco a la sombra y tamizado en malla 2 y colocado dentro de un tubo Eppendorf de 2.5 mL de volumen.
2. Se le agregó 1 mL de agua desionizada libre de B.
3. Las muestras se colocaron en un contenedor para mantenerlos en posición horizontal.
4. Éstas se fijaron en un agitador de vaivén a una velocidad de 2 (en escala de 8 velocidades de agitación, el 2 equivale a un vaivén por segundo) durante 8 horas.
5. Se centrifugaron a 1000 rpm por 2 minutos y se tomó la alícuota de la parte superior para la determinación de la concentración de B mediante el método miniaturizado (Wimmer y Goldbach, 1998).
6. Se acidificó la muestra por una hora.
7. Se desechó el resto del extracto.

Como conclusión, se obtuvo una modificación útil en la determinación de B soluble en suelo, miniaturizando la extracción 10 veces y evitando el proceso de ebullición que resulta en riesgos para el laboratorista, además de los inconvenientes ya mencionados anteriormente que pueden resultar en un factor de variación entre muestras y para diferentes tipos de suelo.

La correlación del B soluble del suelo obtenido mediante este método fue de $r = 0.89$ con la concentración de B total de la planta y un 0.95 con la de hojas medias, demostrando que el B soluble es un indicador del estado del B en el árbol de aguacate cv. Hass.

1.4. Conclusiones

- a) Es posible determinar B total en aguacate cultivar cv. Hass mediante el método Wimmer y Goldbach (1998) con modificaciones en la obtención de extractos. Es importante considerar previamente la concentración esperada para realizar las diluciones necesarias (en material vegetal y aforo al recuperar el digestado) para que la concentración final quede en el rango de la curva (entre 0 y 2 mg L^{-1}).
- b) A mayor deficiencia de B, las hojas de aguacate cv. Hass se vuelven más delgadas y ligeras requiriéndose mayor número de hojas para la determinación convencional de B soluble a partir de material vegetal fresco.
- c) El corte circular intervenal con sacabocados requerido para determinar B soluble en aguacate es tardado (8 muestras en 1 hora).
- d) La extracción de B soluble a partir de material vegetal seco es rápida (25 muestras por hora) comparada contra la convencional a partir de material vegetal fresco (8 muestras por hora). Además, la cantidad de agua y material vegetal requerida es 10 veces menor. Con base en las ventajas mencionadas respecto a la rapidez de la obtención del extracto y el ahorro de materiales y agua desionizada, la determinación de B soluble a partir de material vegetal seco es un método prometedor que debe probarse y estandarizarse en diferentes tipos de plantas.
- e) La solución extractora para obtención de B soluble con material vegetal seco puede ser agua desionizada sin Tritión. La clorofila que se pueda extraer no interfiere con el desarrollo del color en el método miniaturizado para determinar B (Wimmer y Goldbach, 1998) ni en la lectura final del espectrómetro a 550 nm .
- f) Se obtuvieron modificaciones útiles en la determinación de B soluble en aguacate, tanto para material vegetal como para suelo reduciendo los volúmenes de la extracción 10 veces.

- g) Los métodos miniaturizados de extracción de B soluble tanto para suelo como para aguacate cv. Hass resultan ser reproducibles, económicos, y correlacionan con la concentración de B soluble en diferentes partes de la planta, así como también con la del árbol completo.
- h) Se sugiere probar estos métodos con diferentes especies de plantas para validarlos como métodos confiables para estudiar el estado del B en cultivos comerciales.

1.5. Literatura citada

- Agazzi EJ. 1967. Extraction-flame photometric determination of boron. *Anal. Chem.* 39:223-235.
- Berger KC y E Truog. 1940. B deficiencies as revealed by plant and soil tests. *J. Am. Soc. Agron.* 32:297-301.
- Castillo JR, Mir JM, Martínez C y C Bendicho. 1985. Determination of boron waste in vegetal matter by atomic absorption spectrometry using direct atomization of methyl borate as volatile phase. *Atom Spectrosc.* 6:152-155.
- García IL, Córdova MH y C. Sánchez-Pedrono. 1985. Sensitive method for the spectrophotometric determination of boron in plants and waters using crystal violet. *Analyst* 110:1259.
- Goldberg S. 1997. Reactions of boron with soils. *Plant and Soil.* 193:35-48.
- Gregoire DC. 1987. Determination of boron isotope ratios in geological materials by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 59:2479-2484.
- Handreck KA. 1990. Methods of assessing boron availability in potting media with special reference to toxicity. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 21:2265-2280.
- Sah NR y HP Brown. 1997. Techniques for boron determination and their application to the análisis of plant and soil samples. *Plant and Soil.* 193:15-33.
- Self JR y UC Gupta. 1993. Soil testing for boron on alkaline soils. In: *Boron and its role in crop production.* Ed. UC Gupta. Pp 125-135 CRC Press Inc. Boca Raton, FL, EUA.
- Shuman LM, Bandel VA, Donohue SJ, Isaac RA, Lippert RM, Simes JT y MR Tucker. 1992. Comparison of mehlich-1 and mehlich-3 extractable soil boron with hot-water extractable boron. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 23:1-14.

- Smith FG, Euederin DR, Houk RS, Egan CB y RE Serfass. 1991. Measurement of boron concentration and isotope ratios in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with direct injection nebulization. *Anal. Chim. Acta.* 248:229-234.
- Wimmer AM y EH Goldbach. 1998. A miniaturized curcumin method for determination of boron in solutions and biological samples. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162:15-18.

**CAPÍTULO II. NUTRICIÓN CON BORO EN AGUACATE (*Persea americana* Mill.)
CV. HASS: EFECTO EN CÉLULAS Y TEJIDOS DE RAÍZ, BROTE DEL VÁSTAGO
Y NERVADURA DE HOJAS (Boron Nutrition in cv. Hass Avocado (*Persea americana*
Mill.): Effect on Root, Vegetative Shoot and Vein Cells and Tissues)**

RESUMEN

Aunque la deficiencia de boro (B) es uno de los temas más discrepantes en la nutrición de aguacate debido a que afecta tanto la calidad del fruto como el rendimiento, la información respecto a sus efectos a nivel celular y tisular del contenido de B en el árbol y su impacto en la producción de fruta es escasa actualmente. Dado a que las raíces participan en la absorción y conducción de nutrimentos; la calidad y cantidad de fruta es afectada por las condiciones el desarrollo de los brotes del vástago y del árbol; y la estructura y distribución de las nervaduras centrales de las hojas maduras determinan la distribución de fotosintatos, se desarrollaron los efectos de diferentes niveles de B en solución nutritiva (0.01, 0.21, 0.43, 0.63, 0.83 y 1.53 mg L⁻¹) sobre estas estructuras. Los tratamientos se aplicaron a plantas de aguacate cv. Hass injertadas sobre un patrón mexicano (derivado de un mismo árbol). La concentración de boro total (Bt) en hojas fue de 40.7, 31.4, 71.7, 62.2, 76.8 y 120.1 mg kg⁻¹ con base en materia seca para cada nivel de B, respectivamente. El análisis microscópico en ápices de raíz mostró que: i) la pared celular es rugosa en plantas con deficiencia de B (0.01 mg L⁻¹), ii) el grosor de la cofia y el número de capas celulares que crecen periclinalmente del meristemo hacia la cofia aumenta a medida que incrementa la concentración de B en el medio externo, iii) El nivel alto de B (1.5 mg L⁻¹) propició la reducción del tamaño de las células y iv) las raíces deficientes (0.01 mg L⁻¹ de B en solución nutritiva) poseen células con pared celular irregular y con una distribución desorganizada a nivel tisular, de la misma forma que los síntomas descritos para otras especies. En el brote del vástago se observó que: los tricomas rotos de los primordios foliares son un buen indicador de la deficiencia; mientras que en haces vasculares de la nervadura central de hojas maduras se encontró que: i) el diámetro ecuatorial y longitudinal de las células del xilema no varía con el nivel de B en el medio externo, ii) menor longitud del floema externo al interno en el tratamiento de 0.01 mg L⁻¹ y, iii) deformaciones en el tejido vascular de la nervadura central de hojas maduras que crecieron en 1.5 mg L⁻¹ de B. La deficiencia de B no es visible a nivel tisular en brotes del vástago.

Palabras clave: *Boro, célula, tejido, nutrición, Persea americana* Mill., *hidroponia*

SUMMARY

Although B deficiency seems to be one of the main issues in avocado nutrition affecting both fruit quality and yield, information about its cellular and tissue effects on the tree B status and its impact on fruit production is currently scarce. As roots largely control nutrient absorption and transport; fruit quality and quantity is affected by growth conditions for vegetative shoots and tree growth; and the structure and physiology of the central vein from mature leaves determines the export of photosynthetates, B effects on these tissues was studied at different B levels in nutrient solution (0.01, 0.21, 0.43, 0.63, 0.83 y 1.53 mg L⁻¹). B was applied to avocado plants cv. Hass grafted onto a Mexican rootstock (obtained from the same tree). Plant total boron (Bt) concentration amounted to 40.7, 31.4, 71.7, 62.2, 76.8 and 120.1 mg of B per kg on a dry matter basis, respectively for each B level. Microscopic studies on root tips showed that i) the cellular wall was irregularly shaped in roots of B deficient plants (0.01 mg L⁻¹), ii) the root cap thickness and the number of cellular layers growing periclinaly from the meristem to the root cap increased with increasing B concentrations, and iii) high B levels (1.5 mg L⁻¹ B) resulted in a reduction of the size of young cells, iv) deficient root cells (0.01 mg L⁻¹ B in nutrient solution) possessed irregularly shaped walls and disordered distribution on a tissue level, similar to symptoms described for other species. In vegetative shoots it was to be seen that: i) broken tricoms in the youngest leaves are a good indicator for B deficiency; whereas the central vein of mature leaves exhibited: i) no variation of equatorial and longitudinal diameter of the xylem cells with different B levels, ii) a smaller distance from the external to the internal phloem in the 0.01 mg L⁻¹ B treatment and, iii) deformations of the main vein vascular tissue when grown in 1.5 mg L⁻¹ B. B deficiency could not be noticed on a tissue level in vegetative shoots.

Index words: Boron, cell, tissue, nutrition, Persea americana Mill., hydroponics

2.1. Introducción

México contribuye con el 34 por ciento del aguacate que se produce en el mundo (Salazar-García, 2002). La superficie de este cultivo ha incrementado en el país debido al aumento de la demanda de exportación (ASEEAM, 1998). El estado de Michoacán contribuye con 84 por ciento de la producción nacional del fruto. El manejo del huerto, en consecuencia, exige cada vez mayor atención en todos los aspectos controlables para producir frutos que cumplan con los estándares de calidad en el mercado nacional y mundial.

El rendimiento promedio de aguacate en el estado de Michoacán es de 9.94 t.ha⁻¹. Este, comparado con el rendimiento máximo que puede ser de hasta 20 t.ha⁻¹, y mayor, indica que la nutrición es uno de los temas que más interesa a los técnicos y productores ya que se cuenta con información inconsistente de la respuesta del árbol a la fertilización (Maldonado, 2002). Esta actividad representa actualmente la tercera parte de los costos de producción de aguacate en huertos comerciales (Téliz, 2000).

Las fallas en la nutrición que redundan en la economía de producción básicamente son la disminución de rendimiento y calidad de frutas (Blevins y Lukaszewski, 1998). El manejo racional de la nutrición con B del aguacate es una actividad que ha tenido respuestas erráticas en el estado de Michoacán, no obstante que aproximadamente 30 por ciento de la superficie sufre esta limitante nutrimental (Lovatt, 1999). La misma autora señala que este micronutriente contribuye a la producción de frutos en cuanto a cantidad y alta calidad comercial, debido a que, determina la viabilidad del polen, fertilidad de óvulos, desarrollo de la forma de tubos polínicos, así como también el amarre y forma de los frutos.

La esencialidad del B para las plantas fue probada por Warington en 1923, a partir de entonces, se han investigado muchas respuestas tanto anatómicas como fisiológicas de la planta como resultado de la deficiencia de este micronutriente. Actualmente se sabe que los efectos celulares de la deficiencia de B en general, incluyen reacciones primarias, secundarias y hasta terciarias, dependiendo de la velocidad con la que se presenten en las diferentes estructuras de la planta. La relación entre las respuestas primarias y la expresión visual de los síntomas es mayormente desconocida (Yu *et al.*, 2001). Peor aún, la clasificación de los síntomas de deficiencia en alguna de las categorías anteriores resulta conflictivo debido a que se obtienen resultados opuestos en el mismo tema, por ejemplo, Goldbach (1997) indicó la divergencia en los resultados publicados por varios autores respecto al efecto de la deficiencia de B en la inhibición de la división celular. En cambio, no existe tal controversia al mencionar que el órgano que se afecta a corto plazo (menos de 15 minutos) con la deficiencia de B es la

raíz, particularmente en los ápices (Dell y Huang, 1997; Goldbach *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001).

La raíz de aguacate carece de pelos radicales. Ésta característica parece ser intrínseca del género *Persea* ya que no se han observado estas estructuras en diferentes genotipos de *P. americana* y *P. schiedeana* (Velasco-Cárdenas, 2001, citado por Salazar, 2002). La zona meristemática de la raíz presenta división celular hacia el ápice para formar la cofia o caliptra y hacia la base de la raíz para formar las células que se diferenciarán para formar tejidos funcionales tanto de sostén como de conducción conforme se alejan del meristemo (Salazar, 2002). Los tejidos en diferenciación son los más sensibles a la deficiencia de B, especialmente los de la zona de extensión de la raíz en la que se inhibe el alargamiento y la división celular (Marschner, 1995; Shelp, 1993; Dell y Huang, 1997).

El efecto morfológico de la deficiencia de B reportado en brotes incluye en general la inhibición del crecimiento, quemaduras y necrosis del brote, muerte regresiva, tejido quebradizo, paredes celulares irregulares, grietas y rompimiento de tallos y pecíolos (Goldbach, 1997). Cuando la deficiencia de este nutrimento no se manifiesta morfológicamente en los brotes del vástago, éstos pueden diferenciarse como órganos reproductivos y, dependiendo del nivel de deficiencia, se presenta un retardo o inhibición de la floración, aborto de flores y frutos, inhibición del crecimiento de tubos polínicos, bronceado y deformación de frutos, reducción de tamaño del fruto (Goldbach, 1997).

Huang *et al.* (2001) reportaron el efecto de B en etapa de diferenciación y órganos florales, Lovatt (1999) realizó un estudio en el que reporta resultados erráticos del efecto de la fertilización foliar en amarre de frutos y Behrendt y Zoglauer (1996) describen el efecto de este micronutrimento en la embriogénesis. No obstante, hasta la fecha no existe investigación sistemática referente a la participación del B en la diferenciación de tejidos vasculares: xilema, floema, raíces, tallos u hojas (Dell y Huang, 1997).

Con base en lo anterior, el presente trabajo consistió en estudiar el aspecto morfológico de las raíces, brotes del vástago y nervaduras de hojas maduras en plantas de aguacate cv. Hass, cultivadas en hidroponía con diferentes niveles de B en solución externa.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Material vegetal

Se colectaron semillas de aguacate de un árbol criollo mexicano proveniente de la región de Uruapan, Michoacán. Se seleccionaron semillas uniformes (excluyendo aquellas

grandes, chicas y deformes) y se germinaron en vasos de unicel de 500 mL con agrolita como sustrato. Después de su germinación y hasta que las plantas alcanzaron 2 meses de edad se regaron con agua y en su desarrollo posterior, éstas se regaron durante un año y medio con solución nutritiva (SN) Steiner (1961) completa en cuanto al contenido de macro y micronutrientes. La solución fue diluida 40 % en invierno y 30 % en las demás estaciones del año, debido a que el aguacate no resiste altos contenidos de sales en el medio externo. En este período, las plantas fueron injertadas con varetas de aguacate cv. Hass provenientes de un solo árbol. Se obtuvo un lote homogéneo de plantas de 1.5 años de edad y sin síntomas visuales de deficiencias nutrimentales.

2.2.2. Transplante y sitio experimental

Los árboles injertados de 1.5 años de edad se transplantaron en bolsas de plástico negro de 30 x 60 cm en arena de sílice con una granulometría de 2 a 3 mm de diámetro llenas hasta los 50 cm. El experimento se estableció en un invernadero del Colegio de Postgraduados ubicado en Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Se instaló un sistema de riego por gravedad y se aplicaron 3 riegos de 200 mL cada uno con solución nutritiva Steiner diluida al 30 % por planta diariamente. El sistema de enfriamiento y calefacción permitió mantener la temperatura entre 13 y 32 °C (± 3 °C) de noche y de día, respectivamente.

2.2.3. Diseño de tratamientos

A partir del transplante (1.5 años posteriores a la germinación), las plantas se mantuvieron un año más con la misma SN, variando únicamente el nivel de B de 0.01, 0.21, 0.43, 0.63, 0.83 y 1.53 mg L⁻¹. De esta manera se tuvieron 6 tratamientos con 4 repeticiones cada uno, con lo cual dio un total de 24 unidades experimentales.

2.2.4. Boro total (Bt)

Para determinar Bt se utilizaron las plantas completas (follaje, tallos y raíz) de cada tratamiento. La preparación del material vegetal y las adaptaciones para la determinación de la concentración de B en los extractos de describe en los apartados 1.2.2 y 1.3.1 del Capítulo I.

2.2.5. Técnica de inclusión en parafina

Se colectaron 4 brotes de raíz, 2 brotes del vástago y 2 nervaduras de hojas maduras por unidad experimental en un frasco con solución fijadora FAA (500 mL de etanol absoluto,

50 mL de ácido acético glacial, 100 mL de formaldehído y 350 mL de agua destilada) manteniéndose en ella 24 horas, los tejidos se sacaron de la solución fijadora, se lavaron con agua corriente tres veces en intervalos de 15 minutos cada uno y se envolvieron en malla de tul. Para la infiltración en paraplast las muestras se colocaron en el procesador automático de tejidos marca Tissue-Tek II (C. O. Sakura finetechnical mod. 4640-B), pasando primero por un proceso de deshidratación en diferentes diluciones de alcohol etílico (50, 70, 96 y 100 %), después se transfirieron a xileno- alcohol etílico absoluto (1:1), tres cambios de xileno y 2 en paraplast (Sigma Chemical Co. USA); las muestras se mantuvieron por 3 horas en cada solución. Para la inclusión en paraplast los tejidos se retiraron del procesador automático, se colocaron en moldes de papel conteniendo paraplast caliente y se dejaron enfriar. Los bloques de paraplast (de aproximadamente un cm²) con el tejido, se montaron en bases de madera para fijarlos al microtomo rotatorio marca American Optical Company mod. Spencer 820 y se cortaron a un grosor de 10 µm. Los cortes se colocaron en un baño de flotación con agua caliente (± 70 °C) y grenetina para montarse en portaobjetos dejándose secar por 24 horas.

2.2.6. Tinción de los cortes para microscopía de luz

Para teñir los cortes se usó la tinción diferencial safranina-verde rápido con el siguiente procedimiento: primero se eliminó el paraplast con tres cambios de xileno, se hidrataron con alcohol etílico (100, 96, 70 y 50 %, 3 minutos cada cambio). La tinción con safranina se realizó durante 2 horas. Posteriormente se deshidrataron los cortes en diferentes diluciones de alcohol etílico (50, 70 y 96 %) y se contrastaron con el colorante verde rápido durante 5 segundos, se lavaron con alcohol etílico (96 y 100 %), se hicieron tres cambios de xileno, finalmente se montaron en resina sintética (Johansen, 1940). Las preparaciones se observaron en un Fotomicroscopio modelo III Carl Zeiss con una cámara digital (Pixera Professional) y se tomaron imágenes.

2.2.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) para detectar diferencias estadísticas entre niveles bajo medio y alto de B para cada variable (SAS Institute, 1999). Para la medición y conteo de células, capas celulares y tejidos se utilizó el programa Image Tool versión 3.0 (Wilcox *et al.*, 2002).

2.3. Resultados y discusión

En la Figura 2.1. se puede apreciar la pared celular rugosa en las imágenes A1, A2 y A3 debido a la pérdida de tensión de la pared celular (Goldbach *et al.*, 2001) en raíces de plantas con deficiencia de B (0.01 mg L^{-1} de B en solución nutritiva). Esta característica es evidente en el área de células que rodea al meristemo de la raíz hacia la cofia (A1), en el área de células del meristemo con crecimiento hacia el cilindro central (A2) y en las células cercanas al cilindro central (A3). La rugosidad de la pared celular solamente se presentó en el nivel más bajo de B en solución nutritiva. En cambio, en las raíces con nivel de B óptimo (B1, B2 y B3) y alto (C1, C2 y C3) no se presentaron estas deformaciones en la pared celular. También en las raíces que crecieron en este nivel de B se distinguen las células con paredes celulares lisas y bien definidas debido a que las paredes celulares tienen más del 90 % del B total de la planta (Loomis y Durst, 1992).

La desorganización del tejido celular es otra característica que varió en el tejido que crece del meristemo hacia la cofia (A1, B1 y C1). Nótese la irregularidad de dirección del crecimiento celular (anticlinal, periclinal y oblicuo) y tamaño de las células en el tejido de plantas deficientes (A1), que contrasta de la organización en capas celulares periclinales de raíces que crecieron en el mayor nivel de B en solución nutritiva (C1). Estos tejidos jóvenes presentan este aspecto debido a efectos primarios. Las primeras reacciones a nivel celular que exhibe la planta expuesta a esta deficiencia hasta la fecha son grandemente inexploradas. Sin embargo Yu *et al.* (2001) consideran que el daño ocasionado incluye reacciones fisiológicas que alteran el metabolismo de proteínas del citoesqueleto (tubulina y actina).

Las células jóvenes (procambiales) que darán origen al cilindro central se muestran en las imágenes A3, B3 y C3. La imagen C3 evidencia la desventaja del nivel excesivo en la reducción del crecimiento en estas células que formarán el xilema y el floema. Esta reducción de crecimiento celular se presenta desde los tejidos próximos al meristemo (C2). Se podría decir que estas células presentan los efectos secundarios descritos por Findelee *et al.* (1997), los cuales se manifiestan 20 minutos posteriores a la inducción de la deficiencia de B. Básicamente consisten en un re-endurecimiento de la pared celular, así como también una disminución de la conductividad hidráulica; a nivel apoplasto se incrementa la concentración de Ca^{2+} , posiblemente debido a la disminución de cargas negativas en la pared celular y a nivel de membrana plasmática se presenta una reducción de la actividad de la enzima reductasa en raíces en los primeros 5 minutos posteriores a la inducción de la deficiencia. En

esta etapa también la membrana muestra perforaciones (Cakmak *et al.*, 1995) y se acumulan fenoles (Cakmak *et al.*, 1995; Goldbach, 1997).

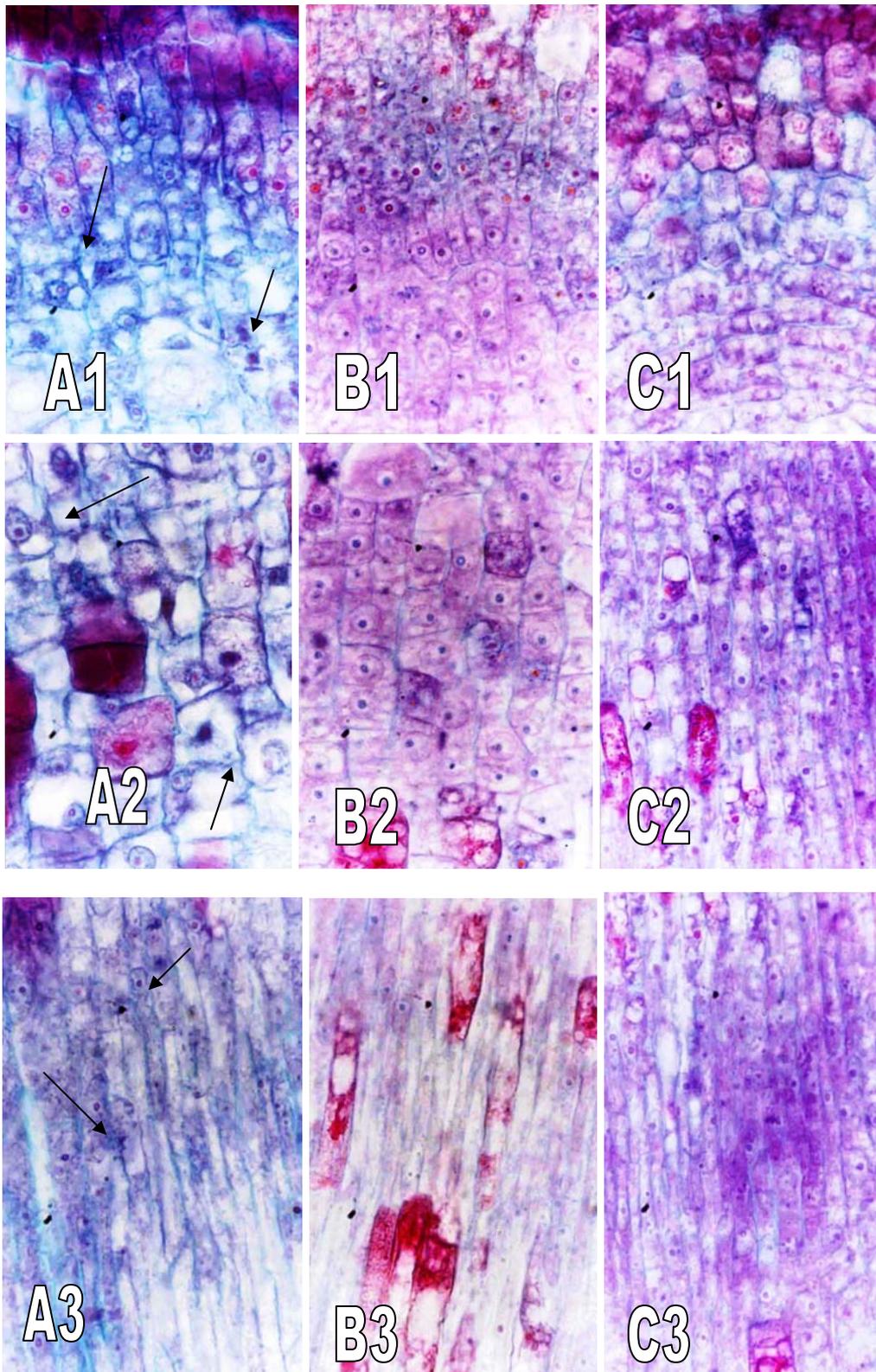


Figura 2.1. Fotonumerografías de cortes histológicos de raíz de aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.) provenientes de plantas que se desarrollaron por un periodo de

un año con el efecto de los tratamientos de B en solución nutritiva de 0.01, 0.63 y 1.53 mg L⁻¹ (de la A a la C de izquierda a derecha, respectivamente en cada fila). La fila 1 muestra células de la cofia, la fila 2 muestra células adyacentes al meristemo que crecen hacia el cilindro central y la fila 3 muestra células diferenciadas en el cilindro central junto al meristemo. Las flechas señalan rugosidad en paredes celulares de raíces deficientes en B. (40 X).

Debido a la dificultad para obtener cortes completos de raíz nutridas con 0.01 mg L⁻¹ de B se infiere que las células que formarán el sistema vascular de las plantas deficientes en B (A3) serán deformes y con paredes celulares irregulares. Otra de las estructuras afectada funcionalmente por esta deficiencia de B es la membrana plasmática. La presente contribución no consideró la observación a este nivel.

Cuadro 2.1. Estadística básica para grosor de cofia y número de capas celulares en el meristemo de raíz de aguacate (*Persea americana* Mill.) cultivadas en tres niveles de B en solución nutritiva (0.01, 0.63 y 1.53 mg L⁻¹).

Parámetro	Media	B en solución nutritiva	Estadística básica
	(μm)	(mg L ⁻¹)	(Tukey, $\alpha \leq 0.05$)
Grosor de cofia	409.28 a	1.5	Pr > F= 0.0006 R ² = 0.81 CV= 14.44 CM= 45.31
	372.26 a	0.63	Media= 313.71 DMS= 124.19
	200.79 b	0.01	
No. de capas celulares del meristemo	11.00 a	1.5	Pr > F= <.0001 R ² = 0.91 CV= 19.02 CM= 1.13
	6.00 b	0.63	Media= 5.94 DMS= 3.10
	1.33 c	0.01	

Letras diferentes a la derecha de la media indican diferencias estadísticas entre tratamientos de B en solución nutritiva (Tukey, $\alpha \leq 0.05$); Pr > F= probabilidad, R²= coeficiente de determinación; CV= coeficiente de variación; CM= cuadrado medio del error y DMS= diferencia mínima significativa.

El grosor de la cofia se incrementó a medida que se aumentó la concentración de B en solución nutritiva dentro del rango de concentración de B utilizado en la presente

contribución (0.01 a 1.5 mg L⁻¹). Los resultados muestran diferencias estadísticas (Cuadro 2.1) del tratamiento deficiente y los niveles óptimo y excesivo con medias de 200.8, 372.3 y 409.3 μm , respectivamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

El número de capas celulares que crecen periclinalmente del meristemo hacia la cofia aumenta a medida que incrementa la concentración de B (Cuadro 2.1). El resultado del conteo de capas celulares fue de 1.3, 6 y 11 capas para los niveles deficiente, óptimo y alto, respectivamente con diferencias estadísticas para los 3 niveles (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). Sin embargo se ha observado que en caso de deficiencia severa, desaparece la caliptra, el centro quiescente y la protodermis, además, cesa el crecimiento celular conduciendo a la muerte de los ápices de raíz (Dell y Huang, 1997).

Tanto el grosor de cofia, como el número de capas celulares que crecen periclinalmente del meristemo hacia la cofia manifiestan efectos terciarios de la deficiencia de B a nivel morfológico, estos son resumidos por Goldbach (1997), a nivel de raíz se presenta una inhibición de su crecimiento en un periodo de 3 a 6 horas, engrosamiento de ésta adquiriendo un aspecto parecido al coral, se desarrollan grietas, se presenta un oscurecimiento de tejidos del ápice de raíz, además de rompimiento de tejidos, paredes celulares irregulares e inhibición del crecimiento apical.

Marschner *et al.* (1996), publicaron que debido a que los nutrientes absorbidos vía raíz son transportados, como regla general, vía xilema hacia los brotes, y los fotoasimilados son transportados vía floema hacia la raíz, también se afecta la absorción de algunos nutrientes vía raíz debido a que el crecimiento de este órgano se inhibe en condiciones de deficiencia de nutrientes de baja movilidad como son el calcio y el boro. Con base en los resultados de la presente contribución, deficiencia de B también influyeron negativamente en la longitud del floema externo al floema interno en las nervaduras de hojas maduras, lo cual podría explicar un efecto negativo en el transporte de nutrientes y de fotoasimilados en plantas que sufren esta limitante (Cuadro 2.2 y Figura 2.2).

En la Figura 2.2 se muestra los ápices del vástago y la nervadura central de hojas maduras para los niveles de 0.01 y 1.53 mg L⁻¹ de B en solución nutritiva. La concentración de B total en la planta fue de 40.7 y 120.1 mg kg⁻¹ respectivamente, con base en materia seca, lo que prueba que el efecto celular en brotes, nervadura central y ápice de raíz se debe a los tratamientos de nutrición vía raíz. La deformación del floema externo al floema interno en la nervadura central de hojas maduras deberá ser evaluada a nivel celular para evidenciar las implicaciones funcionales de esta característica.

El brote del vástago es una estructura sensible a la deficiencia de B debido a que está en continuo crecimiento y, por consiguiente, demanda este nutrimento constantemente para su desarrollo. La forma del domo superior del promeristemo no presentó diferencias estadísticas

Cuadro 2.2. Estadística básica para brote del vástago y nervadura central de hojas maduras de aguacate (*Persea americana* Mill.) cultivadas en seis niveles de B en solución nutritiva (0.01, 0.21, 0.43, 0.63, 0.83 y 1.53 mg L⁻¹).

Parámetro	B en solución nutritiva		Estadística básica (Tukey, $\alpha \leq 0.05$)
	Media (μm)	(mg L ⁻¹)	
Grosor de promeristemo (brote del vástago)	363.82 a	0.83	Pr > F= <.0001
	124.39 b	0.01	R ² = 0.98
	122.34 b	1.53	CV= 9.92
	110.87 cb	0.43	CM= 14.88
	97.78 cb	0.63	Media= 149.98
	80.70 c	0.21	DMS= 40.78
Longitud del floema externo al floema interno (nervadura central de hojas maduras)	604.95 a	0.63	Pr > F= 0.0010
	567.67 a	0.43	R ² = 0.79
	552.54 a	1.53	CV= 7.80
	537.20 a	0.83	CM= 41.05
	494.71 ba	0.21	Media= 526.60
	402.51 b	0.01	DMS= 112.51
Diámetro ecuatorial de células del xilema (nervadura central de hojas maduras)	36.03 a	1.53	Pr > F= 0.158
	34.56 a	0.43	R ² = 0.45
	29.86 a	0.63	CV= 12.44
	29.70 a	0.01	CM= 3.90
	29.35 a	0.21	Media= 31.33
	28.46 a	0.83	DMS= 10.68
Diámetro longitudinal de células del xilema (nervadura central de hojas maduras)	44.66 a	1.53	Pr > F= 0.086
	44.22 a	0.83	R ² = 0.51
	43.87 a	0.21	CV= 9.75
	43.15 a	0.63	CM= 4.12
	43.08 a	0.43	Media= 42.27
	34.63 a	0.01	DMS= 11.30

Letras diferentes a la derecha de la media indican diferencias estadísticas entre tratamientos de B en solución nutritiva (Tukey, $\alpha \leq 0.05$); Pr > F= probabilidad, R²= coeficiente de determinación; CV= coeficiente de variación; CM= cuadrado medio del error y DMS= diferencia mínima significativa.

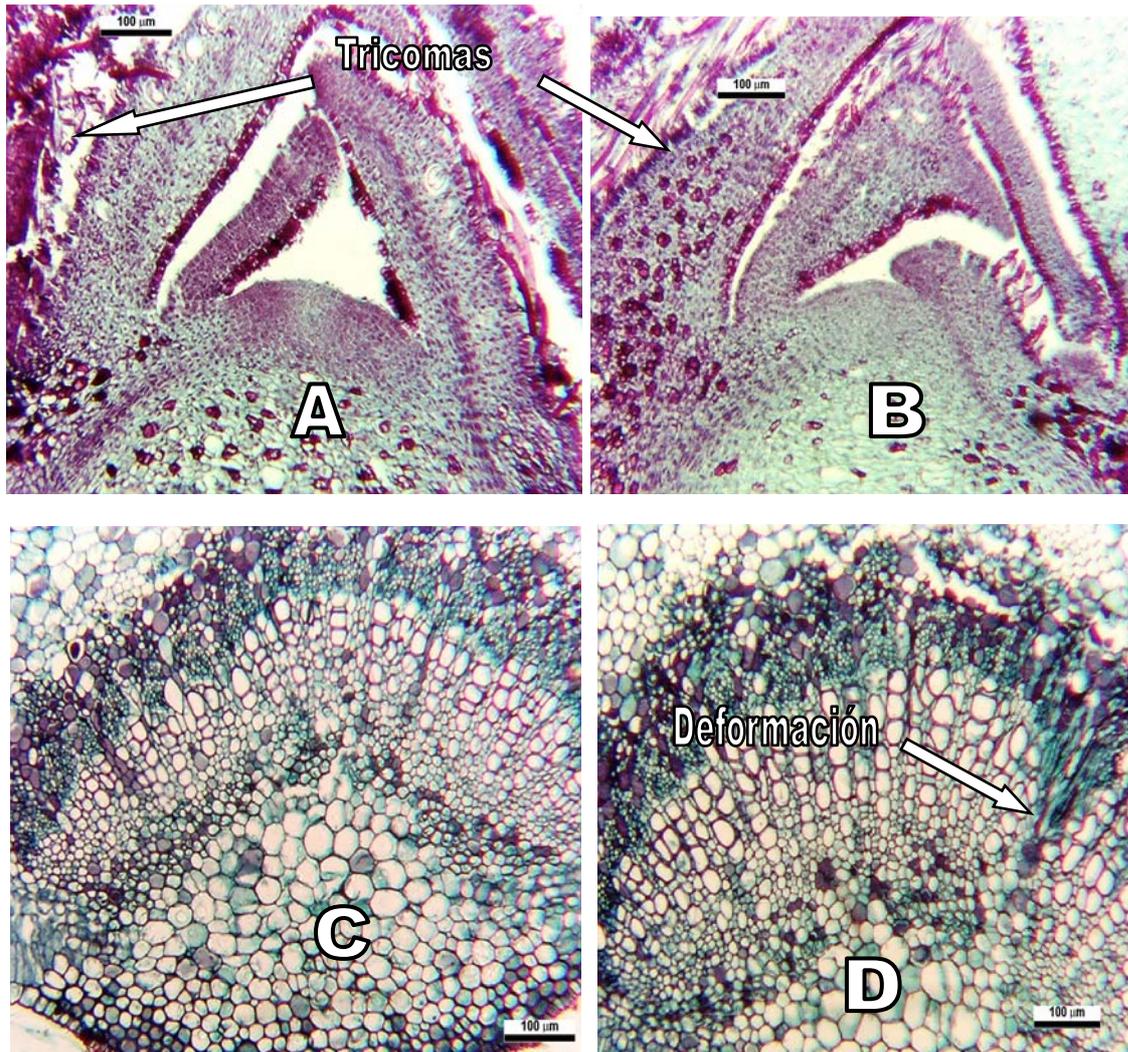


Figura 2.2. Cortes histológicos de brotes y nervadura central de hoja de aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.) provenientes de plantas que crecieron un año en 0.01 (A y C) y 1.53 (B y D) mg L⁻¹ de B en solución nutritiva. A y B brotes del vástago; C y D haces vasculares centrales de hojas maduras; la barra de escala (100 µm); la flecha en la imagen D señala una “deformación” del floema externo y el xilema.

significativas entre niveles de B en solución nutritiva (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). En cambio el grosor del promeristemo presentó diferencias estadísticas significativas entre niveles de B en solución nutritiva pero sin orden que pudiera atribuirse al nivel de este nutriente en el medio externo (Cuadro 2.2). Lo anterior evidenció que los brotes del vástago no muestran anatómicamente la deficiencia o el exceso de B. En cambio, la única característica anatómica evidente en los niveles deficientes de este nutriente (menor a 0.43 mg L⁻¹ B en solución nutritiva) es que los tricomas se rompieron al hacerse el corte en el microtomo comparados contra los de 0.63 a 1.5 mg L⁻¹ (Figura 2.2, B) en las que se aprecian completas estas estructuras.

2.4. Conclusiones

La deficiencia de B demuestra alteraciones morfológicas microscópicas en plantas cultivadas con 0.01 mg L^{-1} B en solución nutritiva. Las células de ápice de raíz presentan pared celular rugosa.

La deficiencia severa se manifiesta de forma evidente en plantas que crecieron un año en el tratamiento con 0.01 mg L^{-1} B en solución nutritiva.

El grosor de la cofia y el número de capas celulares que crecen periclinalmente del meristemo hacia la cofia incrementa conforme aumenta la concentración de B en solución nutritiva, en niveles que van de 0.01 a 1.5 mg L^{-1} de B.

El nivel de 1.5 mg L^{-1} de B en solución nutritiva propició el desarrollo de plantas con síntomas de exceso de B, condición que se manifestó mediante la reducción del diámetro de los vasos del xilema sin llegar a la muerte de los ápices de raíz, como sucede en plantas con síntomas de toxicidad.

Los brotes primarios del vástago no explican la deficiencia de B a nivel tisular.

Los tricomas de los primordios foliares son un indicador sensible de la deficiencia de B en el brote principal del vástago.

Las células del xilema en la nervadura central de hojas maduras tienen un diámetro ecuatorial y longitudinal que no varía estadísticamente con diferentes niveles de B en solución nutritiva. En cambio, la longitud del floema externo al floema interno es menor en el tratamiento cultivado con 0.01 mg L^{-1} B en solución nutritiva.

Los haces vasculares de hojas maduras que crecieron con 1.5 mg L^{-1} B en solución nutritiva presentan deformaciones que van del floema externo hacia el floema interno.

2.5. Literatura citada

- ASEEAM. 1998. El aguacate mexicano: producción y destino. Asociación de Empacadores y Exportadores de Aguacate de Michoacán. Uruapan, Michoacán. México. 43 p.
- Behrendt U. y K. Zoglauer. 1996. Boron controls suspensor development in embryogenic cultures of *Larix decidua*. *Physiol. Plant.* 97: 321-326.
- Blevins G.D. y M.K. Lukaszewski. 1998. Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 49:481-500.

- Cakmak I. Kurz H. y H. Marschner. 1995. Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. *Physiol. Plant.* 95:11-18.
- Dell B. y L. Huang. 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil.* 193:103-120.
- Findekle P., Wimmer M. y H. Goldbach. 1997. Early effects of boron deficiency on physical cell wall parameters, hydraulic conductivity and plasmalemma-bound reductase activities in young *C. pepo* and *V. faba* roots. In: *Boron in Soils and Plants*. R.W. Bell and B. Rerkasem eds. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 221-227 p.
- Goldbach H.E. 1997. A critical review on current hypotheses concerning the role of boron in higher plants: suggestions for further research and methodological requirements. *J. Trace and Microprobe Techn.* 15: 51-91.
- Goldbach H.E., Yu Q., Wingender R., Schultz M., Wimmer M. Findekle P. y F. Baluška. 2001. Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164:173-181.
- Huang L., Dell B. y R.W. Bell. 2001. Seasonal conditions modify pollen viability responses to B deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Wilgoyne). In: Goldbach E.H., Rerkasem B., Wimmer A.M., Brown H.P. Thellier M. y W.R. Bell. *Boron in plant and animal nutrition*. Luwer Academic/ Plenum Publishers. New York. p.137-142.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. Mc. Graw Hill. EUA. 523 p.
- Lovatt C. J. 1999. Management of foliar fertilization. *Terra.* 17:257-264.
- Loomis W.D. y Durst R.W. 1992. Chemistry and biology of boron. *BioFactors* 3:229-239.
- Maldonado T. R. 2002. Diagnóstico nutrimental para la producción de aguacate Hass (Aguacatl). Ed. Fundación Produce de Michoacán A.C. México. 74 p.
- Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd ed. Academic Press. London. 885 p.
- Marschner H., Kirkby E.A. y I. Cakmak. 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J. of Exp. Bot.* 47:1255-1263.
- Salazar-García S. 2002. *Nutrición del aguacate, principios y aplicaciones*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias e Instituto de la Potasa y el Fósforo A.C. México. Ed. INPOFOS A.C. 165 p.
- SAS Institute. 1999. *SAS User's Guide*. Ver. 8.0 SAS Institute Inc. Cary NC. 595 p.

- Shelp B.J. 1993. Physiology and biochemistry of boron in plants. In Boron and its role in crop production. Ed. U.C. Gupta. CRC Press, Boca Raton, FL. EUA. 53-85 p.
- Steiner A.A. 1961. A method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant and Soil. 15:134-154.
- Téliz O. D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa. México. 219 p.
- Warrington K. 1923. The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. Ann. Bot. 37: 629-6 72.
- Wilcox, D., B. Dove, D. McDavid & D. Greer. 2002. UTHSCSA Image Tool for Windows ver. 3.0. The University of Texas Health Science Center in San Antonio. U.S.A.
- Yu Q., Wingender R., Schultz M., Baluška F., y H. Goldbach. 2001. Short-term boron deprivation induces increased levels of cytoskeletal proteins in *Arabidopsis* roots. Plant Biol. 3:335-340.

CAPÍTULO III. FACTOR DE CONCENTRACIÓN DE BORO EN AGUACATE CV. HASS: INDICADOR DEL NIVEL CRÍTICO (B Concentration Factor In Avocado Leaves: Critical Level Indicator)

RESUMEN

La deficiencia de boro (B) es una limitante para la producción de aguacate, ya que afecta tanto la calidad de fruta como el rendimiento, la información respecto al diagnóstico del estado del B en el árbol y de su impacto en la producción de fruta es, a la fecha, escasamente conocido. Con base en lo anterior, se inició un estudio para identificar los niveles críticos de B soluble y total extractable. Se aplicaron 6 niveles de B en solución nutritiva en un rango entre 0.01 y 1.5 mg L⁻¹ para plantas de aguacate cv. Hass injertadas sobre un patrón mexicano (derivado de un mismo árbol). Se determinó boro total (Bt) y boro soluble extractable (Bs) en las primeras hojas maduras (6^a y 7^a a partir del ápice). Los resultados mostraron que i) el factor de concentración basado en B soluble de las hojas 6^a y 7^a es un buen indicador del estado de este nutrimento en la planta, ii) el nivel crítico es de 0.63 mg L⁻¹ para plantas cultivadas en solución nutritiva, iii) los niveles de Bs para un intervalo adecuado de suplemento de B van de 0.52 a 0.72 mg kg⁻¹ de MF en las primeras hojas adultas cuando se extrae en una relación de 1:10 (peso/volumen), y iv) el suplemento adecuado de B en solución nutritiva oscila entre 0.43 y 0.83 mg L⁻¹.

Palabras clave: B soluble, B total, B extractable, Persea americana Mill., hidroponia

SUMMARY

Although B deficiency is limiting for avocado production, affecting both fruit quality and yield, information about diagnosing the B status of the tree and its impact in fruit production is yet scanty. Thus, a study was initiated to identify critical B levels for total and extractable B. Six B levels were applied ranging from 0.01 to 1.5 mg L⁻¹ to avocado plants cv. Hass grafted onto a Mexican rootstock (derived from the same tree). Total (Bt) and water extractable B (Bs) were tested on the first adult leaves (6th and 7th from top). Results showed that i) Bs concentration in the 6th and 7th avocado leaves is a good indicator for the B status of the plant, ii) the critical level for plants grown in nutrient solution was 0.63 mg L⁻¹, iii) Bs levels for adequate B supply ranged between 0.52 to 0.72 mg kg⁻¹ MF in the first adult leaves when extracted at an extraction ratio of 1:10 (w/v), and iv) adequate B supply in nutrient solution ranged between 0.43 and 0.83 mg L⁻¹.

Index words: soluble B, total B, extractable B, Persea americana Mill., hydroponics

3.1. Introducción

México contribuye con 34 % del aguacate que se produce en el mundo (Salazar-García, 2002). La superficie del cultivo de aguacate se ha incrementado en el país debido al aumento de su demanda para la exportación (ASEEAM, 1998). El estado de Michoacán contribuye con 84 % de la producción nacional del fruto. El manejo del huerto, en consecuencia, exige cada vez mayor atención en todos los aspectos controlables para producir frutos que cumplan con los estándares de calidad en el mercado nacional y mundial.

La nutrición es uno de los temas que más interesa a los técnicos y productores ya que se cuenta con información poco confiable de la respuesta del árbol a la fertilización. Esta actividad representa actualmente la tercera parte de los costos de producción de aguacate en huertos comerciales (Téliz, 2000).

El manejo racional de la nutrición del aguacate con B es una actividad que ha tenido poco interés en el estado de Michoacán, no obstante que aproximadamente 30 % de la superficie sufre esta limitante nutrimental (Lovatt, 1999). La misma autora señala que este micronutriente contribuye a la producción de frutos en cuanto a cantidad y alta calidad comercial debido a que determina la viabilidad del polen, fertilidad de óvulos, desarrollo de la forma de tubos polínicos, así como también el amarre y forma de los frutos.

Debido al manejo inadecuado o al desconocimiento de la influencia de los factores climáticos y del suelo en la absorción de B vía radical, la fertilización foliar se realiza como una práctica preventiva habitual de la deficiencia en huertos comerciales. Lo anterior concentra gran parte de la atención del manejo del B en aguacate, que aunque es un micronutriente, tiene una macrofunción en la fisiología del cultivo.

Los árboles de aguacate han sido considerados sensibles, tanto al exceso como a la deficiencia de B. La medición del contenido total de B se realiza usualmente mediante una digestión seca del material vegetal (Johnson y Ulrich, 1959) proveniente de hojas maduras completas (Téliz, 2000; Goodall *et al.*, 1981; Maldonado, 2002). Sin embargo, este parámetro en campo no siempre refleja el estado nutrimental real del árbol, ya que se pueden encontrar niveles altos de B total (Bt) en árboles que muestran deficiencia visible de este micronutriente.

El B soluble (Bs) comprende el B libre en forma de H_3BO_3 y el que está ligeramente complejoado. Shuxiang *et al.* (2002) reportaron que la concentración de Bs es el mejor indicador para evaluar el nivel disponible de este nutriente para el desarrollo de la planta.

Este parámetro evidencia en minutos la deficiencia inducida en tejido en etapa de diferenciación (Goldbach *et al.*, 2000).

Gassert *et al.* (2002) evidenciaron un mecanismo de absorción activa en las plantas que actúa a niveles bajos de concentración de B. Este mecanismo se detecta cuantificando la concentración de B en el extracto celular fresco dividido entre la concentración de B en el medio exterior y sirve para caracterizar la absorción de B en plantas superiores. Estos autores concluyeron que el factor de concentración de B (FCB) varía entre especies y cultivares. Además, explicaron las diferencias de absorción de B proveniente de la solución nutritiva (SN) por la planta completa mediante un FCB. Con base en experimentos realizados con avena y trigo (Nable *et al.*, 1997), girasol (Pfeffer *et al.*, 1999), *Desmodium ovalifolium* y *Arabidopsis thaliana* (Gassert *et al.*, 2002), el valor del FCB puede ser ≤ 1 .

El transporte pasivo a través de la membrana plasmática puede explicarse por simple difusión a través de su bicapa lipídica y por transporte mediante canales, dependiendo de la composición de las capas lipídicas y de la composición de las proteínas que contiene. En cambio, la permeabilidad restringida del ácido bórico puede explicar los FCB menores que 1 y se manifiesta cuando la concentración del medio externo es alta para la especie o variedad (Brown *et al.*, 2002; Dannel *et al.*, 2002).

Stangoulis *et al.* (2001) describieron el transporte bifásico de ácido bórico a través de membranas de *Chara corallina*, dependiendo de la concentración del medio externo. Este es facilitado (dependiente de energía o activo) y se satura a 5 μM , y después de esto, la penetración se lleva a cabo por simple difusión con una fase lineal. Este mecanismo también puede explicar las enormes diferencias de absorción de B entre especies y genotipos (Bellaloui y Brown, 1998).

La necesidad de encontrar un “nivel crítico” para este frutal nos obliga primero a definir ¿qué es un nivel crítico? Para algunos nutrimentos los límites entre suficiencia y deficiencia son estrechos y, peor aún, ocurren traslapes debido a que los requerimientos varían entre especies y cultivares (Gupta, 1993) y según el estado fisiológico de la planta. Para algunos investigadores el nivel crítico es aquel que se necesita para obtener 90 % del máximo rendimiento (Davis *et al.*, 1978; Kluge y Podlesak, 1985). Otros autores consideran el nivel crítico como el rango bajo o marginal que demerita de 5 a 10 % el rendimiento máximo (Sánchez *et al.*, 2007). Por otro lado, existen cultivos en los que la deficiencia de B no demerita la cantidad, sino la calidad de cosecha (Téliz, 2000; Maldonado, 2002). Por tales motivos se requiere definir el nivel crítico de B para cada cultivo y considerar las condiciones

climáticas y edafológicas que influirán en su desarrollo. En este trabajo, el “nivel crítico” es la máxima concentración justamente suficiente para evadir reacciones de deficiencia.

Con base en la problemática anterior, el presente trabajo pretende proponer el FCB cuantificado en las 6^a y 7^a hojas (usualmente muestreadas en campo) para definir el nivel crítico de B en aguacate cv. Hass.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material Vegetal

Se colectaron semillas de aguacate de un árbol criollo mexicano proveniente de la región productora de aguacate en el municipio de Uruapan, Michoacán. Se seleccionaron semillas uniformes (excluyendo aquellas grandes, chicas y deformes) y éstas se germinaron en agrolita. Posteriormente, las plantas se injertaron con varetas provenientes de un solo árbol de aguacate cv. Hass. Con esto se obtuvo un lote homogéneo de plantas criollas injertadas de 1.5 años de edad con las características convencionales a nivel comercial. Después de su germinación y hasta que éstas alcanzaron 2 meses de edad se regaron con agua y en su desarrollo posterior, con solución nutritiva (SN) Steiner (1961) diluida 30 %. De esta manera se obtuvieron plantas sanas y sin síntomas de deficiencias nutrimentales.

3.2.2. Transplante y Sitio Experimental

Los árboles injertados de 1.5 años de edad se transplantaron en bolsas de plástico negro de 30 x 60 cm en arena de sílice con una granulometría de 2 a 3 mm de diámetro llenas hasta los 50 cm. El experimento se estableció en un invernadero del Colegio de Postgraduados ubicado en Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Se instaló un sistema de riego por goteo con 3 riegos de 200 mL de solución nutritiva Steiner diluida al 30 % por planta diariamente. El sistema de enfriamiento y calefacción consiguió un control de temperatura entre 13 y 32 °C (± 3 °C) de noche y de día, respectivamente.

3.2.3. Diseño de Tratamientos

Las plantas de aguacate se regaron durante un año y medio con SN Steiner (1961) diluida 40 % en invierno y 30 % en las demás estaciones del año. A partir del transplante, las plantas se mantuvieron un año más con la misma SN, variando únicamente el nivel de B de 0.01, 0.21, 0.43, 0.63, 0.83 y 1.53 mg L⁻¹, los cuales en adelante referiremos como tratamientos del 1 al 6, respectivamente. Al final del experimento los árboles tenían 2.5 años.

3.2.4. Boro Soluble (Bs)

El Bs se obtuvo de las hojas provenientes de la 6ª posición descendente de cada brote. Estas son hojas con un desarrollo completo, las cuales se lavaron (en un proceso de 7 enjuagues de 3 segundos cada uno: tallando ligeramente con las manos utilizando agua potable y los 2 siguientes solamente mediante enjuagues, 3 veces más con agua destilada y, para finalizar, un lavado con agua desionizada). Se cortó con perforadora 1 g de círculos regulares de 0.6 cm de diámetro de material vegetal fresco proveniente de la parte intervenal de la lámina. La solución extractora se preparó con 7 mL L⁻¹ de Extrán (detergente) aforando a 1 L con agua desionizada. El extracto se obtuvo colocando 1g de material vegetal en 10 mL de solución extractora (1:10 peso/volumen), se agitó 1 minuto cada 30 minutos y finalmente, se filtró a las 2 h (Goldbach, 2005. Comunicación personal). La determinación de la concentración de B en el extracto se realizó utilizando el método propuesto por Johnson y Ulrich (1959).

3.2.5. Boro Total (Bt)

Para la determinación de Bs, para determinar Bt se utilizaron las hojas provenientes de la 6ª y 7ª posición descendente de cada brote. Estas fueron hojas con un desarrollo completo, incluyendo su pecíolo. La preparación de las muestras incluyó el proceso de lavado descrito anteriormente. Posteriormente se secaron en estufa con circulación forzada de aire a 60 °C por 3 días y se molieron. Después se realizó la extracción mediante una digestión seca con hidróxido de calcio en mufla a 350 °C por 6 horas. La ceniza se solubilizó con 10 mL de HCl al 10 %. Una vez obtenido el extracto, se utilizó el método propuesto por Johnson y Ulrich (1959) para la determinación de concentración de B.

3.2.6. Cálculo del Factor de Concentración de B (FCB)

El FCB se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$FCB = \left[\frac{[B_{vegetal}]}{[BSN]} \right], \text{ donde:}$$

[*Bvegetal*] = Concentración de B en material vegetal fresco para Bs o seco para Bt y [*BSN*] = Concentración de B en solución nutritiva.

Para determinar el FCB en esta investigación utilizamos la concentración de las hojas 6 y 7 que son las convencionalmente muestreadas en campo para evaluación nutrimental en aguacate, ya que por estar bien desarrolladas, son fuente de nutrimentos para los brotes vegetativos y florales, así como también para los frutos.

3.2.7. Análisis Estadístico

Las pruebas estadísticas se realizaron mediante un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.01$) (SAS Institute, 1999) considerando 6 niveles de concentración de BSN y 2 árboles como unidad experimental, tanto para Bs como para Bt.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. B soluble (Bs) y B total (Bt)

El Bs está constituido por el B libre más el ligeramente complejoado con polioles y se localiza en el apoplasto de material vegetal fresco. Estas dos formas de B reflejan la cantidad real disponible para la planta (Shuxiang *et al.*, 2002). Mientras que, el B que se cuantifica como Bt es el que constituye estructuralmente a la planta incluyendo la fracción del Bs.

Cuadro 3.1. Contenido de B soluble (Bs) y total (Bt) en la 6ª y 7ª hojas de aguacate cv. Hass.

Tratamientos	B soluble	B total
mg L ⁻¹ B	mg Kg ⁻¹ MF	mg Kg ⁻¹ MS
0.01	0.65a	40.70a
0.21	0.85a	31.35a
0.43	0.58a	71.70a
0.63	0.52a	62.15a
0.83	0.72a	76.75a
1.53	0.46a	120.10a
Pr > F	0.69	0.48
Media	0.63	67.13
C.V.	51.84	58.62
R ²	0.44	0.56
DMS	1.39	167.87

MS= materia seca; MF= materia fresca; Pr > F= probabilidad; C.V.= coeficiente de variación; DMS= diferencia mínima significativa. Letras iguales a la derecha de los valores significa que no hay diferencia estadística ($p \leq 0.01$).

En los tratamientos que se mantuvieron un año con diferentes niveles de BSN, el Bs (Cuadro 3.1) fue aproximadamente 100 veces menor que el Bt. En ambas formas de B no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.

Brown y Hu (1994) reportaron que las concentraciones de B en el citoplasma no pueden ser reguladas únicamente mediante un proceso de absorción pasiva. Este tipo de absorción se hace evidente en la Anexo 3.1, en la que se muestra una tendencia clara de incremento en la concentración de Bt en las hojas de los árboles que crecieron con niveles mayores de BSN. En lo que se refiere a la concentración de Bs en hojas (Anexo 3.1 y Cuadro 3.1), el incremento de Bs en los tratamientos a los que se les proporcionó menor cantidad de BSN sugieren un mecanismo activo de absorción de B (Pfeffer *et al.*, 1999). Dannel *et al.* (2001) reportaron este mecanismo de mayor concentración de B en plantas de girasol, el cual es promovido por un “transportador de alta afinidad por el B” que se mantiene activo a baja concentración de este micronutriente en el medio externo.

La traslocación primaria B ocurre vía difusión pasiva a través de la bicapa lipídica y/o mediante transporte facilitado a través de las proteínas incrustadas la membrana. La vía dependiente de energía se induce cuando se aporta un bajo suplemento de B a través de un sistema de absorción de alta afinidad por el B. Esta última establece un gradiente de concentración entre el simplasma y el medio externo. Cuando se aporta B en concentración alta se retiene una concentración significativa se retiene en el xilema mediante un proceso pasivo (Dannel, 2002).

Este mecanismo puede ser desactivado después de aplicar altas concentraciones de B a la planta. Takano *et al.* (2002) reportaron una proteína denominada BOR1 en *Arabidopsis thaliana*, esencial para el transporte de B vía xilema, la cual se activa a bajas concentraciones y protege los brotes de la deficiencia de este nutriente. Takano *et al.* (2005) describieron que la dinámica de producción de estos transportadores es controlada por el nivel de B en el medio externo: bajo condiciones de deficiencia de B, el BOR1-GFP se localiza en la membrana plasmática; en cambio, después de la aplicación de B al medio externo, se observó a los transportadores como estructuras en el citoplasma antes de su degradación. Esta endocitosis posterior a la corrección de la deficiencia evita la acumulación de niveles tóxicos en los brotes.

El Cuadro 3.1 y la Anexo 3.1 muestran un incremento en concentración de Bt conforme se aumentó la concentración de BSN. Aún cuando esta tendencia es marcada, no explica el vigor, tamaño de planta, color, número de brotes, número de hojas ni algún otro parámetro relacionado con la salud de los árboles ya que los tratamientos con mayor

concentración de BSN presentaron síntomas de toxicidad. Opuestamente, Goldbach *et al.* (2000) y Shuxiang *et al.* (2002) afirman que el Bs es el mejor indicador del estado nutrimental de B en la planta. Para el caso de aguacate cv. Hass, la tendencia tiene una pendiente negativa (Anexo 3.2) y el incremento de FCB soluble a baja concentración indica la entrada del mecanismo de absorción activa a baja concentración (Anexo 3.3). Con base en estos resultados, es necesario tomar con ciertas reservas el hecho de considerar el Bt como único dato para evaluar el nivel crítico de B.

Tanto los resultados del análisis de Bs como los de Bt brindan únicamente resultados de concentraciones aritméticamente diferentes en cada uno de los 6 niveles de BSN. Este problema es común en campo. Los análisis de laboratorio pueden ser confusos al reportar un nivel de B suficiente tanto en suelo como en planta en árboles que muestran deficiencia visual característica o viceversa.

Para definir cuál es la concentración óptima de BSN o en tejido vegetal de las hojas 6 y 7 (convencionalmente muestreadas en evaluaciones de campo), se requiere establecer un criterio práctico que englobe aspectos sencillos a considerar para la valoración de un nivel crítico en aguacate cv. Hass, como el que se propone en la presente contribución.

Factor de Concentración de B (FCB)

En el Cuadro 3.2 se muestran los valores del factor de concentración de B (FCB), el cual se obtuvo al dividir la concentración de Bs o Bt en material vegetal entre la concentración de B en la solución nutritiva (BSN). De esta forma se obtuvo un FCB que, cuando es > 1 , indica que la planta está concentrando en sus tejidos más B del que se le aportó vía raíz (Gassert *et al.*, 2002).

En las plantas que estuvieron sometidas a la inducción de la deficiencia mediante la aplicación de diferentes niveles de B en la SN por un año, el nivel crítico se alcanzó en la solución con 0.63 mg L^{-1} B. En la Anexo 3.3 se observa la elevación de línea de tendencia en los niveles con menor concentración de B en SN. Este nivel es justamente el mínimo necesario para evitar la intervención del supuesto mecanismo de absorción activa que además, a juzgar por las características de los árboles de este tratamiento, representa una dosis mínima suficiente para el adecuado crecimiento y salud de la planta. Esta elevación la muestra la línea de tendencia del FCB total en todos los niveles menores a 1.5 (Anexo 3.4) con lo que queda en evidencia su falta de sensibilidad para detectar el nivel crítico de B.

Con base en los resultados anteriores, el FCB soluble resulta ser un índice sensible para detectar tanto deficiencia como suficiencia de B en aguacate cv. Hass. No se recomienda extrapolar estos resultados a otros géneros o especies ya que la movilidad el B varía dependiendo de la producción de polioles de cada género y especie (Brown y Hu, 1998).

Cuadro 3.2. Factor de Concentración de B soluble (FCBs) y total (FCBt) en hojas de aguacate cv. Hass.

Tratamientos	FCBs	FCBt
mg L ⁻¹		
0.01	65.4	4070.0
0.21	4.0	149.3
0.43	1.4	166.7
0.63	0.8	98.7
0.83	0.9	92.5
1.53	0.3	78.5

FCBt= factor de concentración de B total; FCBs= factor de concentración de B soluble.

El FCBt fue aproximadamente 100 veces mayor que el obtenido con los datos de Bs. Con base en los resultados obtenidos del FCBs, el nivel crítico de BSN se definió a una concentración de 0.63 mg L⁻¹ para aguacate cv. Hass. Además, los árboles que crecieron en dicha solución nutritiva, tuvieron una concentración de Bs y Bt en hojas muestreables de 0.52 mg de B kg⁻¹ MF y 62.15 mg de B kg⁻¹ MS, respectivamente.

3.4. Conclusiones

La concentración de B soluble en hojas maduras que crecieron sin síntomas visuales de deficiencia de B osciló entre un rango de 0.52 a 0.72 mg kg⁻¹ MF y el de B total de 62.15 a 76.75 mg kg⁻¹ MS.

Existe un rango estrecho entre los síntomas visuales de deficiencia o de exceso definido por la concentración de B en solución nutritiva suministrada constantemente al aguacate cv Hass. Este se definió entre 0.43 y 0.83 mg L⁻¹ de boro, debido a que los tratamientos con una concentración menor presentaron síntomas visibles de deficiencia y los árboles con mayor concentración, mostraron síntomas de toxicidad.

El nivel crítico de B para plantas de aguacate cv. Hass fue de 0.63 mg L⁻¹ B.

El factor de concentración de B soluble extraído a partir de material vegetal fresco (FCB soluble), resulta ser sensible para detectar tanto deficiencia como suficiencia de este nutrimento en aguacate cv. Hass.

3.5. Literatura citada

- ASEEAM. 1998. El aguacate mexicano: producción y destino. Asociación de Empacadores y Exportadores de Aguacate de Michoacán. Uruapan, Michoacán. México. 43 p.
- Bellaloui N y PH Brown. 1998. Cultivar differences in boron uptake and distribution in celery (*Apium graveolens*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Soil*. 198:153-158.
- Brown PH, Bellaloui N, Wimmer MA, Bassil ES, Ruiz J, Hu H, Pfeiffer H, Dannel F y V Roemheld. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biology*. 4:205-223.
- Brown HP y H Hu. 1994. Boron uptake by sunflower, squash and cultured tobacco cells. *Physiol. Plant*. 91: 435-441.
- Brown HP y H Hu. 1998. Phloem boron mobility in diverse plant species. *Botanica Acta*. 111(4):331-335.
- Dannel F. 2002. Update on boron in higher plants: Uptake, primary translocation and compartmentation. *Plant Biology*. 4: 193-204.
- Dannel F, Pfeiffer H, Walch-Liu P y V Römheld. 2001. Characteristics of boron uptake in roots of sunflower by a putative boron transporter. In *Plant Nutrition-Food Security and Sustainability of Agro-Ecosystems*. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, p. 162-163.
- Davis RD, Beckett PHT y E Wolland. 1978. Critical levels of 20 potentially toxic elements in young spring barley. *Plant and Soil*. 29(2):395-408.
- Gassert B, Sprich E, Pfeiffer H, Dannel F, Wirén NV y V Römheld. 2002. Characterization of boron uptake in higher plants. In *Boron in Plant and Animal Nutrition*. Goldbach HE, Rerkasem B, Wimmer MA, Brown PH, Thellier M and RW Bell. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. p 119-126.
- Goldbach HE. Comunicación personal. 2005. Determination of diffusible B in leaves for the diagnosis of the B status of crops.
- Goldbach EH, AM Wimmer y P Findekle. 2000. Discussion paper: Boron- How can critical level be defined? *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 162: 115.121.

- Goodall GE, Embleton TW y RG Platt. 1981. Avocado fertilization. Division of Agricultural Sciences. University of California.
- Gupta CU. 1993. Boron and its role in crop production. CRC Press. Boca Raton, Florida. 237 p.
- Johnson CM y A Ulrich. 1959. Analytical methods for use in plant analysis. California Agric. Exp. Stn. Bull. 26-78 p.
- Kluge R y W Podlesak. 1985. Plant critical levels of boron for the evaluation of toxicity in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant and Soil. 83(3):381-388.
- Lovatt CJ. 1999. Management of foliar fertilization. Terra. 17(3):257-264.
- Maldonado TR. 2002. Diagnóstico nutrimental para la producción de aguacate Hass. Fundación Produce de Michoacán. México. 74 p.
- Nable RO, Lance RCM y B Cartwright. 1990. Uptake of boron and silicon by barley genotypes with differing susceptibilities to boron toxicity. Ann Bot. 66:83-90.
- Pfeffer H, Dannel F y V Römheld. 1999. Are there two mechanisms for boron uptake in sunflower? Plant Physiol. 155: 34-40.
- Salazar GS. 2002. Nutrición del aguacate, principios y aplicaciones. Instituto de la Potasa y el Fósforo AC. Qro. México. 165 p.
- Sánchez GP, Molinos DaSilva Ch, Alcántar GG y SV Manuel. 2007. Diagnóstico nutrimental en plantas. In: Nutrición de cultivos. Alcántar GEG y TLI Trejo. 2007. Mundiprensa. 440 p.
- SAS Institute. 1999. SAS User's Guide. Ver. 8.0 SAS Institute Inc. Cary. NC. 595 p.
- Shuxiang Z, L Chunhua y HE Goldbach. 2002. Determining the extractable fraction as a diagnostic criterion for the assessment of plant's boron status. In *Boron in Plant and Animal Nutrition*. Goldbach HE, B Rerkasem, MA Wimmer, PH Brown, M Thellier and RW Bell. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. p 319-125.
- Stangoulis CRJ, Reid JR, Brown HP y DR Graham. 2001. Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. Planta. 213:142-146.
- Steiner AA. 1961. A method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. Plant and Soil. 15:134-154.
- Takano J, Noguchi K, Yasumori M, Kobayashi M, Gajdos Z, Miwa K, Hayashi H, Yoneyama T y T Fujiwara. 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. Nature. 420:337-340.

- Takano J, Miwa K, Yuan L, Wirén Von N y T Fujiwara. 2005. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Plant Biology*. 102(34):12276-12281.
- Téliz OD. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Mundi Prensa México, SA de CV México. 219 p.

CAPÍTULO IV. HONGOS ENDÓFITOS RADICALES EN LA NUTRICIÓN CON BORO DEL AGUACATE (*Persea americana* Mill.): EFECTO EN PLANTAS CV. HASS EN UN ANDOSOL. (Root Endophytic Fungi on Avocado (*Persea americana* Mill.) Boron Nutrition: Effect on cv. Hass plants on an Andisol).

RESUMEN

Los hongos endófitos radicales (HER) no solamente han contribuido en la nutrición vegetal desde los inicios de la evolución de las raíces de los vegetales, sino que actualmente son una herramienta útil en la nutrición vegetal. El aguacate cv. Hass injertado sobre patrón mexicano mantiene una asociación mutualista obligada con estos microorganismos en andosoles de huertos comerciales sin haberse probado su participación en la nutrición con B, crucial en la producción de frutos de calidad y en la cantidad requerida por el mercado internacional. Con base en lo anterior, se inició un estudio para evaluar el papel que juegan estos hongos en la nutrición con B en un andosol, suelo más común de los huertos de aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.) de Michoacán, México. Se cuantificó el B absorbido vía raíz y su efecto sobre algunas variables morfológicas. El diseño estadístico fue un factorial 3³ en el que uno de los factores fue el tipo de inóculo: 1= HER nativos, 2= *Glomus intrarradices* (Gi) y 3= plantas libres de endófitos; el nivel de B soluble en mg kg⁻¹ con base en suelo seco (bajo= 0.13, medio= 0.25 y alto= 0.5) como segundo factor.

Los resultados mostraron que: i) la inoculación con endófitos nativos de estos huertos incrementa la concentración de B total en la planta; ii) Los endófitos *Glomus intrarradices* no tuvieron una participación evidente en el incremento en el contenido de B en las plantas de este cv. y; iii) el B total y el tipo de endófito inoculado tienen diferencias estadísticas significativas como factores independientes pero la interacción no fue probada. Con base en este resultado no podemos afirmar que los HER participan en la absorción del B. Se requiere más investigación para probar estadísticamente la participación de los endófitos nativos en la nutrición con B con debido a que: 1) las plantas que crecieron 6 meses en suelo deficiente en B y con hongos endófitos nativos no presentaron síntomas de deficiencia de B, 2) los endófitos radicales nativos mostraron su superioridad estadística después de un año de la inoculación al acumular B total en la planta y al incrementar el nivel de B soluble en el suelo, 3) Los tallos de plantas deficientes en B son débiles y, 4) los HER incrementan la firmeza de tallos en plantas deficientes.

Palabras clave: andosol, absorción, solubilización, *Glomus intrarradices*, dark septated fungi.

SUMMARY

Since early phases in the evolution of root systems of plants, endophytic fungi played a role for plant nutrient acquisition. Plant performance might be improved by the application of selected mycorrhizal inocula (although their usefulness under field conditions is under

debate). Avocado plants are obligatory associated with root entophytic fungi (HER) under field conditions, although their contribution to nutrient uptake is largely unknown in this species. In commercial orchards, avocado cv. Hass grafted onto a Mexican rootstock is always associated with fungal endophytes. Their role for B nutrition was studied on an andisol from Michoacán, México, with Hass Avocado (*Persea americana* Mill.). Uptake of B by mycorrhizal roots and its effect on several morphological variables was evaluated. The statistical analysis was a factorial 3³ with inocula as a factor: 1= indigenous root entophytic fungi (EN), 2= *Glomus intrarradices* (Gi) and 3= entophyte - free plants (T); soluble B: low= 0.13, medium= 0.25 and high= 0.5 mg kg⁻¹ of dry soil as the second factor.

Results showed that: i) indigenous entophytes inoculation from this orchards raises total plant B contents; ii) *Glomus intrarradices* inoculum had no evident effect on B uptake and; iii) there are statistical differences as independent factors for total B and for inoculum type, but this interaction was not tested. The contribution of HER on B absorption could not be ascertained. Further research on the role of HER is required, though, as: 1) plants that grew 6 month on a deficient B soil with indigenous entophyte fungi did not show any B deficiency symptoms, 2) when inoculated with indigenous root fungi, total B increased after 1 year and increased soluble B concentration in the soil, 3) B deficient plant stems are weaker and, 4) HER increase the stems firmness of deficient plants.

Index words: andisol, absorption, solubilization, Glomus intrarradices, dark septated fungi.

4.1. Introducción

La convivencia entre hongos endófitos y raíces de plantas pertenece a las formas simbióticas más antiguas en el proceso de la evolución (Lewis, 1980). Algunos de estos son hongos simbióticos radicales y la importancia que juegan estos en el funcionamiento de las plantas involucradas en la asociación no es totalmente comprendido, sin embargo, a juzgar por su frecuencia y abundancia, se considera que podrían estar involucrados en procesos ecológicos clave tales como la absorción nutrimental vegetal (Silveira *et al.*, 2002).

El sistema de raíces del aguacate carece de pelos radicales, condición que limita su área de exploración en el suelo. Esta desventaja morfológica es apoyada parcialmente por la asociación natural con HER. En esta asociación mutualista obligada, el hongo recibe un nicho ecológico homeostático en las raíces de la planta, lo cual representa una ventaja comparado contra la variabilidad de condiciones del suelo, además de una fuente de C. Por otro lado, la planta obtiene algunos nutrimentos minerales, particularmente los poco móviles como P, Zn, Cu y NH₄ que son absorbidos por las hifas (2 µm en diámetro) ya que estas exploran los poros del suelo (comúnmente de 200 µm de diámetro) donde las raíces de las plantas no pueden

penetrar. Este mutualismo incrementa la absorción de nutrientes, especialmente en suelos con bajo contenido de minerales esenciales para el desarrollo de las plantas (Menge *et al.*, 1980).

Los andosoles de los huertos de aguacate cv. Hass en Michoacán fluctúan generalmente en un rango de pH que va de ácido a ligeramente ácido. Además, el contenido de materia orgánica del suelo es 0.5 a 2 % (Gárate, 1983). Por consiguiente, este ambiente edáfico con alto contenido de materia orgánica produce una baja disponibilidad de B soluble para el cultivo de este frutal en la zona más productora de la república mexicana. El aporte adecuado de este micronutriente propicia cosechas con frutos de calidad y cantidad comercial, sin embargo, no existe información concluyente sobre las ventajas en la nutrición con B derivadas del uso de las micorrizas en huertos comerciales de aguacate.

La participación de los HER en la nutrición con B ha sido publicada por pocos autores como promotora de la absorción vía raíz de este micronutriente (Lehto *et al.*, 2004; Lehto y Laova, citados por Lehto *et al.*, 2004). En cambio, la negativa o nula contribución a la nutrición con B de estos microorganismos ha sido ampliamente publicada (Clark, 2002; Akhilesh y Upadhyay, 1999; Estrada-Luna y Davies, 2001; Clark y Zetto, 2000). Con base en lo anterior, se hizo un estudio para evaluar el papel que juegan estos hongos en la nutrición con B en el suelo más común de los huertos de aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.) en andosoles de Michoacán en cuanto a distribución del B absorbido vía raíz y su efecto sobre algunas variables morfológicas durante el desarrollo de árboles de 1.5 a 2.5 años de edad cultivados en 3 niveles de este nutriente.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Material vegetal

Se colectaron semillas de aguacate de un árbol criollo mexicano proveniente de la región de Uruapan, Michoacán. Se seleccionaron semillas uniformes (excluyendo aquellas grandes, chicas y deformes) y se germinaron en vasos de unicel de 500 mL con agrolita como sustrato. Después de su germinación y hasta que las plantas alcanzaron 2 meses de edad se regaron con agua y en su desarrollo posterior, éstas se regaron durante un año y medio con solución nutritiva (SN) Steiner (1961) diluida 40 % en invierno y 30 % en las demás estaciones del año, debido a que el aguacate no tolera altos contenidos de sales en el medio externo. A los 6 meses fueron injertadas con varetas sanas de aguacate cv. Hass provenientes de un solo árbol. De esta forma se obtuvo un lote homogéneo de plantas con portainjerto

criollo, libres de HER, sin síntomas visuales de deficiencias nutrimentales y en condiciones óptimas para el trasplante y la inoculación.

4.2.2. Suelo utilizado

El andosol utilizado para este experimento provino del huerto de aguacate cv. Hass “La Ceferina” de 22 años de edad ubicado en el municipio de Apo, Michoacán, México propiedad del Sr. Manuel López García. Este huerto presenta síntomas visibles de deficiencia de B y con una producción de 5 toneladas por hectárea, característica de los huertos deficientes. Se colectó suelo de los 20 cm superficiales del área del cajete (superficie donde se localiza la mayor cantidad de raíces activas en este cultivar). Este se mezcló con 20 % de arena de sílice, se fumigó por 3 horas con vapor de agua y se homogenizó. Después de enfriarse a temperatura ambiente, se procedió a la inoculación y trasplante. El pH fue de 6.4 y la textura migajón arenosa. La ventaja de utilizar suelo fumigado para este experimento radica en que en estas condiciones de asepsia, el endófito inoculado tiene la ventaja para colonizar las raíces.

El nivel de B soluble original (0.13 mg kg^{-1} de suelo seco) se utilizó como la concentración más baja del experimento y se realizaron pruebas de adición e incubación de B en forma de ácido bórico para obtener los niveles de 0.25 y 0.5 mg kg^{-1} de B soluble con base en suelo seco, mismos que se utilizaron como los niveles bajo, medio y alto, respectivamente.

4.2.3. Transplante y sitio experimental

Los árboles injertados de 1.5 años de edad se inocularon y se transplantaron en bolsas de plástico negro de 30 x 60 cm con suelo llenas hasta los 50 cm. El experimento se estableció en un invernadero del Colegio de Postgraduados ubicado en Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Se instaló un sistema de riego por goteo y se aplicó 1 riego diariamente de 200 mL con agua. El sistema de enfriamiento y calefacción permitió mantener la temperatura entre 13 y $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$) de noche y de día, respectivamente.

4.2.4. Métodos de cuantificación del hongo

Se realizaron 3 muestreos (cada 2 meses) para verificar el porcentaje de colonización y el conteo de esporas en todos los tratamientos. A los 6 meses que se alcanzó el máximo de colonización se procedió a adicionar los niveles de B soluble en suelo. Estos niveles se verificaron y corrigieron a los 3 y a los 6 meses posteriores de la aplicación y de ácido bórico al suelo.

La cuantificación del porcentaje de colonización se realizó mediante el método de clareo y tinción de estructuras propuesto por Philips y Hayman (1970). Se requirieron 14 clareos con hidróxido de potasio al 10 % en agua destilada (1:10 peso/volumen), uno con ácido clorhídrico al 10 % en agua destilada (1:10 v/v) y otro en agua oxigenada. La tinción se llevó a cabo con una solución de 0.05 g de Azul de tripano en 100 mL de lactoglicerol (ácido láctico, glicerol y agua destilada en volúmenes iguales). Se evaluaron tanto las estructuras características de hongos micorrízicos como la presencia de otros HER distintos de los micorrízicos, del tipo descrito por Grüning *et al.* (2001).

La firmeza se midió en tallos a una altura de 6 cm bajo el brote principal al final del experimento utilizando un penetrómetro calibrado para reportar los resultados en kg cm^{-2} .

4.2.5. Diseño de tratamientos

El diseño estadístico fue un factorial 3x3 completo en el que uno de los factores fue el tipo de inóculo: 1= HER nativos, 2= *Glomus intrarradices* (Gi) y 3= plantas libres de endófitos como tratamiento testigo (T); el segundo factor es el nivel de B soluble (bajo= 0.13, medio= 0.25 y alto= 0.5 mg kg^{-1} de suelo seco). Los factores anteriores conforman 9 tratamientos con 3 repeticiones cada uno (27 unidades experimentales). Se realizó el análisis estadístico y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) con el programa SAS Institute, 1999.

4.2.6. Boro total (Bt) en material vegetal y Boro soluble (Bs) en suelo

La preparación de las muestras para determinar Bt incluyó un lavado con agua potable, otro con agua destilada y finalmente uno con agua desionizada. Posteriormente, estas se secaron en estufa con circulación forzada de aire a 60 °C por 3 días y se molieron. Después se realizó la extracción mediante una digestión húmeda con ácido nítrico en un horno automático. Este proceso de digestión incluye una hora de precalentamiento a 180 °C, una hora de reposo y finalmente 6 horas de digestión a la misma temperatura. El extracto se aforó a 6 ml con agua desionizada. Una vez obtenido el extracto, se determinación de concentración de Bt con el método propuesto por Wimmer y Goldbach (1998).

Los extractos de suelo para la determinación de la concentración de B soluble se obtuvieron mediante el método de Berger y Truog (1940). La concentración de B en extractos tanto de suelo como de material vegetal se cuantificó mediante el método recomendado por Wimmer y Goldbach (1998).

4.2.7. Hongos endófitos nativos (EN) en rizósfera de aguacate cv. Hass

En la rizósfera de plantas de Aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass cultivados en un andosol de un huerto comercial procedente de la región de Uruapan Michoacán se encontraron presentes los hongos micorrízicos vecículo-arbusculares (HMVA) *Scutellospora nigra* (Anexo 4.1.), *Gigaspora* aff. *Gigantea* (Anexo 4.2.), *Glomus* aff. *Aggregatum* (Anexo 4.3.) y *Scutellospora* sp (Anexo 4.4.). Además, se observó la presencia abundante de los denominados **Dark septated fungi (DSF)** (Anexo 4.5.). La proporción de ambos hongos endófitos radicales fue de 33:67 % para HMVA:DSF. Al conjunto de todos estos géneros y especies se le denomina **Endófitos Navitos (EN)** en la presente contribución.

4.3. Resultados y discusión

La mayor cantidad del boro contenido en una planta de aguacate (*Persea americana* Mill.) se localiza en los tallos (31-45 %, información no incluida en el texto derivada de esta investigación). Además, el contenido de este nutrimento en tallos tiene una correlación de 0.94 (probabilidad de <.0001) con el contenido de B total en la planta (Anexo 4.7). Con base en lo anterior, los tallos son una estructura representativa del estado del B en el árbol.

Cuadro 4.1. Contenido de B total por estructuras de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass después de un año de la inoculación con hongos endófitos radicales.

Estructura	-----B total (mg planta ⁻¹)-----			C.V. ($\alpha \leq 0.05$)
	Testigo	<i>Glomus intrarradices</i>	<i>Endófitos Nativos</i>	
Brotos	62.0a	60.4a	70.8a	30.1
Hojas medias	113.4a	129.1a	153.9a	35.8
Hojas viejas	33.0b	36.1b	55.3a	38.1
Tallos	186.7b	278.4a	301.6a	14.8
Raíces gruesas	83.5a	122.3a	149.8a	37.1
Raíces delgadas	49.2b	51.3ab	56.3a	39.8
Total	528.0b	677.5ab	787.8a	21.8

Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tipos de inóculo. C.V.= coeficiente de variación; n= 9.

Por otro lado, la inoculación con HER favoreció la acumulación de B en algunas estructuras de la planta. El Cuadro 4.1 muestra la mayor acumulación de B se observó en estructuras viejas como son hojas viejas, tallos y raíces gruesas de las plantas inoculadas

comparadas contra las del testigo (sin inóculo) en el que estas estructuras acumularon un contenido de B significativamente menor.

El mutualismo con HER generalmente incrementa la absorción de nutrientes tales como el N y el P, especialmente en suelos con bajo contenido de minerales esenciales para el desarrollo de las plantas (Menge *et al.*, 1980). Acorde con este comportamiento, al analizar independientemente el contenido de B en tallos por nivel de B soluble en suelo, se evidenció que los tallos de los árboles que crecieron en la concentración de 0.5 mg kg⁻¹ de suelo seco no manifestaron respuesta en el contenido de B total a la inoculación de HER. En cambio, cuando la planta creció en nivel deficiente, la ventaja de la inoculación se hizo patente con el incremento significativo del contenido de B total (Cuadro 4.2). El análisis estadístico de B total de los tallos presenta el menor coeficiente de variación (Cuadro 4.1). Este parámetro respalda confiablemente las diferencias estadísticas entre estructuras.

Cuadro 4.2. Contenido de B total en tallos de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass después de un año de la inoculación con hongos endófitos radicales cultivados en 3 niveles de B en suelo.

Nivel de B (mg kg ⁻¹ suelo seco)	----- B total (mg tallo ⁻¹)-----			C.V. ($\alpha \leq 0.05$)
	<i>Testigo</i>	<i>Glomus intrarradices</i>	<i>Endófitos Nativos</i>	
0.13	93.0b	143.9a	167.1a	13.2
0.25	174.8b	312.6a	312.9a	12.9
0.5	292.4a	378.5a	425.3a	15.61

Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tipos de inóculo. C.V.= coeficiente de variación; n= 3.

El efecto después de un año de la inoculación con HER sobre el contenido de B total en tallos de las plantas que crecieron en los niveles 0.13 y 0.25 mg kg⁻¹ de B en suelo (deficientes) se muestra en la Figura 4.1. Esta imagen pone en evidencia la desventaja en el contenido de B de la planta y en firmeza del tratamiento sin HER (testigo) contra los inoculados.

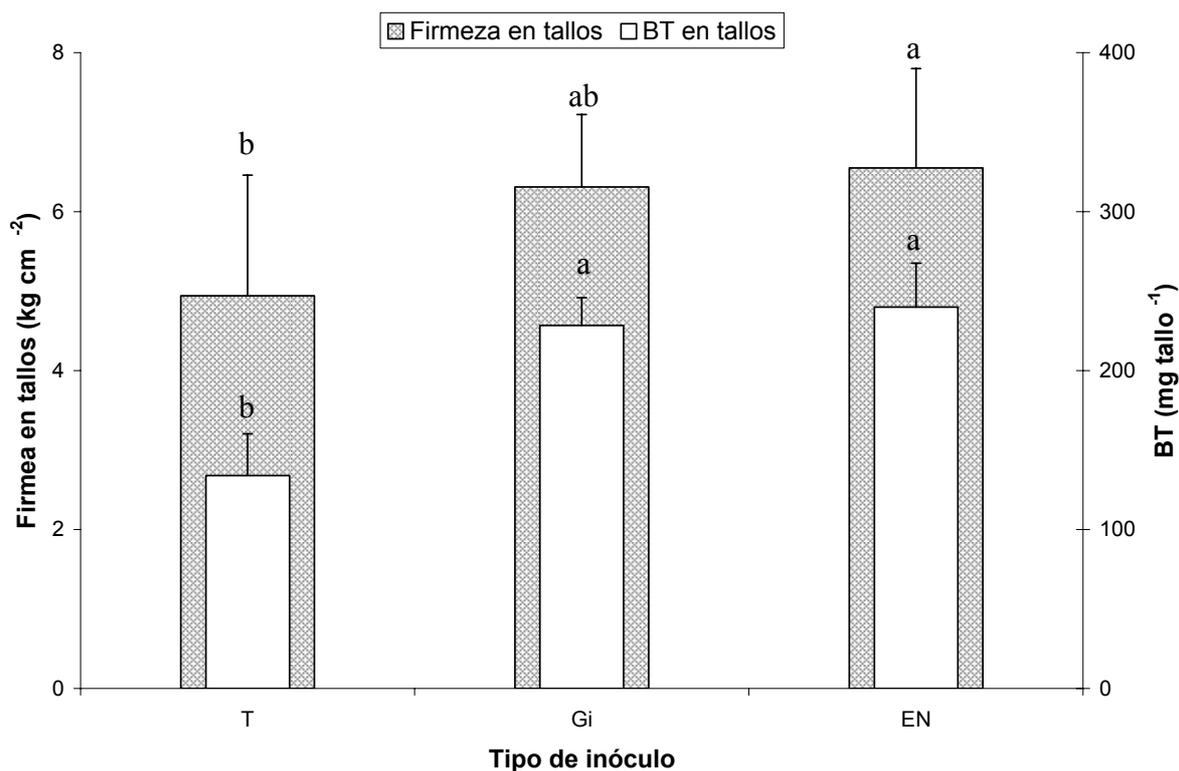


Figura 4.1. Firmeza en tallos y contenido de B total de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) que crecieron un año con inoculación de hongos endófitos radicales con nivel bajo de B en suelo. T= plantas testigo (sin inóculo); Gi= plantas inoculadas con *Glomus intrarradices*; EN= plantas inoculadas con endófitos nativos; letras diferentes sobre las columnas indican diferencias estadísticas entre tipos de inóculo ($\alpha \leq 0.05$).

La función más conocida del B en las plantas es la formación y estabilización de la pared celular mediante la ligadura cruzada con polisacáridos pécticos en el ramnagalacturonano II (Matoh, 1997). La implicación de la deficiencia de B en tallos ha sido publicada por varios autores. Por ejemplo, el desarrollo del xilema es importante para la arquitectura floral y la morfología de las hojas en condiciones de deficiencia de este nutrimento debido a su impacto en la transpiración y distribución de fotosintatos hacia órganos reproductivos y frutos (Dell y Huang, 1997). Tanto el B, como las auxinas participan en la biosíntesis de lignina y en la diferenciación del xilema (Lewis, 1980), estas células deficientes pueden llegar a lignificarse aun cuando su anatomía es deforme (Robertson y Loughman, 1974). Las características anteriores en árboles deficientes en B producen ramas incapaces de soportar el peso del follaje (Dell y Malajczuk, 1994). En cambio, hasta donde conocemos a la fecha no ha sido reportado el incremento en la firmeza de tallos inducida por la inoculación de HER en plantas deficientes de B (Figura 4.1). Para el aguacate la firmeza en tallos es primordial dado que el árbol tiene que sostener el peso de la fruta, por tal motivo, el

amarre de ramas en huertos comerciales se ha convertido en una práctica común para evitar que el peso las desgaje.

En el análisis estadístico de firmeza en tallos, la interacción entre el nivel de B en el suelo y los endófitos inoculados resultó altamente significativa explicando con este resultado que la firmeza de los tallos está directamente relacionada con el tipo de HER asociado al aguacate cv. Hass. Esto en las plantas con niveles bajos de B en suelo (0.13 y 0.25 mg kg⁻¹ de B con base en suelo seco). En cambio, las plantas con 0.53 mg kg⁻¹ de B en suelo no manifestaron el efecto de la inoculación de HER en el incremento de contenido del B total ni en la firmeza de tallos (Cuadro 4.2).

La ganancia de B en los tallos de plantas inoculadas por un periodo de un año se presenta en la Figura 4.2. En ella se muestra estadísticamente la ventaja de la inoculación con HER (EN o Gi) comparada contra la escasa ganancia del tratamiento testigo. Lewis (1980) consideró que no ocurre la traslocación del B por medio de los HER hacia las plantas debido a que los HER tienen manitol, carbohidrato de alta afinidad por el B y, por consiguiente, no permite la movilidad del B dentro de estos endófitos. En contraste, la sucrosa, principal carbohidrato de las plantas lignificadas para traslocación del B, tiene baja afinidad por este nutrimento y por ende, hace posible la movilidad del B dentro del xilema. Opuestamente a este razonamiento, ahora se sabe que en vez de evitar la movilidad, estos complejos B-azúcar-alcohol se mueven por el xilema (Hu *et al.*, 1997). Por tal motivo, existe la posibilidad de que estos complejos podrían ser potencialmente traslocados vía hongos micorrízicos y en la interfase hongo-planta debido a que los endófitos contienen polioles. También es posible que el ácido bórico libre sea translocado vía HER debido a que dichos hongos absorben cantidades significativas de agua (Duddridge *et al.*, 1980).

En términos generales, la traslocación de B por HER ha recibido escasa atención. Estudios realizados por Lehto y Laova (citados por Lehto *et al.*, 2004) cuantificaron en campo una concentración de 10 y 35 mg kg⁻¹ de B en acículas de *Picea abies* (L.) y en esporocarpos de *Paxillus involutus* (Fr.) Fr., respectivamente. Con base en este estudio, los autores proponen la hipótesis de que *Paxillus involutus* (Fr.) Fr. absorbe B y lo trasloca a las partes aéreas de la planta. Este mismo hongo también traslocó ¹⁰B a acículas de *Betula pendula* (L.) Roth. (Lehto *et al.*, 2004). Los autores no concluyeron si la absorción fue pasiva o activa, pero con sus resultados probaron que este hongo absorbe y trasloca B a la conífera huésped. Hasta donde conocemos, éste es el único estudio de translocación de B por hongos endófitos endomicorrízicos.

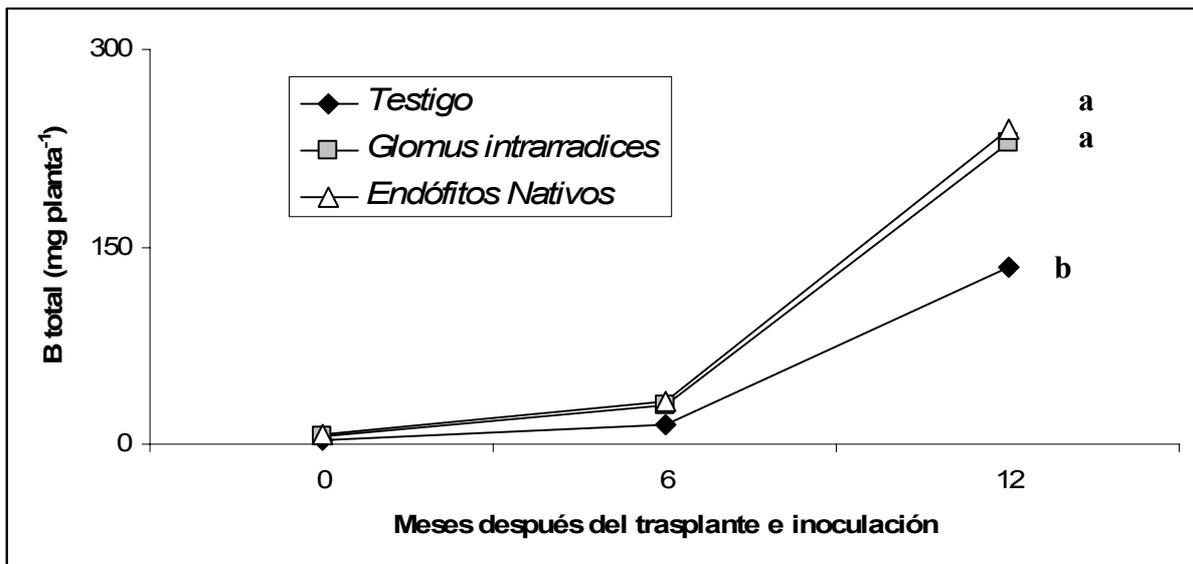


Figura 4.2. Dinámica de acumulación de B total en los tallos de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) que crecieron un año con o sin inoculación de hongos endófitos radicales al momento de la inoculación (0 meses), antes de la aplicación de 0.13 y 0.25 mg kg⁻¹ de B en suelo deficiente (6 meses posteriores a la inoculación) y al final del experimento (12 meses). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre tipos de inóculo ($\alpha \leq 0.05$).

Sin embargo, no existen antecedentes de que la absorción o traslocación de B ocurra con endomicorizas ni en dicotiledóneas. Los resultados de la presente contribución permiten evidenciar la participación de el conjunto de géneros denominados endófitos nativos (EN) en la absorción de B mediante sus hifas y su traslocación a diferentes partes aéreas de aguacate. Con base en los resultados obtenidos existe la posibilidad de hipotetizar que Gi y el complejo de EN contienen una dotación de una o más azúcar-alcoholes que permiten la traslocación de B a través de las hifas hacia la planta de aguacate que contiene azúcares de 7 carbonos como son D-manno-heptulosa y perseitol (Cowan, 2004).

El B es un micronutriente esencial para las plantas, pero el intervalo entre deficiencia y toxicidad es más pequeño que ningún otro elemento (Goldberg *et al.*, 2002). La adsorción de B aumenta conforme se incrementa la alcalinidad del suelo hasta alcanzar un valor de pH de 9 y disminuye después de este valor. La textura del suelo en condiciones de campo varía tanto horizontal como verticalmente. Este parámetro afecta la adsorción de este nutriente en función a la cantidad de arcilla, área superficial, carbono orgánico, carbono inorgánico y Al (Goldberg *et al.*, 2005).

Los andosoles tienen en común que son suelos derivados de cenizas volcánicas con altos contenidos de Fe, Al y materiales amorfos como la montmorillonita. Son de textura

migajón arenosa, con pH ligeramente ácido y con alto contenido de materia orgánica (1 al 2 %) (Gárate, 1983).

Las características de estos suelos explican el comportamiento tan variado del B soluble. Los andosoles, suelo más común en los huertos de aguacate cv. Hass de la región productora de Michoacán, reciben manejo agrícola diferente dependiendo de la topografía del huerto, disponibilidad de agua del terreno y de la disponibilidad de maquinaria agrícola y de trabajadores. Lo anterior hace de cada huerto un caso particular para el comportamiento del B disponible para el árbol.

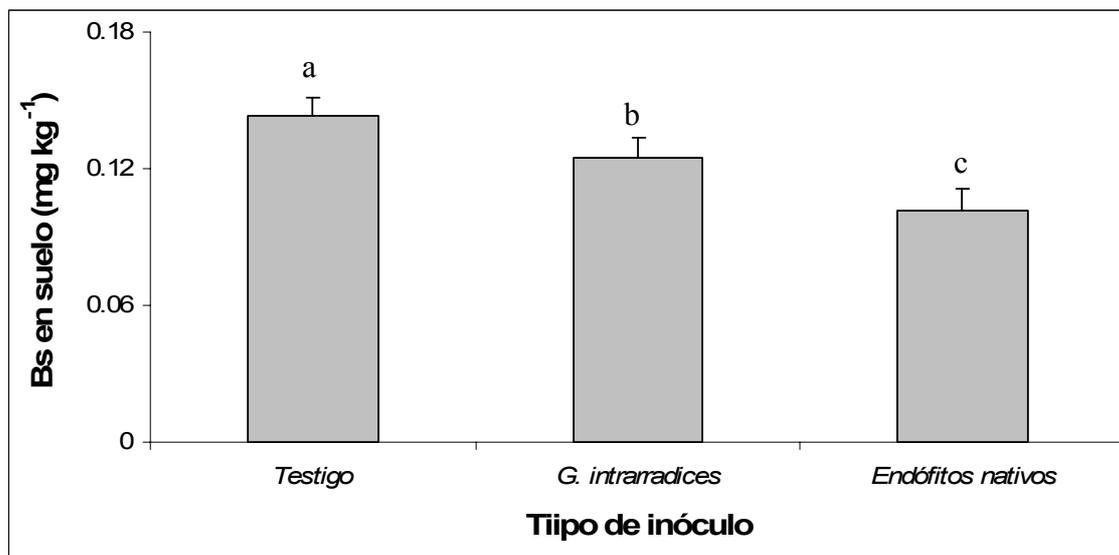


Figura 4.3. Segunda evaluación de B soluble (Bs) realizada 6 meses después de la inoculación de los árboles de aguacate cv. Hass (*Persea americana* Mill.). En este período las raíces ya estaban colonizadas con hongos endófitos e inmediatamente después de esta evaluación se adicionaron los diferentes niveles de B al suelo. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias estadísticas entre tipos de inóculo ($\alpha \leq 0.05$).

El B soluble en suelo seis meses después de la inoculación presentó variación de acuerdo al tipo de inóculo empleado (Figura 4.3). Cabe mencionar que hasta esta etapa (6 meses después del trasplante e inoculación) no se aplicó B a ningún tratamiento. La diferencia en los niveles de B soluble en suelo se debe únicamente al consumo que efectuó la planta durante 6 meses de su desarrollo.

Un año después de establecido el experimento los niveles de B soluble en suelo fueron afectados por el tipo de inóculo (Figura 4.5) opuestamente a la tendencia que se mostró a los 6 meses del inicio de la infección (Figura 4.3).

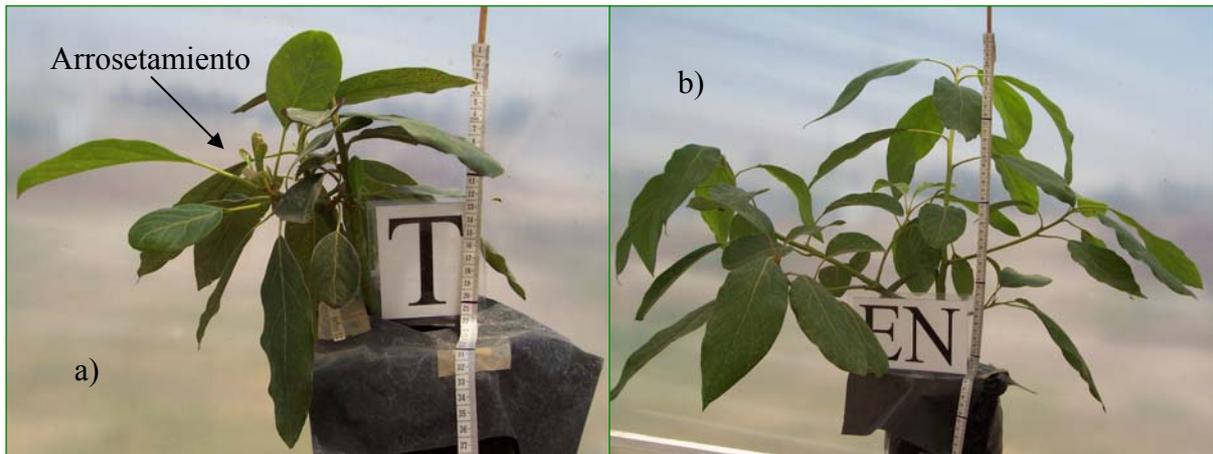


Figura 4.4. Plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass 6 meses después del transplante e inoculación con hongos endófitos radicales: a) Planta testigo (sin hongos inoculados) y, b) Planta inoculada con el complejo de endófitos nativos de huertos de aguacate.

Se observó que las plantas testigo mostraron arrosetamiento y reducción de tamaño característico de la deficiencia de este nutrimento (Figura 4.4a). No obstante, con base en la

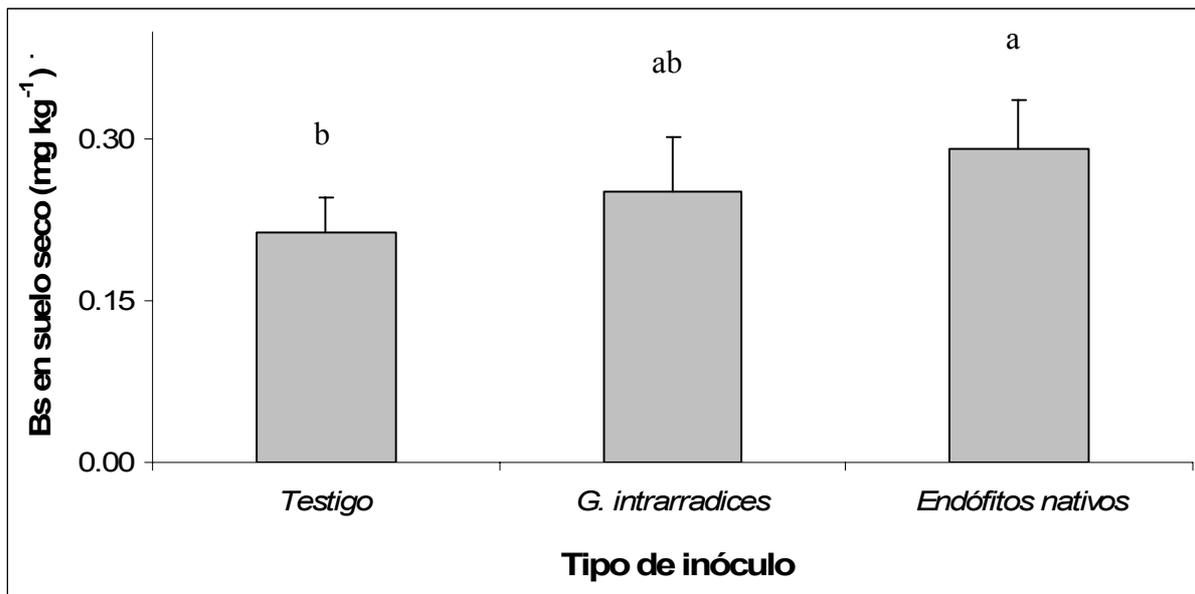


Figura 4.5. Efecto del tipo de inóculo con diferentes HER sobre la concentración de B soluble (Bs) en suelo seco de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) después de 1 año de la inoculación. Letras distintas sobre las columnas significan valores distintos (Tukey, $\alpha = 0.01$, DMS = 0.049).

cantidad de B soluble cuantificada en el suelo y la apariencia de las plantas a los 6 meses de la inoculación podemos afirmar que las plantas sin inóculo no utilizaron B del suelo para su desarrollo, en cambio, las colonizadas si lo usaron. Hasta el momento, no se tienen antecedentes de que los endófitos radicales requieran B para su establecimiento o desarrollo (Blevins y Lukaszewski, 1998), de tal forma que esta queda como una hipótesis que requiere investigación futura.

Las plantas absorben la mayor parte del B en forma de ácido bórico no disociado (Hu *et al.*, 1997). La acidez de suelo de los huertos de aguacate (pH de 5-6) no permite la estabilización del complejo de polioles (ej. manitol o sorbitol) con el ácido bórico (Power and Woods 1997), por lo que puede considerarse que el pH ácido no constituye un factor limitante en la nutrición con B en aguacate. En cambio, la fracción orgánica del suelo contiene una amplia variedad de compuestos con grupos *cis-diol*, mismos que no fueron caracterizados en este andosol utilizado y pudieran influir en la retención del B aplicado. También existe la posibilidad de que parte del B sea secuestrado por los carbohidratos dentro del micelio fúngico (Lehto *et al.*, 2004).

No obstante y con base en la homogeneidad de la aplicación de tratamientos, se puede afirmar estadísticamente que los endófitos nativos originan mayor cantidad de B soluble en el suelo, comportamiento opuesto al del tratamiento testigo después de un año de iniciados los tratamientos (Figura 4.5). La interacción de tipo de inóculo vs. B soluble en suelo de $\alpha = 0.013$ confirma que existe un efecto de los hongos EN radicales sobre el B disponible para la planta. El tratamiento de inoculación de Gi tuvo un comportamiento intermedio semejante al de los EN y al Testigo y no permitió percibir su ventaja en cuanto al B soluble en el suelo. En conclusión, en función de los resultados obtenidos en la presente contribución se puede afirmar que los hongos EN de los huertos de aguacate cv. Hass influyen en el incremento de B soluble en el suelo, el cual es utilizado para el desarrollo eficiente de las plantas colonizadas, mismo que la planta utiliza para su desarrollo más eficientemente que las plantas no colonizadas.

La correlación entre el Bs del suelo y el contenido de este nutrimento en la planta puede predecir cuando los cultivos responderán a la fertilización y cuándo se esperan niveles tóxicos. Lamentablemente, esto es cierto solamente para algunos cultivos y en algunas especies (Goldberg *et al.*, 2002). En el caso particular del aguacate cv. Hass, su contenido de Bt del árbol completo correlaciona 89 % con el Bs del andosol, extraído mediante el método recomendado por Berger y Truog (1940). Mejor aún, esta correlación es de 91 y 95 % para hojas medias y para brotes, respectivamente. Estas correlaciones se evidenciaron que ambas

son estructuras factibles de muestrear con fines de evaluación del estado del B en el árbol. No así los tallos y las raíces gruesas que, aunque tienen un 94 % de correlación, no son fáciles de acceder para evaluaciones de campo.

4.4. Conclusiones

La inoculación con hongos Endófitos Nativos en plantas de aguacate cv. Hass incrementa significativamente el contenido de B total en las estructuras viejas como son hojas basales, tallos y raíces gruesas.

La inoculación de *Glomus intrarradices* y endófitos nativos origina acumulación de B en tallos.

La fragilidad de los tallos de plantas deficientes en B es mejorada con la inoculación de hongos endófitos radicales.

Los HER no incrementan la absorción de B por las plantas. El mecanismo detectado para favorecer la acumulación de B en plantas se basa en el incremento en la concentración de B soluble en el suelo, misma que es la aprovechada por la planta para acumular un mayor contenido de B total.

Los HER nativos de los huertos de aguacate cv. Hass presumiblemente favorecen la solubilización B del suelo, mismo que la planta utiliza para su desarrollo más eficientemente dado que no aparecen síntomas de deficiencia de B comparadas contra las plantas no colonizadas. Otra opción factible es que los hongos endófitos favorecieron el crecimiento de la planta y ésta liberó sustancias que mejoraron la solubilidad de nutrimentos en el suelo.

Conclusión General

Al evaluar el papel de los HER en el incremento de la absorción de B en aguacate cv. Hass y en las condiciones de simbiosis desarrolladas en un andosol de un huerto típico de la región productora de Michoacán podemos concluir que el BT y el tipo de endófito inoculado originan diferencias estadísticas significativas como factores independientes. Con base la interacción estadística no significativa de B total en planta con el contenido de B en suelo, no podemos afirmar con certeza estadística que los HER participan en la absorción del B. No obstante, los hongos endófitos no solamente participan y han participado en la nutrición vegetal desde los inicios de la evolución de las raíces de los vegetales, sino que actualmente son utilizadas en la nutrición vegetal para prácticas de manejo agrícola sustentable con la finalidad de hacer más eficiente la fertilización y hacer posible una producción de alimentos sustentable para los diferentes ecosistemas.

Sugerencias de Investigación

La presente contribución nos permite concluir que se requiere más investigación para probar la participación de los endófitos nativos en la nutrición con B basados en los siguientes puntos:

1. Las plantas que crecieron los primeros 6 meses en suelo deficiente en B y con Endófitos Nativos no presentaron síntomas visibles de deficiencia de B.
2. Los Endófitos radicales Nativos mostraron su superioridad estadística después de un año de la inoculación al acumular B total en la planta y al incrementar el nivel de B soluble en el suelo.
3. Para hacer una conclusión del papel que juegan los hongos endófitos radicales en la nutrición con B se requiere analizar la concentración de todos los nutrientes en el suelo y en material vegetal con mayor número de unidades experimentales.

4.5. Literatura citada

- Akhilesh KN y RS Upadhyay. 1999. VA mycorrhizae and revegetation of coal mine spoils: a review. *Tropical Ecology* 40:1-10.
- Berger KC y E Truog. 1940. Boron deficiencies as revealed by plant and soil test. *J. Am. Soc. Agron.* 32:297-301.
- Blevins DG y KM Lukaszewski. 1998. Boron in plant structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:481-500.
- Clark RB. 2002. Differences among mycorrhizal fungi for mineral uptake per root length of switchgrass grown in acidic soil. *Journal of Plant Nutrition* 25:1753-1772.
- Clark RB y SK Zeto. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition.* 23: 867-902.
- Cowan A.K. 2004. Metabolic control of avocado fruit growth: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase, active oxygen species and the role of C7 sugars. *South African Journal of Botany.* 70: 75–82.
- Dell B y L Huang 1997. Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil* 193: 103–120.
- Dell B y N Malajczuk. 1994. Boron deficiency in eucalypt plantations in China. *Can. J. For. Res.* 24: 2409-2416.

- Duddridge JA, Malibari A, DJ Read 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287:834–836.
- Estrada-Luna AA y FT Jr. Davies. 2001. Micorrizal fungi enhance growth and nutrient uptake of prickly-pear cactus (*Opuntia albicarpa* Scheinvar ‘Reyna’) plantlets after ex vitro transplantation. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76:739-745.
- Gárate OA. 1983. Diagnóstico y corrección de boro en suelos calizos. Tesis doctoral. Instituto Nacional de Investigaciones agrarias. Madrid. España.
- Goldberg S, Corwin DL, Shouse PJ y DL Suarez. 2005. Prediction of boron adsorption by field samples of diverse textures. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69:1379-1388.
- Goldberg S, Shouse PJ, Lesch SM, Grieve CM, Poss JA, Forster HS y DL Suarez. 2002. Soil boron extractions as indicators of boron content of field-grown crops. *Soil Science* 167:720-728.
- Goldberg S, Shouse PJ, Lesch SM, Grieve CM, Poss JA, Froster HS y DL Suarez. 2002. Soil boron extractions as indicators of boron content of field-grown crops. *Soil Science* 167(11):720-728.
- Grüning CR, Sieber TN y O Holdenrieder 2001. Characterization of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Mycological Research* 105:24-32.
- Hu H, Penn SG, Lebrilla CB, PH Brown.1997. Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiol* 113:649–655.
- Lehto T, Lavola A, Kallio E y PJ Aphalo. 2004. Boron uptake by ectomycorrhizas of silver birch. *Mycorrhiza*. 14:209–212.
- Lewis DH.1980. Boron, lignification and the origin of vascular plants—a unified hypothesis. *New Phytol.* 84:209–229.
- Matoh T. 1997. Boron in plant cell walls. *Plant Soil* 193:59–70.
- Menge JA, LaRue J, Labanauskas CK y ELV Johnson. 1980. The effect of two mycorrhizal fungi upon growth and nutrition of avocado seedlings grown with six fertilizer treatments. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105:400-404.
- Philips MJ y SD Hayman. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- Power PP y WG Woods. 1997. The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant Soil* 193:1–13.

- Robertson GA y BC Loughman. 1974. Response to boron deficiency: a comparison with responses produced by chemical methods of retarding root elongation. *New Phytol.* 73:821-832.
- SAS Institute. 1999. SAS User's Guide. Ver. 8.0 SAS Institute Inc. Cary NC. 595 p.
- Silveira SV da, Souza PVD de, Bender RJ y OC Koller. 2002. Effect of arbuscular mycorrhizae on cv. Carmen avocado plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33:1323-1333.
- Steiner AA. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil* 15:134-154.
- Wimmer AM y E H Goldbach. 1998. A miniaturized curcumin method for determination of boron in solutions and biological samples. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 162:15-18.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

1. Conclusiones

Los síntomas de la deficiencia de B en aguacate cv. Hass identificables a simple vista son el arrosetamiento de brotes, la flacidez de tallos y el enchinamiento, acompañado de hojas pequeñas en forma de cuchara y delgadas con tiro de munición y ápice deforme. Ocasionalmente estas hojas deficientes tienen 2 ápices y en invernadero las plantas deficientes mantienen sus hojas en la planta por más tiempo, de tal forma que permiten la evaluación de la deficiencia hasta en hojas viejas.

Los síntomas de deficiencia de B en aguacate cv. Hass se manifiestan en el desorden del crecimiento, tamaño y arreglo de células. También en la irregularidad de forma, y grosor de paredes celulares en brotes de raíz. Los brotes del vástago solamente mostraron el efecto de la deficiencia en la fragilidad de los tricomas de los primordios foliares.

Existe un rango estrecho entre los síntomas visuales de deficiencia o de exceso definido por la concentración de B en solución nutritiva, suministrada constantemente al aguacate cv. Hass. Este se definió entre 0.43 y 0.83 mg L⁻¹ de boro.

Las hojas maduras y los brotes del vástago son estructuras representativas del estado del B en el árbol completo. Por consiguiente, es posible considerar la concentración de este nutrimento para hacer evaluaciones de campo.

La concentración de B soluble en hojas maduras que crecieron sin síntomas visuales de deficiencia de B osciló en un rango de 0.52 a 0.72 mg kg⁻¹ MF y el de B total de 62.15 a 76.75 mg kg⁻¹ MS.

El B absorbido se distribuye en mayor concentración en tallos > hojas maduras > raíces gruesas > brotes > raíces delgadas > hojas basales en aguacate cv. Hass.

La inoculación con hongos endófitos radicales incrementa la concentración de B soluble en el suelo. Las plantas micorrizadas acumulan más B total en sus tallos, raíces gruesas y

hojas viejas. Sin embargo, con la información actual no pudo comprobarse la participación de estos endófitos en la absorción de B vía radical en aguacate cv. Hass.

2. Recomendaciones

Se sugiere mantener en hojas maduras una concentración de B soluble de 0.72 mg kg^{-1} con base en materia fresca y de B total de 76.75 mg kg^{-1} con base en materia seca para suministrar niveles adecuados de B al aguacate cv. Hass en la región de Uruapan, Michoacán y sus alrededores.

En los andosoles de huertos comerciales de la misma zona se recomienda mantener una concentración de B soluble de 0.5 mg L^{-1} en solución, concentración óptima para el cultivo de aguacate cv. Hass sobre portainjerto mexicano.

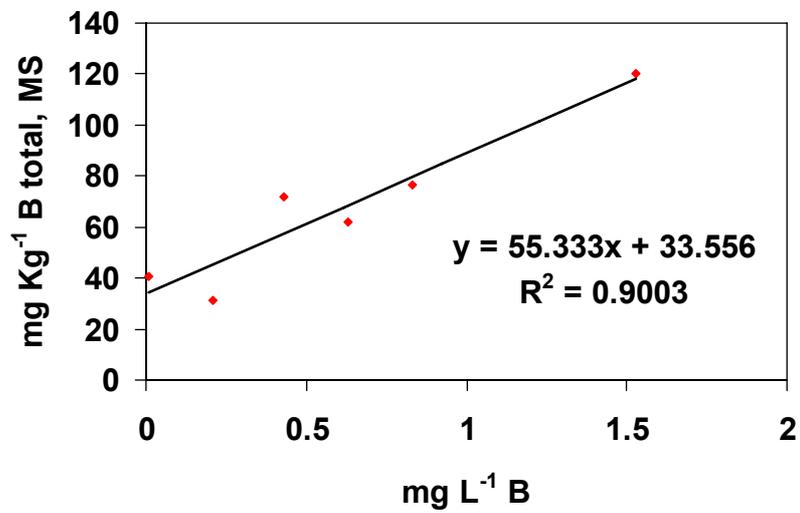
3. Sugerencias de investigación

Se requiere más investigación para probar la participación de los endófitos nativos en la nutrición con B, ya que los resultados obtenidos en este estudio sugieren su participación en la nutrición con este nutrimento, debido a que las plantas que crecieron los primeros 6 meses en suelo deficiente con estos hongos radicales no presentaron síntomas visibles de la deficiencia.

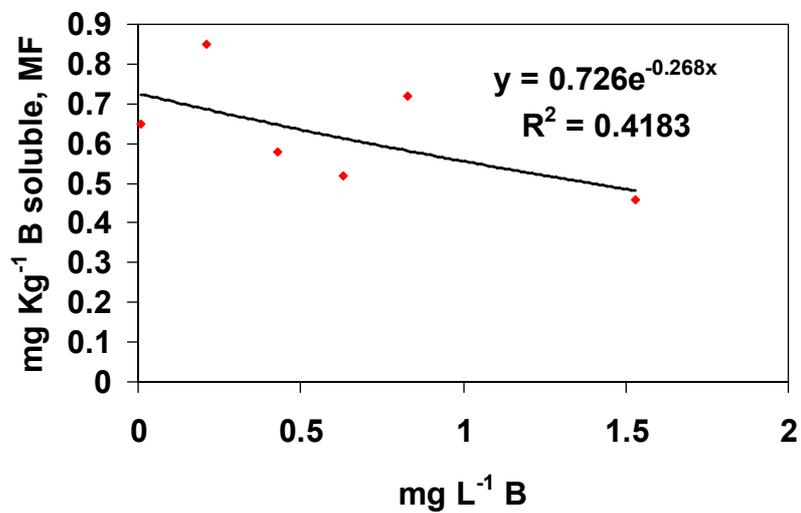
El incremento en la concentración de B soluble en agua que se detectó en el suelo debido a la inoculación con hongos endófitos radicales podría ser causado por el incremento en el crecimiento de las plantas inoculadas. Por consiguiente, es recomendable investigar la tasa de liberación de sustancias que mejoran la solubilidad del B en el suelo rizosférico de plantas inoculadas o que alteran del pH del suelo para identificar las causas de tal incremento en el B hidrosoluble del suelo.

Se sugiere analizar el contenido de polioles (perseitol y *D-manno*-heptulosa, C7-azúcar y su alcohol perteneciente, característicos y predominantes en aguacate) tanto en esta planta, como en los hongos que participan en esta simbiosis para definir su participación en la absorción de B vía micelial.

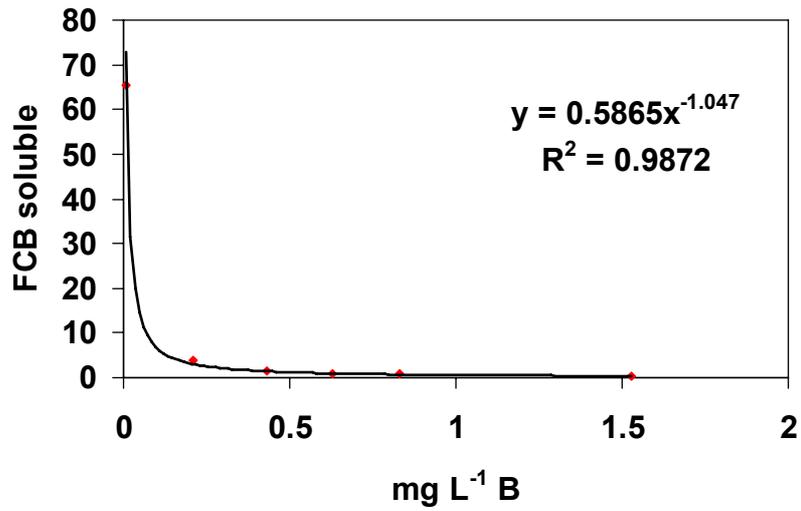
ANEXOS



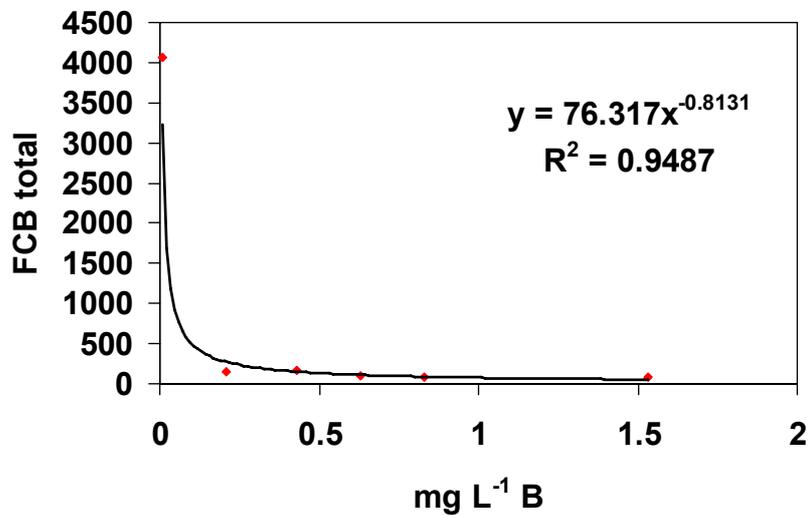
Anexo 3.1. Relación entre la concentración de B en solución nutritiva y la concentración de B total en hojas de aguacate cv. Hass con base en peso de materia seca.



Anexo 3.2. Relación entre la concentración de B en solución nutritiva y la concentración de B soluble en hojas de aguacate cv. Hass con base en peso de materia fresca.



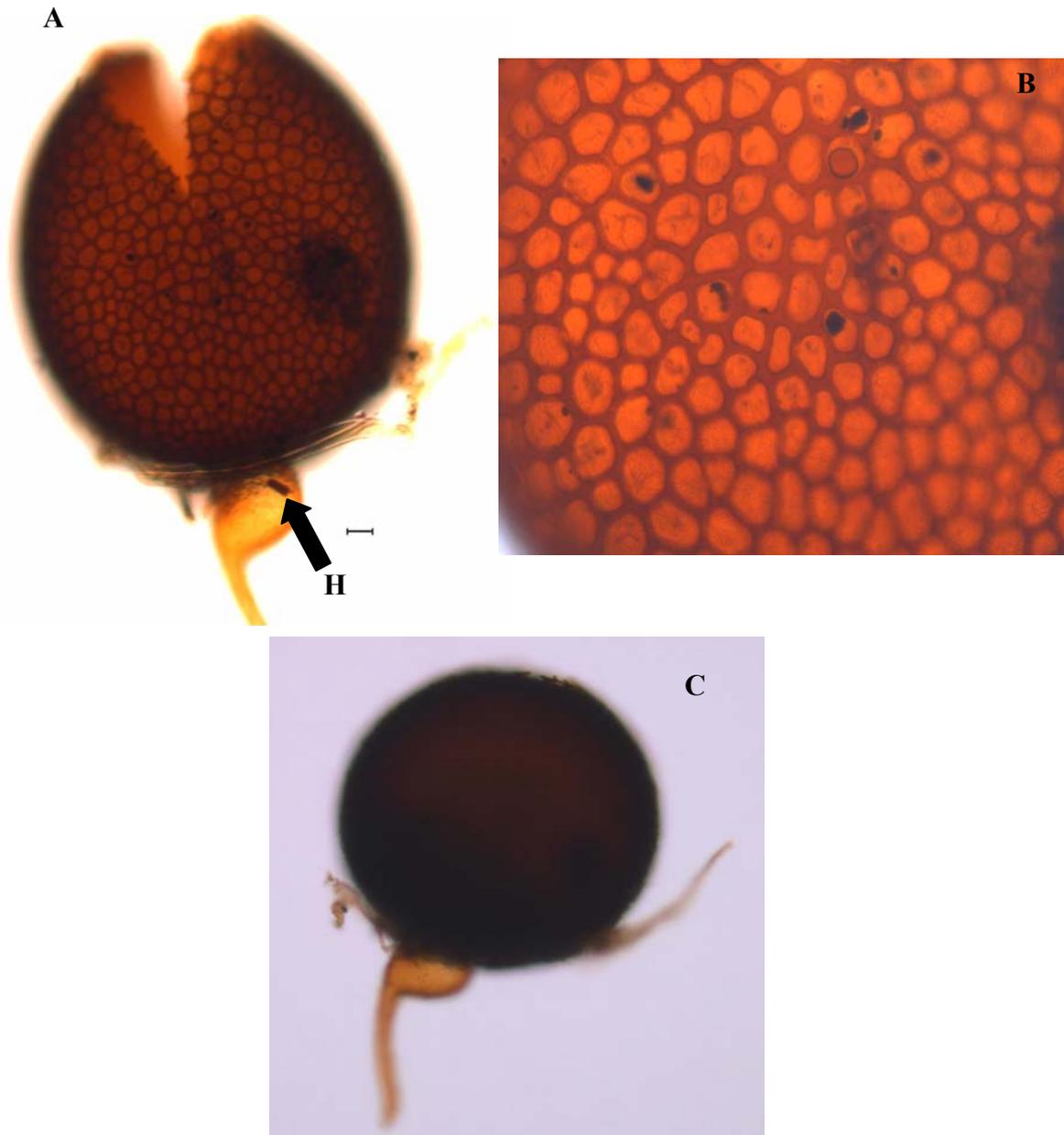
Anexo 3.3. Relación entre la concentración de B en solución nutritiva y el factor de concentración de B soluble (FCB soluble) en hojas de aguacate cv. Hass con base en peso de materia fresca (MF).



Anexo 3.4. Relación entre la concentración de B en solución nutritiva y el factor de concentración de B total (FCB total) en hojas de aguacate cv. Hass con base en peso de materia seca (MS).

Scutellospora nigra

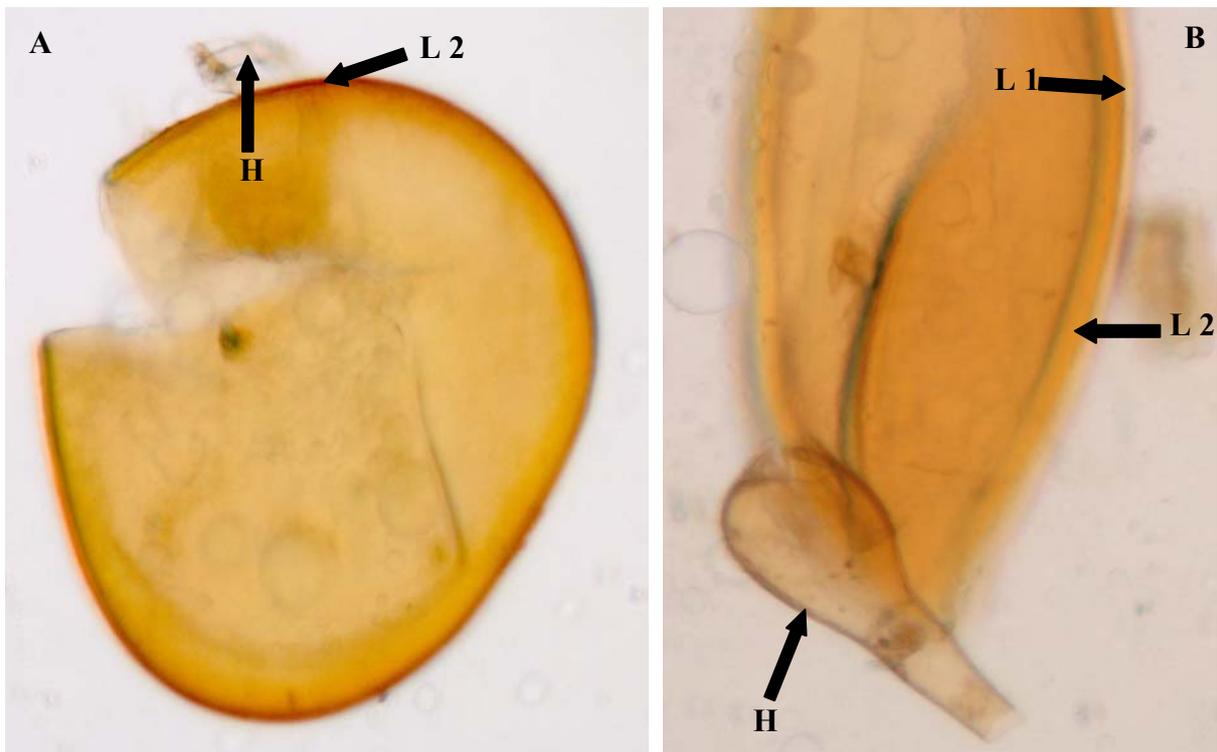
Esporas formadas individualmente en el suelo, globosas de color café oscuro a negro de 300-450 μm de diámetro, con una pared externa ornamentada café oscuro a negro y una pared interna laminada café. La hifa sustentora en forma lateral de color café.



Anexo 4.1. A) *Scutellospora nigra* Espora rota mostrando la ornamentación y la hifa sustentora (H) 10x; B) acercamiento de la ornamentación de pared 40x; C) espora globosa con tubo germinativo (10 X).

Gigaspora aff. *gigantea*

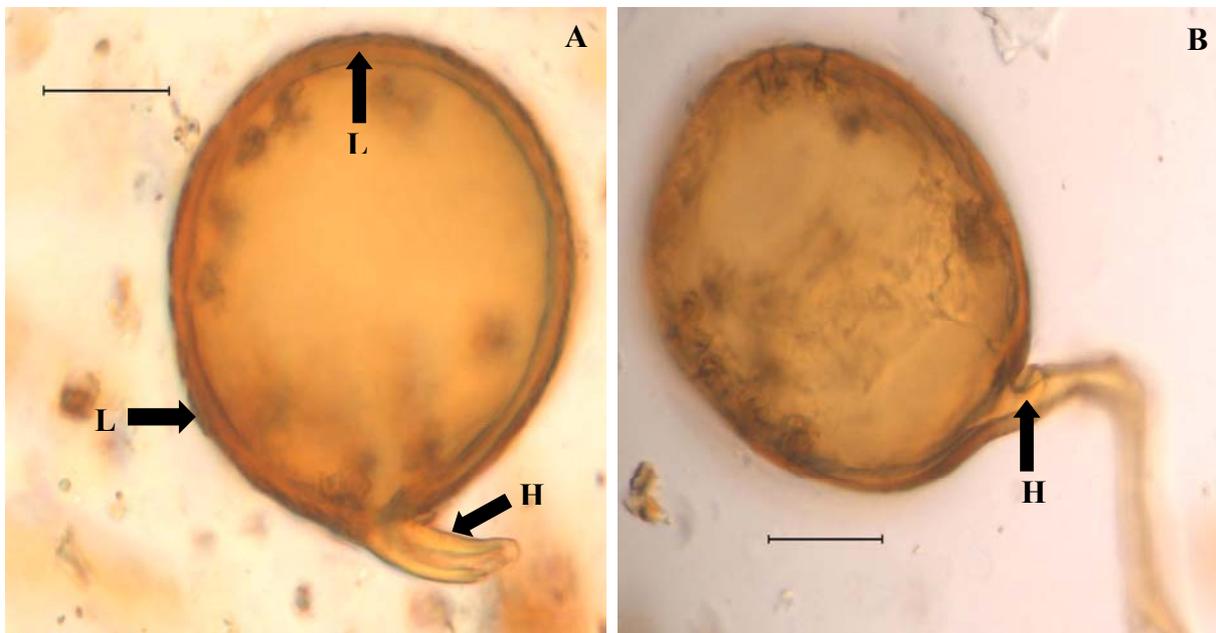
Esporas formadas individualmente en el suelo, subglobosas a raramente elipsoides de 365-400 μm , con la superficie lisa, de color verde pálido cuando jóvenes a verde amarillento cuando maduras. Presenta dos paredes (L1 y L2). L1: unitaria amarillo claro de 1.5 μm y L2 laminada amarillo rojizo de 15 μm , el contenido de la espora es lipídico, globular.



Anexo 4.2. *Gigaspora* aff. *gigantea* A) Espora subglobosa mostrando la hifa (H), y la pared (L2) 10x; B) Espora rota mostrando la hifa sustentora (H) y las dos paredes (L1 y L2) 40x. Barra = 30 μm .

Glomus aff. *aggregatum*

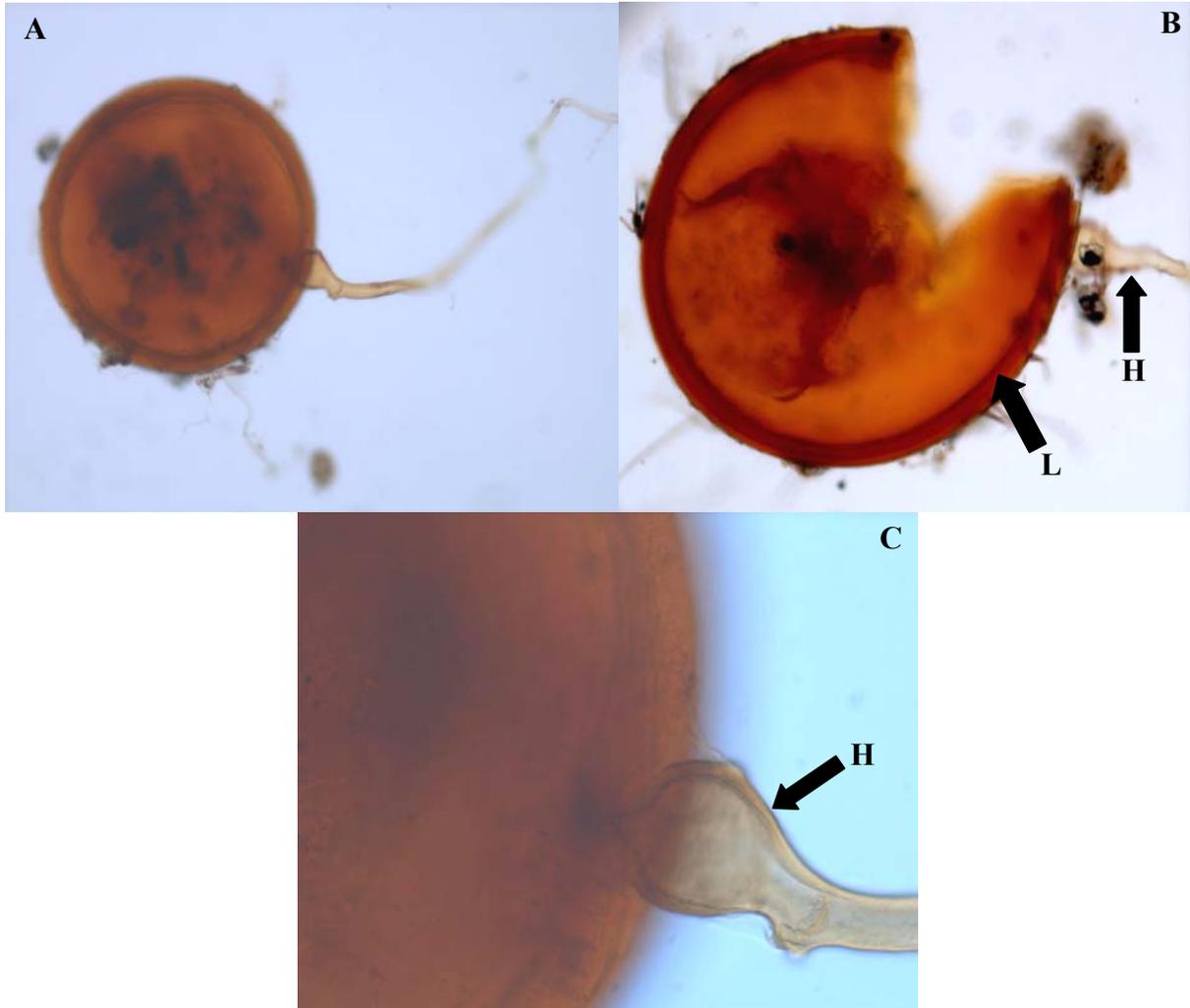
Esporas formadas en esporocarpos laxos en el suelo o dentro de raíces globosas, subglobosas o raramente elipsoides, amarillo claro cuando jóvenes a café claro cuando maduras de 70-100 μm , usualmente con una hifa sustentora simple, recta o curva. Presenta tres paredes (L1, L2, L3), L1 hialina mucilaginosa usualmente ausente en esporas maduras, L2 hialina semiflexible degradada con la edad, L3 laminada café naranja.



Anexo 4.3. *Glomus* aff. *Aggregatum* A) Espora globosa mostrando la hifa curvada (H) y las paredes (L2 y L3); B) Espora madura mostrando la hifa ligeramente constreñida (H) 40x. Barra = 30 μm .

Scutellospora sp

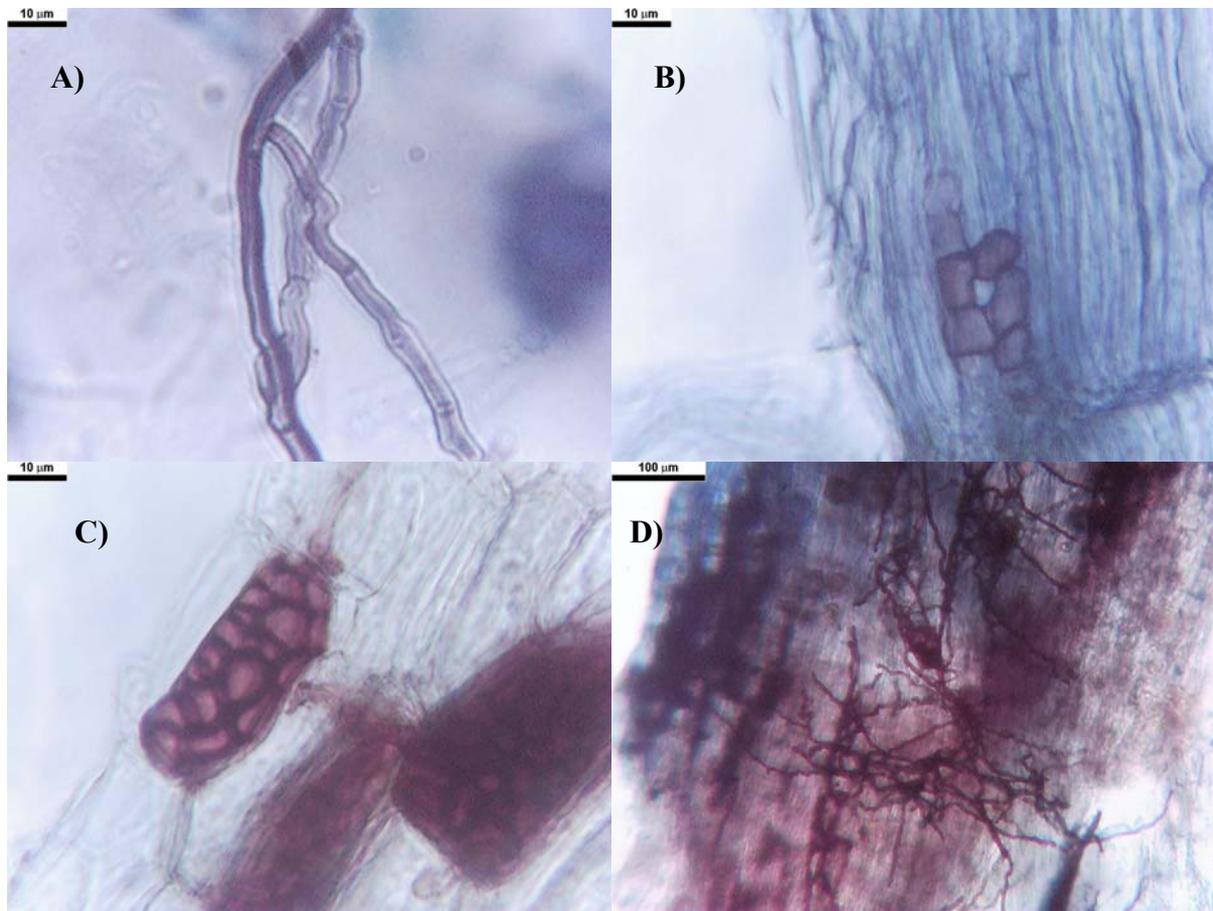
Esporas formadas individualmente en el suelo, de μm , con la superficie lisa, de color amarillo claro cuando jóvenes a naranja rojizo con reactivo de Melzer. Se observa una pared (L).



Anexo 4.4. *Scutellospora sp* A) Espora globosa (10x); B) Espora rota mostrando la hifa sustentora (H) y la pared (L) (10x); C) Acercamiento de la espora y la hifa sustentora (H) (40x).

Dark septated fungi (DSF)

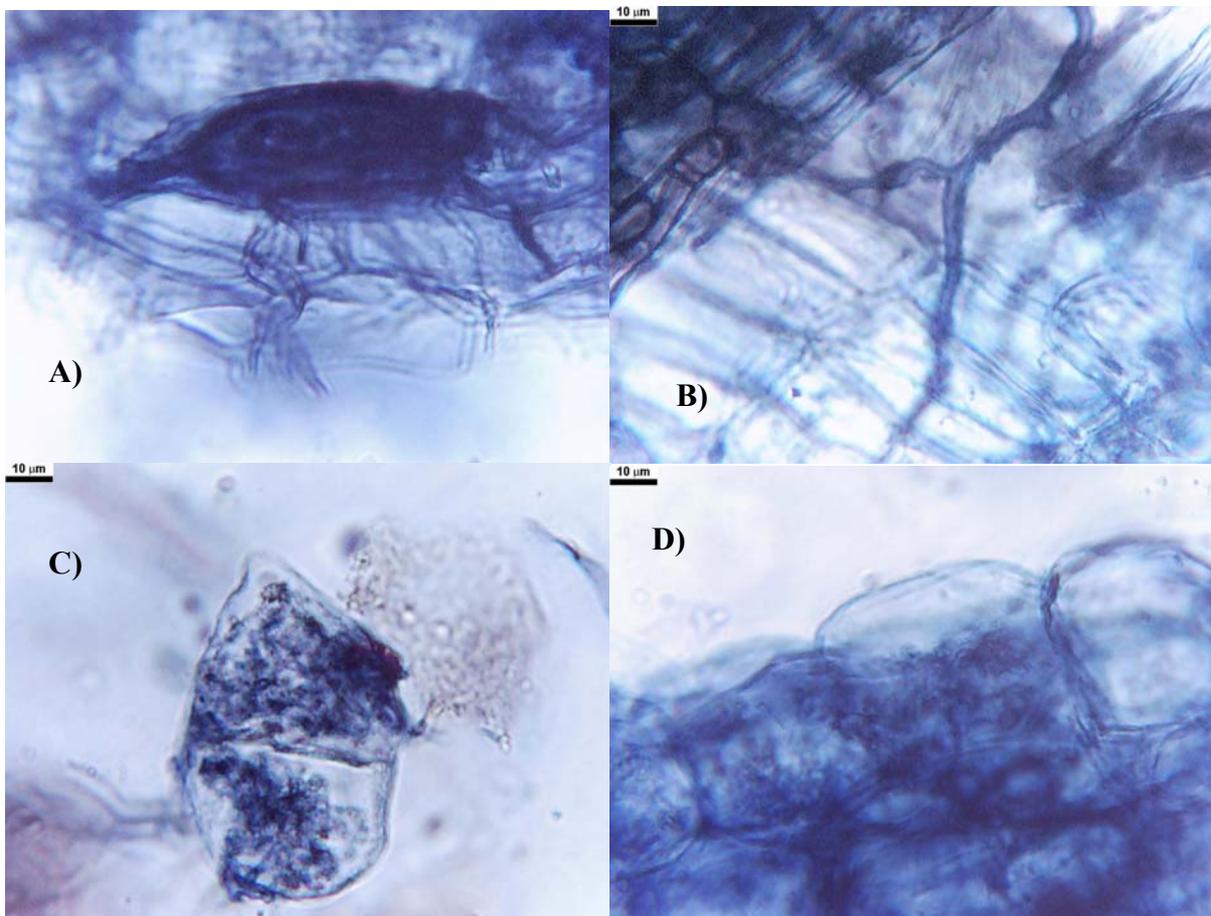
Son hongos endófitos de la raíz septados y oscuros denominados DSF. Su morfología no corresponde a la típica de los hongos micorrízicos. Se ha observado que en determinadas condiciones, estos hongos pueden llegar a ser muy abundantes y no originar daño aparente a las raíces (Girlanda *et al.*, 2002; Grüning *et al.*, 2001; Addy *et al.*, 2000). Estos endófitos cuentan con niveles elevados de melanina y con una producción potencial de metabolitos secundarios tóxicos o inhibidores para herbívoros (Mandyam y Jumpponen, 2005). Se han reportado más de 600 especies de hongos que representan a 100 familias y más de 320 géneros. Entre ellos hay saprobios, patógenos y micorrizas. Su clasificación es incierta debido a que un solo taxón varía grandemente (Ari y Trappe, 2001).



Anexo 4.5. Estructuras de Dark Septed Fungi A) hifas; B) inicio del desarrollo de una mórula dentro de una célula; C) células con mórulas y conexiones hifales; y D) tejido sano con hifas y mórulas.

Glomus intrarradices

Cuentan con vesículas que funcionan como un almacén de reservas alimenticias para el hongo; arbuscúlos que son la conexión con la planta y sus carbohidratos; las hifas que sirven como redes de expansión, propagación y conexión con la planta, suelo y otros microorganismos, además de funcionar como estructuras reproductivas debido a que son capaces de infectar y desarrollar al hongo; y las esporas que son netamente estructuras reproductivas.



Anexo 4.6. Estructuras de *G. intrarradices* en células sanas de raíz de aguacate cv. Hass. Imágenes tomadas a los 6 meses posteriores a la inoculación: A) vesícula y su conexión hifal dentro de células, B) hifas, C) arbuscúlos, y D) tejido sano mostrando arbuscúlos, vesículas e hifas.

Anexo 4.7. Correlación de B total en material vegetal de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass (por partes y con planta completa) con el B soluble del suelo.

	BS EN SUELO (mg kg ⁻¹ SS)	BROTOS	HOJAS MEDIAS	HOJAS BASALES	TALLOS	RAÍCES DELGADAS	RAÍCES GRUESAS	BT POR PLANTA	BT (mg kg ⁻¹ MS)
BS EN SUELO (mg kg ⁻¹ SS)	1	0.77 <.0001	0.78 <.0001	0.62 0.0006	0.86 <.0001	0.86 <.0001	0.85 <.0001	0.89 <.0001	0.85 <.0001
BROTOS		1	0.95 <.0001	0.69 <.0001	0.78 <.0001	0.7 <.0001	0.83 <.0001	0.91 <.0001	0.87 <.0001
HOJAS MEDIAS			1	0.74 <.0001	0.82 <.0001	0.75 <.0001	0.89 <.0001	0.95 <.0001	0.93 <.0001
HOJAS BASALES				1	0.71 <.0001	0.57 0.0018	0.62 0.0005	0.77 <.0001	0.71 <.0001
TALLOS					1	0.72 <.0001	0.84 <.0001	0.94 <.0001	0.94 <.0001
RAÍCES DELGADAS						1	0.79 <.0001	0.82 <.0001	0.79 <.0001
RAÍCES GRUESAS							1	0.94 <.0001	0.93 <.0001
BT POR PLANTA								1	0.98 <.0001

BT= boro total; BS= boro soluble; SS= suelo seco y; MS= materia seca.