

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO ECOSISTEMAS AGROFORESTALES



CLOROSIS FÉRRICA:
CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA
DE ABSORCIÓN DE Fe EN UN PATRÓN
DE CÍTRICOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Alumno:

Mary-Rus Martínez Cuenca

Tutor:

D. Bernardo Pascual España

Director:

D. Francisco Legaz Paredes

Valencia, Diciembre de 2011

RESUMEN

La clorosis férrica es uno de los estreses abióticos más importantes para las plantas, y como tal, resulta un problema agrícola muy extendido especialmente para aquellos cultivos que se desarrollan en terrenos alcalinos calizos, como es el caso de los cítricos en la Comunidad Valenciana.

El objetivo del presente trabajo es caracterizar el sistema de absorción de hierro en un patrón de cítricos, y determinar su respuesta a nivel fisiológico, bioquímico y molecular en condiciones de ausencia de este elemento, dentro de la “Estrategia I” característica de las plantas dicotiledóneas.

Para la consecución de estos objetivos se utilizó citrange Carrizo, considerado como un patrón de tolerancia moderada a la clorosis férrica. En éste, se evaluó el crecimiento vegetativo, el contenido de Fe en los distintos órganos y el estado del aparato fotosintético. Así mismo, se determinó la capacidad de reducción y acidificación de las raíces, mediante el análisis de las actividades de los principales enzimas involucrados, como son la Quelato Reductasa Férrica (FC-R), la Protón-ATPasa (H^+ -ATPasa) y la Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPCasa). También se identificaron en el genoma de los cítricos, secuencias homólogas a los genes FRO1, FRO2, HA1, HA2, PEPC1, IRT1 e IRT2 de *Arabidopsis thaliana*, que codifican para los enzimas FC-R, H^+ -ATPasa y PEPCasa, así como para los principales transportadores de hierro. Posteriormente, se diseñaron los oligonucleóticos correspondientes que permitieron analizar su expresión génica mediante RT-PCR. Finalmente, se determinó la tasa de absorción de hierro por la raíz y su transporte en la planta mediante la técnica de dilución isotópica.

Los resultados del trabajo mostraron que la ausencia de Fe aumenta la expresión de los genes FRO2, HA1 y PEPC1 de cítricos que codifican para los enzimas FC-R, H^+ -ATPasa y PEPCasa, respectivamente; así como la del gen del transportador férrico IRT1. Este hecho se confirmó por la inducción de las correspondientes actividades enzimáticas, así como con el aumento de la absorción de ^{57}Fe .

De acuerdo con la información obtenida se concluye que la capacidad de absorción de hierro en cítricos aumentó en ausencia de Fe en el medio, debido a la activación de los componentes del sistema de absorción de este elemento. Además, se aprecia que todas las respuestas a la deficiencia de Fe de las raíces están metabólicamente inter-correlacionadas unas con otras y colaboran en la absorción de

este elemento por la planta, solubilizando el Fe mediante la acidificación de la rizosfera, reduciendo el ion Fe^{3+} a Fe^{2+} absorbible por la planta, y activando los transportadores de hierro de la membrana plasmática de la raíz.

ABSTRACT

Iron chlorosis is a major abiotic stress for plants and a widespread agricultural problem especially for those crops grown on alkaline calcareous land, as is the case of citrus in the Valencia region.

The aim of this study is to characterize the iron uptake system in a citrus rootstock, and to determine its physiological, biochemical and molecular response in conditions of absence of this element, within the "Strategy I" characteristic of dicotyledonous plants.

Assays were performed in Carrizo citrange, a citrus rootstock considered of moderate-tolerance to iron chlorosis. Here, we evaluated the vegetative growth, the Fe content in different organs and the photosynthetic system state. Furthermore, we investigated the capacity of reduction and acidification of the roots, by analyzing the activities of the main enzymes involved, such as the chelate iron reductase (FC-R), the proton-ATPase (H^+ -ATPase) and the phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPCase). Also the sequences of the genes homologous to *Arabidopsis thaliana* FRO1, FRO2, HA1, HA2, PEPC1, IRT1 and IRT2, which encode enzymes FC-R, H^+ -ATPase and PEPCase and the main iron transporters, were identified in the genome of citrus. Subsequently, corresponding oligonucleotides were designed and gene expression was analyzed by RT-PCR. Finally, we determined the rate of iron uptake by the root and its transport in the plant by isotope dilution technique.

The results of the study showed that the absence of iron increases the expression of the citrus genes FRO2, HA1 and PEPC1 coding for enzymes FC-R, H^+ -ATPase and PEPCase, respectively, and the ferric transporter IRT1 gene. This was confirmed by the induction of the corresponding enzyme activities, as well as the increase of ^{57}Fe absorption observed.

According to the information obtained it is concluded that, iron absorption capacity in citrus increased in conditions of absence of the element, due to activation of the components of the absorption system. In addition, we also observed that all responses to Fe deficiency in roots are metabolically inter-correlated with each other and collaborate in the absorption of this element by the plant, solubilizing Fe by acidification of the rhizosphere, reducing the Fe^{3+} ion to Fe^{2+} form, better absorbable by the plant, and activating iron transporters of the root plasma membrane.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA CLOROSIS FÉRRICA	1
1.2. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DEL Fe EN LA PLANTA	2
1.2.1. Fotosíntesis	3
1.2.2. Sistemas enzimáticos	5
1.2.3. Hierro de reserva	7
1.3. BIODISPONIBILIDAD DEL Fe Y CAUSAS DE LA CLOROSIS FÉRRICA	7
1.3.1. Factores relacionados con la disponibilidad de Fe en el suelo	8
1.3.1.1. Componentes químicos del suelo	8
1.3.1.2. Componentes físicos del suelo	12
1.3.2. Factores relacionados con la absorción de Fe por la planta	12
1.4. SINTOMATOLOGÍA DE LA DEFICIENCIA DE Fe	14
1.5. ABSORCIÓN DE Fe POR LA PLANTA	15
1.5.1. Estrategia I	16
1.5.1.1. Acidificación de la rizosfera	17
1.5.1.2. Inducción de la capacidad reductasa	19
1.5.1.3. Transporte de Fe(II) al interior de las células de la raíz	20
1.5.1.4. Biosíntesis de ácidos orgánicos	21
1.5.1.5. Excreción de compuestos de bajo peso molecular	24
1.5.1.6. Sinergia de las enzimas H ⁺ -ATPasa, FC-R y PEPCasa en el mecanismo de absorción de Fe	25
1.5.1.7. Cambios en proteínas de la raíz	26
1.5.1.8. Cambios morfológicos en la raíz	26
1.5.2. Estrategia II	27
1.6. DISTRIBUCIÓN DEL Fe EN LOS TEJIDOS DE LA PLANTA	28

2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS	37
3.1. MATERIAL VEGETAL	39
3.2. CONDICIONES DE CULTIVO	39
3.2.1. Siembra y acondicionamiento de la planta previo a los tratamientos	39
3.2.2. Tratamientos diferenciales de Fe para la inducción de la deficiencia de hierro	40
3.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
3.3.1. Selección de hojas para evaluar el estado fotosintético de la planta	40
3.3.2. Marcado de plantas con ⁵⁷ Fe	40
3.3.2.1. Preparación del quelato con ⁵⁷ Fe	41
3.3.2.2. Ensayo de absorción de Fe en la raíz	43
3.3.2.3. Ensayo de transporte de Fe por la planta	44
3.4. MUESTREO DE MATERIAL Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	44
3.4.1. Muestras para análisis de contenido de clorofilas	44
3.4.2. Muestras para análisis concentración de Fe total e isotópico	45
3.4.3. Muestras para análisis de actividades enzimáticas y acidificación	45
3.4.4. Muestras para análisis de expresión génica	45
3.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	46
3.5.1. Determinación del estado fotosintético de la planta	46
3.5.1.1. Análisis de la actividad fotosintética	46
3.5.1.2. Análisis de fluorescencia	46
3.5.1.3. Determinación del índice SPAD	47
3.5.1.4. Determinación del contenido en clorofilas	47
3.5.2. Determinación de Fe total e isotópico en el material vegetal	48
3.5.2.1. Digestión ácida de material vegetal	48
3.5.2.2. Digestión seca del material vegetal	48
3.5.2.3. Análisis de Fe total en el material vegetal	49
3.5.2.4. Análisis de las fracciones isotópicas del Fe en el material vegetal ...	50
3.5.3. Determinación de la capacidad reductora de las raíces	51
3.5.4. Determinación de la capacidad acidificadora de las raíces	52

3.5.4.1. Análisis de la extrusión de protones	52
3.5.4.2. Extracción de las fracciones microsomal y soluble de la célula	52
3.5.4.3. Análisis de la actividad de la enzima Protón-ATPasa	53
3.5.4.4. Análisis de la actividad de la enzima Fosfoenol Piruvato Carboxilasa	54
3.5.4.5. Análisis del contenido en proteína	54
3.5.5. Determinación de la expresión génica	55
3.5.5.1. Diseño de los principales genes relacionados con la absorción de hierro en cítricos	55
3.5.5.2. Extracción del RNA mensajero de las raíces	56
3.5.5.3. Análisis de calidad y cantidad del RNA mensajero	57
3.5.5.4. Análisis de la expresión génica en tiempo real (RT-PCR)	57
 3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	 58
 4. RESULTADOS	 59
4.1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO EN LA PLANTA	61
4.1.1. Sintomatología	61
4.1.2. Biomasa y su distribución relativa	61
4.1.3. Estado fotosintético de la planta	62
4.1.3.1. Actividad fotosintética	62
4.1.3.2. Fluorescencia	63
4.1.3.3. Contenido en clorofilas	64
4.1.4. Distribución del Fe en la planta	64
4.1.4.1. Concentración Fe total, contenido y distribución relativa	64
4.2. RESPUESTA DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DE ABSORCIÓN DE HIERRO ANTE LA DEFICIENCIA	65
4.2.1. Capacidad acidificadora de las raíces	65
4.2.1.1. Extrusión de protones	65
4.2.1.2. Enzima Protón-ATPasa	66
4.2.2. Capacidad reductora de las raíces	68
4.2.3. Bioíntesis ácidos orgánicos: Enzima Fosfoenol Piruvato Carboxilasa	69
4.2.4. Absorción de Fe en el interior de las raíces	70

4.2.4.1. Establecimiento del tiempo de marcado óptimo	70
4.2.4.2. Tasa de absorción de las raíces	71
4.2.4.3. Transportador férrico	72
4.2.5. Transporte de Fe, reparto en la planta	73
4.2.5.1. Distribución porcentual de fracciones isotópicas	73
4.2.5.2. Contenido en ⁵⁷ Fe y distribución relativa	74
5. DISCUSIÓN	77
6. CONCLUSIONES	89
7. BIBLIOGRAFÍA	93

TABLAS

Tabla 1. Relación de los isótopos estables del hierro: abundancia de éstos en la naturaleza y en el quelato de hierro marcado ($^{57}\text{FeEDDHA}$)	41
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados como cebadores para RT-PCR	56
Tabla 3. Biomasa de los distintos órganos y del total de la planta y su distribución relativa	62
Tabla 4. Análisis de parámetros de intercambio gaseoso	61
Tabla 5. Análisis de parámetros de fluorescencia	63
Tabla 6. Índice de SPAD y concentración de clorofilas	64
Tabla 7. Concentración de Fe total, contenido en Fe total y su distribución relativa en los distintos órganos y del total de la planta	65
Tabla 8. Tasa de absorción de ^{57}Fe por el sistema radical en función del tiempo de exposición a un quelato marcado	71
Tabla 9. Abundancia de los isótopos de Fe en los distintos órganos de la planta tras un periodo marcado de 1 semana con $^{57}\text{FeEDDHA}$	74
Tabla 10. Contenido en exceso de ^{57}Fe y su distribución relativa en los distintos órganos y del total de la planta tras marcado con $^{57}\text{FeEDDHA}$	75

FIGURAS

Figura 1. Funciones del Fe en la planta	3
Figura 2. Implicación del hierro en la ruta biosintética de la clorofila	4
Figura 3. Actividad del Fe ³⁺ en varios óxidos e hidróxidos férricos presentes en suelos en función del pH	8
Figura 4. Efecto pH sobre las especies Fe ²⁺ y Fe(OH) ⁺ en comparación con las especies hidrolizadas de Fe(III) en equilibrio con el Fe-suelo	9
Figura 5. Especies hidrolizadas de Fe(III) en equilibrio con el Fe-suelo	10
Figura 6. Clasificación de las plantas en función de su respuesta a la clorosis férrica ..	16
Figura 7. Modelo de absorción de Fe por las raíces de las plantas que desarrollan la Estrategia I	17
Figura 8. Esquema ciclo de biosíntesis de ácidos orgánicos en las células de la raíz ..	23
Figura 9. Modelo de absorción de Fe por las raíces de las plantas que desarrollan la Estrategia II	27
Figura 10. Elaboración de quelato líquido ⁵⁷ Fe-EDDHA en laboratorio	42
Figura 11. Aspecto de las plantas de cítricos inducidas a la clorosis férrica	61
Figura 12. Extrusión de protones	66
Figura 13. Análisis de expresión de los genes HA1 y HA2	67
Figura 14. Análisis de la actividad de la enzima protón-ATPasa (H ⁺ -ATPasa)	67
Figura 15. Análisis de expresión de los genes FRO1 y FRO2	68
Figura 16. Análisis de la actividad de la enzima enzima Quelato Reductasa Férrica (FC-R)	69
Figura 17. Análisis de la expresión del gen PEPC y de la actividad de la enzima Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPCasa)	70
Figura 18. Determinación de la tasa de absorción de hierro	72
Figura 19. Análisis de la expresión del gen del transportador del hierro (IRT1)	73

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA CLOROSIS FÉRRICA

La deficiencia de hierro o clorosis férrica es una de las alteraciones nutricionales más importantes que afecta a la mayor parte de los cultivos, tanto hortícolas como frutales, algunos de ellos de gran interés económico, limitando su rendimiento y causando grandes pérdidas económicas. Esta fisiopatía está asociada generalmente con suelos calizos, que ocupan aproximadamente el 30% de la superficie terrestre (Chen y Barak, 1982) y, afecta especialmente a la mayor parte de plantaciones de frutales que se desarrollan en la cuenca mediterránea, donde son habituales este tipo de suelos (Jaegger y cols. 2000). En Europa, el mayor impacto de la deficiencia de hierro se da en España, donde se estima que unas 284.381 ha destinadas a cultivo de cítricos, melocotoneros, tomate y frutales sufren este problema (M.A.P.A. 2007).

La forma más efectiva de evitar la clorosis férrica es mediante el uso de patrones tolerantes. En el caso de los cítricos, se han observado grandes diferencias entre distintas especies en cuanto a su comportamiento en medios clorosantes y, por ello, algunos de ellos se utilizan como patrones tolerantes a la deficiencia de hierro (Cooper y cols. 1962; Forner y Alcaide, 1994). Así, el naranjo amargo es conocido por su buena resistencia a la caliza y condiciones adversas del suelo, sin embargo su sensibilidad a la “tristeza” ha obligado a descartarlo en las plantaciones de la Comunidad Valenciana. También son patrones resistentes el mandarino Cleopatra y el *Citrus macrophylla*, mientras que los citranges Troyer y Carrizo son moderadamente tolerantes a esta fisiopatía (Castle y cols. 2009). Las condiciones alcalinas de la mayoría de suelos de la cuenca mediterránea han impedido la difusión de algunos patrones sensibles como el *Poncirus trifoliata* o el Citrumelo 4475. No obstante, la disponibilidad actual de patrones resistentes es todavía muy limitada.

Por ello, la técnica comúnmente utilizada para combatir la clorosis férrica, es la corrección y/o prevención de esta deficiencia mediante la aplicación al suelo de quelatos férricos de síntesis. Los fertilizantes a base de quelatos de hierro sintéticos que se pueden encontrar en el mercado español constituyen un grupo muy numeroso de marcas comerciales, que ha aumentado paulatinamente durante los últimos veinte años. Por ejemplo, en el año 2007 el mercado ofrecía tres veces más marcas de este tipo de productos que en el año 1990 (de Liñán, 1990, 2007). Como principio activo, la mayoría de estos compuestos están basados en las moléculas Fe-EDDHA (etilendiamino-di-o-hidroxifenilacetato ferrato(III)) y FeEDDHMA (etilendiamino-di-

(o-hidroxi-p-metilfenilacetato ferrato(III))), que son las más eficaces en condiciones alcalinas, ya que es máxima su estabilidad frente al pH en el rango de 7-9 (Norvell, 1991) y mínima su reactividad con los componentes del suelo (Álvarez-Fernández y cols. 2002). No obstante, el elevado precio de estos fertilizantes químicos hace que su aplicación esté restringida solamente a cultivos de gran rentabilidad, como es el caso de los frutales y cítricos. En este momento, España es el mayor consumidor europeo de estos fertilizantes, estimándose su consumo anual en unas 3.000 tm. El gasto en tratamientos correctores de carencia de Fe puede suponer hasta el 50% del coste anual de fertilizantes de una explotación agrícola (Sanz y cols. 1992). En concreto, en España en el año 2004, este coste fue estimado en 26 millones de euros (Syngenta Crop Protection, 2005).

Para comprender y mejorar el control de esta carencia en los cítricos, es fundamental identificar los componentes involucrados en la absorción del hierro, profundizar en los mecanismos bioquímicos y genéticos que se activan, así como en la regulación de las señales implicadas en la homeostasis del Fe.

1.2. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DEL Fe EN LA PLANTA

El **hierro** es un micronutriente esencial para las plantas, ya que su facilidad para cambiar de estado de oxidación hace que esté implicado en un gran número de procesos bioquímicos y que sea cofactor de numerosos complejos enzimáticos (Figura 1).

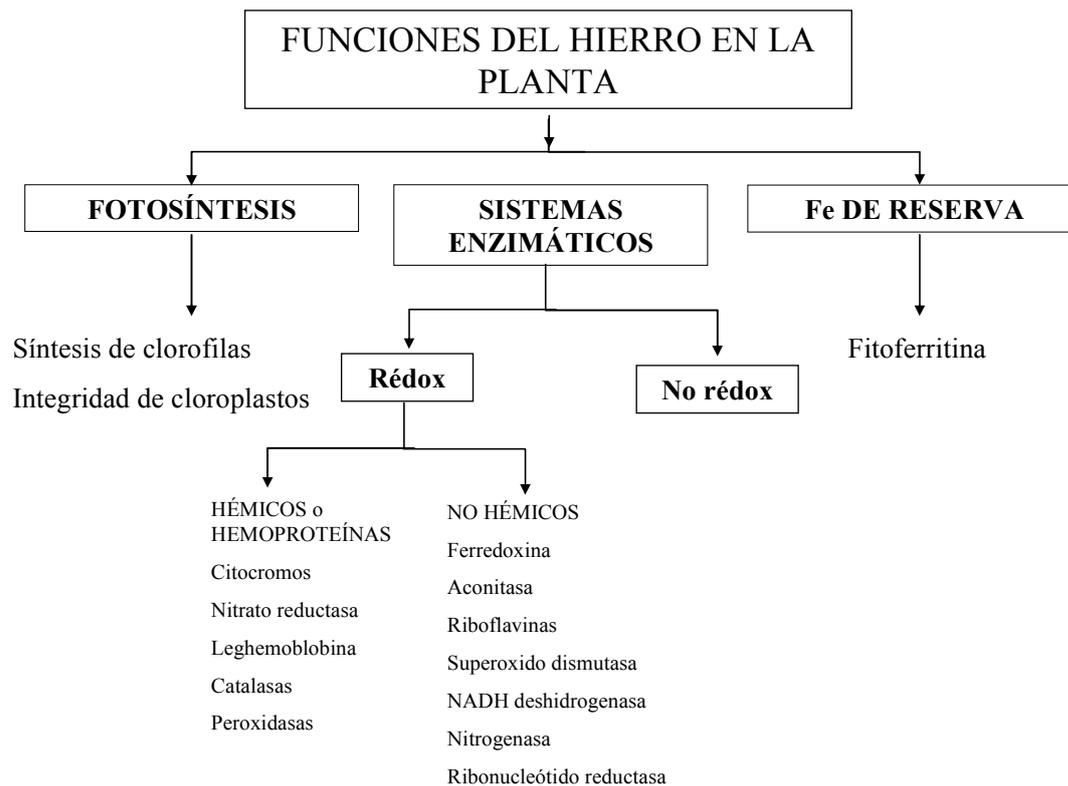


Figura 1. Funciones del Fe en la planta (Álvarez-Fernández, 2000).

1.2.1. Fotosíntesis

El hierro juega un papel muy importante en la fotosíntesis, ya que, participa en varios de los pasos de la ruta biosintética de la clorofila, y regula la actividad del sistema enzimático para la formación de la protoclorofila y de otros pigmentos fotosintéticos (Miller et al., 1984; Marschner, 1995).

La **biosíntesis de las clorofilas** es un proceso complejo, en el que en la primera fase el aminoácido ácido glutámico es convertido en ácido g-aminolevulínico (Figura 2). A partir de ahí, se necesitan varias fases metabólicas para la formación de los cuatro anillos que forman los tetrapirroles. Algunos enzimas de los cloroplastos pueden insertar en el centro del tetrapirrol Mg^{2+} (dando como resultado final la clorofila) o bien Fe^{2+} (para sintetizar grupos hemo). La protoporfirina IX también puede ser exportada del cloroplasto hacia la mitocondria, donde es utilizada para producir citocromos o utilizarse como sustrato para la síntesis del fitocromo (Hans-Walter, 1997; Beale, 1999; Kannangara y Gough, 1978).

De esta manera, la deficiencia de Fe provoca una reducción de los productos de los tetrapirroles involucrados en la síntesis de pigmentos fotosintéticos, sobre todo la

proporción de clorofilas y por eso los pigmentos amarillos (xantofilas y carotenos) predominan en la planta, y son los responsables del amarillamiento foliar.

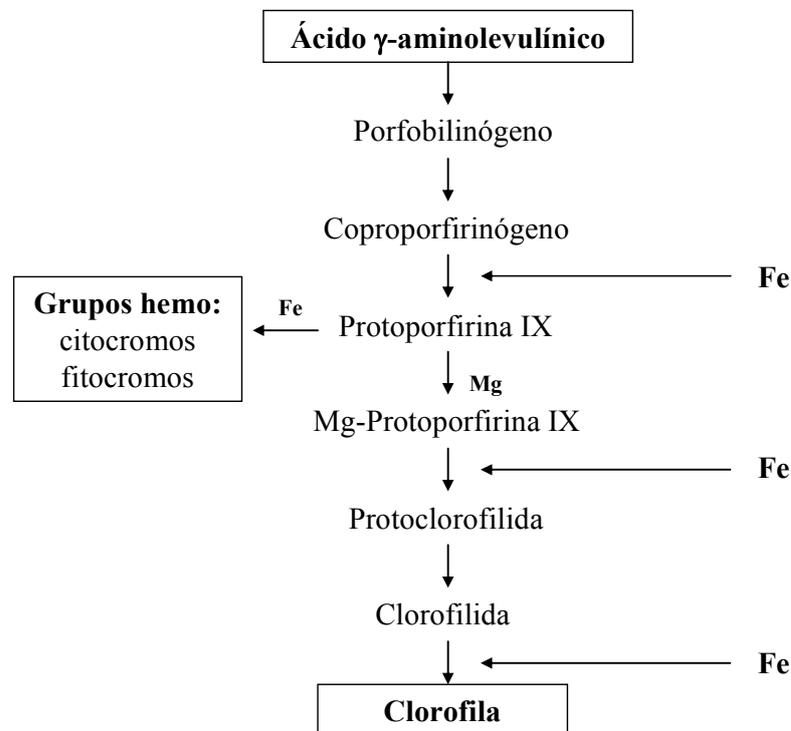


Figura 2. Implicación del hierro en la ruta biosintética de la clorofila.

Los pigmentos fotosintéticos se localizan en las membranas tilacoidales de los cloroplastos asociados con proteínas formando unos complejos, que tienen como función la intercepción y canalización de la energía luminosa a energía química durante el proceso de la fotosíntesis (Seibert, 1993). Los fotones absorbidos en exceso son disipados eficientemente mediante procesos no fotoquímicos (emisión de calor y fluorescencia), existiendo una relación competitiva entre los tres procesos, de forma que cualquier variación en el nivel de utilización de energía por alguno de ellos produce un cambio complementario en los otros. Así, en condiciones de estrés férrico, la tasa de fotosíntesis disminuye, a la vez que la disipación en forma de calor y la fluorescencia aumentan. La relación inversa entre la emisión de fluorescencia de la clorofila a y los procesos fotoquímicos, permite utilizar a la primera como indicador de la eficiencia fotosintética de una planta (Morales 1991; Belkhodja, 1998).

Además, el Fe también es responsable de la morfología, estructura y mantenimiento de los cloroplastos, aunque no parece que afecte al número de éstos por unidad de hoja (Terry y Abadía, 1986; Abadía, 1992; Marschner, 1995). La deficiencia

de hierro disminuye la síntesis de proteínas por la drástica disminución del número de ribosomas y aumento de la concentración de aminoácidos que sufren las hojas cloróticas, pero parece que esta reducción afecta en mayor medida a las proteínas de los cloroplastos que a las citoplásmicas. Funkhouser y Price, (1974) observaron que el contenido de proteínas totales en hojas cloróticas de maíz resultó un 25% inferior al de las hojas testigo, mientras que las proteínas cloroplastidiales disminuyeron en un 82%, sobre todo como consecuencia de la reducción de las proteínas estructurales de los grana.

La reducción en la capacidad fotosintética en condiciones de deficiencia de Fe, se traduce en una disminución de los niveles de azúcares, almidón y algunos aminoácidos, y acumulación de otros, con la consiguiente alteración del espectro de las proteínas, y el enriquecimiento en lípidos grasos insaturados. Todo ello, provoca la alteración del funcionamiento fisiológico de la planta (Abadía, 1992; Terry y Abadía, 1986; Terry y Zayed, 1995).

1.2.2. Sistemas enzimáticos

El hierro se presenta en los vegetales formando parte de un buen número de sistemas enzimáticos importantes para el metabolismo de las plantas, que se pueden dividir en **complejos hémicos** (o hemoproteínas) y no-hémicos, dependiendo de si el ion Fe en la proteína está unido a un anillo de porfirina o no, respectivamente. Dentro del primer grupo tenemos:

- Citocromo: complejo responsable del transporte de energía en los sistemas redox de los cloroplastos, las mitocondrias y la cadena redox de la nitrato reductasa (Clarkson y Hanson, 1980; Marschner, 1995).

- Leghemoglobina: enzima implicada en el proceso de fijación del nitrógeno en leguminosas (Marschner, 1995).

- Catalasa: enzima que interviene en la fotorespiración y en el ciclo de Calvin o vía glicolítica y facilita la dismutación de H_2O_2 en H_2O y O_2 en los cloroplastos (Bar-Akiva y cols. 1978; Römheld y Marschner, 1991).

- Peroxidasa: enzima que favorece la eliminación de H_2O_2 en los cloroplastos, e interviene en la polimerización de fenoles para la biosíntesis de lignina en la rizodermis y endodermis de las raíces (Marschner, 1995).

- Fotocromo: molécula fotosensible esencial para la fotomorfogénesis o desarrollo de la planta (Hans-Walter, 1997; Kannangara y Gough, 1978).

Los **sistemas enzimáticos no-hémicos** se caracterizan porque el Fe está coordinado con un grupo tiol de cisteína o con S inorgánico formando enlaces Fe-S o con ambos (Römheld y Marschner, 1991). Dentro de este grupo tenemos:

- Ferredoxina: componente de los sistemas no hémicos más conocido. Se trata de una proteína férrica que actúa como aceptor final de electrones en un gran número de procesos metabólicos como son la fotosíntesis, la reducción de nitrato y de sulfato (Mengel y Kirkby 2001; Marschner, 1995). Su alto potencial redox le permite reducir sustancias como NADP^+ , nitrato, oxígeno y sulfato.

- Acotinasas: enzima que cataliza la isomerización de citrato a isocitrato en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Hsu y Miller, 1968; Beinert y Kennedy, 1989; Marschner, 1995).

- Riboflavina: molécula necesaria para el crecimiento de las raíces ya que reduce la cantidad de auxina (inhibidor del crecimiento de la raíz). La cantidad de riboflavina en plantas deficientes de Fe es unas 200 veces más elevada que en plantas que crecen en medios con suficiencia de este elemento (Welkie y Miller, 1989).

- Superóxido dismutasa: isoenzima que elimina los radicales libres aniónicos superóxido; se trata de isoenzimas comunes en cloroplastos pero también pueden encontrarse en mitocondrias, peroxisomas y citoplasma (Droillard y Paulin, 1990).

- Ácido aminolevulínico sintetasa y coproporfirinógeno oxidasa: son enzimas relacionadas con la síntesis de porfirinas.

- Xantina oxidasa: isoenzima que tienen funciones en procesos metabólicos tales como la fotosíntesis, la respiración mitocondrial, la fijación de N_2 , la reducción de SO_4^{2-} a SO_3^{2-} , etc.

- Ribonucleótido reductasa: enzima que participa en la síntesis de RNA (Römheld y Marschner, 1991). En este sentido, la deficiencia de Fe provoca la disminución del número de ribosomas en las células de las hojas, pero sólo en caso de deficiencia severa también se ve inhibida la división celular (Abbott, 1967).

- Otras enzimas: hay una serie de enzimas menos conocidas en las que el hierro actúa bien como un componente metálico en reacciones redox o como un elemento de unión entre enzima y sustrato. Entre ellas están las lipoxigenasas que regulan la peroxidación de lípidos, por lo que están implicadas en la senescencia celular y de

tejidos y en las combinaciones incompatibles huésped-patógeno y por tanto, en la resistencia a las enfermedades (Nagarathana et al., 1992).

1.2.3. Hierro de reserva

Finalmente, el hierro libre (hierro que no está complejado a compuestos carbonados) puede interaccionar con el oxígeno para formar aniones superóxido (O_2^-), que dañan las membranas al degradar los componentes lipídicos no saturados. Las células vegetales limitan este daño con el almacenamiento del excedente de hierro en un complejo hierro-proteína llamado “fitoferritina” localizado fundamentalmente en las hojas (Bienfait y Van der Mark, 1983). Esta proteína de reserva $[(FeO.OH)_8(FeO.OPO_3H_2)]$ está formada por 24 subunidades idénticas que forman una esfera hueca con una masa molecular de 480 kDa. El centro de esta esfera contiene entre 5400 y 6200 átomos de Fe(III) como un complejo óxido férrico-fosfato. La fitoferritina constituye la principal reserva de Fe de la planta y supone el 12-23% del Fe total de la planta en materia seca.

En términos cuantitativos, el 65% del Fe presente en las hojas de las plantas está asociado a proteínas; y de esta cantidad, el 35% se acumula en la fitoferritina, el 10% está unido a hemo-proteínas, y otro 20% a sistemas enzimáticos no-hémicos (Price, 1968). Dentro de la hoja, el 80% del Fe se localiza en el cloroplasto (Tiffin y Brown, 1962).

1.3. BIODISPONIBILIDAD DEL Fe Y CAUSAS DE LA CLOROSIS FÉRRICA

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre después de oxígeno, silicio y aluminio, representando el 5% del peso de ésta y el 3.8% de la composición del suelo (Lindsay, 1979; Benavides, 2000). Por ello, la deficiencia de hierro no se produce por un contenido insuficiente de Fe total en el suelo, sino que, normalmente, se trata de una deficiencia inducida por alguna circunstancia que impide que este elemento pueda ser utilizado por la planta.

Las causas desencadenantes de la clorosis férrica se encuentran generalmente en determinados factores del suelo, aunque el genotipo, las condiciones ambientales y el manejo cultural, interactúan en uno u otro sentido sobre esta fisiopatía.

1.3.1. Factores relacionados con la disponibilidad de Fe en el suelo

1.3.1.1. Componentes químicos del suelo.

El hierro se encuentra como Fe(II) en la mayoría de los minerales primarios del suelo (olivino, hornblenda y biotita). Pero durante la meteorización de éstos en medios aerobios, el Fe(II) precipita fundamentalmente como óxidos e hidróxidos de Fe(III), pudiendo coexistir compuestos con distinta composición y grado de cristalización, y por tanto, con distinta solubilidad. De acuerdo con Lindsay (1979, 1991b), la solubilidad de los diferentes óxidos e hidróxidos de Fe depende de:

- Tipo de mineral.

Cuanto más soluble es el mineral de donde procede, mayor es la concentración de Fe disponible en la solución del suelo (Lindsay, 1979; Schwertmann, 1991). Los minerales de Fe se clasifican por su solubilidad según la siguiente secuencia: $\text{Fe}(\text{OH})_3$ amorfo > $\text{Fe}(\text{OH})_3$ del suelo > $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ maghemita > $\gamma\text{-FeOOH}$ lepidocrocita > $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ hematita > $\alpha\text{-FeOOH}$ goetita (Figura 3); donde el óxido de Fe amorfo es el más soluble mientras que la goetita es la de menor solubilidad, y por tanto, el que aparece en el suelo en mayor cantidad.

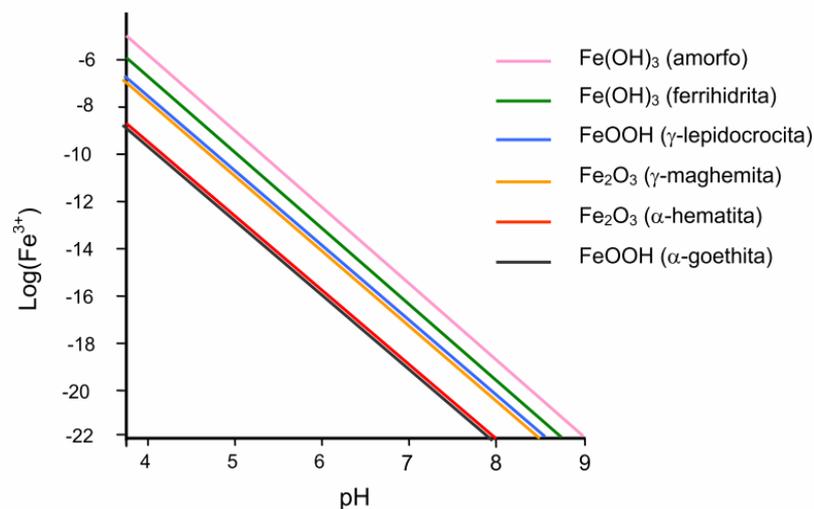
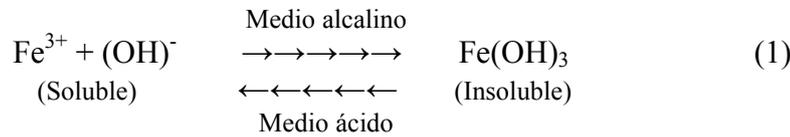


Figura 3. Actividad del Fe^{3+} en varios óxidos e hidróxidos férricos presentes en suelos en función del pH (Lindsay, 1995).

- pH del suelo.

El Fe en el suelo se presenta en dos posibles estados de oxidación: férrico (Fe^{3+}) y ferroso (Fe^{2+}). El predominio de uno u otro, y por tanto la solubilidad del Fe del suelo, está muy relacionado con el pH del suelo, según la siguiente reacción reversible:



De manera que en condiciones ácidas y no oxidantes predominan las formas iónicas solubles (Figura 4).

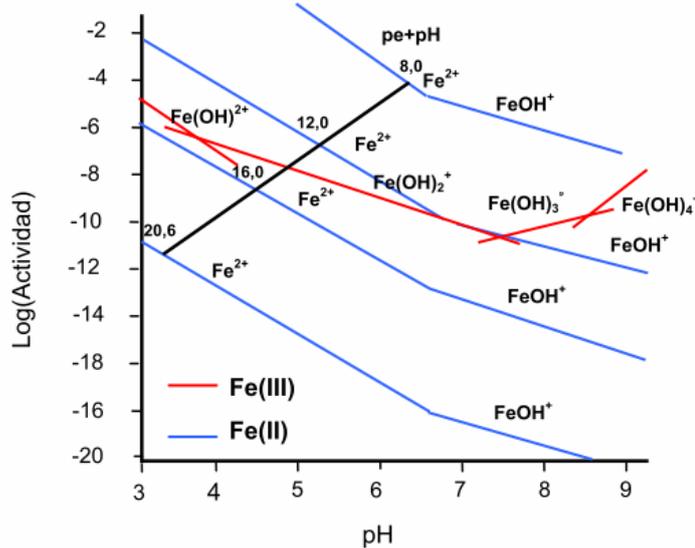


Figura 4. Efecto pH sobre las especies Fe^{2+} y $\text{Fe}(\text{OH})^+$ en comparación con las especies hidrolizadas de Fe(III) en equilibrio con el Fe-suelo (Lindsay y Schwab, 1982).

Sin embargo, en presencia de oxígeno y en medio alcalino, el Fe^{2+} es oxidado rápidamente a Fe^{3+} , el cual es poco soluble en agua; y en donde precipita en forma de óxidos e hidróxidos de Fe^{3+} y otras formas intermedias tales como $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ o $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ (Figura 5), según la reacción:



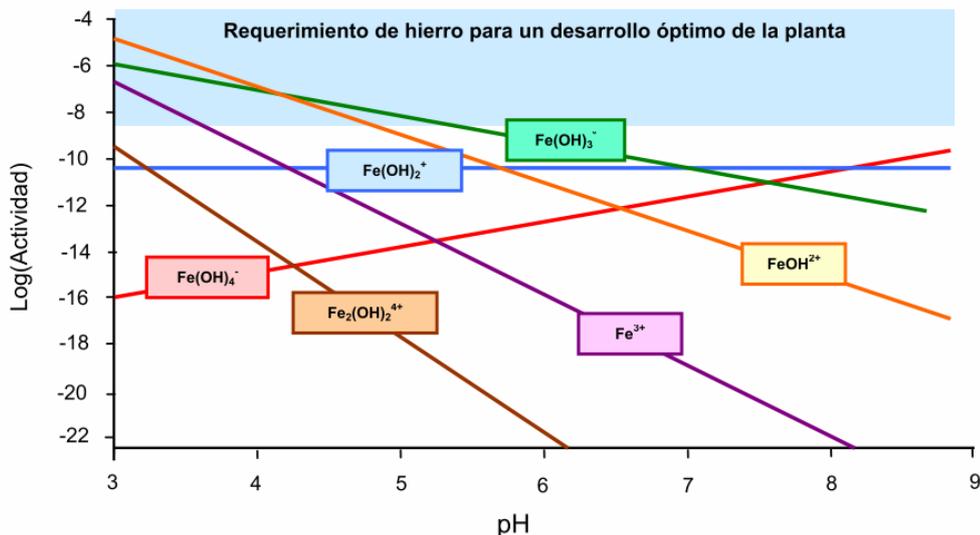


Figura 5. Especies hidrolizadas de Fe(III) en equilibrio con el Fe-suelo (Lindsay, 1979).

El aumento del pH en una sola unidad puede disminuir la solubilidad de los compuestos de hierro hasta 1000 veces reduciendo la concentración de Fe soluble a valores inferiores a 10^{-20} M para un valor de pH entorno a 7.5 (Lindsay, 1995).

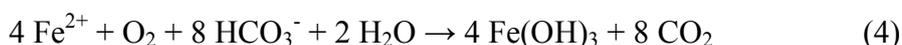
- Contenido de caliza del suelo.

La marcada reacción alcalina de los suelos calcáreos (Figura 5), impide la solubilización del Fe que se encuentra en forma de óxidos e hidróxidos (Lindsay, 1979). En estas condiciones, la concentración de Fe libre es inferior a 10^{-20} M, mientras que los niveles requeridos por la planta son mayores, entre 10^{-9} y 10^{-4} M (Guerinot y Yi, 1994). En consecuencia, este elemento pasa a ser un nutriente deficitario para las plantas.

En los suelos calizos se generan normalmente altas concentraciones de ión bicarbonato controlado por la siguiente reacción:



Esto hace que la mayoría de los suelos calizos tengan un valor de pH que oscila entre 7.5 y 8.5; pudiendo llegar incluso a valores superiores a 9 cuando en los suelos existen contenidos apreciables de NaHCO_3 disuelto. A estos pH la concentración de Fe soluble es bastante baja porque en presencia de bicarbonato también puede formarse hidróxido férrico (Lindsay, 1979, 1991b; Lindsay y Schwab, 1982), mediante la reacción:



Por todo lo anterior, el contenido en ion ferroso de los suelos calizos con una aireación normal, es generalmente muy escaso, predominando el hidróxido férrico, que es la forma termodinámicamente más estable del hierro presente en los suelos, y también la menos soluble, por lo que hace muy difícil su utilización por la planta.

- Encharcamiento.

En suelos con alta humedad y poca aireación (condiciones reductoras) se produce una acumulación de anhídrido carbónico (CO₂), debido a la menor velocidad de difusión de los gases en el agua (Inskeep y Bloom, 1986). Este exceso de CO₂ provoca la aparición de bicarbonato, que se concentra en la solución del suelo por la siguiente reacción:



En estas condiciones, se reduce la cantidad de iones ferrosos a la mitad, debido a la formación de hidróxido férricos (según la reacción (4) explicada en el apartado anterior), mientras que aumentan la de calcio, manganeso, aluminio y sulfatos (Tepe, 1979).

- Formación de complejos.

El Fe tiene capacidad de asociarse con ciertos compuestos naturales, formando complejos estables y facilitando la movilidad de este elemento en la disolución del suelo y su adquisición por la planta (Lindsay, 1991a). Estas moléculas proceden principalmente de la transformación de la materia orgánica (ácidos húmicos y fúlvicos, aminoácidos...), de exudados de las raíces (fitosideróforos) o segregados por algunos microorganismos (sideróforos). Sin embargo, con un exceso de materia orgánica, el Fe puede quedar fijado en compuestos húmicos poco solubles (Sanz-Encinas, 1997).

- Presencia de macroelementos.

El ion Na⁺ puede desplazar al Fe ante los agentes quelantes (Awad, 1988).

En suelos ácidos y con concentración alta de fósforo se pueden formar fosfatos de hierro insolubles (Lindsay y Schwab, 1982).

1.3.1.2. Componentes físicos del suelo.

- Textura del suelo.

En suelos arenosos degradados y con pH bajo, el ion Fe^{2+} solubilizado en el medio ácido es lavado por las lluvias y los riegos, y desplazado a las capas profundas del suelo, y por tanto la concentración de Fe total al alcance de las raíces en estos suelos es muy baja (Mengel y Kirkby, 2001).

Cuando el contenido en arcilla de un suelo es elevado, los iones férricos (Fe^{3+}) pueden quedar adsorbidos por éstas y permanecer fuertemente fijados a ellas, dificultándose de este modo su asimilabilidad (Kashirad y Marschner, 1974; Kolesch y cols. 1987a,b).

- Encharcamiento.

En suelos calizos con textura arcillosa y en condiciones de alta humedad se produce la compactación del suelo y la impermeabilización de las capas superficiales. Esto provoca la falta de aireación del suelo (condiciones reductoras) y la acumulación de ión bicarbonato (según la reacción (5) descrita en el apartado de la química del suelo).

- Concentraciones elevadas de algunos macroelementos.

Los altos niveles de Na^+ y K^+ en el suelo, junto con bajos de Ca^{2+} , degradan la estructura del suelo reduciendo su aireación y alterando las relaciones suelo-agua (Loeppert y cols. 1994). Todo ello afecta, como se ha dicho anteriormente, a la absorción del Fe del suelo.

1.3.2. Factores relacionados con la absorción de Fe por la planta

La clorosis férrica también puede tener su origen en la reducción de la capacidad de absorción de Fe por el sistema radical. Esto puede deberse a:

- Factores ambientales:

Las bajas temperaturas producen la inhibición del crecimiento radicular (Chaney, 1984). En plataneras, el máximo de absorción del Fe se produce por encima de los $37/30^{\circ}\text{C}$ (temperatura día/noche) y cuando las temperaturas descienden hasta los

17/10°C se reduce la cantidad de Fe absorbido en dos o tres veces (Lahav y Turner, 1984).

Por otro lado, las altas temperaturas producen la degradación de fitosideróforos, lo cual afecta directamente a la absorción del Fe en plantas de estrategia II (Bergmann, 1992).

- Presencia de compuestos y/o elementos minerales en altas concentraciones.

El exceso de CO₂ en condiciones de altas temperaturas y suelos encharcados, dificulta la actividad de los enzimas relacionados con la absorción de Fe (Inskeep y Bloom, 1986).

La presencia de bicarbonato en el suelo incrementa el pH en el apoplasto y con ello la inmovilización del Fe. También dificulta la respiración de las raíces, y además, inhibe la síntesis de ácido cítrico, necesario para el transporte del Fe en la planta (Alhendawi y cols. 1997).

La presencia de elevadas concentraciones de otros microelementos en el medio, como Mn (Cohen y cols. 1998; Foy y cols. 1998; Lucena y cols. 2003), Cu (Alcántara y cols. 1994; Barton y cols. 2000; Lucena y cols. 2003), Zn (Cohen y cols. 1998; Lindsay, 1984), pueden afectar el funcionamiento de la reductasa férrica de la raíz, así como competir con el Fe(II) a nivel de absorción. El ejemplo más claro es el ion Zn, que cuando está presente en altas concentraciones puede competir directamente con el Fe²⁺ por el transportador (son de la misma familia) o bien, puede provocar alteraciones estructurales y bioquímicas en los sistemas de transporte que dificulten su afinidad con el Fe²⁺ (Zaharieva y Römheld, 2000).

La presencia de metales pesados, como Cd (Alcántara y cols. 1994; Chang y cols. 2003; Moral y cols. 1994), Pb (Chang y cols. 2003), Co (Barton y cols. 2000), Cr (Barton y cols. 2000) y Ni (Alcántara y cols. 1994; Barton y cols. 2000; Lucena y cols. 2003), además de su posible toxicidad para la planta, pueden afectar al sistema de absorción de las raíces dificultando la reducción, translocación y utilización del Fe (Lucena, 2000).

- Variabilidad genética.

Dentro de la misma especie vegetal, pueden existir variedades eficientes y variedades no eficientes frente a la deficiencia de Fe. Esto ocurre con algunos genotipos de pepino (Rabotti y Zocchi, 2006), alfalfa (Donnini y cols. 2009), guisante (Jelali y

cols. 2010a), vid (Tagliavini y cols. 1995; Dell'Orto y cols. 2000a; Ksouri y cols. 2006), kiwi (Vizzotto y cols. 1999), melocotón (Gogorcena y cols. 2004; Jiménez y cols. 2011) y cítricos (Treeby y Uren, 1993; Manthey y cols. 1994; Castle y cols. 2009).

- Prácticas culturales.

La aplicación abusiva de herbicidas (Udoh y Nelson, 1986), el exceso de riego (Yen y cols. 1988) y las enmiendas orgánicas (Römheld y Marschner, 1986) pueden reducir la absorción de Fe.

1.4. SINTOMATOLOGÍA DE LA DEFICIENCIA DE Fe

La sintomatología de la carencia de Fe en cítricos, como en la mayoría de cultivos, se manifiesta principalmente en las hojas, que pierden su color verde intenso y evolucionan hacia tonos que van desde el verde claro hasta el amarillo pálido, según la intensidad de la afección (Legaz y cols. 1995, 2008). Este hecho es debido a una disminución de la concentración de pigmentos fotosintéticos, fundamentalmente de clorofilas (Abadía y Abadía, 1993). Las nerviaciones de las hojas suelen mantener el color verde oscuro y aparecen remarcadas sobre un fondo más claro semejando una especie de malla o retículo, manifestando así la baja movilidad del Fe incluso dentro de la hoja y su baja distribución hacia las zonas de crecimiento (Chaney, 1984).

La carencia de hierro afecta también al desarrollo y crecimiento de los nuevos órganos en la planta. Las nuevas brotaciones reducen su tamaño como consecuencia de la escasa translocación de este elemento desde las hojas adultas u otros órganos, y son progresivamente menos vigorosas, sus entrenudos más cortos y sus hojas más pequeñas. Si la clorosis se agudiza, se transforma en necrosis y provoca una defoliación prematura de los brotes que conlleva la muerte progresiva de los mismos, comenzando por su zona apical. El crecimiento del sistema radical también se puede ver reducido (Bertoni y cols. 1992).

Los árboles sometidos a condiciones deficitarias de Fe ven afectada su producción de manera especialmente significativa, ya que disminuye el cuajado de frutos (y por tanto, el número de estos) y la calidad de los mismos (Pestana y cols. 2003; Tagliavini y Rombolá, 2001). Con niveles de deficiencia aguda, las naranjas y mandarinas maduras suelen ser de menor tamaño, con la piel suave y falta de color. Es característico que el flavedo adquiera color amarillento, sin alcanzar las tonalidades

anaranjadas-rojizas de los frutos normales. Adicionalmente, la carencia de hierro disminuye el contenido en sólidos solubles totales del zumo (Legaz y cols. 2008). Además, el ciclo vital del árbol se acorta y su fase productiva resulta considerablemente inferior a la normal (Álvarez-Fernández y cols. 2003, 2005), pudiéndose alcanzar la muerte prematura del árbol en casos de deficiencia extrema. Todo ello, provoca importantes repercusiones económicas en una plantación comercial (Miller y cols. 1984).

1.5. ABSORCIÓN DE Fe POR LA PLANTA

Las plantas toman el Fe directamente de la disolución del suelo, mediante un proceso de absorción activa, a través de las raíces (Uren, 1984). El Fe es absorbido principalmente en forma de Fe(II), aunque hay algunas plantas que lo toman como Fe(III) quelado. Cuando la disponibilidad de Fe es suficiente, las plantas utilizan sistemas de transporte de Fe de baja afinidad que absorben la cantidad necesaria para su desarrollo. Altas concentraciones de Fe(II) soluble en el suelo pueden llegar a causar toxicidad, ya que si es absorbido en altas cantidades puede reaccionar con oxígeno y formar radicales libres que dañan componentes celulares como ADN, proteínas, lípidos, etc... (Hell y Stephan, 2003). Sin embargo, bajo condiciones de deficiencia de Fe las plantas inducen sistemas de transporte de alta afinidad (Andrews y cols. 1999; Kaplan, 2002).

Se denominan plantas “no eficientes”, aquellas que ante la deficiencia de Fe pueden permanecer indiferentes o desarrollar reacciones de respuesta con baja intensidad (Figura 6). Por el contrario, las plantas “eficientes” son aquellas que desarrollan eficaces mecanismos de adaptación para aumentar su capacidad para adquirir Fe de la disolución del suelo (Mengel y Kirkby, 2001). El grado de respuesta dentro de cada grupo difiere entre especies, variedades y genotipos (Brown y Jolley, 1988; Shi y cols. 1993).

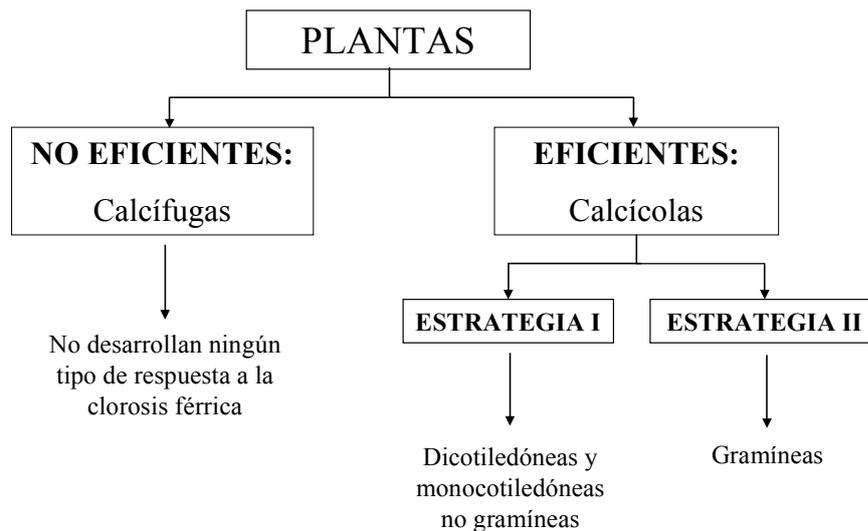


Figura 6. Clasificación de las plantas en función de su respuesta a la clorosis férrica (Mengel y Kirkby, 1982).

Las plantas eficientes han adoptado dos estrategias distintas dependiendo de la forma de adquirir el Fe (Römheld y Marschner, 1986): la Estrategia I de las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas y la Estrategia II de las gramíneas.

1.5.1. Estrategia I

Con el objetivo de aumentar la capacidad de absorción del Fe del suelo, las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas desarrollan una serie de reacciones en respuesta a la deficiencia de Fe, tal como se expone en el esquema expuesto en la Figura 3 (Hell y Stephan, 2003). Éstas se resumen en los siguientes puntos:

i) Acidificación de la rizosfera y del apoplasto de la raíz, para aumentar la solubilidad de Fe^{3+} mediante la excreción de protones por medio de la estimulación de la inducción de la enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Marschner y Römheld, 1994; Rabotti y Zocchi, 2006).

ii) Incremento de la capacidad de reducción del Fe(III) a Fe(II) (forma más soluble) a través de la inducción de la actividad de la enzima FC-R unida a la membrana plasmática (Chaney y cols. 1972; Moog y Brüggemann, 1994).

iii) Activación del transporte del Fe(II) al interior de la célula por medio de la inducción del transportador férrico IRT (Kim y Guerinot, 2007).

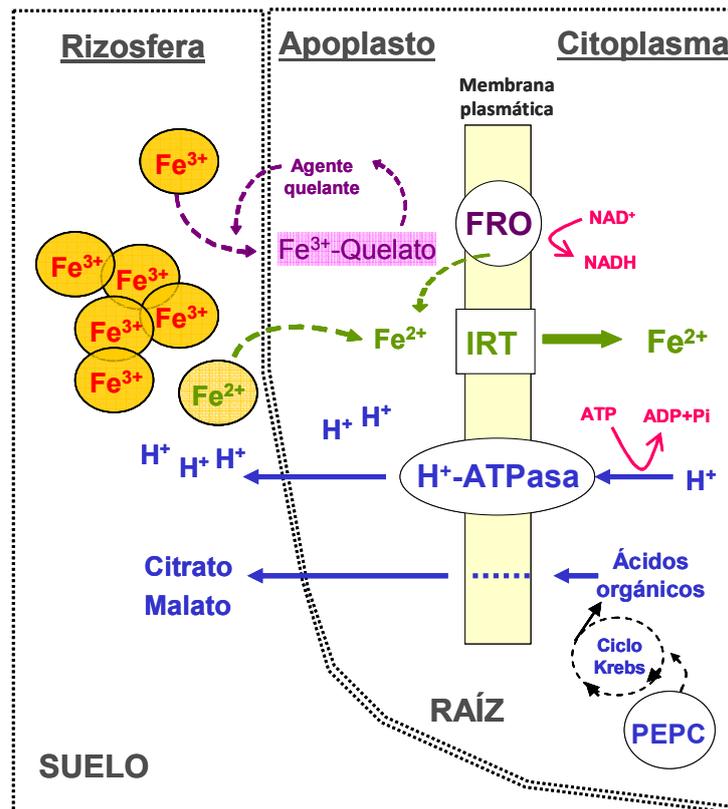


Figura 7. Modelo de absorción de Fe por las raíces de las plantas que desarrollan la Estrategia I (Modificada de Hell y Stephan, 2003). FC-R, enzima FeIII-quelato reductasa, IRT, transportador de Fe(II), H⁺-ATPasa, enzima protón ATPasa; PEPC, enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

1.5.1.1. Acidificación de la rizosfera

Uno de los mecanismos fisiológicos que se estimula en las plantas que desarrollan la estrategia I en condiciones de deficiencia de Fe es la **capacidad de acidificación** de la rizosfera (Rabotti y Zocchi, 2006; Rabotti y cols. 1995; Dell'Orto y cols. 2000; Ksouri y cols. 2006). Las raíces de estas plantas producen un descenso del pH de la solución en la que crecen debido a la activación de una bomba de protones dependiente de ATP, denominada protón-ATPasa (Welkie y Miller, 1993; Susín y cols. 1996), situada en la membrana plasmática de las células subapicales de la raíz (Toulon y cols. 1992). Se han observado valores de inducción de este enzima en plantas deficientes en hierro que oscilan del 18% al 100% según la especie (Rabotti y Zochi, 2006; Valenti y cols. 1991; Susín y cols. 1996; Schmidt y cols. 1997). La liberación de H⁺ en ausencia de Fe va ligada a cambios morfológicos en las raíces de las plantas, ya que se ha visto que favorece la proliferación de raíces laterales y pelos radiculares, así como el engrosamiento de los ápices y el incremento de las células de transferencia en la rizodermis. Estas células rizodérmicas de transferencia son probablemente centros de

flujo de H^+ en las raíces con deficiencia de Fe. Cuando se suministra hierro, el número de estas células disminuye en uno o dos días con la consiguiente reducción de la liberación de H^+ (Römheld y Marschner, 1986). Este tipo de ATPasa ha sido caracterizada bioquímicamente (Serrano, 1989). Se ha observado que su pH óptimo in vitro es de 6.6 (Michelet y Boutry, 1995) y su tamaño molecular de 220-228 kDa, con una subunidad de 100 kDa que constituye la subunidad catalítica del enzima. Existen un total de 6 dominios funcionales en el péptido de 100 kDa (Serrano, 1989). Su funcionamiento se debe a la creación de un intermediario fosforilado, estable a pH ácido, que requiere Mg para su funcionamiento. La enzima H^+ -ATPasa está regulada por una amplia familia de genes denominada HA descrito por primera vez en *Arabidopsis thaliana* (Santi y Schmidt, 2009); y al menos, uno de ellos, el AHA2, se regula en respuesta a la deficiencia de Fe (Fox y Guerinot, 1998).

Esta respuesta del sistema radical ante la deficiencia de Fe, provoca los siguientes efectos:

I) Acidifica el entorno de la raíz en plantas deficientes en Fe, alcanzando hasta aproximadamente 2 mm de distancia de la raíz, incluso en suelos calcáreos (Schaller, 1987), favoreciendo la disolución de las formas de hierro precipitadas en el suelo (Rabotti y cols. 1995).

II) Acidifica el apoplasto radicular, produciéndose el mismo efecto descrito anteriormente también a nivel intercelular (Mengel, 1994; Susín y cols. 1996).

III) Mejora la reducción del Fe(III) ya que favorece la actividad de la enzima Fe(III)-quelato reductasa (Toulon y cols. 1992; Mengel, 1994; Susín y cols. 1996), al facilitarle el pH óptimo para su actividad máxima (pH de 6.5 según Holden y cols. 1991).

IV) Favorece la afinidad de la enzima FC-R por el sustrato, ya que neutraliza la carga negativa del quelato férrico y evita la repulsión con los centros de reducción (Cohen y cols. 1997).

V) Genera un gradiente electroquímico a través de la membrana (negativo en el interior de la célula) que constituye la fuerza motriz para la absorción de Fe^{2+} reducido por la enzima FC-R en el entorno de la raíz (Zocchi y Cocucci, 1990).

VI) Activa la enzima PEPCasa, aumentando la fijación de CO_2 y la consiguiente síntesis de ácidos orgánicos (Rabotti y cols. 1995).

1.5.1.2. Inducción de la capacidad reductora

Para que las plantas de la estrategia I puedan tomar el Fe del suelo, las formas Fe(III) de la solución del suelo deben reducirse a formas Fe(II) (Chaney y cols. 1972). Esta reducción de los compuestos férricos ocurre a través de una enzima denominada Fe(III)-quelato reductasa, FC-R (Chaney y cols. 1972; Bienfait, 1988a; Moog y Brüggemann, 1994), que es específica de la membrana plasmática de las células superficiales de la zona subapical de la raíz (Cohen y cols. 1997). Este enzima es capaz de reducir aceptores externos de electrones de alto potencial como el ferricianuro (+360 mV), así como moléculas de quelatos férricos sintéticos con potenciales menores, entre +100 y +250 mV (Nikolic, 1998). Su máxima actividad se alcanza a pH entre 4 y 5 (Schmidt y Bartels, 1997). La capacidad de las raíces para reducir el Fe³⁺ del medio aumenta en condiciones de deficiencia de Fe y puede llegar a ser 10-20 veces superior a los valores control (Moog y Brüggemann, 1994; Susín y cols. 1996). Además, como se ha dicho anteriormente, la ausencia de Fe favorece el engrosamiento de los ápices y la aparición de pelos radiculares, de manera que aumenta la superficie radicular y por tanto de las zonas reductoras (Kramer y cols. 1980; Römheld y Marschner, 1983; Welkie y Miller, 1993; Moog y Brüggemann, 1994).

La inducción de la enzima como consecuencia de la deficiencia de hierro o con los niveles bajos de éste ha sido descrita por numerosos autores en plantas que siguen la estrategia I de absorción; y que, además, han demostrado la necesidad de su activación para la absorción de Fe (Schmidt, 1999, 2005; Yi y Guerinot, 1996; Jeong y Connolly, 2009; Susín y cols. 1996; Connolly y cols. 2003). Además, el incremento de la capacidad de reducción parece ser fundamental para determinar la mayor o menor tolerancia de un genotipo a la clorosis férrica. Este hecho se ha descrito en cultivos herbáceos, como judía (Krouma y cols. 2006), garbanzo (Mahmoudi y cols. 2007), alfalfa (Andaluz y cols. 2009; M'sehli y cols. 2009) y guisante (Jelali y cols. 2010a); y también en leñosos, como peral (Tagliavini y cols. 1995), vid (Tagliavini y Rombolá, 2001), kiwi (Rombolá y cols. 2002), melocotonero (Gogorcena y cols. 2000, 2004) y cítricos (Treeby y Uren, 1993; Manthey y cols. 1994; Li y cols. 2004; Rivera-Ortíz, 2007). De esta manera, la estrecha relación entre la capacidad de reducción de la enzima FC-R de las raíces y la susceptibilidad a la clorosis férrica se puede utilizar como criterio de selección para la tolerancia a la clorosis de hierro en genotipos nuevos de plantas leñosas (Dell'Orto y cols. 2000; Gogorcena y cols. 2004; Castle y cols. 2009).

Algunos autores aseguran que la presencia de una cantidad mínima de Fe en el medio es un requisito imprescindible para la inducción de la enzima en algunas plantas (Romera y cols. 1996a,b; Gogorcena y cols. 2000). Esta dependencia podría ser debida a la relación de la actividad FC-R con el metabolismo del etileno (Romera y cols. 1996a,b). Sin embargo, esto no se cumple en algunas especies como la remolacha, donde la actividad FC-R es inducida incluso en condiciones de ausencia total de Fe en el medio (Susín y cols. 1996).

Recientemente, se han aislado los genes que codifican la expresión de la enzima FC-R cuyos transcritos se acumulan en respuesta a la deficiencia de Fe (Yi y Guerinot, 1996). Estos genes pertenecen a una superfamilia génica de flavocitocromos que transportan electrones a través de membranas y presentan sitios de unión para FAD y NAD(P)H, que actúan como donadores de electrones para reducir el Fe(III) externo (Robinson y cols. 1999; Li y cols. 2004; Waters y cols. 2002). Al parecer, los genes FRO tienen distintos patrones de expresión y por tanto funciones específicas. En concreto, *Atfro2* es inducida en raíces de *Arabidopsis* (Robinson y cols. 1999), *Psfrol* en raíces, tallos, nódulos y mesófilo de hojas de guisantes (Waters y cols. 2002), y FRO1 en raíces y hojas de tomate (Robinson y cols. 1999). De acuerdo a los autores, el incremento en la expresión del gen FRO2 durante la ausencia de Fe, sería indicativo de que las plantas deficientes en Fe desarrollan un sistema más eficaz para reducir este elemento, y el aislamiento del gen FRO2 tiene implicaciones para la generación de cultivos con mayor calidad nutricional y mejor crecimiento en suelos con bajo nivel de Fe disponible (Robinson y cols. 1999). Con el aporte de Fe la proteína se degrada impidiendo que se produzca una excesiva reducción de hierro y que pueda ser tóxico para la planta (Schmidt, 2006).

1.5.1.3. Transporte de Fe(II) al interior de las células de la raíz

El Fe reducido, Fe(II), es transportado al interior de la célula mediante un **transportador férrico** denominado IRT1. Se trata de una proteína que se localiza en la membrana plasmática y funciona principalmente como un transportador de alta afinidad que regula la absorción de Fe²⁺ en la raíz (Guerinot, 2000; Cohen y cols. 2004). Fox y cols. (1996) observaron un aumento de la absorción de Fe²⁺ en *Pisum sativum* inducida por la deficiencia de Fe, utilizando un quelato enriquecido en ⁵⁹Fe, y sugirieron el aumento de la actividad de una proteína transportadora de Fe²⁺ en el plasmalema. IRT

pertenece a la familia de transportadores metálicos ZIP, que al parecer no son selectivas con el sustrato, pudiendo transportar metales de naturaleza distinta. De hecho, la mayoría de los descubrimientos sobre ellos fueron originariamente como complemento en ensayos de restablecimiento del crecimiento de levaduras, donde se observaban defectos en la absorción de varios micronutrientes (Fe, Zn, Mn). Así, se identificó el transportador ATIRT1 que aunque presenta una alta afinidad por el Fe (Cohen y cols. 2004), también tiene otros sustratos como zinc, manganeso y cadmio (Eide y cols. 1996; Cohen y cols. 1998; Korshunova y cols. 1999; Rogers y cols. 2000).

El gen que codifica la expresión del transportador IRT fue identificado por primera vez en *Arabidopsis* (Eide y cols. 1996; Guerinot, 2000), donde se comprobó la inducción de *Atirt1* y su semejante *Atirt2* en la epidermis de la raíz de plantas sometidas a deficiencia de Fe (Vert y cols. 2001, 2002). Ambos genes codifican para los principales transportadores férricos responsables de participar en aquellos procesos de alta afinidad en la captación del metal (Vert y cols. 2001, 2002, 2009). Sin embargo, si existe un aporte suficiente de Fe, la proteína se degrada evitando la toxicidad del elemento (Connolly y cols. 2002; Schmidt, 2005). También se ha observado una regulación de este tipo para el gen FRO2 de la enzima Fe(III)quelato reductasa (Connolly y cols. 2003). Parece que se requiere de la presencia de cierta cantidad de Fe para inducir la expresión de ambos genes (Vert y cols. 2003). Además, la expresión de IRT en la raíz podría estar controlada por la emisión de señales desde el tallo, incluso con niveles de Fe adecuados en el exterior, que indican el estado nutricional de Fe en la planta (Grusak y Pezeshgi, 1996). Algunas hormonas vegetales (etileno, auxinas) o sus precursores se han propuesto como posibles señales que regulan los mecanismos de respuesta generados por las plantas ante la deficiencia de Fe (Romera y cols. 2005).

1.5.1.4. Biosíntesis de ácidos orgánicos

Las plantas deficientes de Fe se caracterizan por la estimulación de la síntesis **de ácidos orgánicos** en el interior de la célula. La respuesta del metabolismo de los ácidos orgánicos (ciclo de Krebs) inducida por la clorosis férrica, ha sido objeto de estudio en diversas especies, registrándose un aumento de las concentraciones de éstos (principalmente citrato y malato) en diferentes partes de la planta como raíces, hojas y xilema (Jones, 1998; Schmidt, 1999; Marschner y Römheld, 1995; Abadía y cols. 2002).

La síntesis de ácidos orgánicos se lleva a cabo en el interior de la mitocondria. El piruvato es el sustrato previo a la síntesis de ácidos en el ciclo de Krebs (Figura 8). La principal síntesis de piruvato ocurre en el citoplasma de la célula y puede producirse a través de dos rutas: bien de forma directa mediante la fosforilación del fosfoenolpiruvato catalizada por la enzima piruvato quinasa; o bien por la acción de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa). Esta enzima cataliza la carboxilación del fosfoenolpiruvato a oxalacetato, que puede ser posteriormente reducido a malato por la enzima malato deshidrogenasa citosólica, cMDH (Chollet y cols. 1996). El malato citosólico se convierte en piruvato por el enzima málico, bien en el citosol o bien en el interior de la mitocondria, y activa la síntesis del resto de ácidos del ciclo. En condiciones de deficiencia de Fe se ha comprobado la activación de la PEPCasa, y, por tanto, de la segunda ruta descrita (Jones, 1998; De Nisi y Zocchi, 2000; Millar y cols. 1990; Jones y cols. 1996; Chollet y cols. 1996; Abadía y cols. 2002; Andaluz y cols. 2002). Además, también se ha observado que las raíces con deficiencia de hierro tienen una mayor capacidad de fijar el carbono del bicarbonato, y lo asocian a una mayor actividad PEPCasa. La PEPCasa constituye, de este modo, la principal enzima relacionada con el aporte de compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos en tejidos no fotosintéticos bajo condiciones deficitarias de Fe (Chollet y cols. 1996).

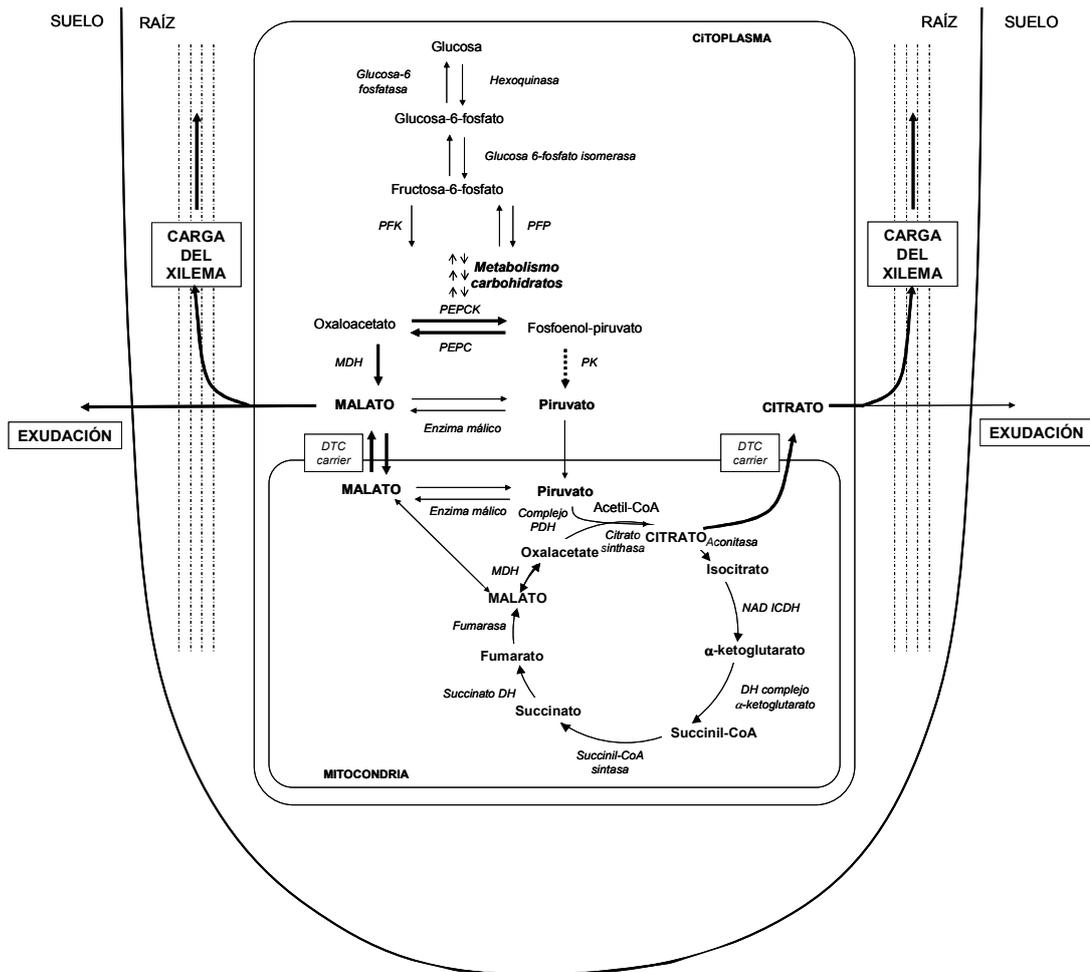


Figura 8. Esquema del ciclo de biosíntesis de ácidos orgánicos en las células de la raíz.

Otros autores sugieren que la elevada síntesis de ácidos orgánicos en condiciones de deficiencia de Fe puede ser debida a un aumento en la glicólisis (de Vos y cols. 1986). En este caso, la enzima fosfofructoquinasa (PFK) se hace insensible a la regulación por citrato (Habison y cols. 1979). Además, la enzima piruvato quinasa (PK) que convierte PEP a piruvato en la glicólisis, se inhibe por el citrato (Goodwin y Mercer, 1983). Ambos hechos provocan un aumento en la concentración de PEP que, a través de la actividad de la PEPC, produce el aumento en la concentración de ácidos.

La función de la síntesis de estos compuestos bajo condiciones de deficiencia de Fe es:

I) Estimular la extrusión de compuestos acidificantes para movilizar las formas Fe^{3+} del suelo (Zocchi y cols. 2007; Jelali y cols. 2010b). Jones (1998) sugiere que

incluso con bajas tasas de exudación de citrato, la cantidad de Fe^{3+} solubilizado es suficiente para satisfacer las necesidades férricas de la planta.

II) Formar complejos con el Fe del suelo para facilitar su absorción por la raíz (Jones y cols. 1996; Gerke, 1997).

III) Participar en la neutralización del pH del citoplasma, en compensación por la extrusión de protones de la enzima H^+ -ATPasa (Landsberg, 1981; de Vos y cols. 1986). El flujo de protones provoca la alcalinización del citoplasma y activa la fijación de CO_2 , asociada a la actividad del enzima PEPCasa (Miller y cols. 1990; López-Millán y cols. 2000). De acuerdo con esta teoría, la carboxilación del fosfoenolpiruvato para formar ácidos orgánicos (principalmente cítrico y málico) retornará el pH del citosol a su valor inicial (Felle, 1988; Bienfait y cols. 1989).

IV) Transportar el Fe a larga distancia desde el sistema radical al resto de los órganos de la planta (Tiffin, 1966a,b; Pich y cols. 1995), principalmente complejoado con el citrato. En este sentido, se ha observado el incremento en la concentración de citrato y malato de la savia de las plantas cultivadas en ausencia de Fe (López-Millán y cols. 2001; Rombolá y cols. 2002), y se ha descrito la proteína FRD3 como responsable de la carga de citrato en el xilema (Durret y cols. 2008). Una proporción significativa de los aniones producidos en las raíces entran a formar parte del pool de compuestos del xilema.

1.5.1.5. Excreción de compuestos de bajo peso molecular

Las raíces de las plantas son capaces de excretar gran variedad de compuestos orgánicos entre los que se encuentran azúcares reductores, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y flavinas, que pueden constituir hasta un 20% del carbono asimilado. El tipo de exudados radiculares está determinado genéticamente, aunque existen factores medioambientales que pueden alterar su composición, tales como el pH, la temperatura, el tipo de suelo, la intensidad de la luz, la edad y el estado nutricional de la planta y la presencia de microorganismos (Jones, 1998).

I) Fenoles: Las plantas deficientes en Fe producen y excretan diferentes compuestos de naturaleza fenólica (Brown y Ambler, 1974; Römheld y Marschner, 1983, 1986): ácido cafeico (Olsen y cols. 1981), ácido fenólico, ácido clorogénico (Hether y cols. 1984) y ácido pcumárico. Probablemente, el papel principal de los

fenoles consista en la inhibición de la degradación de los ácidos orgánicos, cuyo papel en la nutrición férrica como quelantes de Fe es muy importante (Schmidt, 1999).

II) Flavinas: En condiciones de deficiencia de Fe, algunas especies acumulan y excretan flavinas (Welkie y Miller, 1993), tales como la riboflavina (Welkie, 1996) o los sulfatos de riboflavina (Susín y cols. 1994). Se sabe que estas sustancias son capaces de reducir directamente compuestos de Fe(III) en presencia de donadores electrónicos como el NADH o NADPH (González-Vallejo y cols. 1998). Además, los sulfatos de riboflavina ejercen una acción antimicrobiana, disminuyendo la posibilidad de que microorganismos del entorno compitan con la planta en la absorción de Fe (Susín y cols. 1994).

III) Ácidos orgánicos: Pueden llegar a ser el componente más abundante entre los compuestos excretados por las raíces de las plantas ante la deficiencia de Fe (Krafczyk y cols. 1984). En función de sus propiedades de disociación y del número de grupos carboxílicos, los ácidos orgánicos pueden variar su carga negativa y por tanto su capacidad para formar complejos con distintos metales de la solución del suelo. En condiciones de deficiencia de Fe, la función más probable de estos ácidos (citrato, malato) consiste en la solubilización de Fe(III). Cuando el pH del suelo es bajo, forman complejos muy estables con el Fe(III) favoreciendo su disolución en la solución del suelo (Jones y cols. 1996). En suelos calizos, con pH alto, la movilización del Fe por malato y citrato es lenta, puesto que los complejos que se forman son inestables (Jones y cols. 1996; Gerke, 1997). Sin embargo, la combinación del poder acidificante de la enzima H^+ -ATPasa de la raíz con el poder quelante de los ácidos orgánicos (que aumenta según disminuye el pH) podrían constituir un mecanismo viable para movilizar el Fe de la rizosfera (Jones, 1998).

1.5.1.6. Sinergia de las enzimas H^+ -ATPasa, FC-R y PEPCasa en el mecanismo de absorción de Fe

La activación de las capacidades reductora y acidificadora de las raíces, con la deficiencia de hierro se considera como una acción sinérgica de las enzimas FC-R y H^+ -ATPasa para mejorar la adquisición de Fe en la raíz (Rabotti y Zocchi, 2006; Vizzotto y cols. 1999; Dell'Orto y cols. 2000; Donnini y cols. 2009; M'sehli y cols. 2009).

También se ha descrito otro efecto interactivo de ambas enzimas dentro de la célula. El rápido aumento de la actividad FC-R provoca la oxidación de NAD(P)H,

principal donante de electrones para la reducción de compuestos Fe^{3+} . La acumulación de estos protones dentro de la célula, ayuda a bajar el pH en el citosol e induce a su vez la actividad de la H^+ -ATPasa (Rabotti y cols. 1995; Rabotti y Zocchi, 2006).

Finalmente, en ausencia de Fe, se ha observado la despolarización del potencial eléctrico en la membrana de células de judías (Sijmons y cols. 1984), y en menor grado en pepino (Zocchi y Cocucci, 1990). Esto ha sido atribuido a la transferencia de electrones transmembrana que son utilizados por la enzima FC-R durante la reducción del Fe^{3+} (aceptor de electrones). Para garantizar la repolarización de la célula se activa la extrusión de protones y de otros iones como K^+ (Sijmons y cols. 1984; Alcántara y cols. 1991).

La acumulación de ácidos en condiciones de clorosis férrica parece que interviene en el mecanismo de regulación del pH citoplásmico (Landsberg, 1981). El aumento del pH intracelular como consecuencia de la extrusión de protones, conduciría a la activación de la PEPCasa y, por tanto, de la síntesis de ácidos en el ciclo de Krebs (Abadía y cols. 2002). De esta manera, se conseguiría el balance iónico u homeostasis del citoplasma neutralizando el efecto alcalinizante producido por la H^+ -ATPasa.

Sin embargo, algunos autores han descrito la acción individual de alguno de los enzimas como factor predominante en la absorción de Fe. Así, Grusak y cols. (1990) lo atribuyeron a la reducción y Wey y cols. (1997) a la liberación de H^+ . El resultado de la sinergia entre ambas enzimas es el incremento de la absorción de Fe por las plantas.

1.5.1.7. Cambios en las proteínas de la raíz

Distintos trabajos realizados mediante electroforesis y por transcripción in vitro de mRNA de raíz) han demostrado que se producen cambios en la síntesis proteica de distintos polipéptidos en condiciones de deficiencia de Fe (Bienfait, 1988b; Herbig y cols. 1996).

1.5.1.8. Cambios en la morfología de la raíz

Estos cambios consisten en la formación raíces laterales y pelos radiculares, así como el engrosamiento de las zonas subapicales y la estimulación de la formación de células de transferencia (Römheld y Marschner, 1983; Welkie y Miller, 1993; Moog y

Brüggemann, 1994; Kramer y cols. 1980). De esta manera, las raíces de las plantas responden aumentando su superficie de contacto en condiciones de deficiencia de Fe.

1.5.2. Estrategia II

Las raíces de las plantas gramíneas sintetizan y excretan compuestos de bajo peso molecular, llamados fitosideróforos (FS), que forman complejos con el Fe(III) presente en el suelo y posteriormente, son absorbidos sin reducción previa a través de un sistema de transporte de Fe(III)-fitosideróforo de alta afinidad específico de la membrana plasmática de la raíz (Takagi, 1976; Römheld y Marschner, 1986). Estas sustancias son liberadas por las raíces y forman complejos con Fe(III) altamente estables, incrementando así la cantidad de Fe en la solución del suelo (Figura 9).

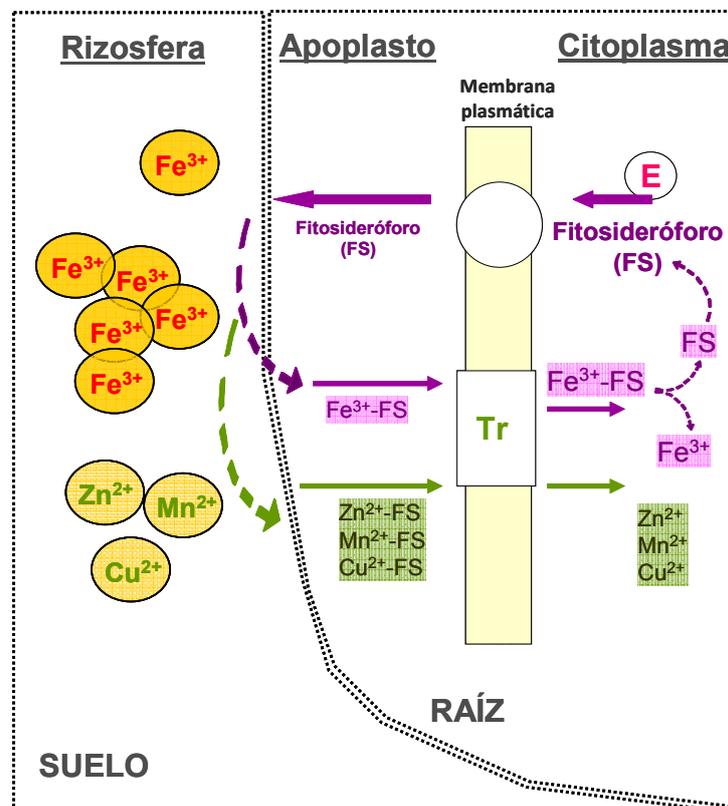


Figura 9. Modelo de absorción de Fe en las raíces de las plantas que desarrollan la Estrategia II (Modificada de Hell y Stephan, 2003). Complejo FeIII-fitosideróforo: (E) incremento en la síntesis y liberación de fitosideróforos, (Tr) Transportador fitosideróforos-Fe³⁺/ otros metales.

Los fitosideróforos se asocian al ácido mugénico y a sus derivados y se sintetizan en las zonas subapicales de la raíz (Marschner y cols. 1987). La naturaleza química de estos compuestos depende de la especie (Marschner y Römheld, 1995), pero parece que la metionina es el precursor común en su biosíntesis y la nicotinamina (NA)

un intermediario (Shojima et al., 1990). El ciclo de síntesis de la metionina sufre una gran activación en las raíces de las plantas deficientes en hierro por la demanda de metionina para la síntesis de fitosideróforos (Kobayashi et al., 2006). El mecanismo de excreción de FS todavía no está claro, pero se ha sugerido que se produce a través de vesículas (Negishi y cols. 2002).

En condiciones de deficiencia de Fe, las plantas gramíneas incrementan la biosíntesis de FS, con aumentos de hasta 20 veces respecto a las plantas control (Takagi y cols. 1984), y alcanzando concentraciones en el suelo de hasta 1 mM (Romera y de la Guardia, 1991). También aumentan la velocidad de absorción de FS al interior del sistema radical y de recambio del transportador; y, por tanto, la capacidad de transporte (Kawai y cols. 1988; Hansen y cols. 1996; Kawai y Alam, 2005). Mori y Nishizawa (1987) propusieron un mecanismo de cotransporte de la excreción de fitosideróforos acoplado a protones o iones potasio.

La liberación de FS depende de la temperatura, mostrando máximos diurnos (Kawai y Alam, 2005; Takagi, 1993). El transporte del complejo hasta el citoplasma de la célula se realiza a través de una proteína de alta especificidad y selectividad denominada YS1 (Curie y cols. 2001), constitutiva de la membrana plasmática de las células apicales de la raíz (Marschner y Römheld, 1995).

Esta proteína está regulada por la deficiencia de Fe en raíz y en tallo y permite también el transporte del complejo Fe(II)-NA y, posiblemente, otros metales (Hell y Stephan, 2003). Una vez que el complejo se encuentra en el citosol, el Fe³⁺ es liberado y el FS se degrada o se excreta al exterior nuevamente.

1.6. METABOLISMO DEL Fe EN EL INTERIOR DE LA PLANTA Y DISTRIBUCIÓN EN LOS DISTINTOS TEJIDOS

El Fe en el interior de la planta puede encontrarse formando parte de reservorios o acervos inactivos que no son utilizables, pudiendo existir una deficiencia de Fe en la planta aunque las concentraciones de Fe en la misma puedan parecer adecuadas. De tal forma, en muchas ocasiones, el contenido de hierro en las hojas cloróticas es similar o incluso superior al de las hojas verdes (Römheld, 2000; Nikolic y Römheld, 2002; Morales y cols. 1998). A este fenómeno se le conoce como “paradoja del hierro” (Römheld, 1997; Morales y cols. 1998).

La causa puede ser la precipitación e inactivación del Fe en el apoplasto de la planta debido a la alcalinización de éste por presencia de bicarbonato (Mengel, 1994; Lucena, 2000; Romera y cols. 1992) y la consiguiente reducción de la actividad FC-R en la raíz de las plantas deficientes (Brüggermann y cols. 1993; Kosegarten y cols. 1999; Susín y cols. 1996; Toulon y cols. 1992). También, un alto suministro de P provoca la presencia de altas cantidades de fosfato en el interior de la planta y la precipitación del Fe en forma de fosfatos férricos no disponibles (Kolesch y cols. 1987a,b). La absorción de nitrato y su posterior reducción a amonio en el apoplasto de la raíz también dificulta la actividad FC-R (Lucena, 2000; Kosegarten y cols. 1998). Estos hechos sugieren que la clorosis férrica aparte de ser un efecto de la escasa disponibilidad de Fe en el suelo, está también relacionado con procesos metabólicos en raíces y hojas (Mengel, 1994).

El recorrido que el Fe tiene que realizar desde la raíz hasta el cloroplasto, puede presentar etapas críticas que originen la clorosis férrica. La toma de Fe y otros micronutrientes por la planta comienza en el apoplasto de las células epidérmicas de la raíz (Sattelmacher, 2001) y es transportado a la parte aérea vía xilema. El Fe^{3+} del apoplasto, en las plantas de estrategia I, debe ser reducido a Fe(II) a través del sistema enzimático Fe(III)-quelato reductasa. Posteriormente, el Fe(II) en plantas de estrategia I o el complejo Fe(III)-FS en plantas de estrategia II, es transportado al interior de la célula mediante los transportadores de membrana específicos. Sin embargo, no todo el Fe del apoplasto entra en la célula. En condiciones de buena aireación, parte de este Fe se oxida y precipita en forma de oxihidróxidos o fosfatos formando una reserva de Fe (Bienfait y cols. 1985).

Una vez en el citoplasma de la célula, el Fe libre debe ser protegido de la oxidación para evitar su precipitación y la formación de radicales superóxido o hidroxilo (Hell y Stephan, 2003). Esto hace suponer que el Fe en el citoplasma está unido a algún tipo de compuesto que evite estos efectos. Distintos autores (Pich y cols. 1997; Scholz y cols. 1988) han propuesto la nicotianamina (NA) como principal complejante del Fe libre en las células. El transporte de Fe desde las células epidérmicas de la raíz hasta el xilema se realiza a través del simplasto y como complejo Fe(II)-NA. Una vez allí, es probablemente oxidado a Fe^{3+} (Landsberg, 1984; Von Wirén y cols. 1999; Hell y Stephan, 2003) y transportado a larga distancia a las partes superiores de la planta unido principalmente a citrato (Chaney, 1989; López-Millán y cols. 2001; Tiffin,

1966a,b), o a otros aniones orgánicos, como malato o malonato (Brown, 1963; Chaney, 1989) e incluso con otro tipo de sustancias orgánicas (Cataldo y cols. 1988).

Se ha comentado que a veces el contenido de Fe en las hojas cloróticas es superior al de las hojas verdes, indicando que la clorosis férrica no es sólo un problema de transporte de Fe desde la raíz a la parte aérea, sino que también está relacionada con la distribución en las hojas. Una vez que el Fe^{3+} llega a las hojas debe ser reducido para entrar en las células (Jolley y cols. 1987; Mengel y Geurtzen, 1988). Para esta reducción se ha propuesto la existencia de una enzima Fe(III)-quelato reductasa situada en la membrana plasmática del mesófilo de la hoja (Brüggermann y cols. 1993; González-Vallejo y cols. 1999; de la Guardia y Alcántara, 1996; Larbi y cols. 2001). Esta reductasa utiliza citrato férrico u otro quelato como fuente de Fe, y la energía necesaria para la reducción procede de la luz (Bienfait y Scheffers, 1992; Jolley y cols. 1987; Laulhère y cols. 1990). La enzima Fe(III)-quelato reductasa del mesófilo alcanza su actividad máxima en un intervalo de pH de 6.3 a 6.8 en hojas cloróticas de varias especies vegetales (Wagner y Moog, 1997). Este hecho junto con el incremento del pH apoplástico en las hojas cloróticas (Mengel, 1994; López-Millán y cols. 2001), podría inhibir el paso de Fe al interior de la célula.

Tras la reducción, el Fe(II) entra en el interior de las células de la hoja, supuestamente de manera similar a como lo hace en la raíz. Por ejemplo, en *Arabidopsis* se ha encontrado que los genes FRO de la enzima Fe(III)-quelato reductasa e IRT del transportador, no sólo se expresan en la raíz sino también en la hoja (Bäuer y cols. 2004).

El cloroplasto es el destino final de una gran parte del Fe en la planta (Terry y Abadía, 1986). El transporte de Fe hacia el interior del cloroplasto es activo y dependiente de la luz (Bughio y cols. 1997a,b). Una vez el Fe alcanza su destino final, si no va a ser utilizado, se almacenará en forma de proteína no tóxica, fitoferritina, pudiendo liberarse según las necesidades de la planta (Briat, 1996; Briat y Lobreaux, 1997). Otro destino del Fe podría ser la mitocondria, que es el orgánulo donde se generan proteínas con enlace Fe-S (Kushnir y cols. 2001).

Aunque el transporte de Fe se realiza, principalmente, vía xilema siguiendo la dirección del flujo de masas creado por la transpiración; este elemento se puede concentrar también en órganos en crecimiento, donde la intensidad de la transpiración es menor debido a una estructura incompleta del xilema (Landsberg, 1984). La removilización del Fe desde los órganos maduros a los jóvenes o en crecimiento a

través del floema depende también de la NA (Schölz, 1989; Stephan y Schölz, 1993; Hell y Stephan, 2003).

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es caracterizar el sistema de absorción de hierro de una planta modelo de cítricos (citrange Carrizo) ante la deficiencia de este elemento. Como objetivos parciales se pretende:

2. Evaluar los cambios fisiológicos que se producen en la planta ante la deficiencia de Fe.
3. Analizar la respuesta de los distintos componentes del sistema de absorción de Fe por los cítricos ante la deficiencia de Fe, así como su regulación por este elemento.
4. Determinar las tasas de absorción y transporte de ^{57}Fe en respuesta a la concentración de Fe en el medio.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Los estudios se llevaron a cabo en plantas procedentes de semillas del patrón citrange Carrizo [(*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.)) Raf., uno de los patrones de cítricos más utilizados en la Citricultura Valenciana. Las semillas utilizadas se adquirieron en la empresa Viveros Alcanar S.A.T nº1398 (Tarragona, España).

3.2. CONDICIONES DE CULTIVO

3.2.1. Siembra y acondicionamiento de la planta previo a los tratamientos

La siembra se hizo en contenedores de 0.5 L de capacidad utilizando como suelo un sustrato estéril compuesto de turba, fibra de coco, arena y perlita en la siguiente proporción: 50:25:20:5, suplementado con 1.38 g kg⁻¹ de superfosfato cálcico. Para garantizar el perfecto control de las condiciones de cultivo, se germinaron en una cámara de cultivo (Sanyo MCR-350H, Sanyo Electric Biochemical Co, Japón) a 25°C, 80% de humedad relativa y ciclos de luz (200 μmol m⁻² s⁻¹, 400-700 nm) y oscuridad de 16-8 horas, respectivamente.

Cuando las plántulas tuvieron 2 hojas verdaderas se iniciaron los riegos con una solución nutritiva aplicando todos los macro y micronutrientes descrita por Hoagland y Arnon (1950), adaptada para plantas de semillero (dilución 1/2): 3 mM Ca(NO₃)₂, 3 mM KNO₃, 2 mM MgSO₄, 2.3 mM H₃PO₄ y micronutrientes. El pH de la solución se ajustó a 6.0 mediante adición de 1 M KOH ó 1 M H₂SO₄. Se realizaron 2 riegos semanales durante 8 semanas.

Transcurrido este tiempo, las plántulas de desarrollo similar fueron transplantadas individualmente a contenedores de plástico negro de 0.5 L. de capacidad, utilizando arena gruesa como sustrato. Las macetas se mantuvieron en un invernadero de cristal con luz suplementaria (200 μmol m⁻² s⁻¹, 400-700 nm) para extender el fotoperiodo a 16 horas. Las condiciones térmicas oscilaron de 16-18°C por la noche a 26-28°C por el día, y la humedad relativa se mantuvo en torno al 80%. Se regaron dos veces por semana hasta el inicio del experimento con la solución nutritiva descrita anteriormente.

3.2.2. Tratamientos diferenciales de Fe para la inducción de la deficiencia de hierro

Tras un tiempo de aclimatación de 7 días, se seleccionaron las plántulas de desarrollo similar y se formaron 2 grupos homogéneos. Desde este momento en cada grupo se desarrolló un programa diferencial de abonado. A uno se le aplicó la solución de riego de macro y micro nutrientes anterior (con 20 μM Fe-EDDHA, tratamiento control, Ct) y al otro se le suprimió el aporte de Fe (tratamiento -Fe).

En cada riego se suministraron 200 mL de solución por planta para garantizar el drenaje fuera de la maceta y evitar de esta manera la acumulación de sales en la arena. Los tratamientos se mantuvieron durante 8 semanas.

3.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.3.1. Selección de hojas para evaluar el estado fotosintético de la planta

Al cabo de los dos meses de inducción de la clorosis, las plantas que se regaron con solución nutritiva en ausencia de hierro mostraron síntomas de clorosis férrica en las hojas brotadas durante el tratamiento; mientras que las regadas con hierro carecían de dichos síntomas. Se escogieron 20 plantas representativas de cada tratamiento y en cada una se seleccionó una hoja (4ª hoja adulta desde el ápice de la planta) que se identificó con una etiqueta. Estas hojas se utilizaron para analizar los siguientes parámetros fotosintéticos: fotosíntesis, fluorescencia y clorofilas.

3.3.2. Marcado de plantas con ^{57}Fe

Para cuantificar el hierro absorbido por las plantas se utilizó la técnica de dilución isotópica. Ésta se basa en la alteración intencionada de la abundancia natural de uno de los isótopos del Fe en el sistema de estudio. Para ello, se adiciona una cantidad conocida de un compuesto de Fe con una abundancia isotópica alterada (enriquecido), que se comporta como trazador.

El hierro tiene cuatro isótopos estables en función del número de neutrones de los átomos de Fe. En este caso utilizamos el isótopo del hierro que tiene 57 neutrones (^{57}Fe). La abundancia natural en este isótopo es del 2.199% (Dauphas y Rouxel, 2006) y

se aplicó en una concentración de ^{57}Fe del 95.194%, que equivale a un enriquecimiento del 92,995% en ^{57}Fe (Tabla 1). El término enriquecimiento hace referencia al porcentaje de ^{57}Fe menos la abundancia natural de este isótopo.

Tabla 1. Relación de los isótopos estables del hierro: abundancia de éstos en la naturaleza (Dauphas y Rouxel, 2006) y en el quelato de hierro marcado (^{57}Fe EDDHA) utilizado en las soluciones de marcado de plantas.

	^{54}Fe	^{56}Fe	^{57}Fe	^{58}Fe	Fe total
Abundancia natural (%)	5,845	91,754	2,199	0,202	100
Abundancia total del quelato (%)	0,005	4,304	95,194	0,497	100

3.3.2.1 Preparación del quelato con ^{57}Fe

La aplicación de fertilizante férrico es más eficaz cuando se compleja con un agente quelante. Y dentro de la amplia gama existente, el orto,orto-EDDHA(ácido etilendiamino-N,N'-di-(o- hidroxifenilacético)) es de los más estables para un rango de pH básico, siendo uno de los más utilizados en estudios de fertilización. Como no existe abono comercial enriquecido con ^{57}Fe hubo que sintetizarlo en el laboratorio siguiendo el método propuesto por Petree y cols. (1978).

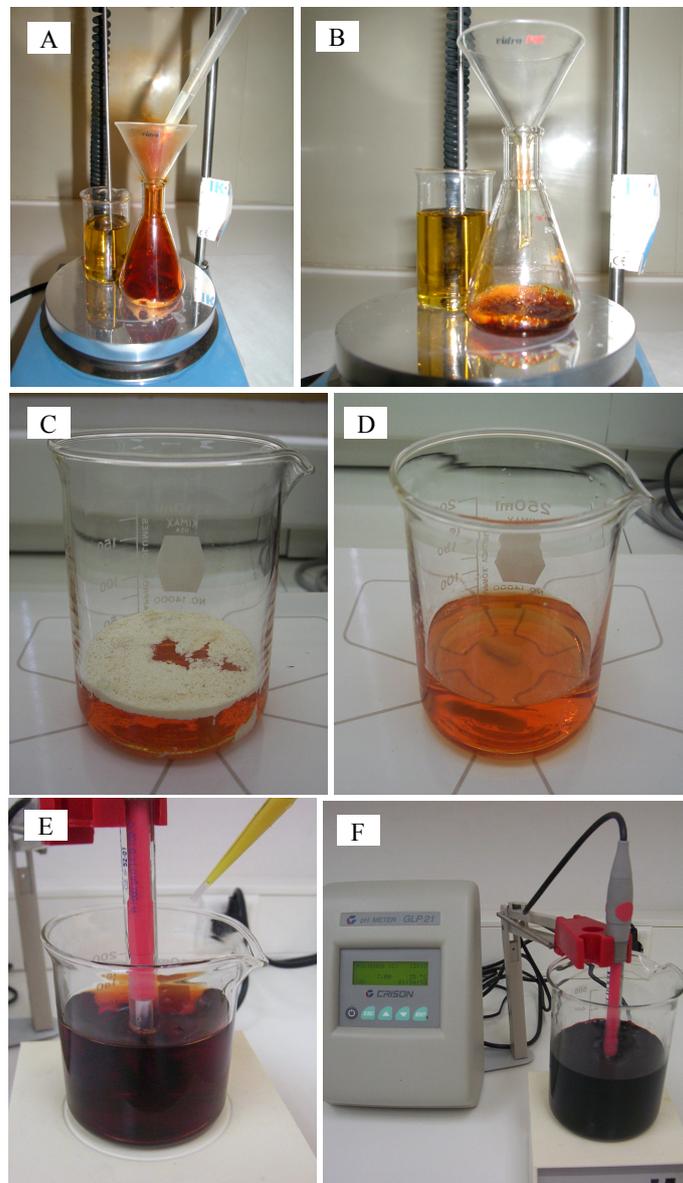
El hierro metálico empleado estaba enriquecido al 95.2% en el isótopo estable ^{57}Fe (marca ISOFLEX USA No: 26-01-57-3162). Para comenzar el proceso de disolución, se adicionó ácido nítrico 65% (Suprapur, Merck, Alemania) sobre el Fe metálico utilizando 1 mL ácido nítrico por cada 0,1 g de Fe (Figura 4A y B). La reacción se realizó con agitación constante y alta temperatura (120°C), y bajo campana de absorción de gases. Estas condiciones se mantuvieron durante 3 días para garantizar la perfecta disolución del metal.

El agente quelante empleado fue como o,o-EDDHA con una riqueza del 98% (marca LGC Promochen GmlH D-46485 Wesel, Alemania). Para garantizar la formación del complejo se utilizó un mol de agente quelante (con 2% exceso para evitar la precipitación del Fe añadido) por cada mol de Fe. El o,o-EDDHA se disolvió a temperatura ambiente en medio básico utilizando sosa 0.5 M, a razón de 4 moles de NaOH por cada mol de EDDHA (Figuras 4C y D).

Finalmente para favorecer la formación del complejo se incorporó la disolución de nitrato férrico lentamente sobre la disolución de o,o-EDDHA manteniendo siempre

el pH en el intervalo de 6-8, reajustando constantemente con sosa o ácido nítrico. El producto final se estabilizó a un pH de 7 (Figuras 4E y F). El quelato férrico (^{57}Fe -o,o-EDDHA) se protegió de la luz durante todo el ensayo para evitar procesos de fotodegradación (Hill-Cottingham, 1955) y se guardó en una botella de plástico opaca hasta su utilización.

Figura 10. Proceso de elaboración de quelato líquido ^{57}Fe -EDDHA en laboratorio. Reacción de disolución del ^{57}Fe metálico mediante la adición de HNO_3 : (A) momento inicial a 40°C y (B) en plena reacción a 120°C . Reacción de disolución del agente quelante (o,o-EDDHA) mediante la adición de NaOH a T° ambiente: (C) momento inicial y (D) resultado final. (E) Reacción de formación del complejo ^{57}Fe -EDDHA: adición lenta del nitrato férrico sobre el agente quelante, con agitación suave y controlando el pH de la mezcla entre 6,5 y 7,5. Desde el primer momento la mezcla toma color rojo-ciruela que se va haciendo más intenso a medida que adicionamos más nitrato férrico. (F) Resultado final del quelato líquido estabilizado a pH 7.0.



3.3.2.2. Ensayo de absorción de Fe por la raíz

Con este ensayo se pretendía determinar la tasa de absorción de Fe por el sistema radical de las plantas de ambos tratamientos a concentraciones de Fe crecientes en el sustrato y durante un tiempo corto de marcado. Previo a este ensayo, se realizó otro para establecer el tiempo óptimo de marcado.

En ambos ensayos se tomaron 3 grupos de 10 plantas de cada tratamiento (Ct y – Fe). Las plantas se sacaron cuidadosamente de los contenedores, se lavó cuidadosamente el sistema radical con agua desionizada y se introdujeron durante 20 minutos en una solución de lavado compuesta por 0.1 mM de CaSO_4 para eliminar la acumulación de hierro en el apoplasto.

Seguidamente, se introdujeron en la solución de marcado. Esta solución fue idéntica a la descrita en la solución de riego, y se tamponó a pH 7 con 1 mM MES; pero el hierro se aplicó en forma de quelato marcado (^{57}Fe -EDDHA) al enriquecimiento descrito anteriormente. La concentración utilizada en el ensayo para determinar el tiempo de marcado fue de 20 μM . Y los tiempos ensayados fueron de 5, 10, 20, 40 y 80 minutos. Para caracterizar la curva de absorción del hierro se utilizaron concentraciones crecientes de hierro desde 10 a 1000 μM , y un tiempo de marcado de 20 minutos (establecido en el ensayo previo, apartado 4.2.4.1 del capítulo de resultados).

Posteriormente, se procedió a retirar el ^{57}Fe no intracelular acumulado en la raíz durante el marcado de las plantas mediante dos lavados sucesivos. En primer lugar, se retiró el ^{57}Fe no específico pegado a las paredes celulares, mediante el método descrito por Fox y cols. (1996). Para ello, se introdujeron las plantas durante 5 minutos en una solución de desorción compuesta por 5 mM Mes-NaOH (pH 5.0), 5 mM CaCl_2 , 5 mM ascorbato sódico y 1 mM FeSO_4 . En segundo lugar, se retiró el ^{57}Fe acumulado en el apoplasto siguiendo el método descrito por Bienfait y cols. (1985). Para ello, se introdujeron las plantas durante 10 minutos en una solución de CaCl_2 0.5 mM en condiciones de abundante aireación. Seguidamente se pasaron a otra solución nutritiva ausente de Fe consistente en 10 mM MES (pH 5.5), 1.5 mM de bipyridina (agente que forma compuestos de color rosa cuando compleja con Fe^{2+}) y 1 mM de ditionita (un agente reductor que reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+}), y se mantuvo durante 1 hora en burbujeo constante con nitrógeno para desplazar el oxígeno disuelto. Todos los experimentos de absorción se desarrollaron en cámara de cultivo (Sanyo MCR-350H, Sanyo Electric

Biochemical Co, Japón) bajo condiciones controladas de 28°C, 80% de humedad relativa y luz constante de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo fotosintético.

3.3.2.3. Ensayo de transporte de Fe por la planta

Con este ensayo se quería cuantificar la absorción de Fe y su distribución en los distintos órganos de la planta. Así como, las diferencias en el transporte entre plantas inducidas o no a la clorosis.

Se hicieron 2 grupos de 6 plantas de cada tratamiento y se regaron durante una semana con solución nutritiva en la que se sustituyó la fuente de Fe por quelato, enriquecido al 95.2% con ^{57}Fe , a una concentración final de 20 μM . Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo (Sanyo MCR-350H, Sanyo Electric Biochemical Co, Japón) bajo condiciones controladas de 28°C, 80% de humedad relativa y luz constante de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo fotosintético. En esta experiencia se realizaron 4 riegos y se utilizaron 250 mL de solución en cada riego y planta, para garantizar el drenaje de la solución y prevenir la acumulación excesiva de sales en el sistema radical.

3.4. MUESTREO DE MATERIAL Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

3.4.1. Muestras para análisis de contenido de clorofilas

Una vez medidos los parámetros de fotosíntesis, fluorescencia e índice SPAD en las hojas seleccionadas en el apartado 3.3.1, se procedió al muestreo de las mismas para analizar su contenido en clorofilas.

Las muestras se lavaron con agua y detergente no iónico, enjuagándose 3 veces con agua desionizada. Posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -20°C hasta su liofilización (LyoAlfa 6, Telstar, Terrasa, España). Una vez liofilizadas se determinó su peso seco y se trituraron en un molinillo refrigerado con agua (IKA M 20, Alemania) para evitar su calentamiento, hasta un tamaño inferior a 0,3 mm de diámetro y se guardaron en recipientes herméticos a 4°C protegidos de la luz.

3.4.2. Muestras para el análisis de la concentración de Fe total e isotópico

En primer lugar, se extrajeron las plantas de los contenedores y se lavó el sistema radical para liberarlo de los restos de arena adheridos. En el ensayo de transporte se separó la parte aérea del sistema radical cortándola a 2 cm por encima de la última raíz. A continuación, se dividió la parte aérea en hojas y tallos, y el sistema radical se fraccionó en raíz gruesa y raíz fibrosa (<2 mm). En el ensayo para determinar la tasa de absorción por la raíz solamente se tomó muestra del sistema radical. En cada una de estas fracciones se determinó el peso fresco total.

Las muestras de material vegetal se lavaron con agua y detergente no iónico, enjuagándose 3 veces con agua desionizada. Posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -20°C hasta su liofilización (LyoAlfa 6, Telstar, Terrasa, España). Una vez liofilizadas se determinó su peso seco y se trituraron en un molinillo refrigerado con agua (IKA M-20, Alemania) para evitar su calentamiento, hasta un tamaño inferior a 0,3 mm de diámetro y se guardaron en recipientes herméticos a 4°C protegidos de la luz.

3.4.3. Muestras para análisis de actividades enzimáticas y acidificación

La actividad de los enzimas que regulan el sistema de absorción se determinó en el sistema radical de las plantas de ambos tratamientos. Para ello, se extrajeron las plantas de los contenedores y se lavó el sistema radical con agua desionizada para liberarlo de los restos de arena adheridos.

Las plantas utilizadas para medir la actividad FC-R y la extrusión de protones se reservaron para su utilización en fresco. En el caso de las enzimas H⁺-ATPasa y PEPCasa se seleccionó la raíz fibrosa, se congeló con nitrógeno líquido y se guardó a -20°C hasta la posterior extracción de las fracciones de análisis.

3.4.4. Muestras para análisis de expresión génica

La expresión de los genes que regulan el sistema de absorción se determinó en el sistema radical de las plantas de ambos tratamientos. De manera que, se extrajeron cuidadosamente 15 plantas de cada estado nutritivo y se lavó el sistema radical con agua desionizada para liberarlo de los restos de arena adheridos. Se separaron en 3 grupos

para hacer tres extracciones independientes de RNA de cada tratamiento. Se seleccionó la raíz fibrosa, se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta la posterior extracción de RNA mensajero

3.5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.5.1. Determinación del estado fotosintético de la planta

3.5.1.1. Análisis de la actividad fotosintética

La actividad fotosintética (A), o tasa de asimilación neta de CO_2 , se midió mediante un analizador portátil modelo CIRAS (PP-systems, Hitchin, Reino Unido). Se trata de un sistema abierto que emplea los principios de intercambio gaseoso para medir la tasa de fotosíntesis y transpiración.

Para realizar la medida se introdujo la hoja en una cámara (PLC 6, U) herméticamente cerrada para conseguir una atmósfera aislada del exterior. Las condiciones en el interior fueron de 25°C , déficit de vapor del aire (VPD) de alrededor de 1.7 Pa y caudal de aire a través de la cubeta de $0.5\text{-}1.5\text{ l min}^{-1}$. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) en la superficie de la hoja se ajustó a una densidad de flujo de fotones de $1000\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Las medidas se realizaron de 10:00 a 11:30 h de la mañana para evitar altas temperaturas y altos déficits de presión de vapor en las hojas. Se tomaron diez medidas consecutivas de cada hoja a intervalos de 3 segundos.

Se determinaron los siguientes parámetros de intercambio gaseoso a nivel de saturación de la luz: A_{max} , tasa de fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2$ absorbido $\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$); g_s , conductancia estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$); C_i , concentración intercelular de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2\text{ mol}^{-1}$) y E , tasa de evapotranspiración ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$).

3.5.1.2. Análisis de fluorescencia

Se utilizó un fluorímetro portátil (PAM – 2100, Heinz Walz GmbH, Alemania). Las condiciones ambientales fueron similares a las de intercambio gaseoso. Previo a las medidas, las hojas se mantuvieron en oscuridad durante 30 minutos. El valor mínimo de la fluorescencia (F_0) se obtuvo con la excitación de las hojas con un haz débil de luz de

diodo. Para inducir el la fluorescencia máxima (Fm) se aplicó un pulso de luz blanca saturante de 2100 μmol quanta durante 5 s.

De los valores obtenidos se calculó:

Fv, rendimiento de la fluorescencia variable, $F_v = F_m - F_o$,

Fv/Fm, variación de la máxima eficiencia del fotosistema II,

Fv/Fo, ratio entre la fluorescencia variable e inicial.

3.5.1.3. Determinación del índice SPAD

Se estimó el contenido de clorofilas en las hojas con un medidor de clorofilas portátil SPAD-502 (Minolta, Japón). Esta herramienta permite hacer estimaciones de contenido de clorofilas, sin necesidad de destruir las hojas de la planta; midiendo el ratio de radiación transmitida a 2 longitudes de onda (940 y 650 nm) por una superficie de hoja de 0.06 cm^2 .

3.5.1.4. Determinación del contenido en clorofilas

Las muestras seleccionadas en el apartado 3.4.1. se trasvasaron a un matraz erlenmeyer de 25 mL envuelto en papel de aluminio para evitar la luz. Se añadió 6 mL de N,N dimetilformamida a 4°C, se agitó manualmente durante 30 segundos y se dejó en cámara fría a 4°C (Moran y Porath, 1980). Pasadas 72 h, se agitó de nuevo la disolución, se trasvasó a tubos falcon y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos a 4000 rpm para separar el extracto de clorofilas de los restos vegetales. Se recogió el sobrenadante en tubos de pirex de 16 mL envueltos en papel de aluminio y se colocó en un recipiente con hielo para evitar la degradación. Tras añadir una pizca de sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4) para deshidratar la solución, se dejó reposar 1 hora. Durante todo el proceso de extracción, se evitó que la luz entrara en contacto con las muestras y degradara las clorofilas. Finalmente se leyó la absorbancia de los extractos en un espectrofotómetro UV-VIS a 2 longitudes de onda (λ_{647} y λ_{664}).

Los valores de absorbancia obtenidos se emplean para calcular la clorofila a, b y total a partir de las siguientes fórmulas (Moran, 1982):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12.64 \times A_{664} - 2.99 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = -05.6 \times A_{664} + 23.26 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \text{Ch a} + \text{Ch b} = 7.04 \times A_{664} + 20.27 \times A_{647}$$

La concentración de clorofila a, b y total se expresa en $\mu\text{mol m}^{-2}$.

3.5.2. Determinación de Fe total e isotópico en el material vegetal

3.5.2.1. Digestión ácida del material vegetal

Este proceso se realiza para liberar los micro y macroelementos que componen el tejido vegetal en formas inorgánicas libres de carbono y así poder determinar su concentración. En nuestro caso, sólo se analizó el contenido en el ión hierro. Se utilizó la técnica conocida como “digestión ácida nítrico-perclórica” y posteriormente se analizó mediante espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.

Para ello, se pesaron 0.5 g de las muestras liofilizadas y trituradas en tubos digestores de borosilicato, y se les añadió 10 mL de ácido nítrico al 65%. Se agitaron suavemente y se les dejó en reposo durante 24 horas. Posteriormente, se colocaron los tubos en un termobloque digestor (FOSS, Tecator, Dinamarca) durante 10 minutos a 120°C, y seguidamente durante 20-25 minutos a 170°C, hasta que el volumen del ácido se redujo aproximadamente a la mitad. Una vez frío, se le añadió 2 mL de ácido perclórico al 70% y se continuó la digestión a 200°C. La digestión finalizó cuando la solución en el interior del tubo digestor se volvió incolora. Cuando los tubos se enfriaron, se enrasaron a 25 mL con agua mili-Q y se añadió una gota de Tritón. Se guardaron las muestras digeridas en cámara a 4°C hasta su análisis.

3.5.2.2. Digestión seca del material vegetal

Este tipo de digestión se utilizó en aquellos casos en que la cantidad de material vegetal era insuficiente para realizar la digestión ácida. Para ello, se pesó el material existente de la muestra en tubos de pyrex de 10 mL y se calcinó en horno-mufla a 550°C durante 12 horas. Una vez frío, se extrajeron los macro y microelementos con ácido nítrico al 2% (Hiperpur Panreac, Fe<1 ppb) en baño de ultrasonidos (Fungilab S.A., Sant Feliu de Llobregat, España) a 40°C durante 30 minutos. Posteriormente se trasvasaron las soluciones a tubos falcon mediante sucesivos lavados con nítrico al 2%

hasta un volumen final de 50 mL. Se guardaron las muestras digeridas en cámara a 4°C hasta su análisis.

3.5.2.3. Análisis de Fe total en el material vegetal

La cuantificación de este parámetro se realizó mediante espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES). Se basa en la vaporización, disociación, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma de argón generado en un campo magnético. Para ello, un nebulizador transforma la solución acuosa de la digestión en aerosol con partículas de 1 a 10 μm de diámetro. Estas partículas atraviesan el plasma, que se encuentra a una temperatura entre 4.000 y 8.000°C; y provoca la ruptura de todos los enlaces químicos (atomización) y la ionización de los elementos. Los átomos en el interior de este plasma estable incrementan su estado energético y cuando se desexcitan emiten radiación electromagnética. Esta radiación es característica de cada elemento y se separa en función de su longitud de onda. La cantidad de cada elemento se determina en función de la intensidad de la luz emitida y por comparación con intensidades medidas anteriormente sobre concentraciones conocidas del elemento (patrones de calibrado).

La determinación de Fe se realizó por análisis directo en la solución procedente de la digestión. Para el cálculo de la concentración se utilizó la fórmula:

$$\text{Micronutriente (ppm)} = (a-b) \cdot V / P$$

Donde:

- a: Concentración de Fe en la solución procedente de la digestión de la muestra vegetal ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).
- b: Concentración de Fe en el blanco ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).
- V: Volumen final de la digestión (25 mL).
- P: Peso muestra material digerido (0.5 g).

Los patrones utilizados para la calibración del ICP se enrasaron con una solución de ácido nítrico al 2%. Las muestras se analizaron por duplicado y se incluyó una muestra control (QC) de concentración conocida cada 40 muestras.

3.5.2.4. Análisis de las fracciones isotópicas del Fe en el material vegetal

La medición de las proporciones isotópicas del Fe presente en el material vegetal se determinaron mediante un equipo de espectrometría de masas (MC-ICP-MS), con multicolector de plasma inductivo de alta resolución (Neptune, Thermo Quest, Finnigan) como se describe en Weyer y Schwieters (2003). Este equipo permite la determinación rápida de multitud de elementos a concentración ultratraza sin necesidad de concentrar el analito. Este instrumento incorpora un espectrómetro de masas de doble foco con dispersión de masa variable capaz de operar en los modos de baja, media y alta resolución.

El Fe tiene 4 isótopos estables (^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{57}Fe y ^{58}Fe), de manera que el contenido de Fe total (Fe_t) de una muestra no marcada es suma del Fe de cada uno de los isótopos.

$$\text{Fe}_t = {}^{54}\text{Fe} + {}^{56}\text{Fe} + {}^{57}\text{Fe} + {}^{58}\text{Fe} \quad (1)$$

El equipo, en función de las masas de los isótopo detectados, nos da la abundancia natural (A_n) que hay de cada fracción isotópica en el total de Fe del material vegetal no marcado (en %). Se cumple que:

$${}^{54}A_n + {}^{56}A_n + {}^{57}A_n + {}^{58}A_n = 100 \quad (2)$$

La cantidad de Fe total (Fe_t) presente en una muestra de material vegetal marcada es resultado de dos fracciones: la del contenido de Fe natural no marcado (Fe_n), y la debida al tratamiento de marcado (Fe_{enr}), y se ajusta a la ecuación:

$$\text{Fe}_t = \text{Fe}_n + \text{Fe}_{\text{enr}} \quad (3)$$

Cuando enriquecemos un material vegetal en un determinado isótopo se sigue cumpliendo la ecuación (2), pero se altera la abundancia natural de todos los isótopos (Abundancia natural alterada, A_{na}).

En nuestro estudio, al enriquecer las muestras con ^{57}Fe tendríamos la ecuación:

$${}^{57}A_{na} = {}^{57}A_n + {}^{57}A_{\text{enr}} \quad (4)$$

Donde:

${}^{57}A_{na}$: es la lectura del equipo de la concentración del isótopo ^{57}Fe en la muestra.

${}^{57}A_n$: es la abundancia en la naturaleza del isótopo ^{57}Fe (2.20%).

$^{57}A_{\text{enr}}$: es el enriquecimiento o exceso del isótopo ^{57}Fe debido a la aplicación del quelato marcado.

El contenido total de ^{57}Fe se calcula como combinación lineal de las ecuaciones (3) y (4) de modo que:

$$Fe_t \cdot ^{57}A_{na} = Fe_t \cdot ^{57}A_n + Fe_t \cdot ^{57}A_{\text{enr}} \quad (5)$$

Donde:

$Fe_t \cdot ^{57}A_{na}$: equivale al contenido total de ^{57}Fe en la muestra ($^{57}\text{Fe}_t$).

$Fe_t \cdot ^{57}A_n$: equivale al contenido de ^{57}Fe procedente de la abundancia natural ($^{57}\text{Fe}_n$).

$Fe_t \cdot ^{57}A_{\text{enr}}$: equivale al contenido de ^{57}Fe procedente del marcado, es decir, enriquecimiento en ^{57}Fe como consecuencia del tratamiento ($^{57}\text{Fe}_{\text{enr}}$).

La cantidad de ^{57}Fe absorbida por las raíces debido al tratamiento se obtiene por diferencia entre el ^{57}Fe total menos el correspondiente a la abundancia natural.

$$^{57}\text{Fe}_{\text{enr}} = ^{57}\text{Fe}_t - ^{57}\text{Fe}_n \quad (6)$$

La tasa de absorción instantánea del sistema radical se expresa en $\mu\text{mol } ^{57}\text{Fe}_{\text{enr}} \cdot \text{g}^{-1}$ (peso seco de raíz) $\cdot \text{h}^{-1}$. En el ensayo para determinar la capacidad de absorción del sistema radical se representaron las tasas de absorción a las distintas concentraciones de sustrato, se ajustaron a regresión lineal y se determinó la pendiente de la recta resultante.

3.5.3. Determinación de la capacidad reductora de las raíces

La capacidad reductora de las raíces se determinó con el análisis de la actividad de la enzima quelato-reductasa férrica (FCR) siguiendo el método descrito por (Chaney y cols. 1972). La enzima reduce las formas férricas (Fe^{3+}) de la solución del suelo a forma ferrosa (Fe^{2+}) asimilable por la planta. Para cuantificar la cantidad de ferroso sintetizado se añade al medio de reacción un indicador colorimétrico (BPDS). El reactivo forma un complejo estable con el Fe^{2+} y el medio vira a color rosado. La cantidad de hierro reducido se calcula cuantificando el complejo Fe^{2+} -(BPDS)₃ utilizando un coeficiente de extinción de $22.14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Se analizó la actividad enzimática en las raíces de las plantas de ambos tratamientos. Para ello, se tomaron 5 a 6 fragmentos de raíces de 5-8 mm de longitud

(0.020 g peso fresco). Se introdujeron 5 minutos en 10 mL de una solución de lavado 0.2 mM $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Y finalmente en 10 mL un medio de reacción compuesto por 0.1 mM Fe(III)-EDTA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y 0.3 mM BPDS (Acros Organics, New Jersey, USA). Previamente, se ajustó el pH de la solución a 5.5 con 5 mM MES-NaOH (Panreac, Barcelona, España). Los viales se cubrieron totalmente con papel de aluminio para evitar la luz y se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (23°C). Se tomaron alícuotas de 200 μL y se midió su absorbancia a 535 nm en un espectrofotómetro con lector de multiplacas (Mikrowin 2000, Asys, Eugendorf, Austria). La utilización de las placas multipocillo permite realizar múltiples lecturas simultáneas y se cometen menos errores de lectura ya que todas las reacciones se leen con la misma curva de calibrado. La cantidad de hierro reducido se calculó cuantificando el complejo Fe^{2+} -(BPDS)₃ formado y se expresó como $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ reducido (g peso fresco de raíz)⁻¹ h⁻¹.

3.5.4. Determinación de la capacidad acidificadora de las raíces

3.5.4.1. Análisis de la extrusión de protones

Se determinó la capacidad de acidificación de las raíces cuantificando la cantidad de protones excretados al medio. Se seleccionaron 3 grupos de 3 plantas de los 2 tratamientos (Ct y -Fe) y se transfirieron a matraces erlenmeyer de 250 mL de capacidad con solución nutritiva ajustada a pH 7 con 5 mM NaOH (Panreac, Barcelona, Spain). Se utilizó un volumen de solución de 250 mL, suficiente para evitar riesgos de depleción de la solución, y se burbujeó con una corriente continua de aire durante todo el experimento.

Se midió el pH de la solución cada hora utilizando un pHmetro (Consort C531, Turnhout, Bélgica). Se determinó la acidificación de la solución como la cantidad de protones excretados al medio a las 24 horas de incubación (meq H^+ g⁻¹ peso fresco de planta h⁻¹).

3.5.4.2. Extracción de las fracciones microsomal y soluble de la célula

La H⁺-ATPasa es una enzima que acopla la hidrólisis o síntesis de ATP al movimiento de protones transmembrana (Rabotti y Zocchi, 2006). La enzima PEPCasa

se ha relacionado con la síntesis de ácidos orgánicos y la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs (López-Millán y cols. 2000). La extracción de las fracciones microsomal y soluble de la células de la raíz donde se analizaron las actividades H^+ -ATPasa y PEPCasa, respectivamente, se realizó según el protocolo descrito en Donnini y cols. (2009).

En primer lugar se tomó el material vegetal reservado para analizar la actividad de ambos enzimas y se trituró en un mortero con nitrógeno líquido. Para evitar su deterioro, la temperatura durante la extracción nunca superó los 4°C. Inmediatamente, se pesaron fracciones de 5 gramos de material triturado en tubos falcon de 50 mL y se les añadió 25 mL de un tampón de extracción consistente en 50 mM Tris-HCl (ajustado a pH 7.5), 10% glicerol, 20% PVPP, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA y 14 mM β -mercaptoetanol (todos de Sigma-Aldrich). También contenía 1 mM de PMSF y 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ leupeptina (Sigma) para minimizar la proteólisis. Posteriormente, se filtró el extracto por un filtro de 4 capas de gasa y se recogió en tubos falcon de 50 mL. Se hizo una primera centrifugación a 13.000 g durante 15 minutos (Centrifuga 5810R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Se tomó el sobrenadante y se volvió centrifugar a 100.000 g durante 30 minutos (Ultra centrifuga Optima-L80 Beckman Coulter, Fullerton, USA).

Con este paso separamos la fracción soluble (sobrenadante) y la microsomal (precipitado) de las células. La primera se guardó para medir la actividad de la enzima PEPCasa. La segunda se resuspendió en 100 μL del mismo tampón de extracción y se guardó para medir la actividad H^+ -ATPasa. Se reservó una alícuota de cada fracción para cuantificar la proteína. Para evitar la degradación de los extractos los viales se mantuvieron inmersos en hielo durante todo el proceso de extracción, y una vez finalizado se procedió al análisis inmediato de la actividad correspondiente.

3.5.4.3. Análisis de la actividad de la enzima Protón-ATPasa

La actividad H^+ -ATPasa se determinó midiendo la hidrólisis de ATP a la oxidación de NADH (Rabotti y Zocchi, 2006). La reacción se llevó a cabo en un medio consistente en 25 mM tampón MOPS (ajustado a pH 6.5 con BTP), 250 mM sacarosa, 50 mM KCl, 1 mM ATP, 1 mM PEP, 0.25 mM NADH, 15 $\mu g \cdot mL^{-1}$ enzima lactato

deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), 30. $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ enzima piruvato quinasa (EC 2.7.1.40) y 0.015% Lubrol (todos de Sigma-Aldrich).

La reacción enzimática se llevó a cabo en cubetas de cuarzo utilizando 2 mL del medio de reacción y 50 μL de la fracción microsomal, y se midió la absorbancia a 340 nm de longitud de onda durante un periodo de 5 minutos con un espectrofotómetro (Lambda 25, PerkinElmer, Shelton, CT, USA). La curva resultante muestra el consumo de NADH y la actividad enzimática se calculó utilizando la pendiente de la curva de reacción y se expresó como $\text{nmol NADH mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

3.5.4.4. Análisis de la actividad de la enzima Fosfoenol Piruvato Carboxilasa

La actividad PEPCasa se determinó midiendo la hidrólisis de ATP a la oxidación de NADH (Rabotti y Zocchi, 2006). La reacción enzimática se realizó de manera análoga a la descrita para la enzima H^+ -ATPasa, utilizando en este caso, el siguiente tampón de reacción: 100 mM Tris (ajustado a pH 8.0 con HCl), 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaHCO_3 , 2.5 mM PEP, 0.20 mM NADH y 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ enzima malato deshidrogenasa (EC 1.1.1.37). Se utilizó 50 μL de la fracción soluble y también se expresó como $\text{nmol NADH mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

3.5.4.5. Análisis del contenido en proteína

Se cuantificó la cantidad de proteína de ambas fracciones (microsomal y soluble) utilizando el reactivo de Bradford (Bradford, 1976). La reacción se montó en placas de 96 pocillos. En cada reacción se utilizaron 5 μL de extracto proteico y 200 μL de reactivo Bradford-Bio Rad (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La principal ventaja de utilizar placas multipocillo es que se cometen menos errores de lectura ya que todas las reacciones se leen con la misma curva de calibrado, además permite manejar múltiples reacciones de manera simultánea. Sin embargo, exige el montaje de la reacción en 2 pocillos consecutivos, ya que el resultado de cada muestra es media de la lectura de ambos pocillos, de manera que el número de reacciones se duplica. Una vez montada la placa, se incubó en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro con lector de placas (Mikrowin 2000, Asys, Eugendorf, Austria).

Para hacer la curva de calibrado se utilizó albúmina sérica como proteína patrón. La concentración de proteína final se expresó como μg proteína μL^{-1} .

3.5.5. Determinación de la expresión génica

3.5.5.1. Diseño de los principales genes relacionados con la absorción de hierro en cítricos

Se identificaron los genes de cítricos correspondientes a las enzimas Quelato-Reductasa férrica (FRO), Protón-ATPasa (HA), Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPC) y transportador férrico (IRT) y se analizó su nivel de expresión en plantas de ambos tratamientos.

En primer lugar se seleccionaron todos los ESTs (expressed sequence tags) correspondientes a cada enzima/transportador, anotados para cítricos -5' Mandarina 'clemenules' (*C. clementina* Hort. ex Tan.)- y disponibles en la base de datos del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (Terol y cols. 2007). Mediante la herramienta informática Cap 3 se ensamblaron dichos ESTs de los cuales se agruparon en varios contigs diferentes. Con la herramienta informática Clustal X se alinearon los distintos contigs para excluir aquellos con alto porcentaje de homología.

Para distinguir posibles diferencias de expresión existentes entre los contigs de cada enzima/transportador se diseñó un par de oligonucleótidos para cada contig. Los oligonucleótidos sintéticos fueron diseñados para amplificar el gen del contig seleccionado mediante la herramienta informática Primer 3. Los detalles de los oligos "directo" y "reverso" se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados como cebadores para la RT-PCR en tiempo real.

Gen	Código EST*	Orientación del nucleótido	Secuencia del oligo (5'-3')	Tamaño del amplicón (bp)
HA1	aCL1735Contig1	F	GGACGCGTTTGGTGTAAGAT	143
		R	GAAGTCCAGGGCGTTCAATA	
HA2	aCL5439Contig1	F	TTGGCAGTTACTTGGCAATG	127
		R	GCAAGCTTTCGGAAGTCATC	
FRO1	aCL3074Contig1	F	GCTGCATGTTGGTGACTTTG	78
		R	AACCGCAGAAATCGATCAAG	
FRO2	aC32103G05EF_c	F	GGAGGAGCCAAAACAAGATG	73
		R	CAGCCAAGAAACACAGCAAA	
IRT1	aC34108F04EF_c	F	CTCAGTTGGAGCCACAAACA	115
		R	GTACTCCGCCTGAAGAATGC	
IRT2	aCL3643Contig1	F	CTTTGATTGGTGCTTTGCTG	56
		R	TGGGTGTGTCGTGGATACAA	
PEPC1	aCL4972Contig1	F	AAACACCGGTTAAGGCATCA	52
		R	AGTCGGTTTTGGTGAAAGCA	

*Código EST se refiere al nombre de entrada disponible en la base de datos del Proyecto de Genómica Funcional de Cítricos (CFGP; <http://bioinfo.ibmcp.upv.es/genomics/cfgpDB/>).

3.5.5.2. Extracción del RNA mensajero de las raíces

Se tomaron las muestras de raíz fibrosa congeladas a -80°C y se trituraron con nitrógeno líquido evitando en todo momento su descongelación y consecuente degradación. Todo el material de laboratorio se esterilizó con autoclave durante 30 minutos a 121°C para evitar contaminaciones (Raypa, Terrasa, España).

El primer día de extracción, se pesaron 2 g de tejido vegetal de cada muestra en tubos de 15 mL. Se les añadió un tampón de extracción consistente en 2 mL TCES (20 mL 1 M Tris pH 8.0, 5 mL 4 M NaCl, 25 mL 200 mM EDTA, 2 g SDS y 50 mL H_2O -DEPC), 2 mL de fenol-ácido y 40 μL de β -mercaptoetanol. Se agitaron con vortex durante 1 minuto y se incubaron durante 5 minutos en un baño de agua a 40°C , agitando los tubos manualmente cada minuto. Se centrifugaron (Centrífuga 5810R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 4000 rpm, a 4°C y 30 minutos. Seguidamente se trasvasó la fase superior a otro tubo de 15 mL teniendo la precaución de no coger las capas gelatinosas de la fase intermedia. Se añadió a cada extracto un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitaron con vortex y se centrifugaron nuevamente a 4000 rpm, a 4°C y 30 minutos. El sobrenadante de cada muestra se distribuyó en varios viales eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos en

microcentrífuga (Centrífuga MiniSpin, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) para eliminar impurezas. Finalmente se pasó el sobrenadante a otros eppendorf, se les añadió 0.5 volumen de 6 M LiCl y se incubaron toda la noche a -20°C .

El segundo día de extracción, se centrifugaron los extractos de los eppendorf a 13000 rpm, 4°C y 30 minutos. Con este paso el RNA quedó precipitado (pelet) en la base de los viales y se eliminó el sobrenadante. Seguidamente se hicieron varios lavados (3-4) del pelet añadiendo 200 μL de etanol al 70% y centrifugando a 13000 rpm, 4°C y 5 minutos. Tras el último lavado se desecharon los restos de etanol y se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Por último se resuspendieron los pelets utilizando H_2O -DEPC y se unificaron aquellos pertenecientes a la misma muestra en un solo eppendorf.

Finalmente se realizó la purificación del RNA extraído utilizando el RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) para eliminar el DNA contaminante. Se pasó a través de una columna de purificación siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5.5.3. Análisis de calidad y cantidad del RNA mensajero

Una vez extraído el RNA mensajero, se determinó la calidad (ratio $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$) y cantidad ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) del mismo mediante espectrofotometría UV (Nanodrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA). En cada lectura se utilizó 1-1.5 μL de extracto. Cuando el ratio $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ fue inferior a 2.0 se consideró que el RNA era de buena calidad y se utilizó en los análisis de expresión. Se hicieron alícuotas de mRNA de 25 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ y se congelaron a -80°C para evitar su degradación.

3.5.5.4. Análisis de la expresión en tiempo real (RT-PCR).

La expresión del gen se determinó mediante técnica cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Se utilizó el termociclador LightCycler 2.0 Instrument (Roche) equipado con un software versión 4.0. Para la reacción de amplificación se utilizan capilares de 20 μL . El RNA se degrada fácilmente a temperatura ambiente, por lo que se descongeló lentamente inmerso en hielo y se minimizó al máximo el tiempo de contacto con el aire.

En la reacción se utilizaron 2.5 unidades de MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), 1 unidad de RNase Inhibitor (Applied Biosystems), 2 μL de LC

Fast Start DNA Master PLUS SYBR Green I (Roche), 25 ng de RNA total y 250 nM de los oligonucleótidos específicos de cada gen, todo ello llevado a un volumen de 10 μ L. Las condiciones de reacción fueron de 30 minutos a 48°C, 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 2 segundos a 95°C, 8 segundos a 58°C y 8 segundos a 72°C. Los valores de intensidad de fluorescencia fueron adquiridos durante los pasos de extensión a 72°C. Se realizaron al menos 3 reacciones en tiempo-real (RT-PCR) con 3 réplicas biológicas por muestra.

Para evaluar la especificidad de la reacción se realizaron curvas de desnaturalización tras la amplificación y se secuenciaron los productos de las amplificaciones. Para convertir las medidas de intensidad de fluorescencia en valores relativos de mRNA se prepararon curvas de calibrado utilizando diluciones decimales seriadas de una de las muestras de RNA, que se utilizó como curva patrón.

Los niveles de mRNA relativos se normalizaron a cantidades de RNA total como se describe en (Bustin, 2002; Hashimoto y cols. 2004), asignando un valor arbitrario de inducción de 1 al tratamiento control (Ct).

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados mostrados son valores medios de al menos 3 réplicas \pm error estándar. Sobre cada variable, se aplicó un análisis estadístico de la varianza de una vía (ANOVA one-way), utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus versión 5.1 (Statistical Graphics, Englewood Cliffs, NJ). Para comparar las medias se comparó el método LSD con un 95% de nivel de confianza.

6. RESULTADOS

4.1. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO EN LA PLANTA

4.1.1. Sintomatología

Después de los dos meses de tratamiento de plantas de citrange Carrizo con una solución nutritiva carente de hierro se produjeron claros síntomas de clorosis férrica en las hojas desarrolladas durante este periodo (Figura 11).

El limbo de las hojas de las plantas deficientes (-Fe) adquirió una tonalidad de un verde más claro –casi amarillo- que el de las plantas control (+Fe). Las nerviaciones mantuvieron el color verde oscuro semejante a una especie de malla o retículo, debido a la escasa translocación de este elemento incluso en la propia hoja. La reducida movilidad de este elemento, también explica el mantenimiento del color verde en las hojas existentes en la planta antes de iniciar los tratamientos.



Figura 11. Aspecto de las plantas de citrange Carrizo regadas durante 2 meses con una solución nutritiva sin Fe (-Fe) o con 20 μ M de hierro (+Fe).

4.1.2. Biomasa y su distribución relativa

En la tabla 3 se presentan los valores promedio de la biomasa de las plantas de ambos tratamientos, así como su distribución relativa. El peso total de las plantas deficientes (-Fe) disminuyó en un 27.0%. Pero comparando las fracciones principales se observa que esta reducción fue más acusada en la parte aérea (35.0%) que en el sistema radical (13.7%). El reparto de biomasa en las plantas control (+Fe) es más importante en

la parte aérea (62.1%) que en el sistema radical (37.9%). La menor proporción de biomasa en la parte aérea de las plantas deficientes hace que su reparto entre ambas fracciones sea más equitativo (en torno al 50%) que en las plantas control.

Tabla 3. Biomasa (g) y su distribución relativa (%) de los distintos órganos y del total de la planta correspondientes a las plantas de citrange Carrizo regados durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 μ M de hierro.

	Biomasa (g)		Distribución relativa (%)	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
Hojas	1,11 \pm 0,07 a	0,74 \pm 0,02 b	32,3	29,4
Tallo	1,03 \pm 0,08 a	0,65 \pm 0,02 b	29,8	25,8
Parte aérea	2,14 \pm 0,01 a	1,39 \pm 0,05 b	62,1	55,3
Raíz gruesa	0,59 \pm 0,01	0,61 \pm 0,02	17,0	24,3
Raíz fibrosa	0,72 \pm 0,04 a	0,52 \pm 0,01 b	20,9	20,5
Sistema radical	1,31 \pm 0,03 a	1,13 \pm 0,01 b	37,9	44,7
Planta	3,45 \pm 0,17 a	2,52 \pm 0,18 b	100,0	100,0
Tasa sistema radical:parte aérea	0,61	0,81		

^ZCada valor es la media de 6 plantas \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza. Los valores con diferente letra en cada fila son significativamente diferentes.

4.1.3. Estado fotosintético de la planta

4.1.3.1. Actividad fotosintética

La ausencia de hierro redujo un 54.3% la actividad fotosintética (Tabla 4) o tasa de asimilación de CO₂ (A_{max}) de las hojas cloróticas (-Fe) en comparación con las hojas de las plantas control (+Fe). También experimentaron un descenso en la conductancia estomática (g_s) y en la transpiración (E) de 52.0 y 42.2%, respectivamente. Sin embargo aumentaron ligeramente (8.1%) su concentración de CO₂ intercelular (C_i).

Tabla 4. Análisis de parámetros de intercambio gaseoso en hojas de citrange Carrizo regados durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 μM de hierro. A_{max} , máxima actividad fotosintética; gs, conductancia estomática del vapor de agua; C_i , concentración de CO_2 intercelular; E, transpiración.

	+Fe		-Fe		Ratio +Fe/-Fe
A_{max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	6,6 \pm 0,2	a	3,0 \pm 0,1	b	2,2
gs ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	150,2 \pm 10,3	a	73,0 \pm 5,8	b	2,1
C_i (ppm)	352,5 \pm 3,3	b	381,8 \pm 3,8	a	0,9
E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	1,70 \pm 0,02	a	0,95 \pm 0,01	b	1,8

^zCada valor es la media de 10 muestras \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza. Los valores con diferente letra en cada fila son significativamente diferentes.

4.1.3.2. Fluorescencia

En la tabla 5 se exponen los parámetros de fluorescencia de adaptación a la oscuridad de la clorofila de las hojas brotadas durante el periodo de inducción a la clorosis. La ausencia total de hierro en los 2 meses de tratamiento provocó un descenso de alrededor de 10% en la eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm) y del 35% en Fv/Fo. El descenso de estos ratios no fue consecuencia del parámetro Fm, sino del aumento del 40% de la fluorescencia mínima (Fo) en las plantas -Fe, con respecto a las +Fe.

Tabla 5. Análisis de parámetros de fluorescencia en hojas maduras de citrange Carrizo regados durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 μM de hierro. Fo, fluorescencia mínima; Fm, fluorescencia máxima; Fm, fluorescencia variable (Fv = Fm-Fo); Fv/Fm, variación de la máxima eficiencia del fotosistema II; Fv/Fo, ratio fluorescencia variable e inicial.

	+Fe		-Fe	
Fo	0,24 \pm 0,01	b	0,34 \pm 0,02	a
Fm	1,43 \pm 0,02		1,40 \pm 0,06	
Fv/Fm	0,83 \pm 0,01	a	0,76 \pm 0,01	b
Fv/Fo	5,00 \pm 0,10	a	3,22 \pm 0,05	b

^zCada valor es la media de 10 muestras \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza. Los valores con diferente letra en cada fila son significativamente diferentes.

4.1.3.3. Contenido en clorofilas

En la tabla 6 se presentan los resultados de la medida indirecta del contenido en clorofilas (Índice de SPAD) y de la concentración de clorofila a, b y total, de las hojas muestreadas en ambos tratamientos (4ª hoja madura desde el ápice de la planta).

La ausencia de hierro en la solución nutritiva provocó un descenso significativo de todos los parámetros analizados. El valor del índice de SPAD a los 2 meses de tratamiento se redujo un 61.6% en las plantas deficientes. Esta reducción se confirma al determinar el contenido de clorofila a, b y total que descendieron un 52.6, 68.9 y 58.6%, respectivamente. El descenso mayor del contenido en clorofila b en las plantas deficientes provocó que el ratio clorofila a/b sea 52.0% superior en estas plantas.

Tabla 6. Índice SPAD y concentración de clorofilas en hojas maduras de citrange Carrizo regados durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 µM de hierro.

	+Fe		-Fe		
SPAD	63,2 ± 1,0	a	24,2 ± 1,7	b	
Clorofila a (µmol m ⁻²)	419,0 ± 47,0	a	198,5 ± 6,2	b	
Clorofila b (µmol m ⁻²)	244,7 ± 57,0	a	76,2 ± 15,1	b	
Clorofila total (µmol m ⁻²)	663,7 ± 10,9	a	274,7 ± 9,6	b	
Ratio Cl a / Cl b	1,7		2,6		

^zCada valor es la media de 10 muestras ± error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza. Los valores con diferente letra en cada fila son significativamente diferentes.

4.1.4. Distribución del Fe en la planta

4.1.4.1. Concentración y contenido Fe total en la planta y su distribución relativa

Se analizó la concentración de hierro total en las distintas fracciones de la planta. La media ponderada de la parte aérea, el sistema radical, así como del total de la planta se calculó en función del contenido en Fe y de la biomasa. Como cabría esperar, la concentración de Fe (Tabla 7) en las plantas control fue 1.8 veces mayor que en las plantas deficientes (44.8% descenso). La mayor bajada apareció en el sistema radical y, sobretodo, en la concentración de la raíz fina o fibrosa (58.9%), que es la fracción de la planta donde más Fe se acumula. El contenido de Fe total (concentración por peso seco) descendió un 59.9% en toda la planta y 64.5% en la raíz fibrosa. La concentración

ponderada es ligeramente diferente en ambos tratamientos. Las plantas control concentran más cantidad de Fe en el sistema radical (reserva de Fe de la planta) que en la parte aérea (Tabla 7). Este hecho se invierte en las plantas deficientes porque, al regarse con una solución nutritiva carente de Fe, la planta moviliza sus reservas hacia la parte aérea y reduce el Fe presente en el sistema radical.

Tabla 7. Concentración de Fe total (mg kg^{-1}), contenido en Fe total (μg) y su distribución relativa (%) en los distintos órganos y del total de la planta correspondientes a las plantas de citrange Carrizo regados durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de $20 \mu\text{M}$ de hierro.

	Fe total (mg kg^{-1})		Fe total (μg)		Distribución relativa (%)	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
Hojas	127,2 \pm 6,8 a	87,9 \pm 13,5 b	141,7 \pm 7,6 a	65,0 \pm 10,0 b	34,4	39,2
Tallo	47,7 \pm 0,4 a	35,0 \pm 3,1 b	49,1 \pm 0,4 a	22,7 \pm 2,0 b	11,9	13,7
Parte aérea	89,1 \pm 2,5 a	63,1 \pm 4,4 b	190,7 \pm 5,3 a	87,8 \pm 6,1 b	46,4	52,9
Raíz gruesa	34,9 \pm 5,2	29,6 \pm 0,7	20,4 \pm 3,1	18,0 \pm 0,4	5,0	10,9
Raíz fibrosa	277,3 \pm 30,4 a	116,5 \pm 15,7 b	200,1 \pm 22,0 a	60,0 \pm 8,1 b	48,7	36,2
Sistema radical	168,8 \pm 17,0 a	69,4 \pm 7,4 b	220,5 \pm 22,2 a	78,0 \pm 8,4 b	53,6	47,1
Planta	119,3 \pm 12,8 a	65,9 \pm 9,4 b	411,3 \pm 44,3 a	165,8 \pm 23,6 b	100,0	100,0

^zCada valor es la media de 6 plantas \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza. Los valores con diferente letra en cada fila son significativamente diferentes.

4.2. RESPUESTA DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DE ABSORCIÓN DE HIERRO ANTE LA DEFICIENCIA

4.2.1. Capacidad acidificadora de las raíces

El primer componente del sistema de absorción, la capacidad acidificadora de las raíces, se estudió después de cultivar las plantas durante 2 meses con (+Fe) o sin (-Fe) aporte de Fe. Esta propiedad se determinó cuantificando la cantidad de protones liberados por el sistema radical, así como analizando la actividad de la enzima responsable de este fenómeno, la protón-ATPasa.

4.2.1.1. Extrusión de protones

Para medir la cantidad de protones liberados se introdujeron las plantas en una solución nutritiva ajustada a pH 7 hasta el nivel del sistema radical. Desde la primera lectura se observó una mayor bajada del pH de las plantas deficientes en hierro. A las 24 horas, el pH registrado fue de 5.60 en las plantas cloróticas mientras que sólo bajó a

6.31 en las plantas control. Esto se tradujo en una cantidad de protones excretados al medio de 2.1 veces mayor en las plantas cultivadas en ausencia de hierro (Figura 12).

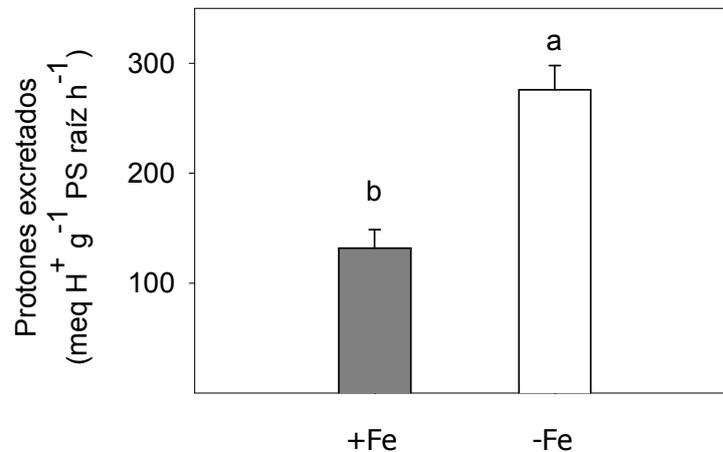


Figura 12. Inducción de la capacidad acidificadora de las raíces de citrange Carrizo medida como los protones excretados a las 24 horas de incubación. Previamente, las plantas se regaron durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 μ M de hierro. Cada valor es la media de 3 plantas \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza. PS: peso seco de la raíz.

4.2.1.2. Enzima protón-ATPasa

Las plantas cultivadas en ausencia de hierro también mostraron una mayor inducción de la enzima responsable de excretar protones fuera de la célula, la protón-ATPasa.

El análisis de la expresión génica mostró una inducción del 64.0% en el número de transcritos de HA1 en condiciones de deficiencia de Fe (Figura 13). Sin embargo, la expresión de HA2 no parece que esté regulada por el estado nutritivo de la planta.

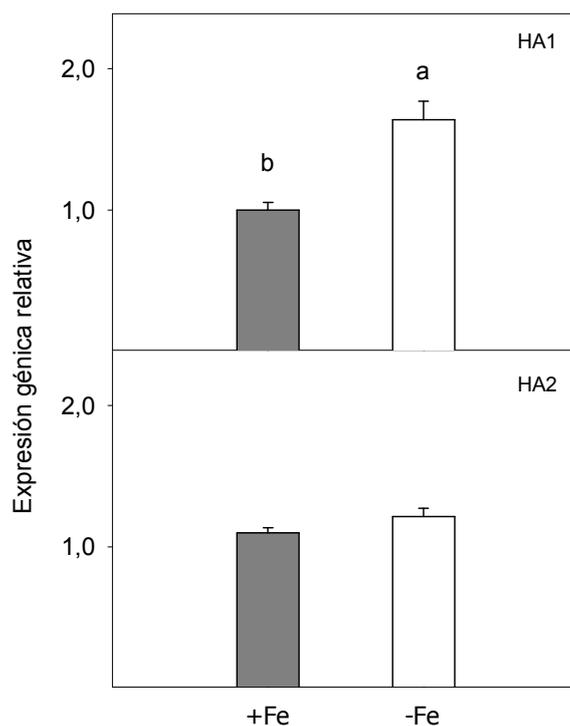


Figura 13. Análisis de la expresión génica de los genes HA1 y HA2 que codifican para la actividad de la enzima protón-ATPasa (H^+ -ATPasa) en raíces de citrange Carrizo regadas durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de $20 \mu M$ de hierro. Se realizaron 3 extracciones de RNA mensajero de las raíces fibrosas de las plantas de ambos tratamientos y se analizaron por triplicado mediante técnica RT-PCR en tiempo real. Cada valor es media de tres experimentos independientes \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza.

Además, la actividad enzimática observada en las plantas cloróticas fue prácticamente el doble que en las plantas control (Figura 14), que correlaciona con el incremento en la extrusión de protones observada en la Figura 12.

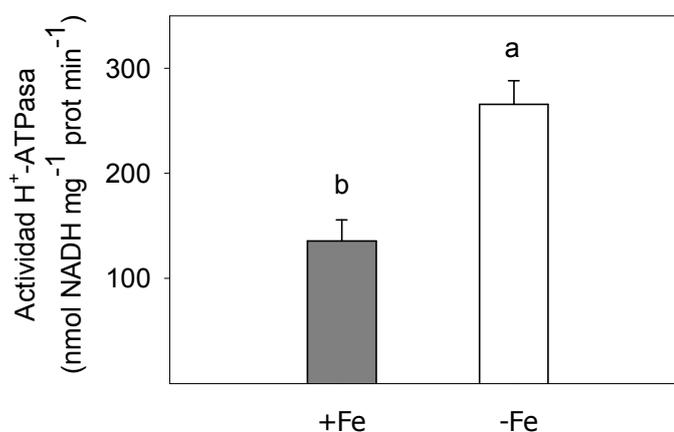


Figura 14. Análisis de la actividad del enzima protón-ATPasa (H^+ -ATPasa) en puntas de raíz de citrange Carrizo regadas durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de $20 \mu M$ de hierro. Cada valor es media de tres experimentos independientes \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza.

4.2.2. Capacidad reductora de las raíces

En segundo lugar, se estudió la capacidad reductora de hierro de las raíces tras cultivar las plantas durante 2 meses con (+Fe) o sin aporte de Fe (-Fe). El análisis de expresión de los genes que codifican la actividad de la enzima FC-R muestra que existe una expresión diferencial de los dos genes (FRO1 y FRO2) en cítricos. Así, mientras que FRO1 no muestra diferencias entre los tratamientos, el gen FRO2 experimentó una activación del 55.1% en ausencia de Fe (Figura 15).

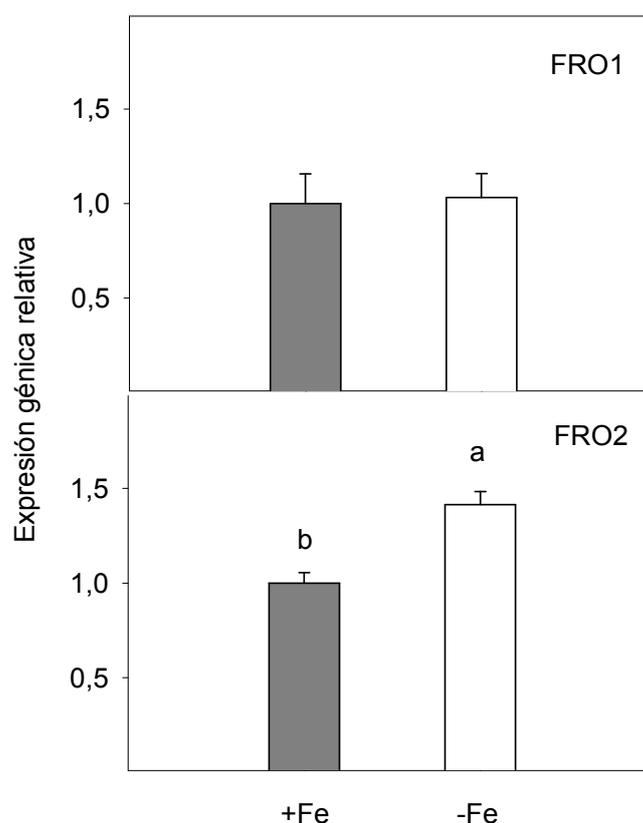


Figura 15. Análisis de la expresión génica de los genes FRO1 y FRO2 que codifican para la actividad de la enzima Quelato Reductasa Férrica (FC-R) en raíces de citrange Carrizo regadas durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 μ M de hierro. Se realizaron 3 extracciones de RNA mensajero de las raíces fibrosas de las plantas de ambos tratamientos y se analizaron por triplicado mediante técnica RT-PCR en tiempo real. Cada valor es media de tres experimentos independientes \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza.

Posteriormente se analizó su actividad enzimática. Para ello, se tomaron puntas de raíz de características homogéneas y se pusieron a incubar durante 24 h en un medio con hierro en forma férrica ($\text{Fe}^{(\text{III})}$ EDTA). El enzima redujo el sustrato y produjo hierro ferroso que se cuantificó mediante espectrofotometría. Al final del periodo de clorosis,

la inducción de la actividad de este enzima fue del 194% en las plantas deficientes (-Fe), en comparación con las plantas control (Figura 16). Este comportamiento correlaciona con la expresión del gen FRO2 (Figura 15).

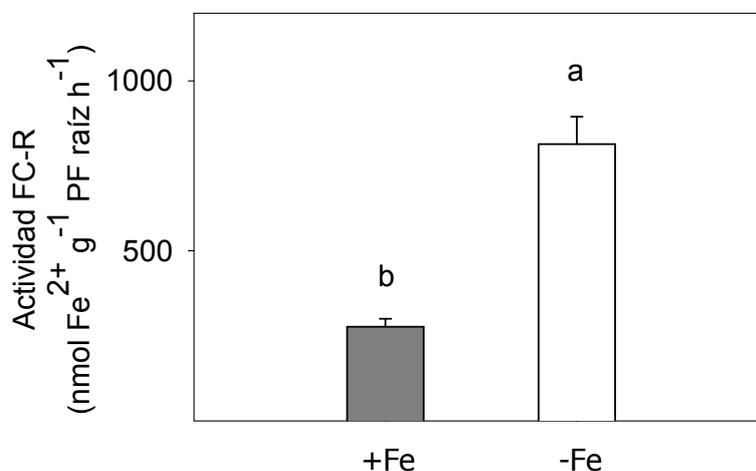


Figura 16. Análisis de la actividad del enzima Quelato Reductasa Férrica (FC-R) en puntas de raíz de citrange Carrizo regadas durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 μ M de hierro. Cada valor es media de tres experimentos independientes \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza.

4.2.3. Biosíntesis de ácidos orgánicos en la raíz: Enzima Fosfoenol Piruvato Carboxilasa

La enzima Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPCasa) es una de las responsables de activar el ciclo de Krebs en la mitocondria. Esta enzima es responsable de introducir oxalacetato en la mitocondria que favorece la síntesis de ácidos orgánicos. Estos ácidos se pueden excretar también fuera de la célula y al xilema, contribuyendo a la acidificación de la rizosfera y al transporte de Fe a otros órganos de la planta.

La figura 17 muestra que, nuevamente, el periodo de tratamiento sin hierro ha provocado la inducción de la enzima PEPCasa. Tanto el gen PEPC1 como la actividad enzimática han aumentado su expresión cuando se compararon con las plantas control. En concreto, en un 95.0 y 66.7%, respectivamente.

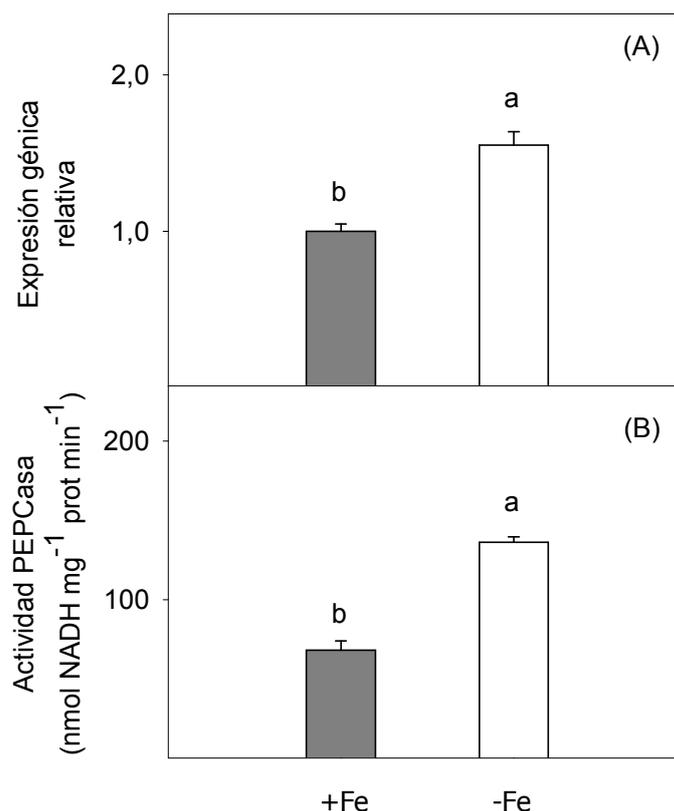


Figura 17. Análisis de la activación enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilasa (PEPCasa) en raíces de citrange Carrizo regadas durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 μM de hierro. (A) Expresión del gen PEPC1 mediante técnica RT-PCR en tiempo real. Se realizaron 3 extracciones de RNA mensajero de las raíces fibrosas de las plantas de ambos tratamientos y se analizaron por triplicado. (B) Actividad enzimática medida en puntas de raíz. Se incubaron 3 muestras de cada tratamiento y se analizaron por triplicado. Cada valor es la media de 3 experimentos \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza. Los valores con diferente letra en cada fila son significativamente diferentes.

4.2.4. Absorción de Fe en el interior de las raíces

4.2.4.1. Establecimiento del tiempo de marcado óptimo

En este ensayo se determinó la tasa de absorción de la raíz en varios tiempos de marcado (5, 10, 20, 40 y 80 minutos) con la intención de establecer el tiempo más adecuado para realizar los ensayos de absorción posteriores.

Los resultados presentados en la tabla 8 muestran que los tiempos cortos de marcado presentan mayores tasas de absorción. El tratamiento de 5 minutos tuvo una tasa 50% superior que a los 10 minutos. La tasa de absorción cuando pasamos de 10 a

40 minutos sólo se reduce un 25%. La tasa más baja es con 80 minutos de marcado (3.6 veces más baja que la de 5 minutos).

Tabla 8. Tasa de absorción de ^{57}Fe en raíces de citrange Carrizo en función del tiempo de exposición (5 a 80 minutos). Las plantas utilizadas en este ensayo eran plantas cultivadas en solución nutritiva completa. La solución utilizada durante el ensayo de marcado era similar a la de riego y la fuente de Fe se aplicó como ^{57}Fe -EDDHA (20 μM).

Tiempo marcado (minutos)	^{57}Fe absorbido (nmol ^{57}Fe g ⁻¹ PS h ⁻¹)	
5	22,23 ± 4,20	a
10	10,96 ± 2,85	b
20	7,65 ± 0,26	bc
40	8,29 ± 1,54	c
80	4,82 ± 0,60	d

^ZCada valor es la media de de 3 experimentos ± error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza. Los valores con diferente letra en cada fila son significativamente diferentes. PS: peso seco de la raíz.

4.2.4.2. Tasa de absorción de las raíces

En este ensayo se determinó la tasa de absorción de la raíz aplicando como fuente un quelato de hierro (Fe- α -EDDHA) enriquecido al 95.2% en el isótopo estable ^{57}Fe durante un periodo de marcado de 20 minutos.

Posteriormente, se analizó el enriquecimiento del sistema radical en este isótopo de modo que el exceso en la concentración en ^{57}Fe (excluyendo su abundancia natural, 2.20%) representa la absorción de la planta debida al tratamiento. Los resultados mostraron que la tasa de absorción del ion Fe^{2+} aumentó linealmente con la concentración de este ion en el substrato, ajustándose a tendencias lineales de una manera muy significativa (Figura 18). La absorción aumentó en condiciones de ausencia de Fe en el medio, obteniéndose una pendiente de 156% mayor en las plantas deficientes. Esto explica la mayor eficiencia en la absorción de las plantas sometidas a clorosis.

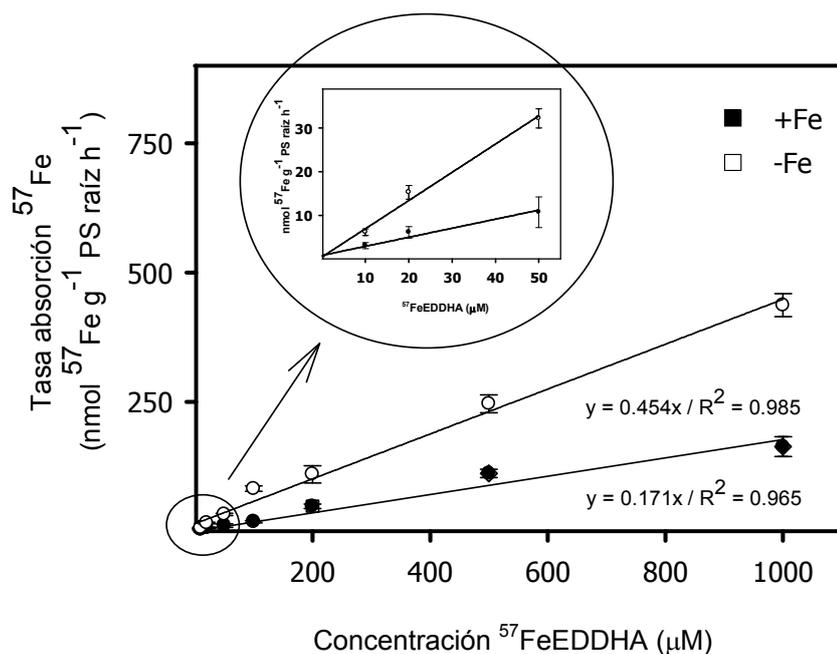


Figura 18. Determinación de la tasa de absorción de hierro en raíces de cítrange Carrizo medido como el ^{57}Fe absorbido por las raíces en función de la concentración de $^{57}\text{Fe-EDDHA}$ externo (0 a 1000 μM). Las plantas se regaron durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 μM de hierro. ²Cada valor es la media de de 3 experimentos \pm error estándar.

4.2.4.3. Transportador férrico

Nuevamente, el análisis de la expresión génica confirmó que en condiciones de ausencia de Fe se vuelve a activar otro de los componentes del sistema (Figura 19). En este caso hablamos del transportador implicado en la absorción de hierro (IRT). Durante los dos meses de tratamiento, el gen IRT1 ha aumentado un 41.5% su expresión en las plantas deficientes en comparación con las plantas control, mientras que se vio inducción significativa de IRT2.

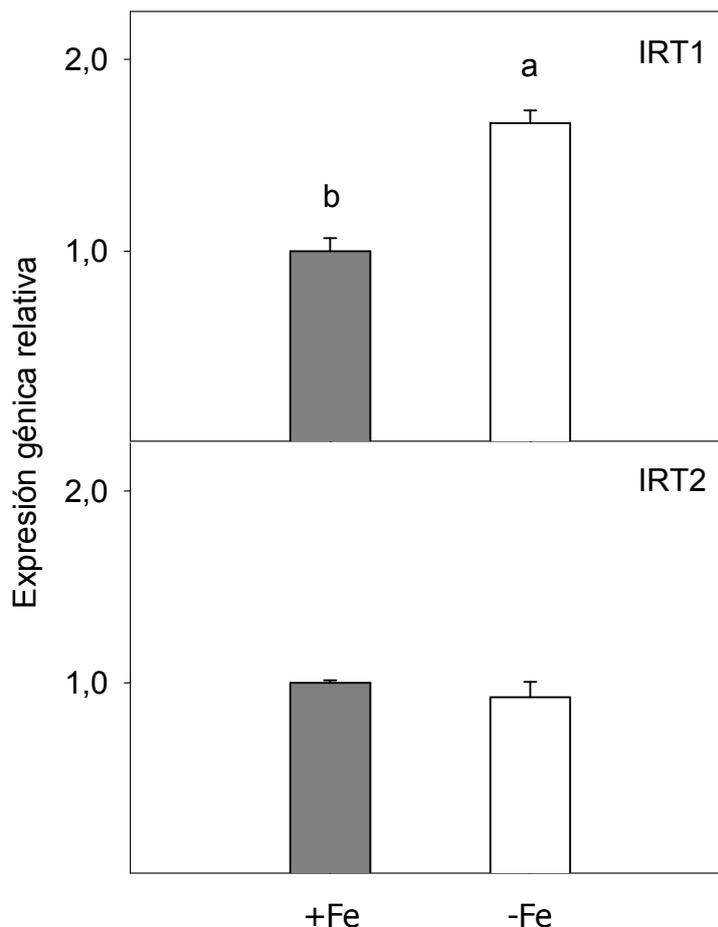


Figura 19. Análisis de la expresión génica de los genes IRT1 y IRT2 que codifican la actividad del transportador del hierro (IRT1) en raíces de citrange Carrizo regadas durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de 20 μ M de hierro. Se realizaron 3 extracciones de RNA mensajero de las raíces fibrosas de las plantas de ambos tratamientos y se analizaron por triplicado mediante técnica RT-PCR en tiempo real. Cada valor es media de tres experimentos independientes \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza.

4.2.5. Transporte de Fe, reparto en la planta

4.2.5.1. Distribución porcentual de fracciones isotópicas

La técnica de dilución isotópica nos sirvió para estudiar el reparto del Fe aportado mediante el fertilizante en los distintos órganos de la planta. En la tabla 9 se expone la concentración de los distintos isótopos en cada órgano. La media ponderada de la parte aérea, el sistema radical y el total de la planta se calculó en función de la concentración del correspondiente isótopo y el contenido en Fe total. Las plantas deficientes son las que más ^{57}Fe

absorbieron (1.7 veces mayor en el sistema radical). Nuevamente el material más marcado fue la raíz fibrosa (2.2 veces mayor que en las plantas control). Sin embargo, la diferencia del ^{57}Fe de la parte aérea entre los dos tratamientos fue menos acentuado (5.7%), posiblemente debido a la baja movilidad de Fe.

El aumento en la concentración de ^{57}Fe en las plantas deficientes provocó la disminución del resto de isótopos. Si se estudia cada uno individualmente, la reducción de ^{54}Fe y ^{56}Fe (isótopo mayoritario en la naturaleza) fue entorno al 1.1% para ambos, mientras que el descenso del ^{58}Fe fue de 3.8% en el conjunto de la planta.

Tabla 9. Abundancia de los isótopos de Fe (A_t , en %) en los distintos órganos de la planta tras un periodo de 1 semana de riego con $100 \mu\text{M } ^{57}\text{FeEDDHA}$. Previamente, las plantas de citrange Carrizo fueron inducidas a la clorosis férrica regándolas durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de $20 \mu\text{M}$ de hierro.

	Fracciones isotópicas Fe (%) ^z							
	+Fe				-Fe			
	$^{54}A_t$	$^{56}A_t$	$^{57}A_t$	$^{58}A_t$	$^{54}A_t$	$^{56}A_t$	$^{57}A_t$	$^{58}A_t$
Hojas	5,800	91,710	2,233	0,257	5,796	91,581	2,345	0,278
Tronco	5,799	91,618	2,316	0,267	5,795	91,484	2,467	0,254
Parte aérea	5,799	91,687	2,254	0,260	5,796	91,556	2,377	0,272
Raíz gruesa	5,726	90,540	3,458	0,276	5,661	89,455	4,632	0,252
Raíz fibrosa	5,765	91,132	2,827	0,276	5,561	88,029	6,174	0,236
Sistema radical	5,761	91,077	2,885	0,276	5,584	88,358	5,818	0,240
Planta	5,779	91,360	2,593	0,269	5,696	90,051	3,996	0,257

4.2.5.2. Contenido en ^{57}Fe y distribución relativa

En la tabla 10 se muestran los valores de enriquecimiento (o exceso) del isótopo ^{57}Fe , expresado como microgramos de ^{57}Fe absorbidos por los distintos órganos de la planta. El cálculo de este parámetro se describe en el apartado 3.5.2.4. del capítulo Material y Métodos.

Con independencia del tratamiento, se observó que las plantas de ambos tratamientos se marcaron con ^{57}Fe en todos sus órganos, y en mayor medida en las plantas deficientes. El contenido en ^{57}Fe en las planta deficiente fue 1.8 veces superior que en las plantas control, debido sobre todo al enriquecimiento del sistema radical, y en particular a la raíz fina (86.3% superior). Aunque la cantidad de ^{57}Fe absorbida por las hojas es muy baja en comparación con el resto de órganos de la planta, merece especial mención que el enriquecimiento en las plantas deficitarias fue 103.5% superior a los controles.

Como se ha expuesto anteriormente, el sistema radical se enriqueció considerablemente más que la parte aérea, acumulando prácticamente en torno al 94% del total del ^{57}Fe absorbido por la planta en ambos tratamientos.

Tabla 10. Contenido en exceso de ^{57}Fe (μg) y su distribución relativa (%) en los distintos órganos y del total de la planta correspondiente a plantas de citrange Carrizo regadas durante 1 semana con $100\ \mu\text{M}$ $^{57}\text{FeEDDHA}$. Previamente, las plantas fueron inducidas a la clorosis férrica regándolas durante 2 meses con una solución nutritiva en presencia (+Fe) o en ausencia (-Fe) de $20\ \mu\text{M}$ de hierro.

	^{57}Fe exceso (μg)		^{57}Fe exceso (%)	
	+Fe	-Fe	+Fe	-Fe
Hojas	0,046 \pm 0,002 b	0,095 \pm 0,003 a	2,9	3,2
Tronco	0,057 \pm 0,004	0,061 \pm 0,007	3,5	2,0
Parte aérea	0,103 \pm 0,090 b	0,155 \pm 0,029 a	6,4	5,2
Raíz gruesa	0,255 \pm 0,031 b	0,426 \pm 0,024 a	15,8	14,4
Raíz fibrosa	1,254 \pm 0,185 b	2,384 \pm 0,072 a	77,8	80,4
Sistema radical	1,508 \pm 0,252 b	2,811 \pm 0,118 a	93,6	94,8
Planta	1,612 \pm 0,117 b	2,966 \pm 0,390 a	100,0	100,0

^zCada valor es la media de 6 plantas \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza. Los valores con diferente letra en cada fila son significativamente diferentes.

5. DISCUSIÓN

La clorosis férrica es un problema agrícola muy extendido, especialmente para aquellos cultivos que se desarrollan en terrenos alcalinos calizos -con pHs entre 7.5 y 8.5-, donde la concentración de bicarbonato presente suele ser alta (Lindsay y Schwab, 1982; Lucena, 2000).

Muchos autores han clasificado los patrones de cítricos en función de su tolerancia a la clorosis férrica, sobre la base de algunos de sus efectos en la parte aérea, como son principalmente, la reducción del crecimiento (Pestana y cols. 2005; Castle y cols. 2009) o la alteración del aparato fotosintético (Sudahono y cols. 1994; Pestana y cols. 2005; Castle y cols. 2009; González-Mas y cols. 2009). También se ha utilizado la capacidad reductora de las raíces como indicador del grado de resistencia a esta fisiopatía (Treeby y Uren, 1993; Castle y cols. 2009). Sin embargo, poco se ha dicho, sobre la respuesta global del sistema de absorción de Fe en plantas de cítricos ante la falta de este elemento, y especialmente, sobre los mecanismos bioquímicos y genéticos que se activan en el sistema radical bajo estas condiciones, así como sobre su regulación.

En este trabajo, se estudian las respuestas de un patrón de cítricos, en el que se ha inducido la clorosis férrica. En primer lugar, se han observado los síntomas visuales de la deficiencia en hierro, y se ha medido el crecimiento vegetativo, los niveles de hierro endógeno y el estado fotosintético de la planta. En segundo término, se ha analizado el comportamiento de los distintos componentes del sistema de absorción de hierro por las raíces. El genotipo utilizado en el estudio fue el citrange Carrizo, considerado como una especie de tolerancia intermedia a la clorosis férrica, pero que puede manifestar síntomas agudos de deficiencia en suelos altamente calizos (Castle y cols. 2009).

El sistema empleado para inducir la clorosis férrica en las plantas fue la eliminación completa de la fuente de Fe durante un tiempo. De esta manera, se tomaron plantas de citrange Carrizo y se regaron durante 2 meses con una solución nutritiva carente de Fe. A lo largo del periodo que duró el tratamiento de inducción, las plantas manifestaron progresivamente los síntomas característicos de la deficiencia de este elemento. La ausencia de hierro produjo brotaciones vegetativas menos vigorosas, hojas más pequeñas, y en general reducción del crecimiento de la planta. En concreto, las plantas deficientes mostraron un descenso de su biomasa del 27.0%, principalmente debida a la reducción casi a la mitad del peso de la parte aérea (Tabla 3). Este fenómeno ha sido ampliamente descrito en cítricos y otras especies sometidas a condiciones de

clorosis férrica (Legaz y cols. 1995, 2008; Pestana y cols. 2005). La reducción del peso de las raíces fue menor (13.8%), en contraposición con algunos autores que han observado un incremento de la biomasa del sistema radical en las plantas cultivadas en ausencia de Fe debido al aumento en el número de raíces secundarias (Kramer y cols. 1980; Viti y Cinelli, 1993; Bavaresco y cols. 1994; Marschner y cols. 1996; McDonald y cols. 1996; Pestana y cols. 2005).

El **contenido total de Fe en la planta** también se vio reducido en casi un 60% cuando no se le suministró este elemento (Tabla 7). La principal reducción de la concentración de Fe se produjo en la raíz fibrosa (70% respecto al control), posiblemente porque al suprimir el aporte de Fe en la solución de riego durante los dos meses de inducción, se provocó la movilización de la reserva de Fe de esta fracción de la planta, para translocarse hacia la parte aérea durante el crecimiento vegetativo. A pesar de ello, el contenido de Fe registrado en las hojas de las plantas deficientes también se redujo en un 54%. Algunos autores han propuesto que, de acuerdo con lo que se ha denominado la “paradoja del Fe”, el contenido en Fe total no es por sí solo un buen parámetro para determinar el grado de clorosis de la planta (Morales y cols. 1998; Römheld, 2000). No obstante, existe una extensa bibliografía indicando que en los cítricos, generalmente, la concentración de Fe de las hojas se correlaciona con el grado de deficiencia de este elemento (Embleton y cols. 1973). Castle y cols. (2009) también observaron una reducción en el contenido de Fe en plantas de cítricos a las que se les retiró el aporte de Fe.

El hierro en la planta juega un papel muy importante en la formación y mantenimiento de la estructura del **aparato fotosintético** de la hoja, así como en su funcionamiento (Terry y Abadía, 1986). La concentración de clorofilas en las hojas brotadas durante el periodo de inducción de la clorosis (Tabla 6) es similar a la descrita por otros autores en plantas de cítricos (Zude y cols. 1999; Rivera-Ortíz y cols. 2007; González-Mas y cols. 2009), o de otras especies (Morales y cols. 1991; Abadía y cols. 1989; Pestana y cols. 2005; Molassiotis y cols. 2006; Jelali y cols. 2010a). La concentración de clorofilas está en correlación con el contenido de Fe en éstas, indicando el grado de clorosis que sufre la planta (Larbi y cols. 2006). El incremento del ratio clorofila a/b en las plantas deficientes de Fe fue de 52.0% en comparación con las plantas +Fe, lo cual es característico de este tipo de clorosis (Quilez y cols. 1992; Sharma, 2004). Esto se debió a la pérdida de clorofila b, pigmento asociado con los complejos antena de los fotosistemas I y II (Tanaka y cols. 2001). Ello sugiere la

disminución del tamaño del complejo como mecanismo de adaptación en condiciones de deficiencia de Fe para evitar el exceso de luz (Timperio y cols. 2007). También parece que el descenso en la concentración de clorofila total puede estar relacionado con el papel del Fe en la formación de compuestos como el ácido g-aminolevulínico y protoclorofilas, precursores de la biosíntesis de clorofilas (Marschner, 1995).

El análisis de la fluorescencia es una herramienta muy útil para estudiar el estado del aparato fotosintético de la planta *in vivo* y su posible daño fotoquímico. En nuestro caso (Tabla 5), se observó un descenso del ratio Fv/Fm que al parecer no fue debido a cambios en la cadena transportadora de electrones (variación de Fm), sino a cambios estructurales en el PSII, particularmente a nivel de pigmentos (variación de Fo). El aumento de Fo puede tener su origen en el incremento de la reducción del *pool* de plastoquinona en la fase oscura de la fotosíntesis, como ya describieron Belkhdja y cols. (1998) en remolacha y otras especies. Además, de acuerdo con Pereira y cols. (2000), la reducción del ratio entre la fluorescencia variable y la inicial (Fv/Fo) es consecuencia de daños estructurales en los tilacoides, afectando negativamente a la fotosíntesis. Sin embargo, Morales y cols. (2000) apuntaron que el rendimiento máximo de la fluorescencia en oscuridad (Fv/Fm) puede no ser indicativo del daño real del fotosistema II en hojas deficientes de Fe. Estos autores demostraron que la deficiencia de Fe puede desacoplar también el complejo antena del PSII de los centros de reacción. Según ellos, la eficiencia del fotosistema II (PSII) se vería afectada solo ligeramente en condiciones de clorosis férrica (Morales y cols. 1998; Pestana y cols. 2001; Molassiotis y cols. 2006).

El fuerte descenso en la concentración de Fe provocó una reducción severa de la asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}), la conductancia estomática (gs) y la tasa de transpiración (E) de acuerdo a los resultados expuestos en la Tabla 4. Todo ello se asocia con una reducción del uso eficiente del agua (UEA) en las plantas cloróticas (Larbi y cols. 2006; Molassiotis y cols. 2006; Eichert y cols. 2010). Aunque esta disminución del UEA no está bien estudiada parece que se debe al menor peso de la cutícula abaxial (o envés) de la hoja con bajo contenido en Fe y la disminución de la cantidad de lípidos solubles presentes en la cutícula por unidad de superficie, que provoca, por tanto, que la resistencia de la cutícula de estas hojas a la pérdida de agua sea menor. Además, existen indicios que sugieren también una alteración de la regulación estomática en las hojas cloróticas y que influiría en el UEA. Se ha observado que la deficiencia de Fe disminuye la longitud de poro del estoma, ya que limita el

crecimiento y la expansión de la hoja (Fernández y cols. 2008). El proceso de diferenciación estomática continúa en la hoja hasta que ésta alcanza entre 10 y 50% de su tamaño final y es sensible a las condiciones ambientales, incluyendo el estado nutricional de la planta. La disminución de la longitud del poro en las hojas deficientes se puede asociar a la reducción de la expansión de la hoja tanto a nivel de epidermis como de células guardia. Esto explicaría la bajada del 52.0% en la conductancia estomática observada en las plantas deficientes. La bajada de la A_{CO_2} es debida, no solo a un efecto estomático, sino también, a la alteración del aparato fotosintético, provocada por la reducción del contenido de clorofila y un desarrollo anormal de los cloroplastos, con desorganización de los grana y formación de cuerpos osmofílicos de naturaleza lipídica. Otra consecuencia es la reducción del número y tamaño de los gránulos de almidón (Zhou-Hou y cols. 1984; Davis TD y cols. 1986).

Los cítricos, como el resto de dicotiledóneas, emplean la **estrategia I** como mecanismo de absorción de hierro. En concreto, las raíces responden a la deficiencia de Fe mejorando la acidificación del apoplasto de la raíz, así como induciendo la actividad de la enzima encargada de la reducción de las formas férricas de la solución del suelo. A menudo, las plantas también liberan compuestos reductores a la rizosfera, en su mayoría ácidos orgánicos. Además, se activa una proteína transportadora que impulsa el transporte del ión Fe^{2+} a través de la membrana plasmática de la raíz (Schmidt, 1999; Abadía, 2002; Marschner y Römheld, 1994; Kim y Guerinot, 2007). Los resultados presentados en este trabajo muestran las respuestas del patrón citrange Carrizo a nivel de expresión génica y fisiológica, que puede determinar su tolerancia a la clorosis férrica.

En presencia de Fe, no se detectaron diferencias en la expresión constitutiva de los genes HA1 y HA2 de la raíz en este genotipo, aunque la deficiencia de hierro aumentó significativamente los niveles de transcripción de HA1 en un 64% con respecto a las plantas control (Figura 13). Algunas investigaciones anteriores demuestran que la acidificación de la rizosfera después de la deficiencia de Fe depende en gran medida la expresión de los miembros de la familia del gen HA (Santi y Schmidt, 2009), y coincidiendo con nuestros resultados, el gen CsHA1 de pepino está regulado por el nivel de Fe, mientras que el gen CsHA2 no se ve afectado (Santi y cols. 2005). La actividad de la **enzima H^+ -ATPasa** aumentó un 51% en las raíces de las plantas deficientes de Fe (Figura 14), de acuerdo con los datos obtenidos sobre la

acidificación de la solución externa (Figura 12). Así pues, parece que en cítricos, esta actividad enzimática está estrechamente regulada por la expresión del gen HA1. En estudios anteriores, se observó que dentro de una misma especie, existen genotipos sensibles y tolerantes a la clorosis férrica, y que difieren en su capacidad para acidificar la rizosfera cuando el Fe escasea (Rabotti y Zocchi, 2006; Rabotti y cols. 1995; Tagliavini y cols. 1995; Wey y cols. 1997; Vizzotto y cols. 1999; Dell'Orto y cols. 2000; Ksouri y cols. 2006; Donnini y cols. 2009; Jelali y cols. 2010a). En un estudio sobre cítricos, Treeby y Uren (1993) observaron que las especies más tolerantes a la clorosis disminuían el pH de la solución nutritiva en respuesta a la deficiencia de Fe, mientras que los menos tolerantes no tenían esta capacidad tan desarrollada. Por el contrario, nuestros resultados mostraron que la extrusión de protones ocurre en las raíces de las plantas de ambos estados nutritivos, aunque este efecto fue más intenso en las plantas deficientes de Fe.

También se analizó la expresión de los genes FRO en las raíces de cítricos, ya que la absorción de hierro en las plantas está fuertemente regulada por los niveles de transcripción de estos genes, dado su papel en la reducción de Fe en la superficie de la raíz (Jeong y cols. 2009). Los datos presentados en este documento confirman el comportamiento inductivo de estos genes observado en otras especies como consecuencia de la deficiencia de Fe (Connolly y cols. 2003). Así, el acusado incremento en un 55% de los niveles de transcripción del gen FRO2 en citrange Carrizo tras la ausencia de hierro, parece indicar la existencia de un sistema más eficaz que permite la reducción de hierro, supuestamente crítico contra el estrés férrico (Figura 15). Por otra parte, los niveles relativamente altos de FRO2 encontrados en las raíces de las plantas control, podría sugerir una apreciable capacidad reductora constitutiva en las raíces de los cítricos (Li y cols. 2002). De acuerdo con esto, la actividad FCR fue inducida en un 194% en las raíces de las plantas con deficiencia de Fe (Figura 16). De esta manera, se ha observado una estrecha relación entre la capacidad de reducción de las raíces y la tolerancia a la clorosis férrica de algunos genotipos de las plantas leñosas (Dell'Orto y cols. 2000a; Gogorcena y cols. 2004), incluyendo cítricos, donde la deficiencia de Fe aumentó la actividad FC-R en mayor medida en las especies tolerantes a la clorosis que en las sensibles (Treeby y Uren, 1993; Manthey y cols. 1994). Estas afirmaciones están de acuerdo con nuestros resultados, lo que indican que la deficiencia de Fe induce una fuerte respuesta para la reducción de Fe^{3+} en el sistema radical de citrange Carrizo cuando la solubilidad de las formas férricas del suelo está

comprometida (como es el caso por ejemplo, de suelos con pH elevado), y que probablemente determina el grado de tolerancia de este patrón a la clorosis férrica.

Por todo ello, la activación de la actividad de las enzimas FC-R y H⁺-ATPasa en las raíces de las plantas con deficiencia de hierro, ha sido considerada por algunos autores como una acción sinérgica de ambas enzimas para mejorar la adquisición de Fe, a través de la acidificación del apoplasto radicular y de la reducción de Fe³⁺ (Rabotti y Zocchi, 1994; Rabotti y Zocchi, 2006; Vizzotto y cols. 1999; Dell'Orto y cols. 2000; Donnini y cols. 2009; M'sehli y cols. 2009; Jelali y cols. 2010), como parece ocurrir en portainjertos de cítricos.

En este trabajo, también se identificaron las secuencias en cítricos de dos miembros de la familia de genes IRT (IRT1 e IRT2) que se ha demostrado que codifican los principales **transportadores férricos** responsables en los procesos de absorción de alta afinidad del metal (Eide y cols. 1996; Vert y cols. 2001, 2002, 2009.) y se analizó su expresión génica mediante RT-PCR (Figura 19). En primer lugar, nuestros datos muestran que la expresión de IRT2 no se vio afectada como consecuencia de la ausencia de Fe, mientras que IRT1 aumentó significativamente el número de transcripciones. Esta observación podría indicar un papel clave del transportador IRT1 en la reacción de los portainjertos de cítricos ante condiciones de deficiencia de Fe, por el aumento de la capacidad del transporte de hierro en la raíz, de acuerdo con informes anteriores sobre *Arabidopsis* (Cohen y cols. 1998; Guerinot, 2000; Connolly y cols. 2002; Henriques y cols. 2002; Vert y cols. 2002).

Adicionalmente, para estudiar la cinética de absorción de Fe por la raíz se realizaron varios **ensayos de marcado** con un quelato férrico (FeEDDHA) enriquecido en el isótopo de 57 neutrones (⁵⁷Fe). La dilución isotópica se ha descrito como una técnica muy eficaz para este tipo de ensayos (Rodríguez-Castrillón y cols. 2008). Anteriormente, se habían realizado estudios empleando isótopos radioactivos, pero la peligrosidad de los mismos dificultaba el manejo del material y el análisis de las muestras (Cesco y cols. 2002; Bocanegra y cols. 2006). También se utilizó la espectroscopía Mössbauer para detectar isótopos estables, pero esta técnica exige un alto enriquecimiento de los tejidos vegetales, difícil de conseguir en los ensayos de nutrición comunes y sobre todo en aquellos que requieren un corto tiempo de marcado (Kilcoyne y cols. 2000; Kovács y cols. 2005). Finalmente, Rodríguez-Castrillón y cols.

(2008) estudiaron la absorción de ^{57}Fe en plantas de pepino utilizando por primera vez la espectrometría de plasma inducido (ICP-MS) de alta resolución para analizar el enriquecimiento del material vegetal. Se trata de una técnica de detección muy empleada en el análisis multielemental o de varios isótopos debido a su selectividad y alta sensibilidad a concentraciones de traza. En esta ocasión, los isótopos empleados son estables y no radioactivos y la sensibilidad del equipo elevadísima. Por todo ello, resulta ser una herramienta muy útil y eficaz para estudios de absorción, y es la que se eligió para analizar todas las muestras de material vegetal enriquecido con ^{57}Fe .

Para determinar la **tasa de absorción de Fe por la raíz** se realizó un ensayo de tiempo corto de marcado y con concentraciones crecientes de $^{57}\text{FeEDDHA}$. Anterior a éste, se planteó otro ensayo para establecer el tiempo óptimo de marcado, ya que no existían estudios previos similares en plantas de cítricos. Se determinó la tasa de absorción de las plantas ante distintos tiempos de tratamiento (de 5 a 80 minutos). El ratio por hora en los tiempos de exposición más cortos fue mayor, hasta 2.9 veces más alto con 5 minutos que con 10 (Tabla 8), pero se descartó su empleo porque en tiempos muy cortos de marcado puede haber sobreestimaciones debidas a pequeñas cantidades de trazador adheridas a la pared celular. Además, los errores cometidos al corregir el resultado en base a una hora, son más pronunciados en estos niveles (Kronzucker y cols. 1996). También se descartaron los tiempos más largos porque pueden producirse fenómenos de translocación del trazador. Por todo ello, se estableció un tiempo de marcado óptimo de 20 minutos, tiempo considerado adecuado para que el flujo de salida del isótopo desde el citoplasma sea prácticamente despreciable (Kronzucker y cols. 1996).

Seguidamente, se realizó el ensayo de la tasa de absorción de Fe con concentraciones crecientes de sustrato (desde 10 a 1000 μM) en las plantas de ambos estados nutricionales. Nuestros resultados mostraron que la respuesta en ambos casos fue lineal con la concentración de sustrato, pero la deficiencia de hierro impulsó la tasa de absorción del $^{57}\text{Fe-EDDHA}$ por la raíz, obteniéndose una estimulación del 168.0% para la concentración extrema de 1 mM (Figura 18) en relación a las plantas control (+Fe). En consecuencia, Fox y cols. (1996) obtuvieron un aumento de la absorción de Fe en *Pisum sativum* inducida por la deficiencia de Fe, mediante el uso de un quelato enriquecido en ^{59}Fe . Además, Manthey et al., (1994) midieron las cantidades de ^{55}Fe transportados a las partes superiores de las plantas de cítricos durante las 2 semanas de crecimiento tras un período inicial de 3 días de exposición a FeHEDTA marcado con

^{55}Fe . Estos autores proponen que el ^{55}Fe transportado a los tallos y hojas fue proporcional al Fe activamente absorbido por las raíces; ya que probablemente, los niveles de ^{55}Fe en las raíces reflejan en gran medida la precipitación no regulada de Fe en la superficie de la raíz. Por lo tanto, la translocación de ^{55}Fe desde las raíces hasta los brotes fue significativamente mayor para las plantas con deficiencia de Fe que para el control. Estos resultados apoyan en parte a los obtenidos en nuestro trabajo, aunque el método utilizado no es comparable.

Las concentraciones de sustrato ensayadas en este estudio parecen mostrar que el comportamiento cinético de los transportadores de Fe^{2+} en las raíces de cítricos difiere de los sistemas de transporte de alta afinidad (HATS) de otros iones, que siguen una cinética de Michaelis-Menten con un umbral de saturación en concentraciones inferiores a 1 mM (Siddiqi y cols. 1990; Wang y cols. 1993; Kronzucker y cols. 1996; Cerezo y cols. 2001). Esto es probablemente debido a que el Fe (III) quelado debe reducirse a Fe (II) antes de su absorción, y por ello existe una interferencia clara de la capacidad reductora de la FCR en este proceso. En este sentido, Grusak y cols. (1990) observaron la correlación entre los cambios en la actividad reductasa y la absorción de Fe en raíces de *Pisum sativum*; y posteriormente, Manthey y cols. (1993) sugirieron que los niveles de absorción de ^{55}Fe en plantas de cítricos también mostraban buena correlación con la tasa de reducción de las raíces.

La inducción de la absorción en condiciones de ausencia de Fe también se reflejó en una estimulación **del transporte de Fe a larga distancia en la planta**. Las plantas deficientes en Fe respondieron de manera más eficiente al ensayo, mostrando una acumulación de ^{57}Fe mayor, tanto a nivel de total de planta como de las distintas fracciones vegetales que la componen (Tabla 10). La distribución relativa del ^{57}Fe muestra el notable enriquecimiento del sistema radical frente a la parte aérea, de entorno al 94 y 6%, respectivamente, pero no viéndose diferencias entre ambos tratamientos. Manthey y cols. (1994) observaron que el ^{55}Fe transportado a los tallos y hojas fue proporcional al Fe activamente absorbido por las raíces.

Nuestro estudio, también confirmó la estimulación de la enzima **Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPCasa)**, enzima descrita como desencadenante del aporte de compuestos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos en condiciones deficitarias de Fe, y de la consecuente síntesis de ácidos orgánicos en el interior de la

célula. Las plantas deficientes en Fe experimentaron una inducción del 95% de la actividad del gen PEPC1 que codifica dicha proteína en raíces de cítricos (Figura 16). Esto se confirmó con la estimulación en un 66.7% de la actividad del enzima en ausencia de Fe. Esta estimulación de la enzima ante la deficiencia de Fe es coincidente con los resultados obtenidos en otras plantas como *Beta vulgaris* (Andaluz y cols. 2002), *Pisum sativum* (Jelali y cols. 2010b), *Actinidia deliciosa* (Rombolá y cols. 2002) y *Cucumis sativus* (De Nisi y Zocchi, 2000) y *Medicago truncatula* (Andaluz y cols. 2009). La inducción del enzima también se asocia con la tolerancia de distintos genotipos de *Prunus* a la clorosis férrica (Jiménez y cols. 2011).

6. CONCLUSIONES

La absorción de hierro en cítricos aumentó en ausencia de Fe en el medio, debido a la activación de los componentes del sistema de absorción de este elemento en condiciones de clorosis, descrito en plantas dicotiledóneas como “estrategia I”.

La actividad de la enzima Quelato Reductasa Férrica (FC-R), responsable de reducir las formas férricas a ferrosas, se indujo significativamente en condiciones de déficit de hierro.

Tanto la disponibilidad del Fe como la capacidad de asimilación de éste por la planta son altamente dependientes del pH del medio. En condiciones de deficiencia de hierro se intensifica la extrusión de protones para solubilizar el ión férrico en el entorno del sistema radical. La activación de la enzima Protón-ATPasa (H^+ -ATPasa) para acidificar eficientemente el medio externo, es clave en el proceso metabólico de extrusión de protones.

La deficiencia de Fe estimuló marcadamente la actividad de la enzima Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPCasa), responsable de la activación de la síntesis de ácidos orgánicos. Estos ácidos participan en la regulación del pH celular, en la acidificación de la rizosfera y en el transporte de Fe a larga distancia.

La ausencia de Fe indujo la activación de los genes FRO2, HA1 y PEPC1 de cítricos que codifican la expresión de las enzimas FC-R, H^+ -ATPasa y PEPCasa, respectivamente.

El transporte del hierro en estado ferroso, al interior de la planta se lleva a cabo mediante un transportador férrico específico (IRT1) localizado en las células epidérmicas de la raíz de los cítricos. En ausencia de hierro, IRT1 incrementó significativamente su expresión génica.

El estudio de la absorción de ^{57}Fe por el sistema radical reveló que existen marcadas diferencias en la absorción del hierro dependiendo de la disponibilidad de este elemento. La tasa de absorción del ion Fe^{2+} por el sistema radical experimentó una tendencia lineal con el aumento de la concentración de éste en el substrato, y fue mayor en condiciones deficitarias de Fe.

Finalmente, de los resultados expuestos en este trabajo se deduce que las respuestas bioquímicas en las plantas de cítricos deficientes en Fe reflejan una estrategia de absorción de este elemento que tiene como resultado final una mejora de la movilización del Fe en la rizosfera, y en su reducción; esto conlleva un aumento de la absorción por el sistema radical. Además, todos los componentes del sistema de absorción de Fe de las raíces de este cultivo están metabólicamente inter-

correlacionados unos con otros y colaboran en la absorción del elemento por la planta. El grado de tolerancia a la clorosis férrica está determinado por la regulación de estos componentes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abadía J.** 1992. Leaf responses to Fe deficiency: a review. *J. Plant Nutr.* 15(10):1699-1713.
- Abadía J y Abadía A.** 1993. Iron and plant pigments. pp:327-343. En: Iron chelation in plants and soil microorganisms. Barton LL y Hemming BC. eds.; Academic press: New York, USA.
- Abadía A, Sanz M, de las Rivas J y Abadía J.** 1989. Photosynthetic pigments and mineral composition of Fe deficiency pear leaves. *J. Plant Nutr.* 12:827-838.
- Abadía J, López-Millán AF, Rombolá A y Abadía A.** 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil* 241:75-86.
- Abbott AJ.** 1967. Physiological effects on micronutrient deficiencies in isolated roots of *Lycopersicon esculentum*. *New Phytol.* 66:419-437.
- Alcántara E, de la Guardia MD y Romera FJ.** 1991. Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion in roots of Fe-deficient cucumber plants. *Plant Physiol.* 96:1034-1037.
- Alcántara E, Romera FJ, Cañete M y de la Guardia MD.** 1994. Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *J. Exp. Bot.* 45(281):1893-1898.
- Alhendawi RA, Römheld V, Kirkby EA y Marschner H.** 1997. Influence of increasing bicarbonate concentrations on plant growth, organic acid accumulation in roots and iron uptake by barley, sorghum and maize. *J. Plant Nutr.* 20(12):1731-1753.
- Álvarez-Fernández A.** 2000. Calidad y eficacia de quelatos férricos (Fe-EDDHA, Fe-EDDHMA, Fe-EDDHSa y Fe-EDDCHA) como fertilizantes. Tesis doctoral. pp.:463. Universidad Autónoma de Madrid.
- Álvarez-Fernández A, Sierra MA y Lucena JJ.** 2002. Reactivity of synthetic Fe chelates with soils and soil components. *Plant Soil.* 241:129-137.
- Álvarez-Fernández A, Paniagua P y Abadía J.** 2003. Effect of Fe deficiency chlorosis on fruit quality in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J. Agri. Food Chem.* 51:5738-5744.
- Álvarez-Fernández A, Abadía J y Abadía A.** 2005. Iron deficiency, fruit yield and fruit quality. pp.: 85-101. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plants and Microbes. Barton LL y Abadía J eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.
- Andaluz S, López-Millán AF, Peleato ML, Abadía J y Abadía A.** 2002. Increases in phosphoenolpyruvate carboxylase activity in iron-deficient sugar beet roots: Analysis of spatial localization and post-translational modification. *Plant Soil* 241:43-48.
- Andaluz S, Rodríguez-Celma J, Abadía A, Abadía J y López-Millán AF.** 2009. Time course induction of several key enzymes in *Medicago truncatula* roots in response to Fe deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 47:1082-1088.
- Andrews NC, Fleming MD y Gunshin H.** 1999. Iron transport across biologic membranes. *Nutr. Rev.* 57(4):114-123.
- Astolfi S, Zuchi S, Passera C y Cesco S.** 2003. Does the sulfur assimilation pathway play a role in the response to Fe deficiency in maize (*Zea mays* L.) plants?. *J. Plant Nutr.* 26(10-11):2111-2121.
- Award F, Römheld V y Marschner H.** 1988. Mobilization of ferric iron from a calcareous soil by plant-borne chelators (phytosiderophores). *J. Plant Nutr.* 11(6-11):701-713.

- Bar-Akiva A, Maynard DN y English JE.** 1978. A rapid tissue test for diagnosing iron deficiencies in vegetable crops. *HortScience*. 13:284-285.
- Barton LL, Johnson GV, O'nan AG y Wagener BM.** 2000. Inhibition of ferric chelate reductase in alfalfa roots by cobalt, nickel, chromium and copper. *J. Plant Nutr.* 23(11-12):1833-1845.
- Bäuer P, Thiel T, Klatter M, Berezcky Z, Brumbarova T, Hell R y Grosse I.** 2004. Analysis of sequence, map position and gene expression reveals conserved essential genes for iron uptake in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiol.* 136:4169-4183.
- Bavaresco L, Fregoni M y Perino A.** 1994. Physiological aspects of lime-induced chlorosis in some *Vitis* species. I. Pot trial on calcareous soils. *Vitis* 33:123-126.
- Beale SI.** 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.* 60:43-73.
- Beinert H y Kennedy MC** 1989. Engineering of protein bound iron-sulfur clusters. A tool for the study of protein and cluster chemistry and mechanisms of iron-sulfur enzymes. *Eur. J. Biochem.* 186:5-15.
- Belkhdja R, Morales F, Quilez R, López-Millán AF, Abadía A y Abadía J.** 1998. Iron deficiency causes changes in chlorophyll fluorescent due to the reduction in the dark of the photosystem II acceptor side. *Photosynth. Res.* 56:265-276.
- Benavides A.** 2000. Absorción y asimilación de hierro en las plantas. *Ciencia UANL* 3(1):50-57.
- Bergmann W.** 1992. Nutricional disorders of plants. Gustav Fischer Verlag Jena. Stuttgart, New Cork, pp:741.
- Bertoni GM, Pissaloux A, Morard P y Sayag DR.** 1992. Bicarbonate-pH relationship with iron chlorosis in white lupins. *J. Plant Nutr.* 15(10):1509-1518.
- Bienfait HF.** 1988a. Mechanism in Fe-efficiency reactions of higher plants. *J. Plant Nutr.* 11(6-11):605-629.
- Bienfait HF.** 1988b. Proteins under control of the gene for Fe efficiency in tomato. *Plant Physiol.* 88(3):785-787.
- Bienfait HF y Van der Mark F.** 1983. Phytoferritin and its role in iron metabolism. En: *Metals and micronutrients: uptake and utilization by plants.* Robb DA y Pierpoint WS (eds). Academic Press, New York, 111-123.
- Bienfait HF, Van den Briel W y Mesland-Mul NT.** 1985. Free space iron pools in roots. *Plant Physiol.* 78:596-600.
- Bienfait HF, Lubberding HJ, Heutink P, Linder L, Visser J, Kaptein R y Dijkstra K.** 1989. Rhizosphere acidification by iron deficient bean plants: the role of trace amounts of divalent metal ions. *Plant Physiol.* 90: 359-364.
- Bienfait HF y Scheffers MR.** 1992. Some properties of ferric citrate relevant to the iron nutrition of plants. *Plant Soil* 143(1):141-144.
- Bocanegra MP, Lombartini JC y Orioli GA.** 2006. Plant uptake of iron chelated by humic acids of different molecular weights. *Commun. Soil Sci. Plan.* 37:239-248.
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

- Briat JF.** 1996. Roles of ferritin in plants. *J. Plant Nutr.* 19(8-9):1331-1342.
- Briat JF y Lobreaux S.** 1997. Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci.* 2(5):187-193.
- Brown JC.** 1963. Iron chlorosis in soybeans as related to the genotype of rootstock. *Soil Sci.* 96:387-394.
- Brown JC y Ambler JE.** 1974. Iron-stress response in tomato. I. Sites of Fe reduction, absorption and transport. *Physiol. Plant.* 31(3):221-224.
- Brown JC y Jolley VD.** 1989. Plant metabolic responses to iron-deficiency stress. *BioScience* 39:546-551.
- Brüggermann W, Maas-Kantel K y Moog PR.** 1993. Iron uptake by leaf mesophyll cells: The role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. *Planta* 190:151-155.
- Bughio N, Takahashi M, Yoshimura E, Nishizawa NK y Mori S.** 1997a. Light-dependent iron transport into isolated barley chloroplasts. *Plant Cell. Physiol.* 38(1):101-105.
- Bughio N, Takahashi M, Yoshimura E, Nishizawa NK y Mori S.** 1997b. Characteristics of light-regulated iron transport system in barley chloroplasts. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43:959-963.
- Bustin SA.** 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29:23-39.
- Byrne DH, Rouse RE y Sudahono.** 1995. Tolerance to citrus rootstocks to lime-induced iron chlorosis. *Subtrop. Plant Sci.* 47:7-11.
- Castle WS, Nunnallee J y Manthey JA.** 2009. Screening citrus rootstocks and related selections in soil and solution culture for tolerance to low iron stress. *HortScience.* 44:638-645.
- Cataldo DA, McFadden KM, Garland TR y Wildung RE.** 1988. Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II) and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiol.* 86(3):734-739.
- Cerezo M, Tillard P, Gojon A, Primo-Millo E y García-Agustín P.** 2001. Characterization and regulation of ammonium transport systems in *Citrus* plants. *Planta* 214:97-105.
- Cesco S, Nikolic M, Römheld V, Varanini Z y Pinton R.** 2002. Uptake of iron (Fe-59) complexed to water-extractable humic substances by sunflower leaves *Plant Soil* 241:121-128.
- Chaney RL.** 1984. Diagnostic practices to identify iron-deficiency in higher plants. *J. Plant Nutr.* 7(1-5):47-67.
- Chaney RL.** 1989. Translocation of iron roots to shoots. En: 5th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Jerusalem, Israel.
- Chaney RL, Brown JC y Tiffin LO.** 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol.* 50:208-213.
- Chang YC, Zouari M, Gogorcena Y, Lucena JJ y Abadía J.** 2003. Effects of cadmium and lead on ferric chelate reductase activities in sugar beet roots. *Plant Physiol. Biochem.* 41:999-1005.
- Chen Y y Barak P.** 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Adv. Agron.* 35:217-240.
- Chollet R, Vidal J y O'Leary MH.** 1996. Phosphoenolpyruvate carboxylase, an ubiquitous highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Phys.* 47:273-298.
- Clarkson DT y Hanson JB.** 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:239-298.
- Cohen CK, Norvell WA y Kochian LV.** 1997. Induction of the root cell plasma membrane ferric reductase. An exclusive role for Fe and Cu. *Plant Physiol.* 114(3):1061-1069.

- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF y Kochian LV.** 1998. The role of Fe-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* 116(3):1063-1072.
- Cohen CK, Garvin DF y Kochian LV.** 2004. Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. *Planta* 218(5):784-792.
- Connolly EL, Fett JP y Guerinot ML.** 2002. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell.* 14:1347-1357.
- Connolly EL, Campbell NH, Grotz N, Prichard CL y Guerinot ML.** 2003. Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiol.* 133(3):1102-1110.
- Cooper WC, Reece PC y Furr JR.** 1962. Citrus breeding in Florida-past, present and future. *Proc. Fla. State. Hort. Soc.* 5-13.
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF y Walker EL.** 2001. Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* 409(6818):346-349.
- Dauphas N y Rouxel O.** 2006. Mass spectrometry and natural variations of iron isotopes. *Mass Spectrom. Rev.* 25:515-550.
- Davis TD, Jolley VD, Valser RH, Brown JC y Blaylock AD.** 1986. Net photosynthesis of Fe-efficient and Fe-inefficient soybean cultivars grown under varying iron levels. *J. Plant Nutr.* 9(3-7):671-681.
- De Liñán C.** 1990. Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales. Agrotécnicas, S L. Madrid.
- De Liñán C.** 2007. Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales. Agrotécnicas, S L. Madrid.
- De Nisi P y Zocchi G.** 2000. Phosphoenolpyruvate carboxylase in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots under iron deficiency: activity and kinetic characterization. *J. Exp. Bot.* 51:1903-1909.
- Dell'Orto M, Brancadoro L, Scienza A y Zocchi G.** 2000. Use of biochemical parameters to select grapevine genotypes resistant to iron-chlorosis. *J. Plant Nutr.* 23(11y12):1767-1775.
- Donnini S, Castagna A, Ranieri A y Zocchi G.** 2009. Differential responses in pear and quince genotypes induced by Fe deficiency and bicarbonate. *J. Plant Physiol.* 166:1181-1193.
- Droillard MJ y Paulin A.** 1990. Isoenzymes of superoxide dismutase in mitochondria and superoxide isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiol* 94:1187-1192.
- Durret TP, Gassmann W y Rogers EE.** 2008. The FRD3-Mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol.* 144:197-205.
- Eichert T, Peguero-Pina JJ, Gil-Pelegrín E, Heredia A y Fernández V.** 2010. Effects of iron chlorosis and iron resupply on leaf xylem architecture, water relations, gas exchange and stomatal performance of field-grown peach (*Prunus persica*). *Physiol. Plant.* 138:48-89.
- Eide DJ, Broderius M, Fett J y Guerinot ML.** 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:5624-5628.

- Embleton, TW, Jones WW, Labanauskas CHK, Reuther W.** 1973. Leaf analysis as a diagnostic tools and guide to fertilization. En: The citrus industry. Ed. Reuther W. Univ. Calif. Div. Agric. Sci. Berkeley. Calif. 3:183-210.
- Felle H.** 1988. Short-term pH regulation in plants. *Physiol. Plant.* 74:583-591.
- Fernández-López JA, Almela L y Fernández-Rubio J.** 1993. La nutrición férrica de las plantas. El problema de la clorosis. Secretariado de Publicaciones Universidad de Murcia.
- Forner JB y Alcaide A.** 1994. Últimas investigaciones en patrones tolerantes. *El Agricultor Cualificado.* 0:21-24.
- Fox TC y Guerinot ML.** 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:669-696.
- Fox TC, Shaff JE, Grusak MA, Norvell WA, Chen Y, Chaney RL y Kochian LV.** 1996. Direct measurement of $^{59}\text{Fe}^{2+}$ influx in roots of *Pisum sativum* using a chelator buffer system to control Fe^{2+} in solution. *Plant Physiol.* 111:93-100.
- Foy CD, Farina MPW y Oakes AJ.** 1998. Iron-manganese interactions among clones of nilegrass. *J. Plant Nutr.* 21(5):987-1009.
- Funkhouser EA y Price CA.** 1974. Chloroplast RNA: possible site of an early lesion in iron deficiency. *Plant Cell Physiol.* 15:883-889.
- Gerke J.** 1997. Aluminium and iron (III) species in the soil solution including organic complexes with citrate and humic substances. *Z. für Pflanzenernähr. Bodenk.* 160:427-432.
- Gogorcena Y, Abadía J y Abadía A.** 2000. Induction of in vivo root ferric chelate reductase activity in fruit tree rootstock. *J. Plant Nutr.* 23(1):9-21.
- Gogorcena Y, Abadía J y Abadía A.** 2004. New technique for screening iron-efficient genotypes in peach rootstocks: Elicitacion of root ferric chelate reductase by manipulation of external iron concentrations. *J. Plant Nutr.* 27:1701-1715.
- González-Mas MC, Llosa MJ, Quijano A y Corner-Giner MA.** 2009. Rootstock effects on leaf photosynthesis in 'Navelina' Trees grown in calcareous soil. *HortScience* 44(2):280-283.
- González-Vallejo EB, Susín S, Abadía A y Abadía J.** 1998. Changes in sugar beet leaf plasma membrane Fe(III)-chelate reductase activities mediated by Fe-deficiency, assay buffer composition, anaerobiosis and the presence of flavins. *Protoplasma* 205(1-4):163-168.
- González-Vallejo EB, González-Reyes JA, Abadía A, López-Millán AF, Yunta F, Lucena JJ y Abadía J.** 1999. Reduction of ferric chelates by leaf plasma membrane preparations from Fe-deficient and Fe-sufficient sugar beet. *Aust. J. Plant Physiol.* 26(6):601-611.
- Goodwin T y Mercer E.** 1983. Nitrogen fixation, amino acid biosynthesis and proteins. En eds, Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press, Oxford New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.
- Grusak MA y Pezeshgi S.** 1996. Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the dgl mutant of pea. *Plant Physiol.* 110(1):329-334.
- Grusak MA, Welch RM y Kochian LV.** 1990. Does iron deficiency in *Pisum sativum* enhance the activity of the root plasmalemma iron transport protein? *Plant Physiol.* 94:1353-1357.

- De la Guardia MD y Alcántara E.** 1996. Ferric chelate reduction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves: influence of light, oxygen, iron-deficiency and leaf age. *J. Exp. Bot.* 47(298):669-675.
- Guerinot ML.** 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:190-198.
- Guerinot ML y Yi Y.** 1994. Iron: nutritious, noxious and not readily available. *Plant Physiol.* 104(3):815-820.
- Habison A, Kubicek CP y Röhr M.** 1979. Phosphofructokinase as a regulatory enzyme in citric acid producing *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 5:39-42.
- Hamzé M, Ryan J y Zaabout M.** 1986. Screening of citrus rootstocks for lime-induced chlorosis tolerance. *J. Plant Nutr.* 9(3-7):459-469.
- Hans-Walter H.** 1997. *Plant biochemistry and molecular biology.* Oxford University Press, Oxford.
- Hansen NC, Jolley VD, Berg WA, Hodges ME y Krenzer EG.** 1996. Phytosiderophore release related to susceptibility of wheat to iron deficiency. *Crop Sci.* 36(6):1473-1476.
- Hansen NC, Hopkins BG, Ellsworth JW y Jolley VD.** 2005. Iron nutrition in field crops. pp.: 23-58. En: *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plants and Microbes.* Barton LL y Abadía J. eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.
- Harley CP y Linder RC.** 1945. Observed responses of apple and pear trees to some irrigation waters of north central Washington. *P. Am. Soc. Hortic. Sci.* 46:35-44.
- Hashimoto JG, Beadles-Bohling AS y Wiren KM.** 2004. Comparison of RiboGreen and 18S rRNA quantitation for normalizing real-time RT-PCR expression analysis. *BioTechniques* 36:54-60.
- Hell R y Stephan UW.** 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216(4):541-551.
- Henriques R, Jasik J, Klein M, Martinoia E, Feller U, Schell J, Pais MS y Koncz C.** 2002. Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Mol. Biol.* 50:587-597.
- Herbik A, Giritch A, Horstmann C, Becker R, Balzer H J, Bäumlein H y Stephan UW.** 1996. Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant chloronerva. *Plant Physiol.* 111(2):533-540.
- Hether NH, Olsen RA y Jackson LL.** 1984. Chemical identification of iron reductants exuded by plant roots. *J. Plant Nutr.* 7(1-5):667-676.
- Hoagland DR y Arnon DI.** 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. AES. Bull.* 347:1-32.
- Holden MJ, Luster DG, Chaney RL, Buckhout TJ y Robinson C.** 1991. Fe³⁺-chelate reductase activity of plasma membrane isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots- Comparison of enzymes from Fe deficient and Fe-sufficient roots. *Plant Physiol.* 97(2):537-544.
- Hsu W y Miller GW.** 1968. Iron in relation to aconitase hydratase activity in *Glycine max.* Merr. *Biochim. Biophys. Acta.* 151:711-713.
- Inskeep WP y Bloom PR.** 1986. Effects of soil moisture on soil pCO₂, soil solution bicarbonate and Fe chlorosis in soybeans. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50(4):946-952.
- Jaegger B, Goldbach H y Sommer K.** 2000. Release from lime induced iron chlorosis by CULTAN in fruit trees and its characterisation by analysis. *Acta Horticult.* 531:107-113.

- Jelali N, Dell'orto M, Rabhi M, Zocchi G, Abdely C y Gharsalli M.** 2010a. Physiological and biochemical responses for two cultivars of *Pisum sativum* ("Merveille de Kelvedon" and "Lincoln") to iron deficiency conditions. *Sci. Hortic.* 124:116-121.
- Jelali N, M'sehli W, Dell'orto M, Abdely C, Gharsalli M y Zocchi G.** 2010b. Changes of metabolic responses to direct and induced Fe deficiency of two *Pisum sativum* cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 68:238-246.
- Jeong J y Connolly EL.** 2009. Iron uptake mechanisms in plants: Functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant Sci.* 176:709-714.
- Jiménez S, Ollat N, Deborde C, Maucourt M, Rellán-Álvarez R, Moreno MA y Gogorcena Y.** 2011. Metabolic response in roots of *Prunus* rootstocks submitted to iron chlorosis. *J. Plant Physiol.* 168:415-423.
- Jolley VD y Brown JC.** 1985. Iron stress response in tomato affected by potassium and renewing nutrient solutions. *J. Plant Nutr.* 8(6):527-541.
- Jolley VD, Brown JC, Pushnik JC y Miller GW.** 1987. Influences of ultraviolet(uv)-blue light radiation on the growth of cotton. I. Effect on iron nutrition and iron stress response. *J. Plant Nutr.* 10(3):333-351.
- Jones DL.** 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil.* 205:25-44.
- Jones DL, Darrah PR y Kochian LV.** 1996. Critical-evaluation of organic-acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potencial role in root iron uptake. *Plant Soil* 180:57-66.
- Kannagara CG y Gough SP.** 1978. Biosynthesis of d-aminolevulinate in greening barley leaves. Glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Carlsberg Res. Com.* 43:185-194.
- Kaplan J.** 2002. Strategy and tactics in the evolution of iron acquisition. *Sem. Hematol.* 39(4):219-226.
- Kashirad A y Marschener H.** 1974. Effect of pH and phosphate on iron nutrition of sunflower and corn plants. *Agrochimica* 18(6):497-508.
- Kawai S y Alam S.** 2005. Iron stress response and composition of xylem sap of strategy II plants. pp.: 289-309. En: *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plants and Microbes.* Barton LL y Abadía J. eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.
- Kawai S, Takagi SI y Sato Y.** 1988. Mugineic acid-family phytosiderophores in root secretions of barley, corn and shorgum varieties. *J. Plant Nutr.* 11(6-11):633-642.
- Kilcoyne SH, Bentley PM, Thongbai P, Gordon DC y Goodman BA.** 2000. Fe-57 Mossbauer studies of amorphous Pd-40(NiFe)(40)P-20 alloys. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B.* 160:157-166.
- Kim SA y Guerinot ML.** 2007. Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters* 81:2273-2280.
- Kobayashi T, Nishizawa NK y Mori S.** 2006. Molecular analysis of iron-deficient graminaceous plants. In *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms.* pp: 395-435 (Barton LL y Abadía J (eds)). Holanda.
- Kolesch H, Höfner W y Schaller K.** 1987a. Effect of bicarbonate and phosphate on iron chlorosis of grape-vines with special regard to the susceptibility of the rootstocks. I. Field Experiments. *J. Plant Nutr.* 10(2):207-230.

- Kolesch H, Höfner W y Schaller K.** 1987b. Effect of bicarbonate and phosphate on iron chlorosis of grapes-vines with special regard to the susceptibility of the rootstocks. II. Pot experiments. J. Plant Nutr. 10(2):231-247.
- Korshunova YO, Eide D, Clark WG, Guerinot ML y Pakrasi HB.** 1999. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. Plant Mol. Biol. 40:37-44.
- Kosegarten H, Wilson GH y Esch A.** 1998. The effect of nitrate nutrition on iron chlorosis and leaf growth in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Eur. J. Agron. 8(3-4):283-293.
- Kosegarten H, Hoffmann B y Mengel K.** 1999. Apoplastic pH and Fe³⁺ reduction in intact sunflower leaves. Plant Physiol. 121:1-11.
- Kovács K, Kuzmann E, Fodor F, Vértés A y Kamnev AA.** 2005. Mössbauer study of iron uptake in cucumber root. Hyperfine Interact. 165:289-294.
- Krafczyk I, Trolldenier G y Beringer H.** 1984. Soluble root exudates of maize: Influence of potassium supply and microorganisms. Soil Biol. Biochem. 16(4):315-322.
- Kramer D, Römheld V, Landsberg E y Marschner H.** 1980. Induction of transfer-cell formation by iron deficiency in the root epidermis of *Helianthus annuus* L. Planta. 147:335-339.
- Krouma A, Drevon JJ y Abdely C.** 2006. Genotypic variation of N₂-fixing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in response to iron deficiency. J. Plant Physiol. 163:1094-1100.
- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM.** 1996. Kinetics of NH₄⁺ influx in spruce. Plant Physiol. 110:773-779.
- Ksouri R, M'rah , Gharsalli M y Lachaâl M.** 2006. Biochemical responses to true and bicarbonate-induced iron deficiency in grapevine (*Vitis*) genotypes. J. Plant Nutr. 29:305-315.
- Kushnir S, Babiychuck E, Storozhenko S, Davey M, Papenbrock J, de Rycke RR, Engler G, Stephan U, Lange H, Kispal G, Lill R y Van Montagu M.** 2001. A mutation of the mitochondrial ABC transporter Sta1 leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. Plant Cell 13(1):89100.
- Lahav E y Turner DW.** 1984. The effect of temperature on the iron content of banana suckers. J. Plant Nutr. 7(1-5): 725-732.
- Landsberg EC.** 1981. Organic acid synthesis and release of hydrogen ions in response to Fe deficiency stress of mono- and dyco-tiledoneus plant species. J. Plant Nutr. 3:579-591.
- Landsberg EC.** 1984. Regulation of iron-stress-response by whole-plant activity. J. Plant Nutr. 7(1-5):609-621.
- Larbi A, Morales F, López-Millán AF, Gorgocena Y, Abadía A, Moog PR y Abadía J.** 2001. Technical advance: reduction of Fe(III)-chelates by mesophyll leaf disk of sugar beet. Multicomponent origin and effects of Fe deficiency. Plant Cell Physiol. 42(1):94-105.
- Larbi A, Abadía A, Abadía J y Morales F.** 2006. Down co-regulation of light absorption, photochemistry and carboxylation in Fe deficient plants growing in different environments. Photosynth. Res. 89:113-126.
- Laulhère JP, Labouré AM y Briat JF.** 1990. Photoreduction and incorporation of iron into ferritins. Biochem. J. 269(1):79-84.

- Legaz F, Serna MD y Primo-Millo E.** 1995. La deficiencia de hierro en los cítricos. En: Hojas Divulgativas Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Servicio de Transferencia de Investigación y Tecnología Agraria. Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació. Generalitat Valenciana.
- Legaz F, Quiñones A, Martínez-Alcántara B y Primo-Millo E.** 2008. Fertilización de los cítricos en riego a goteo II: Mg y microelementos. *Levante Agrícola*, 400:8-12.
- Li L, Fan YH, Luo XY, Pei Y y Zhou ZY.** 2002. Expression of ferric chelate reductase gene in *Citrus junos* and *Poncirus trifoliata* tissues. *Acta Bot. Sin.* 44:771-774.
- Li LH, Cheng XD y Ling HQ.** 2004. Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. *Plant Mol. Biol.* 54(1):125-136.
- Lindsay WL.** 1979. Chemical Equilibria in Soils. pp.: 449. Eds. John Wiley and Sons. New York, USA.
- Lindsay WL.** 1984. Soil and plant relationships associated with iron deficiency with emphasis on nutrient interactions. *J. Plant Nutr.* 7(1-5):489-500.
- Lindsay WL.** 1991a. Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability. pp.: 29-36. En: *Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Chen Y y Hadar Y. eds.; Kluwer Academic Publishers: Holanda.
- Lindsay WL.** 1991b. Inorganic equilibria affecting micronutrients in soils. pp: 89-112. En Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM y Welch RM, eds, *Micronutrients in Agriculture*, Ed 2. Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI.
- Lindsay WL y Schwab AP.** 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr.* 5(4-7):821-840.
- Loeppert RH, Wei LC y Ocuwpaugh R.** 1994. Soil factors influencing the mobilization in calcareous soils. pp: 343-360. En: *Biochemistry of metal micronutrients in the rizosphere*. Maethy JA, Crowley DE y Luster DG (Eds). Lewis Publishers. Florida, USA.
- López-Millán AF, Morales F, Andaluz S, Gogorcena Y, Abadía A, De Las Rivas J y Abadía J.** 2000. Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiol.* 124:885-897.
- López-Millán A F, Morales F, Abadía A y Abadía J.** 2001. Iron deficiency associated changes in the composition of the leaf apoplastic fluid from field grown pear (*Pyrus communis* L.) trees. *J. Exp. Bot.* 52(360):1489-1498.
- Lucena JJ.** 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron chlorosis. A review. *J. Plant Nutr.* 23(11-12):1591-1606.
- Lucena C, Montilla I, Romera FJ y Alcántara E.** 2003. Effects of several metals on both Fe(III)- and Cu(II)-reduction by roots of Fe-deficient cucumber plants. *J. Plant Nutr.* 26(10-11):2069-2079.
- Mahmoudi H, Labidi N, Ksouri R, Gharsalli M y Abdelly C.** 2007. Differential tolerance to iron deficiency of chickpea varieties and Fe resupply effects. *C. R. Biol.* 30:237-246.
- Manthey JA, McCoy DL y Crowley DE.** 1994. Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron deficiency in *Citrus* rootstocks. *Plant Physiol. Bioch.* 32:211-215.
- M.A.P.A.** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2007. www.mapa.es
- Marschner H.** 1995. Mineral Nutrition of higher plants. Academic Press, Londres.

- Marschner H y Römheld V.** 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil* 165:261-274.
- Marschner H y Römheld V.** 1995. Strategies of plants for acquisition of iron. pp.: 375-378. En: Iron Nutrition in Soils and Plants. Abadía J. ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.
- Marschner H, Römheld V y Kissel M.** 1987. Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along intact barley roots. *Physiol. Plant.* 71(2):157-162.
- Marschner H, Kirby EA y Cakmak I.** 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J. Exp. Bot.* 47:1255-1263.
- McDonald AJS, Ericsson T y Larsson C.** 1996. Plant nutrition, dry matter gain and partitioning at the whole-plant level. *J. Exp. Bot.* 47:1245-1253.
- Mengel K.** 1994. Iron availability in plant tissues – iron chlorosis on calcareous soils. *Plant Soil* 165(2):275-283.
- Mengel K y Geurtzen G.** 1988. Relationship between iron chlorosis and alkalinity in *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 72(3):460-465.
- Mengel K y Kirkby E.** 2001. Principles of plant nutrition. pp.:849. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.
- Michelet B y Boutry M.** 1995. The plasma membrane H⁺-ATPase- A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* 108:1-6.
- Miller GW, Pushnik JC y Welkie GW.** 1984. Iron chlorosis, a world wide problem. The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *J. Plant Nutr.* 7(1-5):1-22.
- Miller GW, Shigematsu A, Welkie GW, Motoji N y Szlek M.** 1990. Potassium effect on iron stress in tomato II. The effects on root carbon dioxide fixation and organic acid formation. *J. Plant Nutr.* 13(11):1355-1370.
- Molassiotis A, Tanou G, Diamantidis G, Patakas A y Therios I.** 2006. Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defence in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. *J. Plant Physiol.* 163:176-185.
- Mori S, Nishizawa N, Hayashi H, Chino M y Yoshimura EJI.** 1991. Why are young rice plants highly susceptible to iron deficiency? En: Iron Nutrition and Interactions in Plants. Chen Y y Hadar Y. eds.; Kluwer Academic Publishers: Holanda, pp 175-188.
- Moog PR y Brüggemann W.** 1994. Iron reductase systems on the plant plasmamembrane-A review. *Plant Soil* 165(2):241-260.
- Moral R, Gómez I, Navarro-Pedreño J y Mataix J.** 1994. Effects of cadmium on nutrient distribution, yield, and growth of tomato grown in soilless culture. *J. Plant Nutr.* 17(6):953-962.
- Morales F, Abadía A y Abadía J.** 1991. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiol.* 97:886-893.
- Morales F, Grasa R, Abadía A y Abadía J.** 1998. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *J. Plant Nutr.* 21(4):815-825.
- Morales F, Belkhdja R, Abadía A y Abadía J.** 2000. Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron-deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis* L.) *Photosynth. Res.* 63:9-21.
- Moran R.** 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with *N,N*-Dimethylformamide. *Plant Physiol.* 69(6):1376-1381.

- Moran R y Porath D.** 1980. Chlorophyll determination in intact tissues using *N,N*-Dimethylformamide. *Plant Physiol.* 65(3):478-479.
- Mori S y Nishizawa N.** 1987. Methionine as a dominant precursor of phytosiderophores in Gramineae plants. *Plant Cell Physiol.* 28(6):1081-1092.
- M'sehli W, Dell'Orto M, De Nisi P, Donnini S, Abdelly C, Zocchi G y Gharsalli M.** 2009. Responses of two ecotypes of *Medicago ciliaris* to direct and bicarbonate-induced iron deficiency conditions. *Acta Physiol. Plant.* 31(4):667-673.
- Nagarathana KC, Shetty A, Bhar SG y Shetty H S** 1992. The possible involvement of lipoxygenase in downy mildew resistance in pearl millet. *J. Exp. Bot.* 43:1283-1287.
- Negishi T, Nakanishi H, Yazaki J, Kishimoto N, Fujii F, Shimbo K, Yamamoto K, Sakata K, Sasaki T, Kikuchi S, Mori S y Nishizawa NK.** 2002. cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggest that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J.* 30(1):83-94.
- Nikolic M.** 1998. The role of the redox systems in uptake and translocation of iron by higher plants. *Lugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta.* 34(2): 479-489.
- Nikolic M y Römheld V.** 2002. Does high bicarbonate supply to roots change availability of iron in the leaf apoplast?. *Plant Soil* 241(1):67-74.
- Norvell WA.** 1991. Reactions of metal chelates in soils and nutrient solutions. pp. 187-227. En: *Micronutrients in Agriculture.* Mortvedt, Cox, Shuman, Welch (Eds.). SSSA Book Series n° 4. Madison. WI (USA).
- Olsen RA, Bennett JH, Blume D y Brown JC.** 1981. Chemical aspects of the iron stress response mechanism in tomatoes. *J. Plant Nutr.* 3(6): 905-921.
- Pereira WE, de Siqueira DL, Martínez CA y Puiatti M.** 2000. Gas exchange and chlorophyll fluorescence in four citrus rootstocks under aluminium stress. *J Plant Physiol.* 157:513-20.
- Pestana M, David M, Varennes A, Abadía J y Araújo-Faria E.** 2001. Responses of "Newhall" orange trees to iron deficiency in hydroponics: effects on leaf chlorophyll, photosynthetic efficiency, and root ferric chelate reductase activity. *J. Plant Nutr.* 24:1609-1620.
- Pestana M, Varennes A y Araújo-Faria E.** 2003. Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. *J. Food Agr. Environ.* 1(1):46-51.
- Pestana M, de Varennes A, Abadía J y Araújo-Faria E.** 2005. Differential tolerance to iron deficiency of citrus rootstocks grown in nutrient solution. *Sci. Hortic.* 104:25-36.
- Petree HE, Myatt HL y Jelenvsky AM.** 1978. Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids. En: U.S. Patent 4:130,582.
- Pich A, Schölz G y Stephan UW.** 1995. Iron-dependent changes of heavy metals, nicotianamine and citrate in different plant organs and in the xylem exudates of two tomato genotypes. Nicotianamine as possible copper translocator. En: Abadía J. eds. *Iron nutrition in soils and plants.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, pp 51-58.
- Pich A, Hillmer S, Manteuffel R y Scholz G.** 1997. First immunohistochemical localization of the endogenous Fe²⁺-chelator nicotianamine. *J. Exp. Bot.* 48(308):759-767.
- Price L.** 1968. Iron compounds and plant nutrition. *Annu Rev. Plant Phys.* 19:239-248.

- Quilez R, Abadía A y Abadía J.** 1992. Characteristics of thylakoids and photosystem II membrana preparations from iron deficient and iron sufficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.). J. Plant Nutr. 15:1809-19.
- Rabhi M, Barhoumi Z, Ksouri R, Abdely C y Gharsalli M.** 2007. Interactive effects of salinity and iron deficiency in *Medicago ciliaris*. C. R. Biol. 330:779-788.
- Rabotti G y Zocchi G.** 2006. Plasma membrane-bound H⁺-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. Physiol. Plant. 90: 779-85.
- Rabotti G, De Nisi P y Zocchi G.** 1995. Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficiency in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. Plant Physiol. 107:1195-1199.
- Rivera-Ortíz P, Castro BI, de la Garza FR, Mendoza G y Etchevers JD.** 2007. Evaluation of different iron compounds in chlorotic italian lemon trees (*Citrus lemon*). Plant Physiol. Biochem. 45:330-334.
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL y Guerinot ML.** 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. Nature. 397:694-697.
- Rodríguez-Castrillón JÁ, Moldovan M, García Alonso JI, Lucena JJ, García-Tomé ML, Hernández-Apaolaza L.** 2008. Isotope pattern deconvolution as a tool to study iron metabolism in plants. Anal. Bioanal. Chem. 390:579-590.
- Rogers EE, Eide DJ y Guerinot ML.** 2000. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:12356-12360.
- Rombolà AD y Tagliavini M.** 2005. Iron nutrition of fruit tree crops. pp.: 61-83. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plants and Microbes. Barton LL y Abadía J. eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.
- Rombolá AD, Brüggemann W, López-Millán AF, Tagliavini M, Abadía J, Marangoni B y Moog PR.** 2002. Biochemical responses to iron deficiency in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). Tree Physiol. 22:869-875.
- Romera FJ y de la Guardia MD.** 1991. La nutrición férrica de las plantas. Grupo Gestión Editorial. Córdoba, España.
- Romera FJ, Alcántara E y de la Guardia MD.** 1992. Role of roots and shoots in the regulation of the Fe efficiency responses in sunflower and cucumber. Physiol. Plant. 85(2):141-146.
- Romera FJ, Welch RM, Norwell WA, Schaefer SC y Kochian LV.** 1996a. Ethylene involvement in the over-expression of Fe(III)-chelate reductase by roots of *E107* pea [*Pisum sativum* L. (brz, brz)] and *chloronerva* tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) mutant genotypes. Biometals 9:38-44.
- Romera FJ, Welch RM, Norwell WA y Schaefer SC.** 1996b. Iron requirement for and effects of promoters and inhibitors of ethylene action of Fe(III)-chelate reductase in roots of strategy I species. Biometals 9:45-50.
- Romera FJ, Lucena C y Alcántara E.** 2005. Plant hormones influencing iron uptake in plants. pp.: 251-278. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plants and Microbes. Barton LL y Abadía J. eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.

- Römheld V.** 1997. The chlorosis paradox: Fe inactivation in leaves as a secondary event in Fe deficiency chlorosis. En 9th International symposium on iron nutrition and interactions in plants, Hohenheim, Stuttgart. Germany.
- Römheld V.** 2000. The chlorosis paradox: Fe inactivation in leaves as a secondary event in Fe deficiency chlorosis. *J. Plant Nutr.* 23(11-12):1629-1643.
- Römheld V y Marschner H.** 1983. Mechanism of iron uptake by peanut plants. I. FeIII reduction, chelate splitting, and release of phenolics. *Plant Physiol.* 71:949-954.
- Römheld V y Marschner H.** 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. pp.: 155-204. En: *Advance in plant nutrition.* vol. 2. Tinker B y Laüchli A. eds; Praeger Scientific, Nueva York.
- Römheld V y Marschner H.** 1991. Functions of micronutrients in plants. En: *Micronutrients in agriculture* (Mordvedt JJ, Cox FR, Snuman LM y Welch RM (eds). SSSA Book Series. Madison, WI. USA.297-328.
- Sanz M, Cavero J y Abadía J.** 1992. Iron chlorosis in Ebro river basin, Spain. *J. Plant Nutr.* 15:1971-1981.
- Santi S y Schmidt W.** 2009. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol.* 183:1072-1084.
- Sanz-Encinas M y Montañés L.** 1997. Diagnóstico visual de la clorosis férrica. *ITEA.* 93(1):7-22.
- Sattelmacher B.** 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol.* 149:167-192.
- Schaller G.** 1987. pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering of soils. *Plant Soil* 97:439-444.
- Schwertmann U.** 1991. Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant Soil* 130(1-2):1-25.
- Schmidt W.** 1999. Review: Mechanism and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytol.* 141(1):1-26.
- Schmidt W.** 2005. Iron stress responses in roots of strategy I plants. pp.: 229-250. En: *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plants and Microbes.* Barton LL y Abadía J. eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.
- Schmidt W.** 2006. Iron stress responses in roots of strategy I plants. pp.: 229-250. En: *Iron Nutrition in*
- Schmidt W y Bartels M.** 1997. Topography of the NADH-linked ferri-chelate (turbo) reductase in plasma membrane from *Plantago* roots. Abstracts of the IX International Symposium on iron nutrition and interactions in plants. University of Hohenheim. Stuttgart. Germany. pp: 58.
- Schmidt W, Bartels M, Tittel J y Fuhner C.** 1997. Physiological effects of copper on iron acquisition processes in *Plantago*. *New Phytol.* 135:659-666.
- Schölz G.** 1989. Effect of nicotianamina on iron re-mobilization in de-rooted tomato seedlings. *Biometals* 2:89-91.
- Scholz G, Becker R, Stephan UW y Rudolph A.** 1988. The regulation of iron uptake and possible functions of nicotianamine in higher plants. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 183(4):257-269.

- Seiber M.** 1993. Biochemical, biophysical and structure characterization of the isolate photosystem II reaction center complex. The Photosynthetic reaction center. Norris J y Deisehofer (eds). Academic Press NY.
- Serrano R.** 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40:61-94.
- Sharma S.** 2004. Adaptation of photosynthesis under iron deficiency in maize. J. Plant Physiol. 164:1261-1267.
- Shi Y, Byrne DH, Reed DWM y Loeppert RH.** 1993. Iron chlorosis development and growth response of peach rootstocks to bicarbonate. J. Plant Nutr. 16(6):1039-1046.
- Shojima S, Nishizawa, NK, Fushiya S, Nozoe S, Irifune T y Nori S.** 1990. Biosynthesis of phytosiderophores in Vitro, biosynthesis of 2'-deoximugineic acid from L-methionine and nicotianamine. Plant Physiol. 93 (4):1497-1503.
- Siddiqi MY, Glass ADM, Ruth TJ y Rufty TW.** 1990. Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. Plant Physiol. 93:1426-1432.
- Sijmons PC, Lanfermeijer FC, De Boer AH, Prins HBA y Bienfait HF.** 1984. Depolarization of cell membrane potential during trans-plasma membrane electron transfer to extracellular electron acceptors in iron-deficient roots of *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 76:943-946.
- Stephan W y Schözl G.** 1993. Nicotinamine: mediator of metals in the phloem?. Physiol. Plant. 88:522-529.
- Sudahono, Byrne DH y Rouse RE.** 1994. Greenhouse screening of citrus rootstocks for tolerance to bicarbonate-induced iron chlorosis. HortScience 29(2):113-116.
- Susín S, Abián J, Peleato ML, Sánchez-Baeza J, Abadía A, Gelpí E y Abadía J.** 1994. Flavin excretion from roots of iron-deficient sugar-beet (*Beta vulgaris* L.). Planta 193(4):514-519.
- Susín S, Abadía A, González-Reyes JA, Lucena JJ y Abadía J.** 1996. The pH requirement for in vivo activity of the iron-deficiency-induced "Turbo" ferric chelate reductase. Plant Physiol. 110(1):111-123.
- Syngenta Crop Protection.** 2005.
- Tagliavini M y Rombolá AD.** 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. Eur. J. Agron. 15:71-92.
- Tagliavini M, Rombolá AD y Marangoni B.** 1995. Response to iron-deficiency stress of pear and quince genotypes. J. Plant Nutr. 18:2465-2482.
- Tagliavini M, Abadía J, Rombolá AD, Abadía A, Tsipourdis C y Marangoni B.** 2000 Agronomic means for the control of iron deficiency chlorosis in deciduous trees. J. Plant Nutr. 23(11-12):2007-2022.
- Takagi S.** 1976. Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washing. Soil Sci. Plant Nutr. 22:423-433.
- Takagi S.** 1993. Production of phytosiderophores. pp.: 111-131. En: Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms. Barton LL y Hemming BC. eds.; Academic Press: Inc. San Diego, CA, USA.
- Takagi S, Nomoto K y Takemoto T.** 1984. Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. J. Plant Nutr. 7(1-5):469- 477.

- Tanaka R, Koshino Y, Sawa S, Sumie Ishiguro S, Okada K y Tanaka A.** 2001. Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 26:365-373.
- Tepe W.** 1979. *Jahresb. 1978. Hess. Forschungsanst. Für. Weinobst-Und Gartenbau.* pp: 741 En: *Nutritional Disorders of plants.* Bergmann W., 1992 (Ed.), Gustav Fischer Verlag Jena. Stuttgart, New Cork.
- Terol J, Conesa A, Colmenero JM, Cercos M, Tadeo F, Agustí J, Alós E, Andres F, Soler G, Brumos J, Iglesias DJ, Gotz S, Legaz F, Argout X, Courtois B, Ollitrault P, Dossat C, Wincker P, Morillon R y Talón M.** 2007. Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC Genomics* 8: 31.
- Terry N y Abadía J.** 1986. Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr.* 9(3-7):609- 646.
- Terry N y Zayed AM.** 1995. Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency. En: *Iron nutrition in soils and plants.* Abadía J (eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. ISBN:0-7923-2900-7:283-294.
- Tiffin LO.** 1966a. Iron translocation I. Plant culture, exudate sampling, iron citrate analysis. *Plant Physiol.* 41:510-514.
- Tiffin LO.** 1966b. Iron translocation II. Citrate/iron ratios in plant stem exudates. *Plant Physiol.* 41:515-518.
- Tiffin LO y Brown JC.** 1962. Iron chelates in soybean exudate. *Science* 19:466-480.
- Timperio AM, D'Amici GM, Barta C, Loreto F y Zolla L.** 2007. Proteomics, pigment composition, and organization of thylakoid membranes in iron-deficient spinach leaves. *J. Exp. Bot.* 58(13):3695-3710.
- Treeby M y Uren N.** 1993. Iron deficiency stress responses amongst citrus rootstocks. *Z. Pflanz Bodenk.* 156:75-81.
- Toselli M, Marangoni B y Tagliavini M.** 2000. Iron content in vegetative and reproductive organs of nectarine trees in calcareous soils during the development of chlorosis. *Eur. J. Agron.* 13:279-286.
- Toulon V, Sentenac H, Thibaud JB, Davidian JC, Moulineau C y Grignon C.** 1992. Role of apoplast acidification by the H⁺ pump. Effect on the sensitivity to pH and CO₂ of iron reduction by roots of *Brassica napus* L. *Planta* 186(2):212-218.
- Udoh DJ y Nelson LE.** 1986. Trifluralin-induced Fe chlorosis in soybeans (*Glycine max* (L.) Mrr.) grown on clayey, high pH soils. *Plant Soil* 96(2):175-184.
- Uren NC.** 1984. Forms, reactions and availability of iron in soils. *J. Plant Nutr.* 7(1-5):165-176.
- Valenti V, Scalorbi y Guerrini F.** 1991. Induction of plasma membrane NADH-ferricyanide reductase following iron stress in tomato roots. *Plant Physiol. Biochem.* 29:249-255.
- Vert GA, Briat JF y Curie C.** 2001. *Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root-periphery transporter. *Plant J.* 26:181-189.
- Vert GA, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF y Curie C.** 2002. IRT1 an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and plant growth. *Plant Cell.* 14:1223-1233.

- Vert GA, Briat JF y Curie C.** 2003 Dual regulation of the Arabidopsis high affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol.* 132(2):796-804.
- Vert G, Barberon M, Zelazny E, Seguela M, Briat JF y Curie C.** 2009. *Arabidopsis* IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells. *Planta.* 229:1171-1179.
- Viti R y Cinelli F.** 1993. Lime-induced chlorosis in quince rootstocks: methodological and physiological aspects. *J. Plant Nutr.* 16(4):631-641.
- Vizzotto G, Pinton R, Bomben C, Cesco S, Varanini Z y Costa G.** 1999. Iron reduction in iron-stressed plants of *Actinidia deliciosa* genotypes: involvement of PM Fe(III)-chelate reductase and H⁺-ATPase activity. *J. Plant Nutr.* 22:479-488.
- Von Wirén N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA y Hider RC.** 1999. Nicotinamine chelates both Fe^{III} and Fe^{II}. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol.* 119:1107-1114.
- De Vos CR, Lubberding HJ y Bienfait HF.** 1986. Rhizosphere acidification as a response to iron deficiency in bean plants. *Plant Physiol.* 81:842-846.
- Wagner V y Moog PR.** 1997. Biochemical characterization of plasma membrane bound ferric chelate reductase activity isolated from spinach leaves. pp.: 68. En: Abstracts 9th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Hohenheim, Stuttgart, Germany.
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ y Glass ADM.** 1993. Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of ¹³NH₄⁺ influx across the plasmalemma. *Plant Physiol.* 103:1259-1267.
- Waters BM, Blevins DG y Eide DJ.** 2002. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiol.* 129(1):85-94.
- Welkie GW.** 1996. Iron-deficiency stress response of a chlorosis-susceptible and chlorosis-resistant cultivar of muskmelon as related to root riboflavin excretion. *J. Plant Nutr.* 19(8-9):1157-1169.
- Welkie GW y Miller GW.** 1989. Sugar beet responses to iron nutrition and stress. *J. Plant Nutr.* 12:1041-1054.
- Welkie GW y Miller GW.** 1993. Plant iron uptake physiology by nonsiderophore system. pp.: 345-369. En: *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*. Academic Press. San Diego, CA, USA.
- Wey LC, Loeppert RH y Ocumpaugh WR.** 1997. Fe-deficiency stress response in Fe-deficiency resistant and susceptible subterranean clover: importance of induced H⁺ release. *J. Exp. Bot.* 48:239-246.
- Weyer S y Schwieters JB.** 2003. High precision Fe isotope measurements with high mass resolution MC-ICPMS. *Int. J. Mass Spectrom.* 226:355-368.
- Yang X, Römheld V y Marschner H.** 1994. Effect of bicarbonate on root growth and accumulation of organic acids in Zn-inefficient and Zn-efficient rice cultivars *Oryza sativa* L. *Plant Soil* 164(1):1-7.
- Yen P, Inskip W y Westerman R.** 1988. Effects of soil moisture and phosphorus fertilization on iron chlorosis of sorghum. *J. Plant Nutr.* 11(6-11):1517-1531.
- Yi Y y Guerinot ML.** 1996. Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J.* 10:835-844.

- Zaharieva TB y Römheld V.** 2000. Specific Fe²⁺ uptake system in strategy I plant inducible under Fe deficiency. *J. Plant Nutr.* 23(11-12): 1733-1744.
- Zhou-Hou J, Korcak RF, Wergin WP, Fan F y Faust M.** 1984. Cellular ultrastructure and net photosynthesis of apple seedlings under iron stress. *J. Plant Nutr.* 7(6): 911-928.
- Zocchi G y Cocucci SM.** 1990. Fe uptake mechanism in Fe-efficient cucumber roots. *Plant Physiol.* 92:908-911.
- Zocchi G, De Nisi P, Dell'Orto M, Espen L y Gallina PM.** 2007. Iron deficiency differently affects metabolic responses in soybean roots. *J. Exp. Bot.* 58:993-1000.
- Zude M, Alexander A y Lüdders P.** 1999. Influence of FeDDHA and sugar acid derivates on healing of iron chlorosis in *Citrus*. *Gesunde Pflanzen* 51:125-129.