

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL



RESPUESTAS DEL SISTEMA DE
ABSORCIÓN DE HIERRO EN LAS RAÍCES
DE LOS CÍTRICOS ANTE DIFERENTES
CONDICIONES CLOROSANTES DEL MEDIO

TESIS DOCTORAL

Autora:

Mary-Rus Martínez Cuenca

Directores:

Dr. Francisco Legaz Paredes

Dr. Eduardo Primo Millo

Tutor:

Dr. Bernardo Pascual España

Valencia, 2012

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

Apartado oficial 46113, Moncada (Valencia)

D. Francisco Legaz Paredes, Dr. en Ciencias Biológicas, Investigador Principal del IVIA y D. Eduardo Primo Millo, Dr. Ingeniero Agrónomo, Investigador Principal del IVIA,

INFORMAN que,

D^a Mary-Rus Martínez Cuenca, Ingeniera Agrónoma, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que, con el título “Respuestas del sistema de absorción de hierro en las raíces de los cítricos ante diferentes condiciones clorosantes del medio”, presenta para optar al grado de Doctora Ingeniera Agrónoma.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Moncada a 28 de septiembre de 2012.

Fdo. D. Francisco Legaz Paredes

Fdo. D. Eduardo Primo Millo

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 calizos, como es el caso de los cítricos en la Comunidad Valenciana.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el sistema de absorción de hierro en los cítricos y su respuesta ante distintas situaciones clorosantes que comprometen la disponibilidad del elemento, provocando la deficiencia de Fe en la planta. Los componentes del sistema de absorción del Fe - acidificación del medio, reducción del Fe(III), transporte a través de la membrana y alteración de la síntesis de ácidos orgánicos-, se analizaron a nivel fisiológico, bioquímico y molecular, en condiciones de ausencia de Fe externo, presencia de bicarbonato (HCO_3^-) y de otros micronutrientes como zinc (Zn) y manganeso (Mn).

Para la consecución de estos objetivos se utilizaron diversos genotipos de cítricos con diferente tolerancia a la clorosis férrica y se simularon diferentes condiciones clorosantes en el medio de cultivo, ya fuera eliminando el Fe o adicionando iones HCO_3^- , Zn^{2+} o Mn^{2+} . En los distintos experimentos se evaluó, según cada caso, el crecimiento vegetativo de las plantas, el contenido de Fe total en los distintos órganos y en el apoplasto de la raíz, así como el estado del aparato fotosintético de las hojas tras la inducción de la clorosis. 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 Férrico Reductasa (FC-R), la Protón-ATPasa (H^+ -ATPasa), la Fosfoenol Piruvato Carboxilasa (PEPCasa) y otros enzimas que intervienen en la

biosíntesis de ácidos orgánicos, como la malato deshidrogenasa (MDH), la piruvato kinasa (PK), el enzima málico (ME), la citrato sintasa (CS), la aconitasa (ACO) y la fumarasa (FUM). Adicionalmente, se identificaron en el genoma de los cítricos las secuencias homólogas a los genes FRO1, FRO2, HA1, HA2, IRT1 e IRT2 de *Arabidopsis thaliana*, que codifican para los enzimas FC-R y H⁺-ATPasa y para los principales transportadores de hierro. También se homologaron las secuencias de PEPC1, cMDH, ME, CS, ACO, FUM, mMDH y DTC que codifican para los correspondientes enzimas del ciclo de Krebs y para el transportador de ácidos dicarboxílicos mitocondrial. En todos los casos, se diseñaron los oligonucleóticos correspondientes que permitieron analizar su expresión génica utilizando 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 deficiencia de Fe aumenta la expresión de los genes FRO2 y HA1 que codifican para los enzimas FC-R y H⁺-ATPasa, así como la del gen del transportador férrico IRT1. Este hecho se confirmó con la inducción de las correspondientes actividades enzimáticas, así como con el aumento de la absorción de ⁵⁷Fe. El genotipo tolerante, mandarina Cleopatra, presenta mayor actividad FC-R que el sensible, citrange Carrizo, y mayor capacidad de acumulación de Fe en el apoplasto de la raíz. En condiciones de clorosis férrica, las raíces de los cítricos acumulan ácidos orgánicos como consecuencia de la activación de algunas enzimas del ciclo de Krebs, como PEPCasa, MDH, CS y FUM; así como la del transportador de ácidos DTC. Los ácidos mayoritarios son citrato y malato, que una vez sintetizados en las raíces son liberados al xilema (para favorecer el transporte de Fe a larga distancia) o al exterior

(para acidificar la rizosfera). La presencia de bicarbonato en el medio induce la clorosis férrica, con la consiguiente alteración del aparato fotosintético de las hojas y la reducción del crecimiento de la planta, especialmente acusado en las raíces. El ión HCO_3^- inhibe la absorción del hierro por las raíces, lo que se traduce en una reducción de la concentración de Fe en los órganos de la planta. Este efecto parece ser debido al bloqueo de la acidificación del medio causado por el poder tampón del HCO_3^- . Como resultado de la disminución de la absorción de Fe por efecto del bicarbonato, se produce una disminución de la concentración de Fe en las raíces, que a su vez, induce las respuestas a la deficiencia de este elemento. Además, el bicarbonato dificulta el transporte del Fe desde las raíces a la parte aérea y también bloquea la movilización del Fe desde los cotiledones a la radícula en plántulas a las que no se les suministró Fe externo. La presencia de concentraciones relativamente elevadas de Zn^{2+} o Mn^{2+} en el medio reduce la absorción del Fe. Esto parece ser debido a un efecto competitivo en el transporte a través de la membrana plasmática, ya que las respuestas a la deficiencia de hierro se activan al disminuir la entrada de Fe en las células radiculares.

De acuerdo con la información obtenida se concluye que la capacidad de absorción de hierro en cítricos aumenta 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. El nivel de tolerancia de los

cítricos a la clorosis férrica está determinado por el grado de respuesta de los componentes del sistema de absorción de Fe ante una situación clorosante, donde el papel de la enzima FC-R es especialmente importante.

RESUM

La clorosi fèrrica és un dels estressos abiòtics més importants de les plantes i, en conseqüència, resulta un problema agrícola molt estès especialment en conreus desenvolupats en terrenys calcaris, com és el cas de la citricultura valenciana.

L'objectiu d'este treball va ser caracteritzar el sistema d'absorció de ferro en els cítrics així com la seua resposta davant de diferents situacions clorosants que comprometen la disponibilitat de l'element, i provoquen la seua deficiència de Fe en la planta. Els integrants del sistema d'absorció del Fe -l'acidificació del medi, la reducció del Fe(III), el transport a través de la membrana i l'alteració de la síntesi dels àcids orgànics-, s'han analitzat en els ordres fisiològic, bioquímic i molecular, així com en condicions d'absència de Fe extern, en presència de bicarbonat (HCO_3^-) i en presència d'altres micronutrients com el zinc (Zn) i el manganés (Mn).

Per a la consecució d'estos objectius es van utilitzar diversos genotips de cítrics amb diferent tolerància a la clorosi fèrrica i es van simular diferents condicions clorosants en el medi de cultiu, ja fora eliminant el Fe o addicionant ions HCO_3^- , Zn^{2+} o Mn^{2+} . En els distints experiments es va avaluar, en cada cas, el creixement vegetatiu de les plantes, el contingut de Fe total en els distints òrgans i en l'apoplast de l'arrel, així com l'estat del sistema fotosintètic de les fulles després de la inducció de la clorosi fèrrica. Així mateix, es va determinar la capacitat de la reducció i de l'acidificació de les arrels, mitjançant l'anàlisi de les activitats dels principals enzims involucrats, com són la Quelat-Reductasa Fèrrica (FC-R), la Protó-ATPasa (H^+ -ATPasa), la Fosfoenol- piruvat Carboxilasa (PEPCasa) i altres enzims que intervenen en la biosíntesi dels

àcids orgànics, com la malato-deshidrogenasa (MDH), la piruvat kinasa (PK); l'enzim màlic (ME), la citrato-sintasa (CS), l'aconitasa (ACO) i la fumarasa (FUM). Addicionalment, es van identificar en el genoma dels cítrics, les seqüències homòlogues als gens FRO1, FRO2, HA1, HA2, IRT1 i IRT2 d'*Arabidopsis thaliana*, que codifiquen per als enzims FC-R i H⁺-ATPasa i per als principals transportadors de ferro. També es van homologar les seqüències de PEPC1, cMDH, ME, CS, ACO, FUM, mMDH i DTC que codifiquen per als corresponents enzims del cicle de Krebs i per al transportador dels àcids ditricarboxilis mitodondrial. En tots els casos, es van dissenyar els oligonucleòtics corresponents que van permetre analitzar la seua expressió gènica utilitzant el RT-PCR. Finalment, es va determinar la taxa d'absorció de ferro per l'arrel i el seu transport en la planta mitjançant la dilució isotòpica.

Els resultats del treball van mostrar que la deficiència de Fe augmenta l'expressió dels gens FRO2 i HA1 que codifiquen els enzims FC-R i H⁺-ATPasa i del gen transportador fèrric IRT1. Este fet es va confirmar amb la inducció de les corresponents activitats enzimàtiques i amb l'augment de l'absorció de ⁵⁷Fe. El genotip tolerant, mandarí Cleòpatra, presenta major activitat FC-R que el sensible, Citrange Carrizo, i més capacitat d'acumulació de Fe en l'apoplast de l'arrel. En condicions de clorosi fèrrica, els arrels dels cítrics acumulen els àcids orgànics com a conseqüència de l'activació d'alguns enzims del cicle de Krebs, com el PEPCasa, el MDH, el CS i el FUM i també el transportador dels àcids DTC. Els àcids majoritaris són el citrat i el malato, que, sintetitzats en els arrels són alliberats al xilema (per tal d'afavorir el transport de Fe a llarga distància) o a l'exterior (per a acidificar la rizosfera). La presència de bicarbonat en el medi induïx la clorosi fèrrica, amb la consegüent alteració

de l'aparell fotosintètic de les fulles i la reducció del creixement de la planta, especialment acusat en els arrels. L'ió HCO_3^- inhibeix l'absorció de ferro per els arrels, la qual cosa es tradueix en la reducció de la concentració de Fe en els òrgans de la planta. Este efecte sembla originat pel bloqueig de l'acidificació del medi com a conseqüència de l'efecte tampó del HCO_3^- . Com a resultat de la disminució de l'absorció de Fe per efecte del bicarbonat, es produeix una disminució de la concentració de Fe en els arrels, i açò induïx les respostes a la deficiència d'este element. A més a més, el bicarbonat dificulta el transport del Fe des dels arrels fins a la part aèria i també bloqueja la mobilització del Fe des dels cotiledons fins a l'arrel en plàntules a les quals no se'ls va subministrar Fe extern. La presència de concentracions relativament elevades de Zn^{2+} o Mn^{2+} en el medi redueix l'absorció del Fe. Açò sembla causat per un efecte competitiu en el transport a través de la membrana plàsmica, ja que les respostes a la deficiència de ferro s'activen al disminuir la seua entrada en les cèl·lules radiculars.

D'acord amb la informació obtinguda, concluïm que la capacitat d'absorció de ferro en cítrics augmenta en absència de Fe en el medi, a causa de l'activació dels components del sistema d'absorció d'este element. A més a més, s'aprecia que totes les respostes a la deficiència de Fe dels arrels estan metabòlicament relacionades les unes amb les altres i col·laboren en l'absorció d'este element per la planta mitjançant la solubilització del Fe amb l'acidificació de la rizosfera, la reducció del ió Fe^{3+} a Fe^{2+} (més absorbible per la planta), i l'activació dels transportadors de ferro de la membrana plàsmica del arrel. El nivell de tolerància dels cítrics a la clorosi fèrrica està determinat pel grau de resposta dels components del sistema

d'absorció de Fe davant d'una situació clorosant, on el paper de l'enzim FC-R és especialment important.

ABSTRACT

Iron chlorosis is one of the main abiotic stress factors in plants, and as such, is a widespread agricultural problem especially affecting those crops grown on calcareous soils, as in the case of citrus in the Valencia region.

The aim of this study was to characterize the iron uptake system in citrus plants and their response to different chlorotic situations that compromise availability of the element, causing Fe deficiency in the plant. The components of the Fe-absorption system -acidification of the medium, reduction of Fe(III), iron transport through the membrane and alteration of the organic acids synthesis- were analyzed at the physiological, biochemical and molecular level, in conditions of absence of external Fe, presence of bicarbonate (HCO_3^-) and other micronutrients such as zinc (Zn) and manganese (Mn).

To achieve these objectives, experiments were carried on various citrus genotypes with a different tolerance to iron chlorosis and inducing various chlorotic mediums, either by removing Fe or adding HCO_3^- , Zn^{2+} or Mn^{2+} ions. Depending on each experiment, we assessed the vegetative growth of the plants, total Fe content in various organs and in root apoplast and the state of the photosynthetic system of the leaves after induction of iron chlorosis. Likewise, we determined the ability of reduction and acidification of the roots, by analyzing the activity of the main enzymes involved, such as the Ferric-Chelate Reductase (FC-R), the Proton-ATPase (H^+ -ATPase), the phosphoenol pyruvate carboxylase (PEPCase) and other enzymes that participate in the biosynthesis of organic acids, such as malate dehydrogenase (MDH), pyruvate kinase (PK), malic enzyme (ME), citrate synthase (CS), aconitase (ACO) and fumarase (FUM). Additionally, we

identified in the citrus genome, sequences homologous to genes FRO1, FRO2, HA1, HA2, IRT1 and IRT2 of *Arabidopsis thaliana*, which encode enzymes FC-R and H⁺-ATPase and the major iron transporters. Also, we homologated the sequences of PEPC1, cMDH, ME, CS, ACO, FUM, mMDH and DTC coding for the corresponding enzymes of the Krebs cycle and the mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate acids transporter. In all cases, we designed the sequences of oligonucleotides for analysing gene expression 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 expression analysis of genes showed that Fe-deficiency increases FRO2, HA1 and IRT1 transcripts abundance encoding for FC-R and H⁺-ATPase enzymes and the iron transporter. This was confirmed with the induction of the corresponding enzymatic activities and the increased ⁵⁷Fe uptake. The iron chlorosis-tolerant genotype, Cleopatra mandarin, presented greater FC-R activity than the sensitive one, Carrizo citrange, as well as an increased capacity for accumulating Fe in its root apoplast. Citrus roots accumulated organic acids under iron chlorosis conditions by stimulating the activity of some enzymes of the Krebs cycle, such as PEPCase, MDH, CS and FUM and the di-tricarboxylate acids carrier DTC. Major acids accumulated are citrate and malate, which once synthesized in the roots are released to the xylem sap (to promote the long-distance transport of Fe) or to the exterior (to acidify the rhizosphere). The presence of bicarbonate in the medium induced iron chlorosis, causing the alteration of the photosynthetic system in the leaves and the reduction of plant growth, particularly pronounced in the roots. HCO₃⁻ ion inhibits iron absorption by the roots, which results in a decrease in Fe concentration in the organs of the plant. This effect appears to be due to blockage of medium acidification

caused by HCO_3^- buffering power. Consequently with the decreased absorption of Fe by the bicarbonate effect, there is a reduction of Fe concentration in the roots, which in turn induces the responses to the deficiency of this element. In addition, bicarbonate hinders Fe transport from the roots to the shoots and also blocks the mobilization of Fe from the cotyledons to the roots of seedlings grown without external Fe. The presence of relatively high concentrations of Zn^{2+} or Mn^{2+} in the medium reduces Fe absorption. This seems to be due to a competition effect at the transport level across the plasma membrane, since responses to iron deficiency are activated when the entry of Fe in the root cells is reduced.

Overall results indicate that citrus ability for iron absorption increases in the absence of Fe in the medium, due to the activation of the element acquisition system components. In addition, all responses to Fe deficiency in roots are metabolically inter-correlated with each other and are involved in the absorption of this element by the plant, solubilising Fe by rhizosphere acidification, reducing the ion Fe^{3+} to Fe^{2+} available to plants and activating iron transporters from the root plasma membrane. The level of citrus tolerance to iron chlorosis is determined by the level of response of the components of the Fe acquisition system in a chlorotic situation, being especially important the role of the enzyme FC-R.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA CLOROSIS FÉRRICA	1
1.2. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DEL Fe EN LA PLANTA	3
1.2.1. Fotosíntesis	4
1.2.2. Sistemas enzimáticos	6
1.2.3. Hierro de reserva	9
1.3. FACTORES QUE AFECTAN A LA CLOROSIS FÉRRICA	9
1.3.1. Componentes químicos del suelo	10
1.3.1.1. Componentes minerales	10
1.3.1.2. pH	11
1.3.1.3. Contenido de caliza y bicarbonato	13
1.3.1.4. Formación de complejos	15
1.3.1.5. Presencia de compuestos y/o elementos minerales en altas concentraciones	15
1.3.2. Componentes físicos del suelo	17
1.3.2.1. Textura y estructura	17
1.3.2.2. Encharcamiento	17
1.3.2.3. Factores ambientales	18
1.3.3. Factores inherentes a la planta y su cultivo	19
1.3.3.1. Variabilidad genética	19
1.3.3.2. Prácticas culturales	19
1.4. SINTOMATOLOGÍA DE LA DEFICIENCIA DE Fe	19

1.5. ABSORCIÓN DE Fe POR LA PLANTA	21
1.5.1. Estrategia I	22
1.5.1.1. Acidificación de la rizosfera	24
1.5.1.2. Inducción de la capacidad reductora	26
1.5.1.3. Transporte de Fe(II) al interior de las células	28
1.5.1.4. Biosíntesis de ácidos orgánicos	30
1.5.1.5. Excreción compuestos de bajo peso molecular	33
1.5.1.6. Sinergia de las enzimas H ⁺ -ATPasa, FC-R y PEPCasa en el mecanismo de absorción de Fe	35
1.5.1.7. Cambios en proteínas de la raíz	36
1.5.1.8. Cambios morfológicos en la raíz	36
1.5.1.9. Influencia del bicarbonato sobre la estrategia I	37
1.5.1.10. Influencia de micronutrientes sobre la estrategia I	38
1.5.2. Estrategia II	40
1.6. TRANSPORTE DEL Fe EN EL INTERIOR DE LA PLANTA Y DISTRIBUCIÓN EN LOS DISTINTOS TEJIDOS	43
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1 EXPERIMENTO 1: RESPUESTAS GÉNICAS Y FISIOLÓGICAS A LA DEFICIENCIA DE HIERRO DE DOS PATRONES DE CÍTRICOS CON DIFERENTE GRADO DE TOLERANCIA A LA CLOROSIS FÉRRICA	57
3.1.1 Expresión de genes relacionados con proceso de absorción ...	58
3.1.2 Acidificación del medio radicular	60

3.1.3 Actividad de la H ⁺ -ATPasa	61
3.1.4 Actividad de la Quelato férrico reductasa (FC-R)	62
3.1.5 Influj o de ⁵⁷ Fe en las raíces	63
3.1.6 Análisis estadístico	66
3.2 EXPERIMENTO 2: RESPUESTAS METABÓLICAS DE LAS RAÍCES A LA DEFICIENCIA DE HIERRO INDUCIDA	67
3.2.1 Concentración de Fe total	68
3.2.2 Parámetros fotosintéticos	68
3.2.3 Ácidos orgánicos en las raíces	69
3.2.4 Ácidos orgánicos en exudados de raíz y savia xilemática	70
3.2.5 Expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos orgánicos	71
3.2.6 Actividades enzimáticas	72
3.2.7 Análisis estadístico	74
3.3 EXPERIMENTO 3: EFECTOS DEL BICARBONATO SOBRE LOS COMPONENTES GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE ADQUISICIÓN DEL HIERRO	75
3.3.1 Distribución y transporte del hierro	76
3.3.2 Influj o de ⁵⁷ Fe en las raíces	76
3.3.3 Parámetros fotosintéticos	77
3.3.4 Expresión de genes relacionados con sistema de absorción	77
3.3.5 Actividades enzimáticas	77
3.3.6 Acidificación del medio radicular	77
3.3.7 Análisis estadístico	78

3.4 EXPERIMENTO 4. INFLUENCIA DEL BICARBONATO EN LA MOVILIZACIÓN DE LAS RESERVAS DE HIERRO DE LOS COTILEDONES EN UN MEDIO DE CULTIVO CARENTE DE Fe	79
3.4.1 Peso de órganos y concentración de Fe	80
3.4.2 Expresión de genes relacionados con la de absorción	80
3.4.3 Actividades de los enzimas H ⁺ -ATPasa, FC-R y PEPC	80
3.4.4 Análisis estadístico	80

3.5 EXPERIMENTO 5. EFECTO DE LOS IONES Zn ²⁺ Y Mn ²⁺ SOBRE LOS COMPONENTES GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE ADQUISICIÓN DEL HIERRO	81
3.5.1 Concentraciones de Fe, Zn y Mn en los órganos	82
3.5.2 Expresión de los genes relacionados con la absorción de Fe.....	82
3.5.3 Actividad del enzima FC-R en las raíces	82
3.5.4 Acidificación del medio radicular	82
3.5.5 Influjo de ⁵⁷ Fe en las raíces	82
3.5.6 Análisis estadístico	82

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESPUESTAS GÉNICAS Y FISIOLÓGICAS A LA DEFICIENCIA DE HIERRO DE DOS PATRONES DE CÍTRICOS CON DIFERENTE GRADO DE TOLERANCIA A LA CLOROSIS FÉRRICA	85
4.1.1 Expresión de los genes HA, FRO e IRT	85
4.1.2 Acidificación del medio externo	87
4.1.3 Actividad de las enzimas H ⁺ -ATPasa y FC-R	89
4.1.4 Absorción de ⁵⁷ Fe por las raíces	89

4.1.4.1 Fe total, intracelular y enriquecimiento en ^{57}Fe	89
4.1.4.2 Tasa de absorción de ^{57}Fe en el sistema radical	92
4.1.5 Discusión	92
4.2 RESPUESTAS METABÓLICAS DE LAS RAÍCES A LA	
DEFICIENCIA DE HIERRO INDUCIDA	100
4.2.1 Desarrollo de la clorosis	100
4.2.2 Capacidad de biosíntesis de ácidos orgánicos	101
4.2.2.1 Concentración en las raíces	101
4.2.2.2 Concentración en el xilema	103
4.2.2.3 Concentración en el exudado radical	103
4.2.3 Actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo de	
los ácidos orgánicos y del transportador mitocondrial	103
4.2.3.1 Expresión génica	103
4.2.3.2 Actividad enzimática	106
4.2.4 Discusión	107
4.3 EFECTOS DEL BICARBONATO SOBRE LOS COMPONENTES	
GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE ADQUISICIÓN	
DEL HIERRO	112
4.3.1 Desarrollo de la clorosis y crecimiento de las plantas	112
4.3.2 Absorción de hierro y su distribución en la planta	113
4.3.3 Estado del aparato fotosintético	116
4.3.4 Expresión génica y actividades enzimáticas	117
4.3.5 Liberación de H^+	119
4.3.6 Discusión	120

4.4 INFLUENCIA DEL BICARBONATO EN LA MOVILIZACIÓN DE LAS RESERVAS DE HIERRO DE LOS COTILEDONES EN UN MEDIO DE CULTIVO CARENTE DE Fe	129
4.4.1 Crecimiento de las plántulas y distribución del hierro	129
4.4.2 Expresión génica	131
4.4.3 Actividades enzimáticas	136
4.4.4 Discusión	137
4.5 EFECTO DE LOS IONES Zn^{2+} Y Mn^{2+} SOBRE LOS COMPONENTES GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE ADQUISICIÓN DEL HIERRO	144
4.5.1 Concentración de Fe y Zn en sistema radical y parte aérea de plántulas germinadas en medio de cultivo con o sin Zn	144
4.5.2 Expresión génica en condiciones con o sin Zn	146
4.5.3 Acidificación medio externo en condiciones con o sin Zn	149
4.5.4 Actividad FC-R en condiciones con o sin Zn	149
4.5.5 Tasa de absorción de ^{57}Fe en condiciones con o sin Zn	150
4.5.6 Concentración de Fe y Zn en sistema radical y parte aérea de plántulas germinadas en medio de cultivo con o sin Mn ...	150
4.5.7 Expresión génica en condiciones con o sin Mn	152
4.5.8 Acidificación medio externo en condiciones con o sin Mn	156
4.5.9 Actividad FC-R en condiciones con o sin Mn	156
4.5.10 Tasa de absorción de ^{57}Fe en condiciones de con o sin Mn .	156
4.5.11 Discusión	157
5. CONCLUSIONES FINALES.....	163
6. BIBLIOGRAFÍA	169

TABLAS

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de los genes FRO, HA, IRT y NRAMP	60
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos de los genes PEPC1, cMDH, mMDH, ME, CS, ACO, FUM y DTC	72
<i>Experimento 1</i>	
Tabla 3. Contenido de hierro total e intracelular y del enriquecimiento en ⁵⁷ Fe del sistema radical	90
<i>Experimento 2</i>	
Tabla 4. Concentración hierro total en parte aérea y sistema radical	100
Tabla 5. Estado del aparato fotosintético de las hojas	101
Tabla 6. Actividades enzimáticas implicadas en la biosíntesis de ácidos orgánicos	106
<i>Experimento 3</i>	
Tabla 7. Biomasa, concentración de hierro total y de ⁵⁷ Fe en exceso y contenido de ⁵⁷ Fe en la parte aérea y el sistema radical	113
Tabla 8. Liberación de hierro apoplásmico y contenido de hierro intracelular en las raíces	116
Tabla 9. Estado del aparato fotosintético de las hojas	117
Tabla 10. Liberación de H ⁺	120
<i>Experimento 4</i>	
Tabla 11. Biomasa de las distintas fracciones de las plántulas	130
Tabla 12. Concentración de hierro total en las distintas fracciones de las plántulas a los 21 días de la siembra y tras 15 días de transferencia a otro medio con Fe	131
Tabla 13. Actividades de los enzimas FC-R, H ⁺ -ATPasa y PEPCasa	136

FIGURAS

Figura 1. Funciones del Fe en la planta	3
Figura 2. Implicación del hierro en la ruta biosintética de la clorofila	5
Figura 3. Actividad del Fe ³⁺ en varios óxidos e hidróxidos férricos presentes en suelos en función del pH	11
Figura 4. Efecto del pH sobre las especies Fe ²⁺ y Fe(OH) ⁺ en comparación con las hidroxiladas de Fe ³⁺ en equilibrio con el Fe del suelo	12
Figura 5. Especies hidrolizadas de Fe ³⁺ en equilibrio con el Fe del suelo.	13
Figura 6. Clasificación de las plantas en función de su respuesta a la clorosis férrica	22
Figura 7. Modelo de absorción de Fe por las raíces de las plantas que desarrollan la Estrategia I	23
Figura 8. Esquema ciclo de biosíntesis de ácidos orgánicos en las células de la raíz	32
Figura 9. Modelo de absorción de Fe por las raíces de las plantas que desarrollan la Estrategia II	41
<i>Experimento 1</i>	
Figura 10. Expresión de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1 e IRT2, actividad enzimas H ⁺ -ATPasa y FC-R y tasa absorción ⁵⁷ Fe	87
Figura 11. Extrusión de protones	88
Figura 12. Liberación de Fe apoplástico	91
<i>Experimento 2</i>	
Figura 13. Concentraciones de citrato y malato en el sistema radical, el xilema y el exudado radical de las plantas	102
Figura 14. Expresión génica de los genes que regulan los enzimas TCA y el transportador DTC mitocondrial	105

Experimento 3

- Figura 15.** Distribución relativa de ^{57}Fe en la planta 114
- Figura 16.** Liberación de Fe no intracelular de la raíces 115
- Figura 17.** Expresión de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1 e IRT2, actividad de los enzimas H^+ -ATPasa y FC-R y tasa de absorción de ^{57}Fe 118
- Figura 18.** Expresión del gen PEPC1 y actividad del enzima PEPCasa . 119

Experimento 4

- Figura 19.** Expresión de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1, IRT2, PEPC1 y NRAMP3 de las plántulas a 21 días de la siembra 133
- Figura 20.** Expresión de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1, IRT2 y PEPC1 de las plántulas tras 15 días de transferencia en un medio con Fe 135

Experimento 5

- Figura 21.** Concentración de hierro y zinc en la parte aérea y el sistema radical de las plántulas cultivadas con o sin Zn 145
- Figura 22.** Expresión de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1, IRT2 y NRAMP3, extrusión de protones, actividad enzima FC-R y tasa de absorción ^{57}Fe de plántulas cultivadas con o sin Zn 148
- Figura 23.** Concentración de hierro y manganeso en la parte aérea y el sistema radical de las plántulas cultivadas con o sin Mn 152
- Figura 24.** Expresión de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1, IRT2 y NRAMP3, extrusión de protones, actividad enzima FC-R y tasa de absorción ^{57}Fe de plántulas cultivadas con o sin Mn 155

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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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-hidroxip-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 *et al.*, 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 *et al.*, 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).

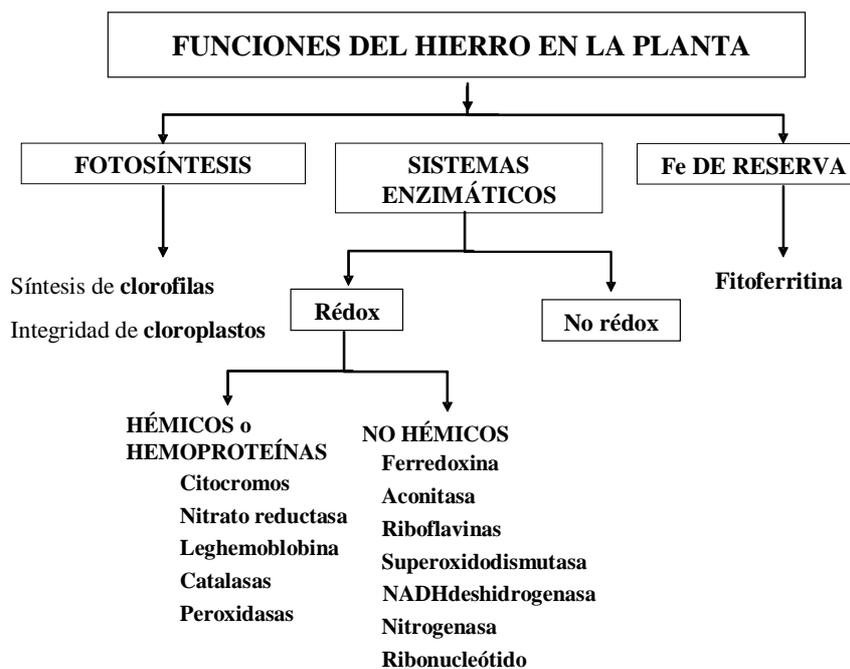


Figura 1. Funciones del Fe en la planta (Álvarez-Fernández, 2000).

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 Mg^{2+} en el centro del tetrapirrol, 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 de clorofilas y, por eso, los pigmentos amarillos (xantofilas y carotenos) predominan en las plantas deficientes en Fe, y son los responsables del amarillamiento foliar.

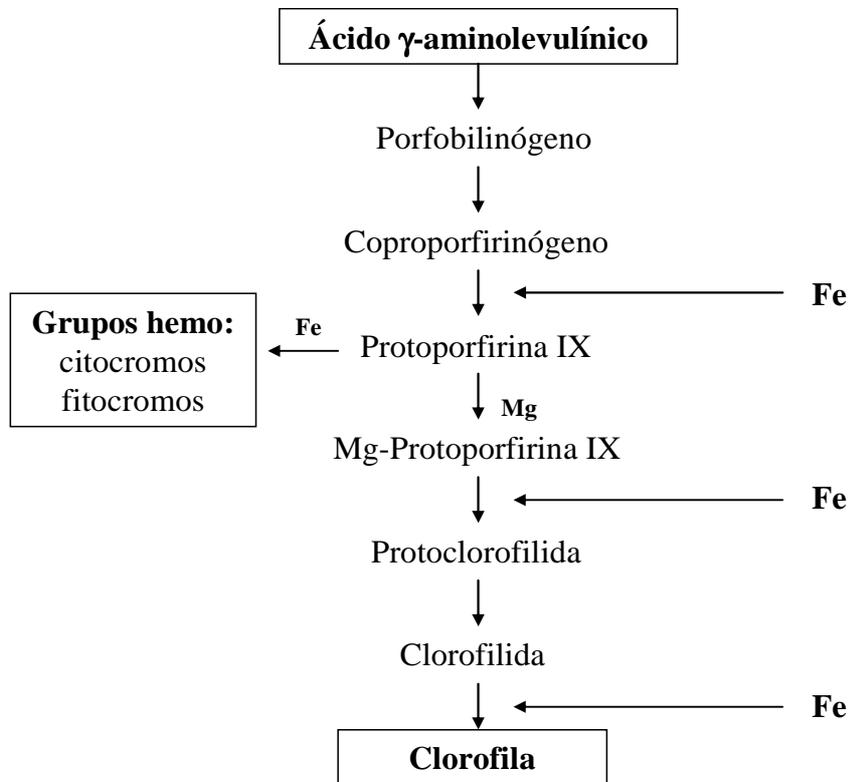


Figura 2. Implicación del hierro en la ruta biosintética de la clorofila.

Los pigmentos fotosintéticos se localizan en las membranas tilacoidales de los cloroplastos asociados con proteínas, con las que forma 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). 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 provoca una drástica reducción del número de ribosomas, con lo cual disminuye la síntesis de proteínas, con el consiguiente aumento de la concentración de aminoácidos en las hojas cloróticas. 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 y almidón. En conjunto, se produce una amplia alteración del metabolismo que da como resultado el mal 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. Facilita la dismutación de H_2O_2 en H_2O y O_2 en los cloroplastos (Bar-Akiva *et al.*, 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).

- Fitocromo: 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: proteína férrica que actúa como aceptor final de electrones en un gran número de procesos metabólicos como son la fotosíntesis y la reducción del nitrato y sulfato (Mengel y Kirkby 2001; Marschner, 1995). Su alto potencial redox le permite reducir sustancias como $NADP^+$, nitrato, oxígeno y sulfato.

- Aconitasa: 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: enzima que elimina los radicales libres aniónicos superóxido; sus isoenzimas son comunes en los 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: enzima que tiene diversas funciones en procesos metabólicos tales como la fotosíntesis, la respiración mitocondrial, la fijación de N₂, la reducción de SO₄²⁻ a SO₃²⁻, 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 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 (Halliwell y Gutteridge, 1984; Peterson, 1991). 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 $[(FeO \cdot OH)_8 (FeO \cdot OPO_3H_2)]$ 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 FACTORES QUE AFECTAN A 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 Componentes químicos del suelo

1.3.1.1 Componentes minerales 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 cantidad de Fe solubilizado depende del 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: Fe(OH)₃ amorfo > Fe(OH)₃ del suelo > γ-Fe₂O₃ maghemita > γ-FeOOH lepidocrocita > α-Fe₂O₃ hematita > α-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.

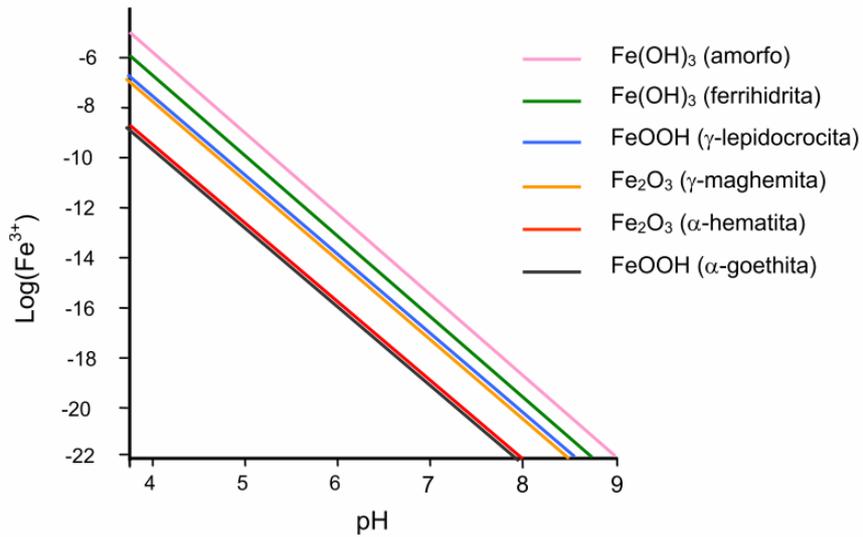


Figura 3. Actividad del Fe^{3+} en varios óxidos e hidróxidos férricos presentes en suelos en función del pH (Lindsay, 1995).

1.3.1.2 pH del suelo

El Fe en el suelo se presenta en dos posibles estados de oxidación: férrico (Fe^{3+}) y ferroso (Fe^{2+}). En condiciones ácidas y no oxidantes predomina la forma Fe^{2+} soluble (Figura 4).

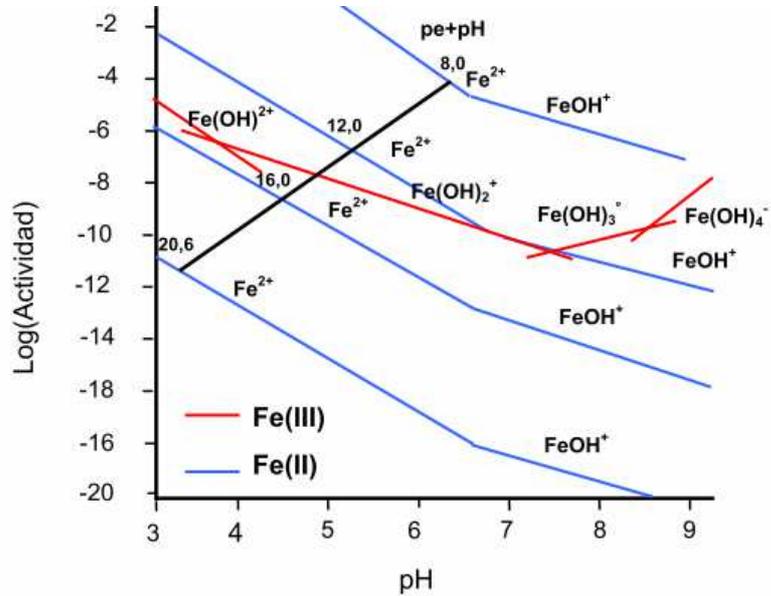
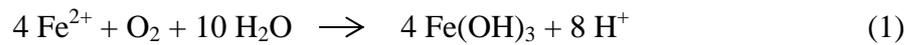


Figura 4. Efecto pH sobre las especies Fe^{2+} y Fe(OH)^+ en comparación con las especies hidroxiladas de Fe(III) en equilibrio con el Fe del suelo (Lindsay y Schwab, 1982).

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



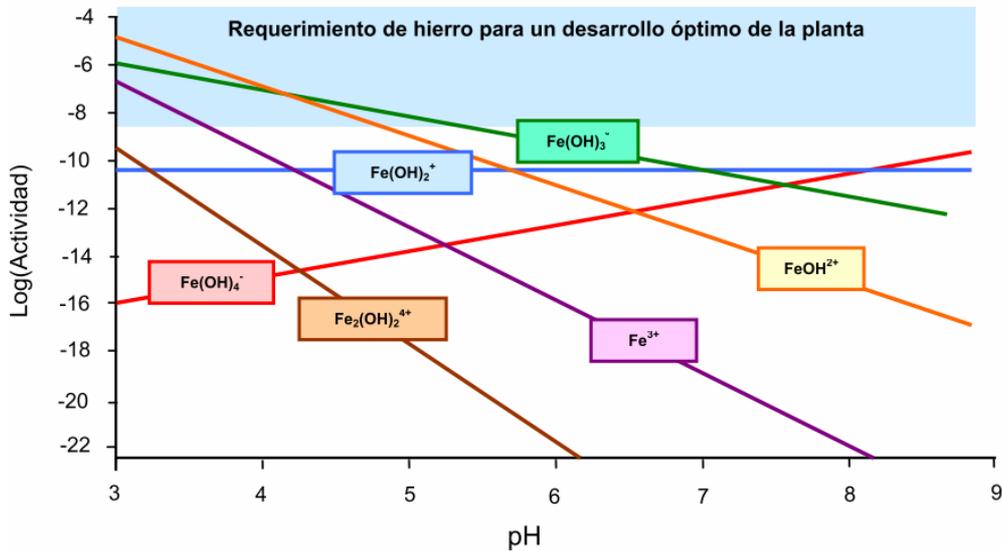
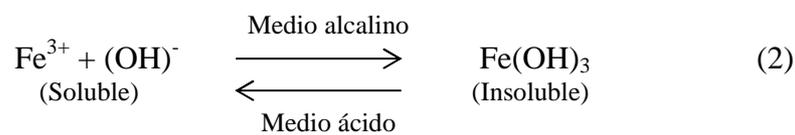


Figura 5. Especies hidroxiladas de Fe(III) en equilibrio con el Fe del suelo (Lindsay, 1979).

La solubilidad del Fe está muy relacionada con el pH del suelo, según la siguiente reacción reversible:



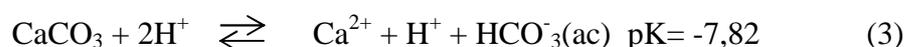
El aumento del pH en una sola unidad puede disminuir la solubilidad de los compuestos de hierro hasta 1000 veces reduciendo la concentración de Fe soluble a valores inferiores a 10^{-20} M para un valor de pH entorno a 7.5 (Lindsay, 1995).

1.3.1.3 Contenido de caliza y bicarbonato del suelo

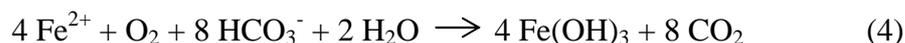
La marcada reacción alcalina de los suelos calcáreos (Figura 5), impide la solubilización del Fe que se encuentra en forma de óxidos e

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 valores de 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.

Por otra parte, los altos niveles de HCO_3^- en la solución del suelo pueden inducir directamente la deficiencia de hierro en las plantas, desacoplando su absorción y transporte (Coulombe *et al.*, 1984; White y Robson, 1990; Cinelli, 1995). Sin embargo, el modo de acción del

bicarbonato no se comprende totalmente. De esta manera, se ha propuesto que el bicarbonato puede actuar: 1) tamponando la solución del suelo, manteniéndolo en un rango de valores entre 7.5 y 8.5, y reduciendo marcadamente la solubilidad y disponibilidad del Fe (Donnini *et al.*, 2009); 2) inhibiendo la inducción de la actividad de la enzima FC-R en plantas deficientes en Fe (Romera *et al.*, 1997; Alcántara *et al.*, 2000); 3) impidiendo el transporte de Fe desde la raíz al tallo (Deal y Alcántara, 2002); y 4) causando la alcalinización del xilema y del apoplasto de la hoja, lo cual reduce el Fe absorbido por las células del mesófilo (Mengel *et al.*, 1994; Wegner y Zimmermann, 2004).

1.3.1.4 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 y Montañés, 1997).

1.3.1.5 Presencia de compuestos y/o elementos minerales en altas concentraciones

La elevada concentración de ion Na^+ en un suelo puede desplazar al Fe ante los agentes quelantes. 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 *et al.*, 1994). Por otro lado, el hierro en suelos ácidos y con presencia de concentración alta de fosfato puede precipitar como fosfatos de hierro insolubles (Lindsay y Schwab, 1982).

La absorción de Fe está estrechamente relacionada con la de otros metales, y las concentraciones elevadas de Zn^{2+} y Mn^{2+} en el medio interfieren en la absorción de Fe^{2+} en la raíz, reduciendo la concentración de Fe en la planta, que incluso pueden mostrar síntomas de deficiencia de Fe (Cohen *et al.*, 1998; Foy *et al.*, 1998; Izaguirre-Mayoral y Sinclair, 2005; Adiloglu, 2006; Aref, 2011; Shanmugam *et al.*, 2011). Este efecto ha sido atribuido a la competencia entre los iones por los sitios de absorción (Kochian, 1991; Welch, 1995). Por el contrario, tanto Zn^{2+} como Mn^{2+} son más fácilmente absorbidos por las raíces de las plantas deficientes en Fe (Alcántara *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1998; Korshunova *et al.*, 1999; Eckhardt *et al.*, 2001). Por otro lado, la presencia de elevadas concentraciones de otros microelementos en el medio puede provocar alteraciones estructurales y bioquímicas en los sistemas de transporte que dificulten su afinidad por el Fe^{2+} (Zaharieva y Römheld, 2000).

Los suelos con un elevado contenido en metales pesados, como Cd (Alcántara *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2003; Moral *et al.*, 1994), Pb (Chang *et al.*, 2003), Co (Barton *et al.*, 2000), Cr (Barton *et al.*, 2000) y Ni (Alcántara *et al.*, 1994; Barton *et al.*, 2000; Lucena *et al.*, 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).

1.3.2 Componentes físicos del suelo

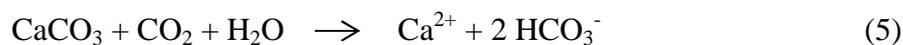
1.3.2.1 Textura y estructura del suelo

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 *et al.*, 1987a,b).

1.3.2.2 Encharcamiento

En suelos con alta humedad y poca aireación (condiciones reductoras) se produce una acumulación de anhídrido carbónico (CO_2), debido a la menor velocidad de difusión de los gases en el agua (Inskeep y Bloom, 1986). Este exceso de CO_2 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 de la química del suelo), mientras que aumentan la de calcio, manganeso, aluminio y sulfatos (Tepe, 1979).

El exceso de humedad también puede afectar a la textura del suelo, como por ejemplo en suelos calizos con textura arcillosa donde 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)). Además, el exceso de CO₂ en condiciones de altas temperaturas y suelos encharcados, puede influir directamente sobre la planta al dificultar la actividad de los enzimas relacionados con la absorción de Fe en la raíz (Inskeep y Bloom, 1986).

Por otro lado, en suelos ácidos y con exceso de humedad, el descenso del potencial redox disminuye la concentración de óxidos férricos y provoca exceso de Fe(II) en el suelo (Ponnamperuma, 1972; Kozlowski, 1984). La absorción excesiva y descontrolada de Fe²⁺ puede alcanzar concentraciones de toxicidad para la planta, apareciendo síntomas como ennegrecimiento de los ápices radiculares, inhibición del crecimiento de la raíz y marcas necróticas en las hojas (Snowden y Wheeler, 1995; Schmidt y Fühner, 1998). Estos efectos son debidos a estrés oxidativo inducido por la generación de radicales libres debido a reacciones Fenton (Hendry y Brocklebank, 1985).

1.3.2.3 Factores ambientales

Las bajas temperaturas producen la inhibición del crecimiento radicular, lo cual afecta la absorción de Fe (Chaney, 1984). En plataneras, el máximo de absorción del Fe se produce por encima de los 37/30°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).

1.3.3 Factores inherentes a la planta y su cultivo

1.3.3.1 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 *et al.*, 2009), guisante (Jelali *et al.*, 2010a), vid (Tagliavini *et al.*, 1995; Dell'Orto *et al.*, 2000a; Ksouri *et al.*, 2006), kiwi (Vizzotto *et al.*, 1999), melocotón (Gogorcena *et al.*, 2004; Jiménez *et al.*, 2008, 2011) y cítricos (Treeby y Uren, 1993; Manthey *et al.*, 1994; Pestana *et al.*, 2005; Castle *et al.*, 2009).

1.3.3.2 Prácticas culturales

La aplicación abusiva de herbicidas que incorporan antagonistas del Fe en su composición (Udoh y Nelson, 1986), el exceso de riego (Yen *et al.*, 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 *et*

al., 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 *et al.*, 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 éstos) y la calidad de los mismos (Pestana *et al.*, 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 *et al.*, 2008). Además, el ciclo vital del árbol se acorta y su fase productiva resulta considerablemente inferior a la normal (Álvarez-Fernández *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 1999; Kaplan, 2002).

Se denominan plantas “no eficientes”, aquéllas 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 aquéllas 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, 1989; Shi *et al.*, 1993).

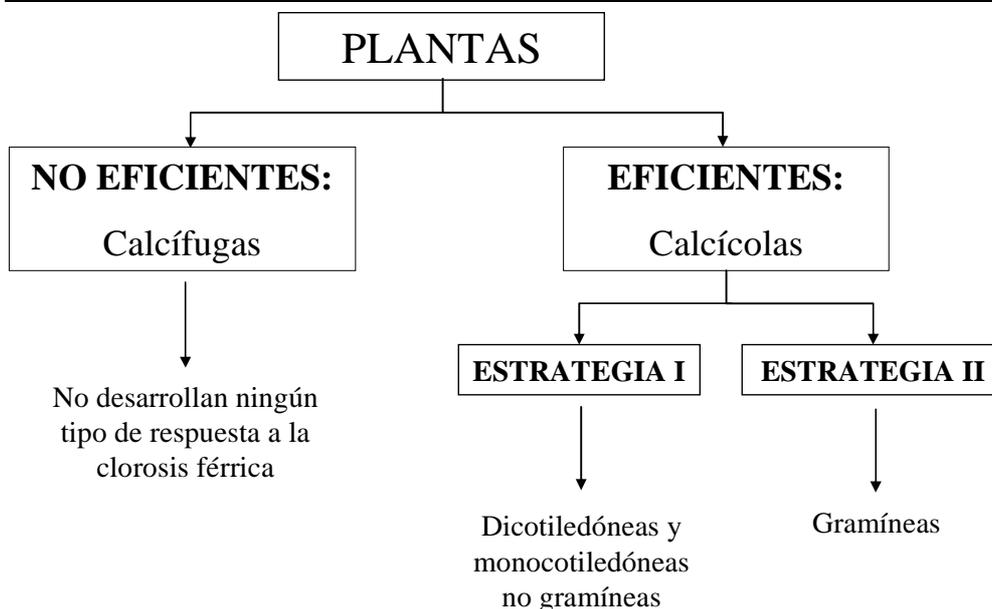


Figura 6. Clasificación de las plantas en función de su respuesta a la clorosis férrica (Mengel y Kirkby, 1982).

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 7 (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 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 *et al.*, 1972; Schmidt, 1999).

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).

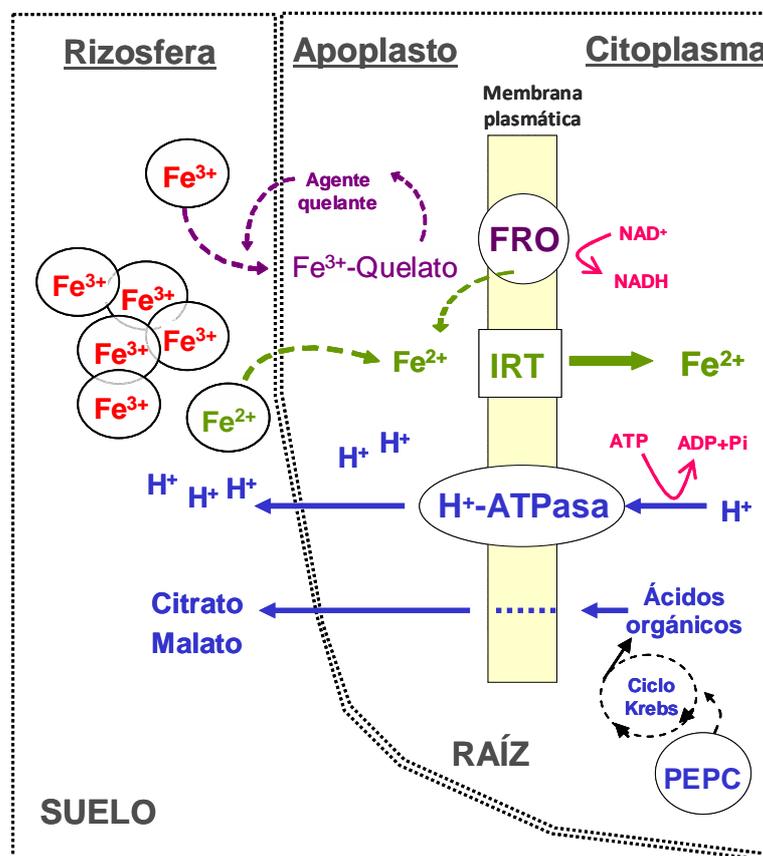


Figura 7. Modelo de absorción de Fe por las raíces de las plantas que desarrollan la Estrategia I (Modificada de Hell y Stephan, 2003). FC-R, enzima Quelato férrico reductasa; IRT, transportador de Fe(II); H^+ -ATPasa, enzima protón ATPasa; PEPC, enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa.

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 *et al.*, 1995; Dell'Orto *et al.*, 2000b; Ksouri *et al.*, 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 *et al.*, 1996), situada en la membrana plasmática de las células subapicales de la raíz (Toulon *et al.*, 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 *et al.*, 1991; Susín *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 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 AHA1, se regula en respuesta a la deficiencia de Fe (Fox y Guerinot, 1998). En raíces de pepino también se observó la inducción del gen CsHA1 con la deficiencia de Fe, mientras que no hubo sobre-expresión del gen CsHA2 (Santi *et al.*, 2005).

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 *et al.*, 1995).

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

III) Mejora la reducción del Fe(III) ya que favorece la actividad de la enzima quelato férrico reductasa (Toulon *et al.*, 1992; Mengel, 1994; Susín *et al.*, 1996), al facilitarle el pH óptimo para su actividad máxima (pH de 6.5 según Holden *et al.*, 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 *et al.*, 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 Fe²⁺ 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 CO₂ y la consiguiente síntesis de ácidos orgánicos (Rabotti *et al.*, 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 *et al.*, 1972). Esta reducción de los compuestos férricos ocurre a través de una enzima denominada quelato férrico reductasa, FC-R (Chaney *et al.*, 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 *et al.*, 1997). Este enzima toma electrones del NADH y reduce el Fe procedente de aceptores de alto potencial como el ferricianuro (+360 mV), así como 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*,

1996; Connolly *et al.*, 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 *et al.*, 2006), garbanzo (Mahmoudi *et al.*, 2007), alfalfa (Andaluz *et al.*, 2009; M'sehli *et al.*, 2009) y guisante (Jelali *et al.*, 2010a); y también en leñosos, como peral (Tagliavini *et al.*, 1995), vid (Tagliavini y Rombolá, 2001), kiwi (Rombolá *et al.*, 2002), melocotonero (Gogorcena *et al.*, 2000, 2004) y cítricos (Treeby y Uren, 1993; Manthey *et al.*, 1994; Li *et al.*, 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 *et al.*, 2000; Gogorcena *et al.*, 2004; Castle *et al.*, 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 *et al.*, 1996a,b; Gogorcena *et al.*, 2000). Esta dependencia podría ser debida a la relación de la actividad FC-R con el metabolismo del etileno (Romera *et al.*, 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 *et al.*, 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 que codifican 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 *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2002). Al parecer, los genes FRO tienen distintos patrones de expresión y por tanto funciones específicas (Jeong y Connolly, 2009). En concreto, AtFRO2 es inducida en raíces de *Arabidopsis* (Robinson *et al.*, 1999), PsFRO1 en raíces, tallos, nódulos y mesófilo de hojas de guisantes (Waters *et al.*, 2002), FRO1 en raíces y hojas de tomate (Robinson *et al.*, 1999; Li y cols 2004) y FRO2 en raíces de *M. truncatula* (Andaluz *et al.*, 2009). De acuerdo con 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 *et al.*, 1999; Connolly *et al.*, 2003). 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; Eide *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 2004). Fox *et al.* (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 *et al.*, 2004), también tiene otros sustratos como zinc, manganeso y cadmio (Eide *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1998; Korshunova *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2000).

El gen que codifica la expresión del transportador IRT fue identificado por primera vez en *Arabidopsis* (Eide *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 2001, 2002, 2009; Connolly *et al.*, 2002). Se han encontrado ortólogos de IRT en muchas especies vegetales como tomate (Eckhardt *et al.*, 2001), guisante (Cohen *et al.*, 2004), pepino (Waters *et al.*, 2007), arroz (Bughio *et al.*, 2002), cacahuete (Ding *et al.*, 2010) y tabaco (Enomoto *et al.*, 2007).

Sin embargo, la proteína se degrada si existe un aporte suficiente de Fe evitando, de esta manera, la toxicidad del elemento (Connolly *et al.*, 2002; Schmidt, 2005). También se ha observado una regulación de este tipo para el gen FRO2 de la enzima quelato férrico reductasa (Connolly *et al.*, 2003). Parece que se requiere de la presencia de cierta cantidad de Fe para inducir la expresión de ambos genes (Vert *et al.*, 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 *et al.*, 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; Fournier *et al.*, 1992; Rabotti *et al.*, 1995; López-Millán *et al.*, 2000, 2009; Abadía *et al.*, 2002; Rombolá *et al.*, 2002; Jelali *et al.*, 2010b).

La biosíntesis 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 *et al.*, 1996). El malato citosólico se convierte en piruvato por el enzima málico, bien en el citosol o bien en el interior de la

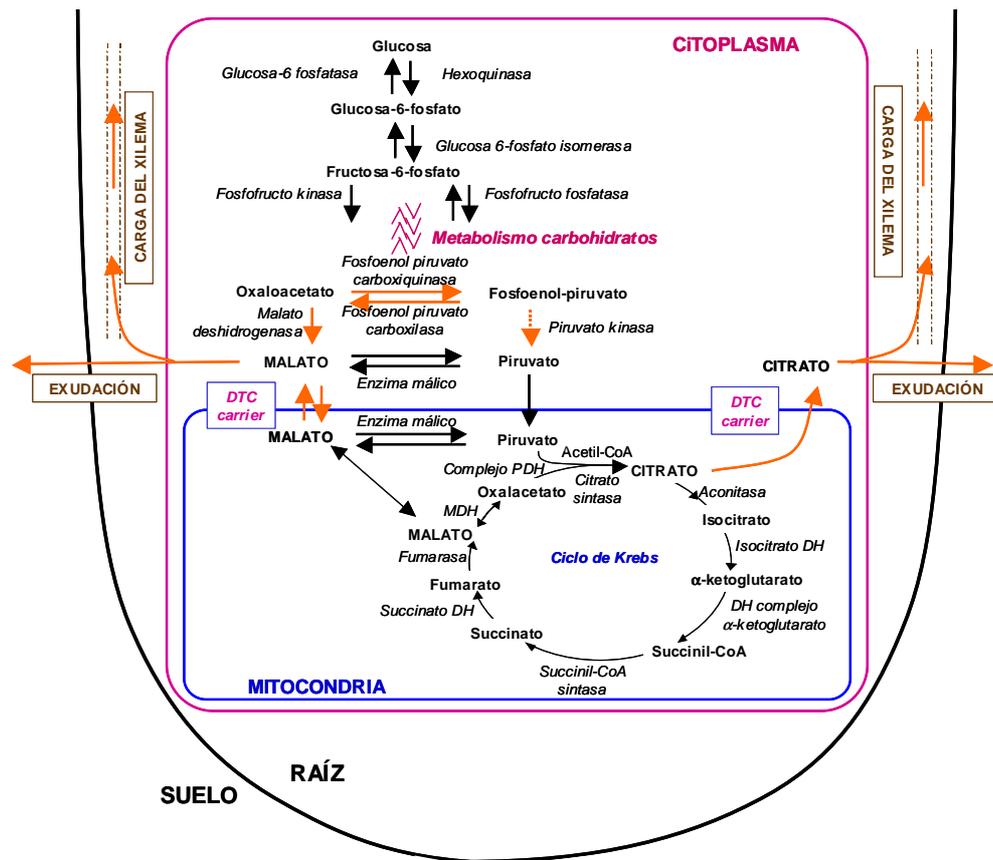
mitocondria, y activa la síntesis del resto de ácidos del ciclo. En condiciones de deficiencia de Fe se ha comprobado la activación de la PEPCasa, y, por tanto, de la segunda ruta descrita (Jones, 1998; De Nisi y Zocchi, 2000; Miller *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1996; Chollet *et al.*, 1996; Abadía *et al.*, 2002; Andaluz *et al.*, 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 *et al.*, 1996). La ausencia de Fe también estimula la actividad de otras enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs y la ruta glicolítica (Zocchi *et al.*, 2007; López-Millán *et al.*, 2000, 2009; Jelali *et al.*, 2010b) y en algunos casos también se ha observado la inducción de la expresión de los genes correspondientes (Thimm *et al.*, 2001).

La membrana de la mitocondria presenta una familia de transportadores que facilitan el tránsito de metabolitos entre el interior y el exterior de este orgánulo y mantienen su comunicación con el citosol. Recientemente, se han realizado muchos progresos en la identificación en *Arabidopsis thaliana* de los miembros de una familia de proteínas transportadoras, donde se ha descrito la existencia de al menos 60 genes putativos que codifican la expresión de éstas (Picault *et al.*, 2004). En concreto, se ha identificado un transportador mitocondrial (DTC) capaz de transportar ácidos dicarbónicos (como oxalacetato, malato, succinato, maleato y malonato) y tricarbónicos (como citrato, isocitrato, cis-aconítico y tras-aconítico). Este transportador desempeña un papel clave

Introducción

en aquellas funciones metabólicas de la planta que requieren flujo de ácidos desde o hacia la mitocondria (Picault *et al.*, 2002).

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



La síntesis de ácidos orgánicos bajo condiciones de deficiencia de Fe podría desempeñar las siguientes funciones:

I) Estimular la exudación de compuestos acidificantes para movilizar el Fe^{3+} del suelo (Zocchi *et al.*, 2007; Jelali *et al.*, 2010b). Jones (1998) sugiere que incluso con bajas tasas de exudación de citrato, la cantidad de

Fe³⁺ 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 *et al.*, 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 *et al.*, 1986). El flujo de protones provoca la alcalinización del citoplasma y activa la fijación de CO₂, asociada a la actividad del enzima PEPCasa (Miller *et al.*, 1990; López-Millán *et al.*, 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 *et al.*, 1989).

IV) Transportar el Fe a larga distancia desde el sistema radical al resto de los órganos de la planta (Tiffin, 1966a,b; Pich *et al.*, 1995), principalmente complejo 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 *et al.*, 2001; Rombolá *et al.*, 2002), y se ha descrito la proteína FRD3 como responsable de la carga de citrato en el xilema (Durret *et al.*, 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, 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 *et al.*, 1981), ácido fenólico, ácido clorogénico (Hether *et al.*, 1984) y ácido p-cumárico. 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 1999; Dell'Orto *et al.*, 2000b; Donnini *et al.*, 2009; M'sehli *et al.*, 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 Fe³⁺. 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 1984; Alcántara *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.* (1990) lo atribuyeron a la reducción y Wey *et al.* (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 *et al.*, 1996; Rellán-Álvarez *et al.*, 2010).

1.5.1.8 Cambios en la morfología de la raíz

Estos cambios consisten en la formación de raíces laterales y pelos radiculares, así como en 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 *et al.*, 1980). De esta manera, las raíces de las plantas responden aumentando su superficie de contacto en condiciones de deficiencia de Fe.

1.5.1.9 Influencia del bicarbonato sobre la estrategia I

Algunos estudios realizados en peral (Donnini *et al.*, 2009), vid (Ksouri *et al.*, 2007), cacahuete (Zuo *et al.*, 2007), *Arabidopsis* (Msilini *et al.*, 2009) y guisante (Jelali *et al.*, 2010b) recogen que cuando las plantas son cultivadas con bicarbonato, aumentan la actividad FC-R de sus raíces, pero sin alcanzar los niveles detectados en las plantas cultivadas en ausencia de Fe. Otros informes en plantas de cítricos y melocotonero a los que se suministró HCO_3^- en concentración elevada observan una reducción de dicha actividad enzimática (Chouliaras *et al.*, 2004a; Molassiotis *et al.*, 2006). Sin embargo, estos autores, observaron que las raíces de plantas de cítricos cultivadas con una solución nutritiva sin Fe, con un bajo suministro de Fe o con adición de HCO_3^- manifestaban un aumento de la capacidad de reducción, en comparación con la actividad encontrada en las raíces de las plantas con un suministro adecuado de Fe (Chouliaras *et al.*, 2004b). Sin embargo, el tratamiento con bicarbonato de plantas deficientes en Fe no incrementa la capacidad reductora de las raíces, como parece ocurrir en plantas de pepino, guisante, tomate y *Arabidopsis* (Romera *et al.*, 1997; Lucena *et al.*, 2007).

Se conoce poco acerca del efecto del ión bicarbonato sobre la estrategia I. En este sentido, Lucena *et al.* (2007) mostraron que este ión puede inducir clorosis férrica en las plantas inhibiendo la expresión de los genes que controlan las enzimas FC-R y H^+ -ATPasa y el transportador

férrico, probablemente a través de la alteración de la eficiencia en la expresión de ciertos factores de transcripción denominados proteínas FER.

1.5.1.10 Influencia de los micronutrientes sobre la estrategia I

Algunos estudios describen que las respuestas de la estrategia I a la deficiencia de Fe afectan a la absorción de algunos iones metálicos (Cohen *et al.*, 1998; Izaguirre-Mayoral y Sinclair, 2005; Shanmugam *et al.*, 2011).

Dado que, la biodisponibilidad de los micronutrientes está determinada por el pH del suelo, las plantas que estimulan la acidificación de la rizosfera para favorecer la solubilización de los iones Fe^{3+} y Fe^{2+} , lo hacen también para el Zn^{2+} y el Mn^{2+} a partir de distintos compuestos del suelo (Lindsay, 1979). Por otra parte, el Zn se encuentra normalmente con estado de oxidación +2, por lo que al contrario que el Fe, las plantas acceden directamente a él sin necesidad de reducción. El Mn, en cambio, puede existir en varias formas y su disponibilidad para las raíces depende de su estado de oxidación. Así, las formas oxidadas Mn(III) y Mn(IV) no pueden ser absorbidas por las raíces (Rengel, 2000). Se ha sugerido que la enzima quelato férrico reductasa de la membrana plasmática puede reducir el Mn(III) bajo condiciones de deficiencia de Fe (Norvell *et al.*, 1993; Pittman, 2005).

Por último, la absorción de metales divalentes por las células de la raíz parece estar regulada por los miembros de la familia génica de transportadores ZIP (proteínas transportadoras de zinc y hierro). Así, los transportadores ZIP regulan la acumulación de zinc en las células de levadura, donde ZRT1 y ZRT2 son transportadores de Zn de alta y baja afinidad que están regulados por los cambios del contenido de Zn celular (Zhao y Eide, 1996a,b). Una familia de genes de transportadores de Zn que

responden a la deficiencia de Zn fue identificada en *Arabidopsis* (Grotz *et al.*, 1998). Entre ellos, ZIP1 y ZIP3 se expresan principalmente en raíces de plantas sometidas a deficiencia de Zn, sugiriendo su función en la absorción del Zn^{2+} procedente del suelo (Guerinot y Eide, 1999; Clemens, 2001).

El Fe^{2+} es transportado al interior de las células de la raíz por el transportador de alta afinidad IRT1, que se expresa en la membrana plasmática de las células de la epidermis de raíces deficientes en Fe (Eide *et al.*, 1996; Vert *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque la función primaria de AtIRT1 es la absorción de Fe, esta proteína también puede transportar otros metales, incluyendo Zn^{2+} y Mn^{2+} (Korshunova *et al.*, 1999). En un mutante de *Arabidopsis* al que se le suprimió la actividad de IRT1 se demostró que este transportador es la principal vía para la adquisición de Fe en las raíces de plantas sometidas a deficiencia de este elemento (Henriques *et al.*, 2002; Vert *et al.*, 2002). Además, la acusada reducción en la concentración de Mn en este mutante en comparación con la especie sin modificar bajo condiciones de deficiencia de Fe indica que IRT1 puede funcionar como transportador de Mn^{2+} , constituyendo una de las principales vías de absorción de Mn^{2+} en raíces de *Arabidopsis* deficientes en Fe. Otros transportadores de la familia ZIP, como MtZIP4 y MtZIP7 en *Medicago truncatula* (López-Millán *et al.*, 2004) y LeIRT1 y LeIRT2 en tomate (Eckhardt *et al.*, 2001) también parecen poseer la capacidad de IRT1 para transportar Mn^{2+} . Además, los mutantes irt1 también tienen menores niveles de zinc, indicando la capacidad de IRT1 para transportar Zn. No obstante, IRT1 mostró alta afinidad por el transporte de Fe y baja afinidad por el de Zn cuando se expresó en levadura (Cohen *et al.*, 2004). Por otro lado, el transportador IRT2 de *Arabidopsis* que se expresa en células de la epidermis

de raíces de plantas deficientes en Fe, también poseen la habilidad de transportar Zn (Vert *et al.*, 2001).

Desde otro punto de vista, los efectos del Zn^{2+} y Mn^{2+} sobre las respuestas de las raíces a la deficiencia de hierro, dentro de la Estrategia I, han sido poco estudiados. De esta manera, se ha descrito que la retirada de los iones Zn^{2+} y Mn^{2+} de la solución nutritiva paraliza la excreción de protones de las raíces de plantas de judías deficientes en Fe (De Vos *et al.*, 1986; Sijmons y Bienfait, 1984; Bienfait *et al.*, 1989). Las raíces reanudan la excreción de protones con la incorporación de cualquiera de estos metales. Un efecto similar ocurre con la capacidad de reducción de Fe(III) de las raíces, que decrece con la deficiencia de Zn^{2+} o Mn^{2+} y luego es estimulada con el resuministro de los iones correspondientes (Sijmons y Bienfait, 1986). En otro trabajo posterior, Romera *et al.* (1997) sugirieron que en plantas de pepino deficientes en Fe, el ión bicarbonato puede inhibir el desarrollo de la capacidad reductora de Fe(III) de las raíces al disminuir la disponibilidad de ciertos metales requeridos por esta respuesta, como Zn^{2+} y Mn^{2+} . Esto fue confirmado en parte, más tarde, por Bohórquez *et al.*, (2001) quienes encontraron que plantas de melocotonero tratadas con bicarbonato que crecían con baja concentración de Fe incrementaban su capacidad de reducción cuando recibían un aporte adicional de Zn.

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).

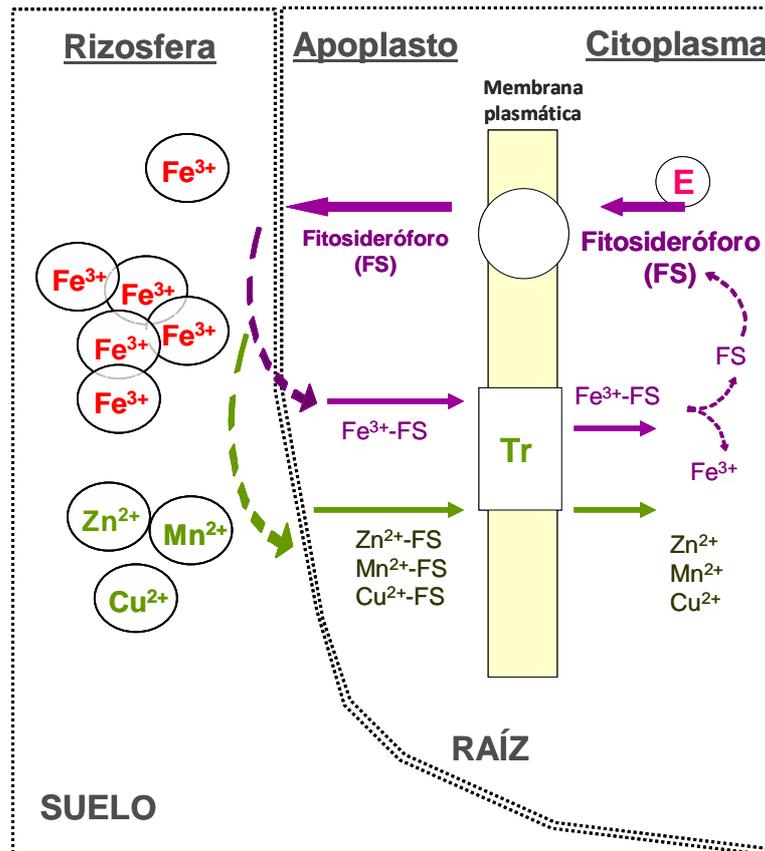


Figura 9. Modelo de absorción de Fe en las raíces de las plantas que desarrollan la Estrategia II (Modificada de Hell y Stephan, 2003). FS, Fitosideróforo; Fe^{3+} -FS, complejo Fe(III)-fitosideróforo; E, incremento en la síntesis y liberación de fitosideróforos; Tr, Transportador fitosideróforos- Fe^{3+} / otros metales.

Los fitosideróforos se asocian al ácido mugénico y a sus derivados y se sintetizan en las zonas subapicales de la raíz (Marschner *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 1988; Hansen *et al.*, 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 *et al.*, 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 TRANSPORTE DEL Fe EN EL INTERIOR DE LA PLANTA Y DISTRIBUCIÓN EN LOS DISTINTOS TEJIDOS

El recorrido que el Fe tiene que realizar desde la raíz hasta el cloroplasto, puede presentar etapas críticas que originen la clorosis férrica. La absorción 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 quelato férrico 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 *et al.*, 1985). La cantidad de Fe acumulado en el apoplasto y re-translocado desde la raíz puede estar relacionada con las diferencias entre genotipos a la resistencia a la clorosis férrica, como parece ocurrir en plantas de soja (Longnecker y Welch, 1990).

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 *et al.*, 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 *et al.*, 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).

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 *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 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 Fe³⁺ (Landsberg, 1984; Von Wirén *et al.*, 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 *et al.*, 2001; Tiffin, 1966a,b), a otros aniones orgánicos, como malato o malonato (Brown, 1963; Chaney, 1989) e incluso con otro tipo de sustancias orgánicas (Cataldo *et al.*, 1988).

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).

Cuando el Fe³⁺ llega a las hojas debe ser reducido para entrar en las células (Jolley *et al.*, 1987; Mengel y Geurtzen, 1988). Para esta reducción se ha propuesto la existencia de una enzima quelato férrico reductasa situada en la membrana plasmática del mesófilo de la hoja (Brüggermann *et al.*, 1993; González-Vallejo *et al.*, 1999; De la Guardia y Alcántara, 1996; Larbi *et al.*, 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 *et al.*, 1987; Laulhère *et al.*, 1990). La enzima quelato férrico 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). Por ello, el incremento del pH apoplástico en las hojas cloróticas (Mengel, 1994; López-Millán *et al.*, 2001), podría inhibir el paso de Fe al interior de la célula.

De hecho, 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 *et al.*, 1998). A este fenómeno se le conoce como “paradoja del hierro” (Römheld, 1997; Morales *et al.*, 1998). La causa puede ser la precipitación e inactivación del Fe en el apoplasto de la hoja debido a la alcalinización de éste por presencia de bicarbonato (Mengel, 1994; Lucena, 2000; Romera *et al.*, 1992) y la consiguiente reducción de la actividad FC-R (Brüggermann *et al.*, 1993; Kosegarten *et al.*, 1999; Susín *et al.*, 1996; Toulon *et al.*, 1992).

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 quelato férrico reductasa e IRT del transportador, no sólo se expresan en la raíz sino también en la hoja (Baüer *et al.*, 2004).

A nivel celular, las plantas poseen mecanismos homeostáticos que les permiten mantener las concentraciones correctas de los iones metálicos esenciales en los diferentes compartimentos celulares y minimizar los daños por exposición a concentraciones tóxicas de los mismos (Clemens, 2001). Una compleja red de procesos de transporte, quelación y secuestro altamente regulados permiten controlar la absorción, acumulación,

desplazamiento y detoxificación de los iones metálicos (Haydon y Cobbett, 2007). Entre los componentes de este entramado, que han sido identificados, se encuentran los transportadores NRAMP pertenecientes a la familia de proteínas del macrófago asociado a la resistencia natural (Supek *et al.*, 1996). Los transportadores NRAMP parecen estar evolucionariamente conservados en los organismos vivos (animales, hongos, bacterias, etc...) incluyendo las plantas, donde, hasta la fecha, se han clonado y caracterizado genes NRAMP en varias especies tales como *Arabidopsis*, arroz, tomate y soja (Curie *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2000; Berezky *et al.*, 2003; Kaiser *et al.*, 2003). Como en otros organismos, los transportadores NRAMP de las plantas no son específicos para un único sustrato metálico, como sucede, por ejemplo con AtNRAMP3 que puede transportar Fe^{2+} , pero también Zn^{2+} , Mn^{2+} y Cd^{2+} (Thomine *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2003). Los genes AtNRAMP3, AtNRAMP4 y LeNRAMP se inducen en condiciones de deficiencia de hierro (Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005), lo que indica que los transportadores NRAMP desempeñan una función en la homeostasis del hierro en las plantas (Jeong y Guerinot, 2009). La localización subcelular de AtNRAMP3 y AtNRAMP4 en el tonoplasto sugiere que estos transportadores actúan movilizándolo los depósitos vacuolares de Fe hacia el citoplasma (Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005). Este efecto influye a su vez sobre otros micronutrientes, ya que se observó que la acumulación de Mn y Zn en respuesta a la deficiencia de hierro aumentaba en el mutante *atnramp3* deficiente en este gen, mientras que la sobre-expresión del AtNRAMP3 reducía la concentración de Mn. Adicionalmente, la sobre-expresión de AtNRAMP3 reduce la expresión de los genes IRT1 y FRO2 que codifican para el transportador primario de Fe y la quelato férrico reductasa (Thomine *et al.*, 2003).

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 *et al.*, 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 *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es caracterizar el sistema de absorción de hierro en los cítricos y su respuesta ante distintas situaciones clorosantes que comprometen la disponibilidad del elemento y que provocan la deficiencia de Fe en la planta. Los componentes del sistema de absorción del Fe -acidificación del medio, reducción del Fe(III), transporte a través de la membrana y alteración de la síntesis de ácidos orgánicos-, se analizaron tanto a nivel genético como metabólico y fisiológico, estableciendo pautas de comportamiento ante distintas condiciones del medio. Los objetivos concretos de las diferentes partes de esta investigación fueron:

Experimento 1: Respuestas génicas y fisiológicas a la deficiencia de hierro de dos patrones de cítricos con diferente grado de tolerancia a la clorosis férrica.

Se estudió el comportamiento de las raíces de un patrón tolerante (M. Cleopatra) y otro susceptible (C. Carrizo) a la clorosis férrica, frente a soluciones nutritivas con o sin aporte de FeEDDHA. Para ello, se efectuaron las siguientes determinaciones:

1. Expresión de los genes relacionados con el proceso de absorción del Fe (HA, FRO e IRT).
2. Actividades H⁺-ATPasa y FC-R.
3. Influxo de ⁵⁷Fe en las raíces.
4. Acidificación del medio radicular y tasa extrusión de protones por las raíces.
5. Concentración de hierro intracelular y apoplástico de las raíces.

Experimento 2: Respuestas metabólicas de las raíces a la deficiencia de hierro inducida.

Se estudió el efecto de la deficiencia de hierro sobre el metabolismo de los ácidos orgánicos en las raíces de un patrón de cítricos. Para ello, se efectuaron las siguientes determinaciones:

6. Concentración de Fe en los diferentes órganos.
7. Estado del aparato fotosintético de las hojas.
8. Concentración de ácidos orgánicos en el sistema radical, savia del xilema y exudado radical.
9. Expresión de los genes relacionados con el metabolismo de los ácidos orgánicos.
10. Actividades enzimáticas que intervienen en la biosíntesis de los ácidos orgánicos.

Experimento 3: Efectos del bicarbonato sobre los componentes génicos y fisiológicos del sistema de adquisición del hierro.

Se estudió la respuesta de las raíces de un patrón de cítricos tolerante a la clorosis férrica (FA-5), frente a la adición de bicarbonato a la solución nutritiva. Para ello, se efectuaron las siguientes determinaciones:

11. Crecimiento de las plantas.
12. Estado del aparato fotosintético de las hojas.
13. Distribución y transporte de Fe en los diferentes órganos.
14. Influxo de ^{57}Fe en las raíces.
15. Expresión de los genes FRO, HA, IRT y PEPC.
16. Actividades H^+ -ATPasa, FC-R y PEPCasa.
17. Acidificación del medio radicular por las raíces.
18. Concentración de hierro intracelular y apoplástico de las raíces.
19. Liberación de Fe del espacio libre de las células de la raíz.

Experimento 4. Influencia del bicarbonato en la movilización de las reservas de Fe de los cotiledones en un medio de cultivo carente de Fe.

Se estudió la translocación del Fe acumulado en los cotiledones de semillas de *Citrus limon* durante la germinación de las plántulas en un medio de cultivo carente de Fe y, con y sin adición de bicarbonato. Así mismo, se evaluó la respuesta del sistema de absorción de Fe de la radícula, tanto con las condiciones anteriores, como después de un suplemento posterior de Fe. Para ello, se efectuaron las siguientes determinaciones:

20. Crecimiento de las plántulas.
21. Concentración de Fe en los diferentes órganos.
22. Expresión de los genes HA, FRO, IRT, PEPC y NRAMP.
23. Actividades H⁺-ATPasa, FC-R y PEPCasa.

Experimento 5. Efecto de los iones Zn²⁺ y Mn²⁺ sobre los componentes génicos y fisiológicos del sistema de adquisición del hierro.

Se estudió el comportamiento del sistema de absorción de Fe en la radícula de plántulas de un patrón de cítricos (*Citrus aurantium*) germinadas en un medio de cultivo con o sin aporte de Fe, Zn y Mn en sus diferentes combinaciones. Para ello, se efectuaron las siguientes determinaciones:

24. Concentración de Fe y Zn o Mn en los diferentes órganos de las plántulas.
25. Expresión de los genes HA, FRO, IRT y NRAMP.
26. Acidificación del medio radicular.
27. Actividad FC-R.
28. Influjos de ⁵⁷Fe en la radícula.

Objetivos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO 1: RESPUESTAS GÉNICAS Y FISIOLÓGICAS A LA DEFICIENCIA DE HIERRO DE DOS PATRONES DE CÍTRICOS CON DIFERENTE GRADO DE TOLERANCIA A LA CLOROSIS FÉRRICA

Este experimento se realizó con plantas sin injertar de los patrones citrange Carrizo (híbrido de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) y mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.).

Semillas de éstos se germinaron en un invernadero utilizando un substrato estéril compuesto por turba, fibra de coco, arena y perlita (50:25:20:5) suplementado con 1.38 g kg⁻¹ de superfosfato de cal y regado dos veces por semana con la solución nutritiva de Hoagland y Arnon (1965) diluida a la mitad: 1.5 mM Ca(NO₃)₂, 1.5 mM KNO₃, 1 mM MgSO₄, 1.2 mM H₃PO₄, 20 µM Fe-EDDHA, 23.2 µM H₃BO₃, 27.2 µM MnSO₄·H₂O, 3.8 µM ZnSO₄·7H₂O, 0.27 µM MoO₃ y 0.25 µM CuSO₄·5H₂O. El pH de la solución nutritiva se ajustó a 6.0 con 1 M KOH ó 1 M H₂SO₄.

Al cabo de 8 semanas las plantas se seleccionaron por uniformidad de tamaño y se trasplantaron individualmente a macetas opacas de 0.5 L llenas de arena gruesa. Posteriormente, las plantas de cada genotipo se separaron en dos grupos que se nutrieron con la solución nutritiva de Hoagland y Arnon: 3 mM Ca(NO₃)₂, 3 mM KNO₃, 2 mM MgSO₄, 2.3 mM H₃PO₄, 46.25 µM H₃BO₃, 54.4 µM MnSO₄·H₂O, 7.65 µM ZnSO₄·7H₂O, 0.55 µM MoO₃ y 0.5 µM CuSO₄·5H₂O con o sin 20 µM Fe-EDDHA (+Fe o -Fe, respectivamente). El pH de las soluciones nutritivas se ajustó a 6.0 con 1 M KOH o 1 M H₂SO₄. Las plantas de ambos genotipos a las que se aplicaron soluciones con o sin hierro se distribuyeron al azar en el área experimental, manteniendo alrededor de su perímetro una fila de plantas guarda no incluidas en el experimento.

Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero con luz suplementaria ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 400-700 nm) para extender el fotoperiodo a 16 h. Las temperaturas oscilaron entre 16-18°C por la noche y 26-28°C durante el día. La humedad relativa se mantuvo próxima al 80%. Las macetas se regaron dos veces por semana, utilizando 200 mL de solución por maceta en cada riego. El exceso de solución drenó fuera de la maceta, evitándose de esta forma la acumulación de sales en la arena.

Los tratamientos se mantuvieron durante 8 semanas y, posteriormente, las plantas de ambos se extrajeron cuidadosamente de las macetas y se separaron los tallos de las raíces. Éstas se lavaron primero con agua corriente para eliminar la arena y, después con agua desionizada. Posteriormente, se procesaron en función de los correspondientes análisis.

3.1.1 Expresión de genes relacionados con el proceso de absorción del Fe

El ARN total fue extraído a partir de 1.5 g de material vegetal empleando el *kit RNeasy Plant Mini* (Qiagen, Hilden, Alemania). Las muestras de ARN obtenidas fueron posteriormente tratadas con *RNAase free DNase* (Qiagen) en columnas de purificación siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad ($\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$) y concentración del ARN extraído fueron determinadas mediante espectrofotometría UV empleando un equipo *Nanodrop ND-100* (Nanodrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Delaware, EEUU).

El análisis de la expresión de los genes considerados se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real empleando un equipo *LightCycler 2.0* (Roche, Penzberg, Alemania) equipado con el *software LightCycler v. 4.0*. La mezcla de las reacciones se realizó siguiendo las

recomendaciones del *kit Fast Star DNA Master PLUS SYBR Green I* (Roche). Para ello se mezclaron 2.5 unidades de *MultiScribe Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems, California, EEUU), 1 unidad de RNase Inhibitor (Applied Biosystems), 2 μ l de *Fast-Start DNA Master PLUS SYBR Green I* (Roche), 25 ng de ARN total y 250 nM de las soluciones de oligonucleótidos específicos de cada gen, en un volumen total de 10 μ l. Las incubaciones fueron llevadas a cabo a 48°C durante 30 min y a 95°C durante 10 min, seguidas de 45 ciclos de polimerización en cadena (95°C 2 s / 58°C 8 s / 72°C 8 s). Los datos de intensidad de fluorescencia fueron adquiridos durante la etapa final (72°C) y transformados en contenidos relativos de mRNA mediante curvas de calibrado realizadas con diluciones decimales seriadas. Posteriormente, tales datos fueron normalizados a cantidades totales de ARN de acuerdo con Bustin (2002) y Hashimoto *et al.* (2004) y un valor de expresión de 1 fue arbitrariamente asignado a los obtenidos para las plantas control de mandarina Cleopatra. El gen de la actina fue utilizado como referencia en las reacciones de amplificación (Yan *et al.*, 2012) y la especificidad de las mismas fue confirmada posteriormente mediante curvas de disociación y secuenciación de los productos resultantes.

Los genes candidatos fueron identificados mediante la búsqueda de homólogos en la base de datos de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) de mandarina *Citrus clementina* Hort. ex Tan. del Consorcio Internacional del Genoma de Cítricos (ICGC; <http://www.citrusgenome.ucr.edu/>). Para amplificar los genes correspondientes de los clones seleccionados se diseñaron oligonucleótidos sintéticos que, tal y como se ha descrito anteriormente, fueron secuenciados para confirmar su especificidad. En la Tabla 1 se presentan detalles acerca de los oligonucleótidos empleados en el

presente trabajo. Al menos se realizaron tres extracciones independientes de ARN y tres reacciones de RT-PCR con tres réplicas técnicas por muestra.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de los genes de cítricos que codifican la expresión de las enzimas Protón-ATPasa (HA) y Quelato férrico reductasa (FRO), del transportador férrico (IRT) y del transportador de metales vacuolar (NRAMP), 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	clementine0.9_001614m	F	GGACGCGTTTGGTGTAAAGAT	143
		R	GAAGTCCAGGGCGTTCAATA	
HA2	clementine0.9_032287m	F	TTGGCAGTACTTGGCAATG	127
		R	GCAAGCTTTCGGAAGTCATC	
FRO1	clementine0.9_002087m	F	GCTGCATGTTGGTGACTTTG	78
		R	AACCGCAGAAATCGATCAAG	
FRO2	clementine0.9_000943	F	GGAGGAGCCAAAACAAGATG	73
		R	CAGCCAAGAAACACAGCAAA	
IRT1	clementine0.9_014282m	F	CTCAGTTGGAGCCACAAACA	115
		R	GTA CTCCGCCTGAAGAATGC	
IRT2	clementine0.9_014448m	F	CTTTGATTGGTGCTTTGCTG	56
		R	TGGGTGTGTCGTGGATACAA	
NRAMP3	clementine0.9_007815m	F	AACATTGGCCTCGTAAATGC	132
		R	AGCATAAGTGCCGTAATGG	

*Código EST se refiere al nombre de transcrito disponible en la base de datos del Consorcio Internacional del Genoma de Cítricos (ICGC; <http://www.citrusgenome.ucr.edu/>).

3.1.2 Acidificación del medio radicular

Para la determinación cuantitativa de la extrusión de protones se transfirieron grupos de diez plantas de cada genotipo a recipientes que contenían 250 mL de solución nutritiva con y sin 20 μM FeEDDHA para las plantas +Fe y -Fe, respectivamente. Las soluciones se ajustaron a pH 7 con 5 mM NaOH. De esta forma el volumen de solución nutritiva por planta era lo suficientemente alto como para evitar el riesgo de agotamiento de los nutrientes. Las soluciones se burbujearon con aire continuamente y las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo con ambiente controlado (Sanyo MCR-350H, Sanyo Electric Biochemical Co, Japón). Las condiciones de ésta fueron iluminación continua ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de

densidad de flujo de protones, 400-700 nm), temperatura de 28°C y 80% de humedad relativa. Los recipientes fueron totalmente recubiertos con papel de aluminio para impedir la iluminación en su interior. La acidificación del medio se determinó midiendo los cambios del pH en la solución nutritiva. Los valores del pH se tomaron en distintos tiempos durante 8 h con un pHmetro (Consort C531, Turnhout, Bélgica), lo que permitió determinar la extrusión de H⁺ durante este periodo.

3.1.3 Actividad de la H⁺-ATPasa

Las raíces fibrosas cortadas de plantas +Fe y -Fe de ambos genotipos, se lavaron con agua destilada, se homogeneizaron en un mortero con nitrógeno líquido y se homogenizaron a 4°C con un tampón que contenía 50 mM de Tris-HCL (pH 7.5), 10% de glicerol, 20% de PVPP, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA y 14 mM de 3-mercaptoetanol (todos de Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA). También se añadió 1 mM de PMSF y 10 µg mL⁻¹ de leupeptina (Sigma) para evitar o minimizar la proteólisis. Después de un filtrado a través de 4 capas de gasa, el homogeneizado se centrifugó a 13000 g durante 15 min (Centrífuga 5810R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y el sobrenadante fue centrifugado otra vez a 100000 g durante 30 min (Ultracentrífuga Optima L-80 Beckman Coulter, Fullerton, California). El precipitado final se resuspendió en el mismo medio tampón de homogenización y se utilizó para las determinaciones de la actividad H⁺-ATPasa (Rabotti y Zocchi, 1994). Para su conservación estas muestras se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -80°C.

La actividad H⁺-ATPasa se determinó acoplado la hidrólisis del ATP a la oxidación del NADH (Rabotti y Zocchi, 1994) en un volumen final de 2 mL de un tampón 25 mM de MOPS-BTP (pH 6.5), que contenía

250 mM de sacarosa, 50 mM de KCl, 1 mM de ATP, 1 mM de PEP, 0.25 mM de NADH, $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ de lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27), $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de piruvato quinasa (EC 2.7.1.40) y 0.015% de Lubrol (todos de Sigma). Las reacciones se iniciaron por la adición de alícuotas de 20-50 μL de la fracción microsomal y los cambios en la absorbancia se midieron mediante espectrofotometría (Lambda 25, Perkin Elmer Shelton, CT, USA) a 340 nm durante un periodo de 5 min.

El contenido en proteínas de la fracción microsomal de las membranas se determinó utilizando 5 μL de la anterior preparación y 200 μL del reactivo Bradford-BioRad (Sigma) incubado a temperatura ambiente durante 30 min, después de lo cual se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (Microwin 2000, Asys, Eugendorf, Austria). Como estándar de proteínas se utilizó BSA (Bradford, 1976).

3.1.4 Actividad de la Quelato férrico reductasa (FC-R)

La actividad FC-R se determinó midiendo la formación del complejo Fe(II)-BPDS a partir de Fe(III)-EDTA (Chaney *et al.*, 1972). Se utilizaron segmentos apicales de raíz (de unos 5-8 mm de longitud) con un peso fresco total de 0.020 g, que se lavaron con una solución 0.2 mM de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ durante 5 min y después se incubaron en 10 mL de solución nutritiva fresca (sin Fe) suplementada con 0.3 mM de BPDS (Acros Organics, New Jersey, USA) y 100 μM de Fe(III)-EDTA (Sigma). El pH de esta solución fue previamente ajustado a pH 5.5 con 5mM de MES-NaOH (Panreac, Barcelona, España). El recipiente utilizado se cubrió con papel de aluminio para no dejar penetrar la luz. Durante un periodo de incubación entre 1 y 6 h a 23°C, se tomaron alícuotas cada hora y se midió la absorbancia a 535 nm

con un espectrofotómetro (Mikrowin 2000, Asys, Eugendorf, Austria). El BPDS forma un complejo rojo soluble en agua con el Fe^{2+} y solo un débil complejo con el Fe^{3+} . La cantidad de hierro reducido se calculó por la concentración del complejo Fe^{2+} -(BPDS) utilizando un coeficiente de extinción de 22.14 mM cm^{-1} , y se expresó en nmol Fe^{2+} reducido g^{-1} PF raíz h^{-1} .

3.1.5 Influjos de ^{57}Fe en las raíces

Los influjos de ^{57}Fe en raíces de plantas alimentadas o no con hierro (+Fe y -Fe, respectivamente) de ambos genotipos se determinaron midiendo el enriquecimiento en ^{57}Fe en las raíces después de ser expuestas a una solución de absorción adicionada con ^{57}Fe -EDDHA. Ésta fue semejante a la anteriormente descrita, substituyendo el Fe-EDDHA por ^{57}Fe -EDDHA (95.6% átomos de ^{57}Fe , Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA) a la concentración de $100 \mu\text{M}$ y ajustada a pH 7 con 1 mM de MES.

Para obtener una medida más exacta del flujo de ^{57}Fe , el enriquecimiento se determinó en el Fe intracelular, después de que el Fe extracelular fue extraído, procediendo como se describe a continuación.

Los distintos grupos de plantas se pasaron separadamente a sus correspondientes soluciones nutritivas, donde se mantuvieron con aireación durante 24 h. Después, dentro de cada grupo se hicieron 3 lotes de 10 plantas cada uno, que se transfirieron a 250 mL de la solución de absorción con ^{57}Fe durante 20 min y finalmente, el ^{57}Fe inespecíficamente unido a las paredes celulares fue eliminado de las raíces, tal como describen Fox *et al.* (1996). Para ello, las plantas se mantuvieron durante 5 min en una solución de desorción, que contenía 5 mM de Mes-NaOH (pH 5.0), 5 mM de CaCl_2 ,

5 mM de ascorbato sódico y 1 mM de FeSO₄. El ascorbato sódico y el FeSO₄ se añadieron inmediatamente antes de su uso, reajustándose la solución de desorción a pH 5.0.

Después de este tratamiento, el hierro apoplástico se eliminó por el método de Bienfait *et al.* (1985). Para ello, las raíces de las plantas anteriores se lavaron con agua destilada y se transfirieron a recipientes que contenían una solución 0.5 mM de CaCl₂, sometida a una vigorosa aireación durante 10 min. Posteriormente, las plantas se pasaron a tubos grandes donde su sistema radicular permaneció sumergido en 250 mL de solución nutritiva sin hierro, adicionada con 10 mM de MES (pH 5.5) y 1.5 mM de bipyridina (un agente complejante que forma un color rosa cuando se compleja con Fe(II)). Se burbujeó nitrógeno a través de la solución para desplazar el O₂ disuelto y, posteriormente, se añadió ditionato sódico (un agente reductor capaz de reducir Fe³⁺ a Fe²⁺) a las soluciones. Inmediatamente antes de su uso, se disolvieron 0.25 g de ditionato sódico en 5 mL de agua desionizada destilada y desoxigenada, inyectándose, mediante una jeringa, 1 mL de esta solución en el medio al inicio de la incubación (tiempo 0), la cual se realizó posteriormente en la oscuridad. Para determinar la cantidad de hierro apoplástico liberado se tomaron alícuotas (5 mL) en diferentes momentos en el transcurso de un periodo de 1 h, midiéndose la absorbancia a 520 nm (Mikrowin 2000, Asys, Eugendorf, Austria). Posteriormente, las raíces se lavaron con agua destilada, a continuación con 0.05 M HCl durante 3 min para eliminar los posibles restos de Fe extracelular y finalmente dos veces con agua desionizada destilada. La concentración de Fe que permanece en las raíces después de este tratamiento representa el Fe intracelular. Los experimentos de influjo se

realizaron en la misma cámara de cultivo y con condiciones iguales que las descritas anteriormente (apartado 3.1.3).

La concentración total de Fe en las raíces se determinó en otros grupos similares de plantas de ambos genotipos tratados con o sin 20 μM FeEDDHA. Con este propósito, las raíces previamente lavadas fueron tratadas con una solución 0.05 M de HCl durante 3 min para eliminar el Fe unido a las paredes celulares y luego volvieron a ser lavadas 2 veces con agua desionizada destilada. Antes de proceder a su análisis, las raíces fueron separadas, pesadas, secadas en una estufa con corriente forzada de aire a 65°C durante 48 h y después vueltas a pesar. Después, 0.5 g de materia seca se incineraron en un horno mufla durante 12 h a 550°C. Posteriormente, el hierro se extrajo con ácido nítrico al 2% (Hiperpur Panreac, Fe < 1 ppb) en un baño ultrasónico (Fungilab S.A., Sant Feliú de Llobregat, Barcelona, España) durante 30 min a 40°C. Las concentraciones totales de Fe se midieron con el modelo ASS Perkin Elmer Analyst (Waltham, Massachusetts, USA). El contenido en ^{57}Fe de las raíces se determinó como describieron Weyer y Schwieters (2003), utilizando un espectrómetro de masas de plasma (MC-ICP MS, Thermo Finnigan Neptune). Los análisis se realizaron con agua ultra-pura (Ultra Pure Water Systems Milli Q Plus).

Los enriquecimientos en ^{57}Fe ($[\Delta^{57}\text{Fe}] = \% \text{ átomos } ^{57}\text{Fe} \text{ en exceso}$) en las raíces se obtuvieron substrayendo la abundancia natural de ^{57}Fe en el tejido a la abundancia determinada en las raíces después de un tiempo de marcado de 20 minutos (1/3 hora). Éstos se aplicaron a los valores del contenido intracelular de Fe ($[\text{Fei}]$ en $\mu\text{g g}^{-1}$ PS raíz) como se expone en la ecuación (1), siendo 57 la masa molecular del ^{57}Fe , para obtener las tasas de absorción de ^{57}Fe ($^{57}\text{FeTA}$) expresadas en $\text{nmol } ^{57}\text{Fe g}^{-1}$ PS raíz h^{-1} .

$$\text{Ecuación 1: } ^{57}\text{FeTA} = \frac{[\text{Fei}] \times [\Delta^{57}\text{Fe}] \times 3}{100 \times 57}$$

3.1.6 Análisis estadístico

Todos los resultados presentados en este experimento corresponden a la media y desviación estándar de tres réplicas obtenidas a partir de tres grupos independientes de plantas (tres plantas por grupo) por genotipo y tratamiento, excepto en los ensayos de acidificación (3.1.2) y de influjo de ^{57}Fe (3.1.5), en los que se utilizaron tres grupos de 10 plantas, por genotipo y tratamiento.

El análisis estadístico se efectuó mediante Análisis de la Varianza (ANOVA) con *Statgraphics Plus versión 5.1* (Statistical Graphics, Englewood Cliffs, NJ). Las medias se compararon utilizando el método LSD (*Least Significant Differences*) a un nivel de confianza del 95 %.

3.2 EXPERIMENTO 2: RESPUESTAS METABÓLICAS DE LAS RAÍCES A LA DEFICIENCIA DE HIERRO INDUCIDA

Este experimento se realizó con plantas sin injertar del patrón de cítricos citrange Carrizo (híbrido de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.).

El semillero donde se obtuvieron las plantas se manejó como en el apartado anterior.

Al cabo de 8 semanas las plantas se seleccionaron por uniformidad de tamaño y se trasplantaron individualmente a macetas opacas de 0.5 L llenas de arena gruesa. Posteriormente, se separaron en dos grupos que se nutrieron con la solución de Hoagland y Arnon con o sin 20 μ M Fe-EDDHA (+Fe y -Fe, respectivamente). El pH de las soluciones nutritivas se ajustó a 6.0 con 1 M KOH ó 1 M H₂SO₄. Las plantas a las que se aplicaron soluciones con o sin hierro se distribuyeron al azar en el área experimental, manteniendo alrededor de su perímetro una fila de plantas guarda no incluidas en el experimento.

Las condiciones de cultivo de las plantas en el invernadero fueron semejantes a las descritas en el apartado anterior.

Los tratamientos se mantuvieron durante 8 semanas y, posteriormente, las plantas de ambos se extrajeron cuidadosamente de las macetas y se separaron los tallos de las raíces. Estos órganos se lavaron primero con agua corriente y, después con agua desionizada. Posteriormente, se procesaron en función de los correspondientes análisis.

3.2.1 Concentración de Fe total

Al final del experimento se recolectaron las hojas jóvenes totalmente expandidas (de la última brotación) y las raíces fibrosas de 6 plantas individuales. Para el análisis del Fe total de estos órganos se procedió de la forma descrita en el apartado 3.1.5.

3.2.2 Parámetros fotosintéticos

La tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO_2}) de hojas individuales unidas al tallo se midió al aire libre entre las 10.00 y las 11.30 h en un día soleado, que permitió efectuar las medidas en condiciones relativamente estables. La radiación fotosintéticamente activa (PAR) en la superficie de la hoja se ajustó a una densidad de flujo de fotones de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para las medidas se utilizó un analizador de intercambio gaseoso CIRAS-2 (PP-systems, Hitchin, UK). La lámina foliar quedó plenamente encerrada dentro de una cubeta PLC 6 (U) universal para hojas (modelo de circuito cerrado), que se mantuvo a $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, con un déficit de presión de vapor entre la hoja y el aire de alrededor de 1.7 Pa. La tasa de flujo de aire a través de la cubeta fue de 0.5-1.5 L min^{-1} . Se tomaron 10 medidas consecutivas a intervalos de 3-s.

El contenido en clorofila de la hoja se estimó mediante un medidor portátil SPAD-502 (Minolta, Japón).

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila (F_0 : fluorescencia basal, F_m : fluorescencia máxima y $F_v = F_m - F_0$: fluorescencia variable) se determinaron con un fluorímetro portátil (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech Instruments Ltd., UK). Después de 30 min de adaptación a la oscuridad, las hojas se iluminaron con un pulso saturante de 2100 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 5 s para inducir la fluorescencia.

Todas las determinaciones se realizaron al final del ensayo en las dos hojas plenamente expandidas más jóvenes de cada una de las 6 réplicas por tratamiento. El valor medio de las dos hojas se consideró representativo de cada planta individual.

3.2.3 Ácidos orgánicos en las raíces

Muestras de raíces tomadas de 6 plantas independientes por tratamiento se congelaron con nitrógeno líquido, se liofilizaron (LyoAlfa 6, Telstar, Terrasa, España) y se trituraron. Este material (50 mg PS) se homogeneizó (Polytron PT 3100, Kinematica, Lucerne, Suiza) durante 1 min a 10000 rpm, en 10 mL de agua ultra-pura (Ultra Pure Water Systems Milli Q Plus). La mezcla se mantuvo en una nevera (4°C), y después de 24 h, la mezcla se re-homogeneizó y centrifugó a 5000 rpm durante 20 min a 4°C (Centrífuga 5810R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se recogió, se filtró a través de un filtro de jeringa de fluoruro de polivinilo de 0.20 µm (OlimPeak, Teknokroma, Sant Cugat del Vallés, España) y se llevó a un volumen final de 10 mL con agua ultra-pura. Las extracciones finales se almacenaron a -80 °C en alícuotas de 1 mL, previamente congeladas con N₂ líquido, hasta un posterior uso.

Los ácidos orgánicos (citrato y malato) se determinaron mediante un cromatógrafo de gases (Agilent 6890, Wilmington, USA) acoplado a un espectrómetro de masas (MS-TOF, Pegasus 4D LECO, MI, USA), con columna capilar BPX35 (30 m x 0.32 mm, SGE Analytical Science, Australia). Las muestras se inyectaron con un muestreador automatizado (CTC Combi Pal auto sampler). El flujo de helio fue de 2 mL min⁻¹ y las temperaturas del inyector, interfase y fuente de MS fueron 230, 250 y 200°C, respectivamente. Los ácidos orgánicos se cuantificaron mediante el

uso de estándares internos. Las cantidades de estándares internos añadidos a las extracciones fueron ajustadas hasta cantidades similares a las de los compuestos endógenos, ya que las relaciones próximas a la unidad dan lugar a determinaciones más precisas.

3.2.4 Ácidos orgánicos en exudados de raíz y savia xilemática

Se constituyeron grupos de 5 plantas por tratamiento (tres réplicas), que se transfirieron a recipientes opacos que contenían 50 mL de las correspondientes soluciones nutritivas (+Fe y -Fe) adicionadas de tampón Tris-HCl 1mM (pH 7.0). Las plantas se incubaron durante 12 h en la misma cámara de cultivo y con iguales condiciones que las descritas anteriormente. Los exudados se recogieron, se filtraron a través de un filtro de jeringa de fluoruro de polivinilo de 0.20 μm (OlimPeak, Teknokroma) y se almacenaron a -80 °C, después de haber sido previamente congelados con N₂ líquido.

La savia del xilema se extrajo por medio de una cámara de presión tipo Scholander (Soilmoisture Equipment Corp. Santa Barbara, USA). Las plantas se cortaron 5 cm por encima de las primeras raíces y el sistema radicular completo se introdujo en la cámara cilíndrica de presión con el extremo cortado fuera del mismo. Se aplicó una presión de 2 MPa durante 5 min y se recogió el fluido xilemático en un tubo de plástico conectado al extremo cortado. Las muestras de savia se filtraron a través de un filtro de jeringa de fluoruro de polivinilo de 0.20 μm (OlimPeak, Teknokroma) y se almacenaron a -80°C, después de haber sido previamente congeladas con N₂ líquido.

Los ácidos orgánicos (citrato y malato) se analizaron en un HPLC iónico (ICS 2000, Dionex, CA, USA) equipado con una columna de

intercambio iónico (250 x 5 mm IonPac CS 16) y una columna supresora CSRS Ultra II-4 mm, funcionando a 100 mA, y a la temperatura de 25°C durante un tiempo operativo de 70 min. Las muestras se inyectaron con un muestreador automático (AS40, Dionex) o directamente por medio de una jeringa cuando los volúmenes eran pequeños. Los ácidos separados se identificaron por sus tiempos de retención y su cuantificación se llevó a cabo mediante el cálculo de las áreas de los picos que se relacionaron con las curvas de calibrado correspondientes. Para la monitorización, procesado de datos y cuantificación se utilizó el software *Chromeleon 6.6*.

3.2.5 Expresión de genes relacionados con el metabolismo de los ácidos orgánicos

Estos análisis, así como la identificación de los genes candidatos que codifican para los enzimas estudiados, se desarrollaron tal como se expone en el apartado 3.1.2. Los detalles sobre los oligonucleótidos utilizados se relacionan en la tabla 2.

Material y Métodos

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos de los genes de cítricos que codifican la expresión de las principales enzimas relacionadas con la biosíntesis de ácidos orgánicos: Fosfoenolpiruvato Carboxilasa (PEPC), Malato Deshidrogenada citosólica (cMDH) y mitocondrial (mMDH), Enzima Málico (ME), Citrato Sintasa (CS), Aconitasa (ACO), Fumarasa (FUM), y del transportador de ácidos di/tricarboxílicos (DTC), 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)
PEPC	clementine0.9_001549m	F	AAACACCGGTTAAGGCATCA	52
		R	AGTCGGTTTTGGTAAAAGCA	
cMDH	clementine0.9_015365m	F	CCTGTGATTCTGCACATGCT	131
		R	CATGCCTCAACAGCATCAGT	
ME	clementine0.9_033758m	F	AGAAGGTTACCGTGGTGTGG	127
		R	TTCTGGATCCCACATGTTCA	
CS	clementine0.9_009277m	F	AAACCCCTGGCCAAATGTT	141
		R	AGAGCTCGGTCCCATATCAACT	
ACO	clementine0.9_001896m	F	GGCAAGTCATTACATGCGTT	108
		R	TGAAGAAGTAGACCCCGGTTGA	
FUM	clementine0.9_008282m	F	AATTGCTGCACGAGTCATTG	95
		R	CTCCTTGTGAGCCTTCTTGG	
mMDH	clementine0.9_014978m	F	AAGGACCTGTGCTCTGCAAT	92
		R	GCAGCAATTGGAACAGTTGA	
DTC	clementine0.9_017076m	F	CAACGCCGCAATTACACTAA	92
		R	GTAGGACCTGCACCTTCCA	

*Código EST se refiere al nombre de transcrito disponible en la base de datos del Consorcio Internacional del Genoma de Cítricos (ICGC; <http://www.citrusgenome.ucr.edu/>).

3.2.6 Actividades enzimáticas

La actividad de los enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y citosólicos en las raíces se midió en las fracciones mitocondrial y soluble, respectivamente. Las muestras fueron obtenidas a partir de grupos de 30 plantas por tratamiento (con tres réplicas) utilizando 100 g de PF de raíces fibrosas en cada una.

Las mitocondrias del tejido radicular se aislaron mediante el método general de Ikuma y Bonner (1967), modificado por Jackson *et al.* (1979). Así, después de la separación del resto de la planta, las raíces fibrosas se lavaron con agua destilada y se cortaron en secciones de 2 ó 3 mm de longitud. Las secciones cortadas (100 g PF) se trituraron en un mortero con

200 mL de un medio que contenía 0.3 M de manitol, 0.2% de BSA, 1 mM de EDTA y 20 mM de MOPS (pH 7.2). Después de ser filtrado a través de muselina, el homogeneizado se centrifugó durante 5 min a 3000 g y la fracción sobrenadante resultante fue centrifugada de nuevo durante 20 min a 12000 g (1). El precipitado mitocondrial se resuspendió en el anterior medio (medio de lavado) y se centrifugó a 1500 g durante 10 min seguido de una precipitación final a 11000 g durante 15 min. El fluido sobrenadante fue cuidadosamente separado por aspiración de las mitocondrias sedimentadas. Para solubilizar las enzimas, las mitocondrias lavadas se resuspendieron en tampón 10 mM HEPES (pH 7.1) con 5 mM de mercaptoetanol. Se añadió Tritón X-100 hasta una concentración final del 0.4% y la muestra se agitó durante 15 min. Después de la incubación con Tritón X-100 la muestra se centrifugó durante 15 min a 36000 g y el sobrenadante se recogió para ser analizado inmediatamente. La fracción sobrenadante de la centrifugación a 12000 g (1) se centrifugó otra vez a 80000 g durante 30 min para obtener la fracción soluble. Todas las operaciones se realizaron a temperaturas entre 0 y 4°C.

Las actividades enzimáticas se ensayaron en las condiciones descritas en las siguientes referencias: PEPC (Vance *et al.*, 1983), PK (Moorhead y Plaxton, 1988), ME (Maurinol *et al.*, 1997), MDH (Dannel *et al.*, 1995), CS (Srere, 1967), ACO (Bacon *et al.*, 1961) y FUM (Bergmeyer *et al.*, 1974). Las actividades enzimáticas se midieron espectrofotométricamente (Lambda 25, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) en un volumen final de 3 mL de medio de reacción. Las reacciones se iniciaron al añadir de 50 a 200 µL de extracto proteico.

El contenido en proteínas se analizó de la misma forma descrita en el apartado 3.1.3.

3.2.7 Análisis estadístico

Los datos presentados sobre concentración de hierro en órganos (3.2.1), valores de SPAD, parámetros de fluorescencia y tasa de asimilación de CO₂ en hojas (3.2.2) y contenido en ácidos orgánicos en raíces (3.2.3) corresponden a la media y desviación estándar de 6 plantas independientes.

Cada muestra para los análisis de la concentración de ácidos orgánicos en el medio de exudación o en la savia del xilema (3.2.4) procedía del conjunto de un grupo de 5 plantas. Los valores presentados corresponden a la media y desviación estándar de los de tres grupos de plantas por tratamiento.

Para los análisis de expresión génica (3.2.5) se realizaron, al menos, tres extracciones independientes de ARN con sus correspondientes reacciones RT-PCR en tiempo real, que se repitieron tres veces en cada muestra. De forma similar, se efectuaron tres extracciones independientes de proteínas (3.2.6) a partir de tres grupos de 30 plantas por tratamiento. En cada extracto, las actividades enzimáticas se midieron por triplicado. En ambos casos los valores presentados son la media y desviación estándar de las tres réplicas.

El análisis estadístico se efectuó como en el experimento anterior.

3.3 EXPERIMENTO 3: EFECTOS DEL BICARBONATO SOBRE LOS COMPONENTES GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE ADQUISICIÓN DEL HIERRO

Este experimento se realizó con plantas sin injertar del patrón de cítricos FA-5 (híbrido de *Citrus reshni* Hort. ex Tan. x *Poncirus trifoliata* [L.] Raf.).

El semillero donde se obtuvieron las plantas se manejó como en los apartados anteriores.

Al cabo de 8 semanas, las plantas se seleccionaron por uniformidad de tamaño y se trasplantaron individualmente a macetas opacas de 0.5 L llenas de arena gruesa. Posteriormente, se separaron en dos grupos que se nutrieron con la solución de Hoagland y Arnon adicionada o no con 10 mM NaHCO₃. El pH de las soluciones nutritivas se ajustó a 8.0 con 1 M KOH o 1 M H₂SO₄.

Las plantas a las que se aplicaron soluciones con o sin bicarbonato (+FeBic y +Fe, respectivamente) se distribuyeron al azar en el área experimental, manteniendo alrededor de su perímetro una fila de plantas guarda no incluidas en el experimento.

Las condiciones de cultivo de las plantas en el invernadero fueron semejantes a las descritas en los apartados anteriores.

Los tratamientos se mantuvieron durante 8 semanas y, posteriormente, las plantas de ambos tratamientos se extrajeron cuidadosamente de las macetas y se separaron los tallos de las raíces. Estos órganos se lavaron primero con agua corriente y después con agua desionizada. Posteriormente, se procesaron en función de los posteriores análisis.

3.3.1 Distribución y transporte del hierro

La distribución del Fe absorbido en la planta completa se determinó utilizando ^{57}Fe durante un periodo de marcado relativamente largo. Así, después de su cultivo con soluciones nutritivas que contenían o no bicarbonato (+FeBic o +Fe, respectivamente), grupos de plantas de cada tratamiento se regaron durante 4 d con las mismas soluciones nutritivas donde el Fe se substituyó por $20\ \mu\text{M } ^{57}\text{FeEDDHA}$. Al final del experimento, las plantas se extrajeron de las macetas, recolectando separadamente los tallos y las raíces. Las raíces se lavaron con agua desionizada, y se trataron con una solución de HCl 0.05 M durante 3 min para eliminar el Fe extracelular y luego dos veces con agua desionizada destilada. Finalmente, se analizó la concentración de Fe en los órganos y el enriquecimiento en ^{57}Fe , por los procedimientos descritos en el apartado 3.1.5.

El contenido total de ^{57}Fe ($^{57}\text{Fe}_t$ en μg) en el órgano se calculó en función de la concentración en Fe en el órgano ([Fe] en $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) y el enriquecimiento en ^{57}Fe ($[\Delta^{57}\text{Fe}] = \% \text{ átomos } ^{57}\text{Fe} \text{ en exceso}$), según la ecuación 2.

$$\text{Ecuación 2: } ^{57}\text{Fe}_t = \frac{[\text{Fe}] \times \text{PS} \times [(\Delta^{57}\text{Fe})]}{100}$$

3.3.2 Influjos de ^{57}Fe en las raíces

Los influjos de ^{57}Fe en raíces de plantas tratadas o no con bicarbonato (+FeBic o +Fe, respectivamente) se determinaron de la forma detallada en el apartado 3.1.5.

3.3.3 Parámetros fotosintéticos

En ambos tratamientos la tasa de asimilación neta de CO₂, el contenido en clorofila y los parámetros de fluorescencia de ésta se determinaron en el mismo tipo de hojas y por los mismos procedimientos descritos en el apartado 3.2.2.

3.3.4 Expresión de genes relacionados con el sistema de absorción de Fe

El análisis de la expresión génica se efectuó según lo expuesto en el apartado 3.1.1.

3.3.5 Actividades enzimáticas

Las actividades de las enzimas Quelato férrico reductasa (FC-R), H⁺-ATPasa y Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) se valoraron por los métodos expuestos 3.1.4, 3.1.5 y 3.2.6.

3.3.6 Acidificación del medio radicular

La capacidad de acidificación de las raíces se determinó en las plantas tratadas con +Fe y +FeBic. Después de su extracción y lavado se transfirieron a recipientes que contenían medios de incubación (250 mL) constituidos por la anterior solución nutritiva con y sin 10 mM de HCO₃⁻ (MI+Bic y MI, respectivamente). Estos medios se ajustaron a pH 8.5 con NaOH 5 mM (Panreac). Las plantas se incubaron durante 24 h en la misma cámara de cultivo y con iguales condiciones que las descritas anteriormente (apartado 3.1.3). La acidificación del medio se determinó midiendo los cambios de pH en la solución nutritiva con un pHmetro (Consort C531).

3.3.7 Análisis estadístico

Los valores de los parámetros fotosintéticos (3.3.3) -índice SPAD, fluorescencia de la clorofila y A_{CO_2} - son la media de los de 6 plantas independientes por tratamiento. Los valores del resto de las determinaciones corresponden a la media y desviación estándar de tres réplicas por tratamiento, obtenidos a partir de tres grupos independientes de 10 plantas cada uno.

El análisis estadístico se efectuó como en los anteriores experimentos.

3.4 EXPERIMENTO 4. INFLUENCIA DEL BICARBONATO EN LA MOVILIZACIÓN DE LAS RESERVAS DE Fe DE LOS COTILEDONES EN UN MEDIO DE CULTIVO CARENTE DE Fe

En este experimento se utilizaron semillas monoembriónicas de limonero (*Citrus limon* L. Burm). Después de la eliminación de las cubiertas, las semillas se esterilizaron superficialmente mediante inmersión durante 10 min en una solución filtrada de hipoclorito cálcico al 7% adicionada de Tween 20 al 0.1% (v/v). Inmediatamente después las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Para la germinación de las semillas y posterior cultivo "*in vitro*" de las plántulas se prepararon dos medios nutritivos que contenían las sales minerales de Hoagland y Arnon con excepción del quelato de hierro, adicionándose 10 mM NaHCO₃ en uno de ellos (-FeBic) pero no en el otro (-Fe). A ambos medios, se les añadió agar (Difco Bacto) al 0.7% (w/v) y se les ajustó el pH a 8.0 (mediante adición de 1 m KOH o 1 M H₂SO₄), antes de ser esterilizados en autoclave durante 20 min a 120°C. Los medios se distribuyeron en tubos de 150 x 25 mm, dispensando 40 cc de medio en cada uno de ellos. Después de sembrar las semillas, los tubos se mantuvieron durante 21 d en una cámara de cultivo (Sanyo MCR-350H, Sanyo Electric Biochemical Co, Japón) a 27°C de temperatura, 80% de humedad relativa y 200 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa durante 16 h al día.

Posteriormente, las plántulas de ambos tratamientos se extrajeron cuidadosamente de los tubos y se separaron los tallos de las raíces. Estos órganos se lavaron con agua desionizada y se procesaron en función de los posteriores análisis.

Un grupo adicional de plántulas que también fueron cultivadas durante 21 d en el tratamiento con bicarbonato (-FeBic) fue dividido en dos partes que se trasplantaron a otros dos grupos de tubos de cultivo preparados como en el caso anterior con la solución nutritiva completa de Hoagland y Arnon (conteniendo 20 μM de FeEDDHA) adicionada o no con 10 mM de NaHCO_3 (+FeBic y +Fe, respectivamente). Un grupo adicional de plántulas se mantuvieron en el medio -FeBic como controles. Estas plántulas se mantuvieron otros 15 d en las mismas condiciones de cultivo anteriormente descritas, antes de ser extraídas y manipuladas como en el caso anterior.

En los grupos de plántulas, establecidos en función del tratamiento al que fueron sometidas, se efectuaron las siguientes determinaciones:

3.4.1 Peso de los órganos (tallos, cotiledones y raíces) y concentración de Fe en los mismos

3.4.2 Expresión de los genes relacionados con el sistema de absorción del hierro por las raíces

3.4.3 Actividades de los enzimas H^+ -ATPasa, FC-R y PEPC en las raíces

Las metodologías en cada caso se corresponden con las utilizadas en los experimentos 3.1 y 3.2.

3.4.4 Análisis estadístico

Los valores de todas las determinaciones son la media y desviación estándar de tres réplicas por tratamiento obtenidas a partir de tres grupos independientes de 10 plantas cada uno.

El análisis estadístico se efectuó como en los anteriores experimentos.

3.5 EXPERIMENTO 5. EFECTO DE LOS IONES Zn^{2+} Y Mn^{2+} SOBRE LOS COMPONENTES GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE ADQUISICIÓN DEL HIERRO

Este experimento se realizó con plántulas de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) obtenidas a partir de semillas germinadas “*in vitro*”, según el procedimiento descrito en el experimento anterior.

En el ensayo sobre el efecto del Zn^{2+} , se preparó un medio de cultivo que contenía las sales minerales de Hoagland y Arnon con excepción del Fe-EDDHA y del $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Este medio se dividió en 4 partes, de las cuales una se dejó inalterada (-Fe0Zn), mientras que a cada una de las otras tres se les añadió separadamente 20 μM Fe-EDDHA (+Fe0Zn), 100 μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (-Fe100Zn) o ambos compuestos (+Fe100Zn). En el ensayo paralelo con Mn^{2+} se procedió de forma semejante, preparando el medio de cultivo de Hoagland y Arnon desprovisto de Fe-EDDHA y $MnSO_4 \cdot H_2O$. Igualmente, este medio se dividió en 4 partes de las cuales una se dejó inalterada (-Fe0Mn) mientras que a las otras tres se les añadió separadamente 20 μM FeEDDHA (+Fe0Mn), 250 μM $MnSO_4 \cdot H_2O$ (-Fe250Mn) o ambos compuestos (+Fe250Mn).

A todos los medios se les añadió agar (Difco Bacto) al 0.7% (w/v) y se les ajustó el pH a 6.0 (mediante adición de 1 m KOH o 1 M H_2SO_4), antes de ser esterilizados en autoclave durante 20 min a 120°C. Los medios se distribuyeron en tubos de 150 x 25 mm, dispensando 40 cc de medio en cada uno. Después de sembrar las semillas en ellos, los tubos se mantuvieron durante 30 d en una cámara de cultivo con las mismas condiciones que en el experimento anterior.

Posteriormente, las plántulas de cada tratamiento se extrajeron cuidadosamente de los tubos y se separaron los tallos de las raíces. Estos órganos se lavaron con agua desionizada y se procesaron en función de los posteriores análisis.

En los grupos de plantas, establecidos en función del tratamiento al que fueron sometidas, se determinaron las analíticas de los apartados siguientes.

3.5.1 Concentraciones de Fe, Zn y Mn en los órganos

3.5.2 Expresión de los genes relacionados con el sistema de absorción de hierro por las raíces

3.5.3 Actividad del enzima FC-R en las raíces

3.5.4 Acidificación del medio radicular

3.5.5 Influjos de ^{57}Fe en las raíces

Las metodologías en cada caso se corresponden con las utilizadas en los experimentos 3.1.

3.5.6 Análisis estadístico

Los valores de todas las determinaciones son la media y desviación estándar de tres réplicas por tratamiento, obtenidos a partir de tres grupos independientes de 10 plantas cada uno.

El análisis estadístico se efectuó como en los anteriores experimentos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESPUESTAS GÉNICAS Y FISIOLÓGICAS A LA DEFICIENCIA DE HIERRO DE DOS PATRONES DE CÍTRICOS CON DIFERENTE GRADO DE TOLERANCIA A LA CLOROSIS FÉRRICA

El experimento 1 permitió caracterizar el sistema de absorción de Fe en plantas de cítricos cultivadas bajo condiciones de clorosis férrica provocada por la ausencia total de Fe en la solución nutritiva. Así mismo, se estudió la regulación de los componentes que participan en dicho proceso en dos patrones de cítricos que presentan una respuesta diferente a la clorosis férrica, mandarino Cleopatra y citrange Carrizo (tolerante y sensible, respectivamente).

4.1.1 Expresión de los genes que regulan la actividad de los enzimas y el transportador férrico

En primer lugar se determinó la expresión de los genes HA, FRO e IRT, que regulan, respectivamente, la actividad de las enzimas H⁺-ATPasa y quelato férrico reductasa, y el transportador férrico en el sistema radical de los cítricos (Figura 10).

Para cada tratamiento, el número de transcritos de los genes HA1 y HA2, fue similar en ambas plantas. Sin embargo, la expresión del gen HA1 aumentó con la deficiencia de Fe en los dos patrones (1.9 y 1.8 veces en MC y CC, respectivamente), mientras que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de HA2 entre los distintos genotipos.

En cuanto a la regulación génica de la enzima FC-R, el gen FRO1 no mostró inducción con respecto a ningún patrón o tratamiento, mientras que la expresión del gen FRO2 aumentó significativamente como consecuencia

de la deficiencia de Fe en ambos genotipos (3.1 y 1.4 veces en MC y CC, respectivamente). Curiosamente, la actividad de este gen registrada en el patrón tolerante siempre fue mayor que la del patrón sensible (entre 1.7 y 3.9 veces, en las plantas +Fe y -Fe, respectivamente).

La actividad de los dos genes que codifican la expresión del transportador férrico, IRT1 e IRT2, fue significativamente mayor en las plantas del genotipo CC que en las de MC. El número de transcritos del gen IRT2 no se vio afectado como consecuencia de la deficiencia de Fe en ningún patrón, mientras que el gen IRT1 mostró una inducción significativa en las plantas deficientes, que fue más pronunciada en el genotipo sensible (60.1%) que en el tolerante (26.7%).

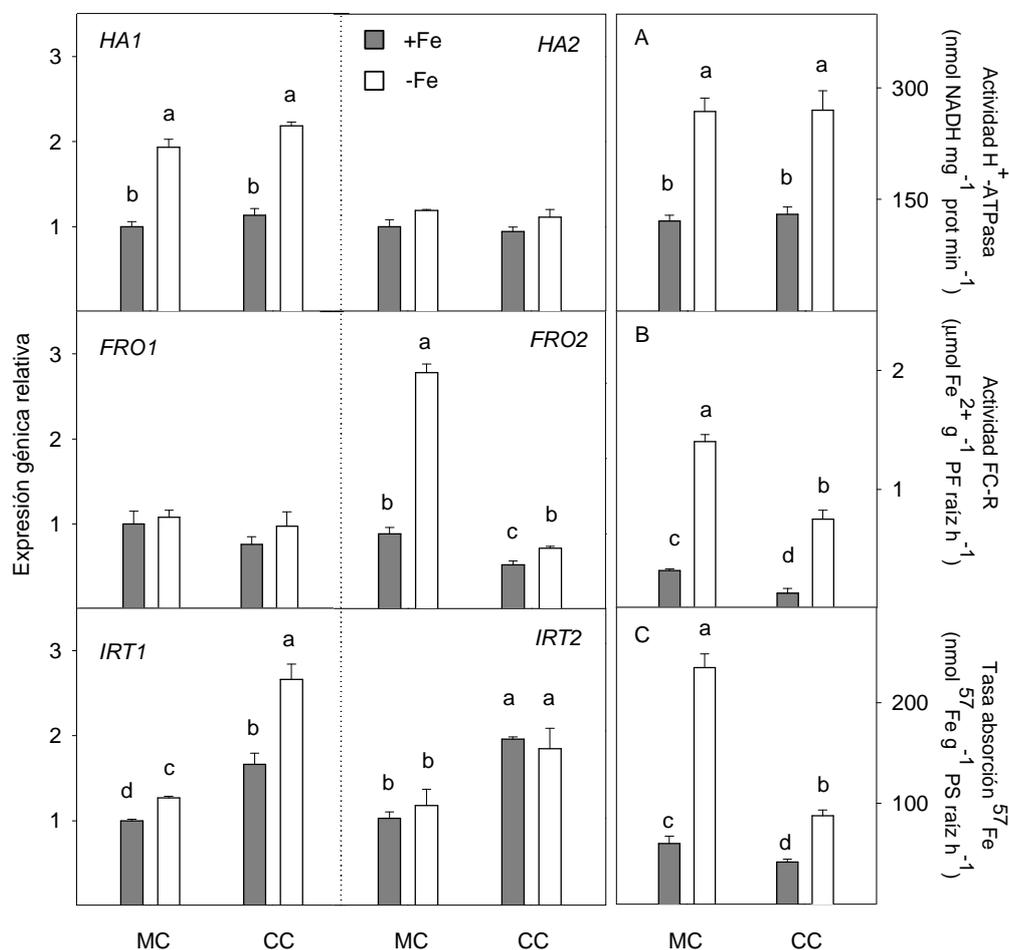


Figura 10. Expresión relativa de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1 e IRT2 medida mediante RT-PCR en tiempo real; (A) actividad H^+ -ATPasa; (B) actividad FC-R y (C) tasa de absorción de ^{57}Fe , determinadas en raíces de los genotipos mandarina Cleopatra (MC) y citrange Carrizo (CC). Las plantas se cultivaron con soluciones nutritivas adicionadas (+Fe) o no (-Fe) con $20 \mu M$ FeEDDHA. Cada valor es media de tres repeticiones \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza.

4.1.2 Capacidad de acidificación del medio externo

Para medir la cantidad de protones liberados se introdujeron las plantas de ambos tratamientos y estados nutritivos en sus respectivas soluciones nutritivas ajustadas a pH 7, hasta el nivel del sistema radical. La

reducción del pH comenzó de inmediato en todos los tratamientos (Figura 11). Las sucesivas medidas del pH de la solución mostraron que la capacidad de acidificación fue más rápida en las plantas deficientes en hierro que en las plantas +Fe, aunque no se encontraron diferencias entre los genotipos.

En concreto, a las 8 horas de incubación, la cantidad de protones excretados al medio fue 88.1% mayor en las plantas -Fe que en las +Fe, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos.

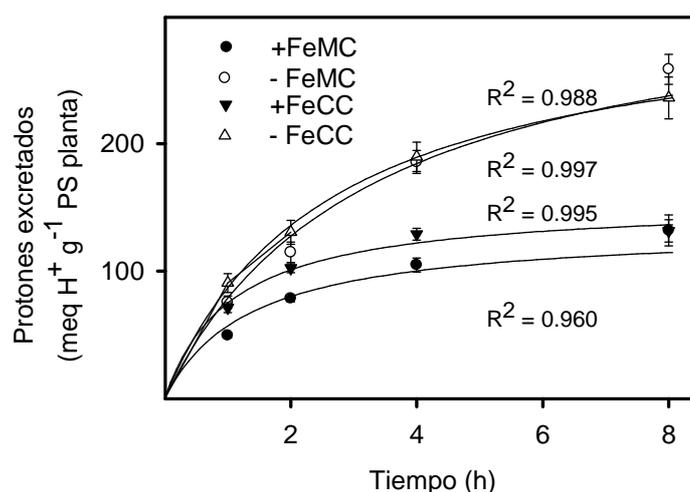


Figura 11. Capacidad de acidificación de las raíces de los genotipos mandarina Cleopatra (MC) y citrange Carrizo (CC), medida como los protones excretados durante un período de incubación de 8 horas. Las lecturas fueron realizadas en solución nutritiva adicionadas (+Fe) o no (-Fe) con 20 μ M FeEDDHA para las plantas +Fe y -Fe, respectivamente. Cada valor es media de tres repeticiones \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza.

4.1.3 Actividad de las enzimas H⁺-ATPasa y FC-R

La determinación de la actividad enzimática responsable de la extrusión de protones mostró que las plantas deficientes en Fe (-Fe) tenían una actividad H⁺-ATPasa considerablemente mayor que las plantas cultivadas en el medio con Fe (+Fe). Este aumento fue de 2.2 y 2.1 veces en MC y CC, respectivamente, aunque no se detectaron diferencias significativas en esta actividad entre ambos genotipos (Figura 10A).

Los resultados de la figura 10B muestran que la capacidad de reducción de Fe³⁺ fue mayor en las raíces de las plantas deficientes que en las plantas control, y, cuando se compararon las plantas deficientes de ambos genotipos, la capacidad de reducción fue mayor en las raíces de MC que en CC. Así, la actividad FC-R de las raíces de las plantas deficientes de MC fue 4.4, 1.9 y 10.7 veces superior que en las plantas +FeMC, -FeCC y +FeCC, respectivamente.

4.1.4 Absorción de ⁵⁷Fe por las raíces

4.1.4.1 Fe total e intracelular y enriquecimiento en ⁵⁷Fe del sistema radical

La capacidad de absorción de Fe de las plantas se determinó en ambos genotipos y estados nutritivos mediante un tratamiento con 100 μM Fe(EDDHA) enriquecido al 95.2% con el isótopo estable ⁵⁷Fe durante un periodo de marcado de 20 minutos.

Los datos de la tabla 3 muestran que la concentración de Fe total del sistema radical de las plantas de ambos patrones cultivadas con Fe fue más de dos veces superior que la de las plantas cultivadas en ausencia del elemento. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el contenido

Resultados y Discusión

de Fe total de las raíces de las plantas +Fe de ambos genotipos, mientras que las raíces de las plantas -FeCC presentaron valores significativamente inferiores a los de -FeMC.

Tabla 3. Concentración de hierro total de las raíces de los genotipos mandarina Cleopatra (MC) y citrange Carrizo (CC) cultivadas con soluciones nutritivas adicionadas (+Fe) o no (-Fe) con 20 μM FeEDDHA. Concentración de Fe intracelular en las raíces después de la retirada del Fe apoplástico según el método descrito por Bienfait *et al.* (1985). Concentración de átomos de ^{57}Fe en exceso ($\Delta^{57}\text{Fe}$) después de marcado con 100 μM $^{57}\text{FeEDDHA}$.

Genotipo	Tratamiento	Concentration Fe en raíces ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS raíz)		$\Delta^{57}\text{Fe}$ (%)
		Total	Intracelular	
Mandarino Cleopatra	+Fe	426.3 a	187.7 b	0.61 c
	-Fe	190.2 b	123.4 c	3.62 a
Citrange Carrizo	+Fe	374.7 a	220.7 a	0.36 d
	-Fe	116.5 c	86.0 d	1.94 b

^ZCada valor es media de tres repeticiones independientes \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 columna son significativamente diferentes.

La figura 12 representa las curvas de flujo de salida de ión ferroso (Fe^{2+}) de las raíces de plantas intactas de ambos genotipos y estados nutritivos. En todos ellos se produjo una fase de liberación rápida de hierro de las raíces, seguida por una fase más lenta. Se supone que el hierro liberado en la primera fase representa el hierro acumulado en el espacio libre de la raíz. De estas curvas se observa, que un periodo de 20 minutos de incubación en presencia de ditionita es adecuado para la determinación de hierro extracelular en las raíces.

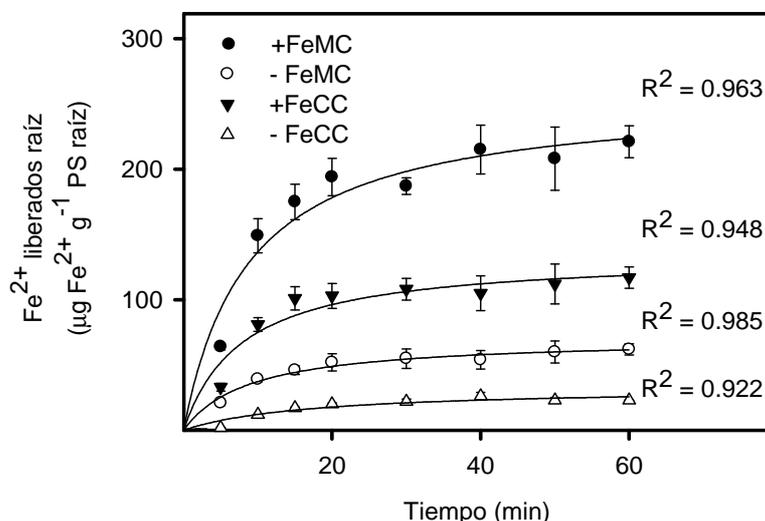


Figura 12. Capacidad de liberación de Fe apoplástico de las raíces de los genotipos mandarino Cleopatra (MC) y citrange Carrizo (CC), medido como los iones ferrosos liberados durante un período de incubación de 20 minutos en presencia de Na_2SO_4 según el método descrito por Bienfait *et al.* (1985). Las plantas fueron cultivadas con soluciones nutritivas adicionadas (+Fe) o no (-Fe) con $20 \mu\text{M}$ FeEDDHA. La solución de incubación no fue renovada durante en este ensayo. Cada valor es media de tres repeticiones \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza.

En estas condiciones, las raíces de las plantas control de MC liberaron mayor cantidad de Fe^{2+} que los controles de CC, mientras que, comparando entre estados nutritivos, las plantas deficientes de ambos genotipos liberaron menor cantidad que sus respectivos controles (Tabla 3). La cantidad de hierro (en $\mu\text{g Fe}^{2+} \text{ g}^{-1} \text{ PS raíz}$) liberado del apoplasto de la raíz de las plantas +FeMC representó el 56% del contenido total de hierro de estas plantas, mientras que en las mismas raíces del tratamiento +FeCC este porcentaje fue cercano al 41%. En las plantas deficientes, el Fe apoplástico liberado representó el 35% y 26% del contenido de Fe total en las raíces de los genotipos MC y CC, respectivamente. La concentración de Fe restante (intracelular) en las raíces después de la extracción del hierro apoplástico

(método de Bienfait *et al.*, 1985) fue mayor en las raíces de las plantas +Fe que en las -Fe, y de todos los tratamientos, los valores más bajos fueron registrados en las raíces -FeCC. La tabla 3 también muestra el enriquecimiento de ^{57}Fe de las raíces (en % de átomos en exceso) después de la retirada del Fe apoplástico. En todos los casos, los enriquecimientos de ^{57}Fe más altos fueron encontrados en las raíces -Fe y en los dos tratamientos, el marcado fue más pronunciado en las raíces del genotipo MC que en CC.

4.1.4.2 Tasa de absorción de ^{57}Fe en el sistema radical

La tasa de absorción de ^{57}Fe en las células de la raíz se calculó con los datos de enriquecimiento en ^{57}Fe (% $\Delta^{57}\text{Fe}$) del Fe intracelular (Tabla 3) y se recoge en la figura 10C. Los resultados indican que la tasa de absorción de ^{57}Fe de las células de la raíz de las plantas -Fe, cuando se someten a un tratamiento durante 20 minutos con $100\ \mu\text{M}$ $^{57}\text{FeEDDHA}$, fue mayor que la observada en las plantas +Fe, cuando se compara entre genotipos. En particular, las plantas -FeMC alcanzaron el valor de tasa de absorción más alto ($235.1\ \text{nmol } ^{57}\text{Fe g}^{-1}\ \text{PS raíz h}^{-1}$), que fue 3.9 veces superior que el encontrado en su control +FeMC. Las tasas de absorción de ^{57}Fe de las plantas -FeCC y +FeCC (87.8 y $41.8\ \text{nmol } ^{57}\text{Fe g}^{-1}\ \text{PS raíz h}^{-1}$, respectivamente) fueron inferiores a las encontradas en los mismos tratamientos de las plantas MC.

4.1.5 Discusión

Las raíces de las plantas incluidas en la denominada estrategia I - entre las que se encuentran los cítricos- 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. 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 experimento muestran las diferencias, tanto a nivel fisiológico como molecular, en la respuesta a la deficiencia de Fe de dos genotipos de cítricos, citrange Carrizo y mandarino Cleopatra, que pueden explicar su diferente resistencia a la clorosis férrica.

En condiciones de presencia de Fe, no se detectaron diferencias en la expresión constitutiva de los genes HA1 y HA2 entre los dos genotipos, pero la carencia de hierro aumentó significativamente los niveles de transcripción del gen HA1 (Figura 10). Algunas investigaciones anteriores demuestran que la acidificación de la rizosfera después de la deficiencia de Fe depende en gran medida la expresión de algunos miembros de la familia génica HA (Santi y Schmidt, 2009), y coincidiendo con nuestros resultados, el gen CsHA1 de pepino está regulado por los niveles de Fe, mientras que el gen CsHA2 no se ve afectado (Santi *et al.*, 2005). La actividad de la enzima H^+ -ATPasa aumentó en las raíces de las plantas deficientes de Fe de ambos genotipos (Figura 10A), aunque sin diferencias significativas entre ellos, y es consecuente con los resultados obtenidos sobre la capacidad de acidificación de la solución externa (Figura 11). Así pues, 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 (Rabotti y Zocchi, 2006; Rabotti *et al.*, 1995; Tagliavini *et al.*, 1995; Wey *et al.*, 1997; Vizzotto *et al.*, 1999; Dell'Orto *et al.*, 2000b; Ksouri *et al.*, 2006; Donnini *et al.*, 2009; Jelali *et al.*,

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 no mostraron diferencias en esta respuesta al aporte de Fe entre los genotipos estudiados. Además, la extrusión de protones se produjo 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 las plantas, ya que se ha descrito que los niveles de transcripción de estos genes modulan fuertemente la absorción de hierro por las plantas, dado su papel clave en el proceso de reducción de Fe en la superficie de la raíz (Jeong y Connolly, 2009). Los resultados del gen FRO2, presentados en este documento, confirman el comportamiento inductivo de estos genes observado en otras especies como consecuencia de la deficiencia de Fe (Connolly *et al.*, 2003). Así, el acusado incremento de los niveles de transcripción de FRO2 en el genotipo tolerante MC 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 10). Por otra parte, los niveles relativamente altos de FRO2 encontrados en las raíces de las plantas control del genotipo MC en comparación con el control de CC, podrían sugerir una apreciable capacidad reductora constitutiva (Li *et al.*, 2002).

Por consiguiente, de acuerdo con la expresión del gen FRO2, las raíces de ambos genotipos indujeron su actividad reductora en condiciones de deficiencia de hierro (Figura 10B), aunque este efecto fue más pronunciado en el portainjerto tolerante (MC). En este sentido, 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 plantas leñosas (Dell'Orto *et al.*, 2000a; Gogorcena *et al.*, 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 *et al.*, 1994). Estas afirmaciones están de acuerdo con nuestros resultados, lo que indican que la deficiencia de Fe induce un grado de respuesta mayor para la reducción de Fe^{3+} en el sistema radical de mandarino Cleopatra que en citrange Carrizo.

Por todo ello, la estimulación de la actividad de los enzimas H^+ -ATPasa y FC-R en las raíces de las plantas con deficiencia de hierro, ha sido considerada por algunos autores como una acción sinérgica de ambos enzimas para mejorar la capacidad de adquisición de Fe, a través de la acidificación del apoplasto radicular y de la reducción de Fe^{3+} (Rabotti y Zocchi, 1994; Rabotti y Zocchi, 2006; Vizzotto *et al.*, 1999; Dell'Orto *et al.*, 2000b; Donnini *et al.*, 2009; M'sehli *et al.*, 2009; Jelali *et al.*, 2010a), como parece ocurrir en portainjertos de cítricos.

De tal manera que, para determinar la tasa de absorción de Fe de las plantas de este experimento se realizó un ensayo de marcado con un quelato férrico (FeEDDHA) enriquecido en el isótopo de 57 neutrones (^{57}Fe). La dilución isotópica se ha descrito como una técnica muy eficaz para este tipo de ensayos (Rodríguez-Castrillón *et al.*, 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 *et al.*, 2002; Bocanegra *et al.*, 2006). También se ha utilizado 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 *et al.*, 2000; Kovács *et al.*, 2005). Finalmente, Rodríguez-Castrillón *et al.* (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 ha elegido para analizar todas las muestras de material vegetal enriquecido con ^{57}Fe . La utilización de tiempos de exposición cortos (5 minutos) se descartó, porque con niveles de marcado muy bajos puede haber sobreestimaciones debidas a las 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 con marcados cortos (Kronzucker *et al.*, 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 *et al.*, 1996).

Finalmente, nuestros resultados mostraron que cuando las plantas de ambos genotipos y estados nutritivos se sometieron a un tratamiento con quelato férrico enriquecido en $^{57}\text{FeEDDHA}$, el sistema radical de las plantas de ambos patrones inicialmente cultivadas en ausencia de Fe mostraron una tasa de absorción de ^{57}Fe superior que las plantas cultivadas con la solución

nutritiva completa (Figura 10C). Fox *et al.* (1996) también obtuvieron un aumento de la capacidad de absorción de Fe inducida por la deficiencia de Fe en *Pisum sativum*, 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 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 en el genotipo tolerante a la clorosis *Citrus macrophylla* fue significativamente mayor para las plantas con deficiencia de Fe que para el control. Por el contrario, este aumento fue mucho menor en el genotipo citrange Troyer, sensible a la clorosis. Estos resultados apoyan en parte a los obtenidos en nuestro trabajo, aunque el método utilizado no es comparable.

Para profundizar en las diferencias en la capacidad de absorción de hierro entre los dos genotipos y estados nutritivos, hemos analizado la expresión génica de dos miembros de la familia de genes IRT (IRT1 y IRT2), que se ha demostrado que codifican la expresión de los principales transportadores responsables de la alta afinidad en la absorción del metal (Eide *et al.*, 1996; Vert *et al.*, 2001, 2002, 2009). En primer lugar, nuestros resultados muestran que la expresión del gen IRT1 aumentó significativamente el número de transcritos en ambos portainjertos como consecuencia de la deficiencia de Fe; mientras que IRT2 no se vio afectado en ningún caso (Figura 10). Este hecho podría indicar un papel clave de IRT1 en la respuesta de los portainjertos de cítricos contra las condiciones

de deficiencia de Fe por medio del aumento de la capacidad de transporte de hierro de la raíz, de acuerdo con informes anteriores sobre *Arabidopsis* (Connolly *et al.*, 2002; Vert *et al.*, 2002). Además, los resultados muestran que, en presencia de hierro externo, los niveles de expresión de IRT1 e IRT2 fueron superiores en CC que en MC, lo que indica una mayor actividad de transporte constitutivo en el primer genotipo.

Sin embargo, surge una aparente contradicción ya que se observa que el nivel de inducción de la expresión de los genes IRT en las raíces de ambos genotipos no se corresponde con las tasas de absorción de ^{57}Fe registradas, que fueron superiores en MC que en CC. Esto llevó a discutir si el aumento de la tasa de absorción fue consecuencia de un aumento de la actividad del transportador o de una mayor capacidad de reducción del Fe(III). De esta manera, Grusak *et al.* (1990) correlacionaron los cambios en la absorción de Fe con los cambios en la actividad de la reductasa en las raíces de *P. sativum*, y posteriormente, Manthey *et al.* (1993) sugirieron que los niveles de absorción de ^{55}Fe en las plantas de cítricos mostraron una buena correlación con las tasas de reducción. Las evidencias presentadas en estos informes están de acuerdo con los resultados presentados en este manuscrito, indicando que el rasgo que refleja las diferencias en la tolerancia a la clorosis férrica entre los dos genotipos probablemente se relaciona con la capacidad de aumentar la reducción del ión férrico en respuesta a la deficiencia de Fe, que fue mayor en las plantas del genotipo tolerante MC. Este factor parece constituir el factor limitante para la adquisición de Fe, ya que, las tasas de absorción de ^{57}Fe fueron también mayores en MC que en CC. Por el contrario, las respuestas de la expresión de los genes relacionados con la acidificación del medio (genes HA) o con el transporte de hierro (genes IRT), no se corresponden con las diferencias a

la tolerancia a la clorosis férrica encontradas anteriormente entre los dos patrones (Castle *et al.*, 2009).

Por otra parte, el genotipo tolerante a la clorosis férrica MC acumuló mayor cantidad de hierro en el apoplasto de su sistema radical que el genotipo sensible CC; y, de acuerdo con Strasser *et al.* (1999), la cantidad de Fe liberado del apoplasto radicular representó en la mayoría de los casos (-FeCC, +FeCC y -FeMC) menos del 40% del contenido total de Fe de la raíz, siendo la excepción las raíces de +FeMC, donde este porcentaje alcanzó un 56.0% (Tabla 3). Longnecker y Welch (1990) propusieron que la acumulación de hierro en el apoplasto radicular de la soja puede ser un factor de resistencia a la clorosis férrica, lo que sugiere que el hierro del espacio libre puede servir como depósito de almacenamiento de hierro a corto plazo, que resulta más fácilmente disponible para la absorción y translocación del elemento que el Fe que ya ha sido absorbido por las células de la raíz. El hecho de que la cantidad de Fe apoplástico disminuyó durante la exposición de las plantas de cítricos a condiciones deficitarias de éste, apoya la hipótesis anterior.

Por lo tanto, podemos concluir que el grado de tolerancia a la deficiencia de hierro en los cítricos parece estar determinada por el nivel de la inducción de la actividad FC-R de la raíz en condiciones de deficiencia de Fe, mediada por el incremento en la expresión del gen FRO2. Además, la resistencia a la clorosis férrica en estas plantas podría estar relacionada con la cantidad de hierro almacenada en el apoplasto de la raíz.

4.2 RESPUESTAS METABÓLICAS DE LAS RAÍCES A LA DEFICIENCIA DE HIERRO INDUCIDA

El experimento 2 permitió evaluar la respuesta del metabolismo de síntesis de ácidos orgánicos en las raíces de un patrón de cítricos bajo condiciones de clorosis férrica.

4.2.1 Desarrollo de la clorosis

En primer lugar se evaluó el estado de las plantas de citrange Carrizo, una vez transcurridos los dos meses de inducción a la clorosis férrica mediante el tratamiento de éstas con una solución nutritiva carente de fertilizante férrico. Así, las plantas cultivadas en condiciones de ausencia de Fe manifestaron claros síntomas de deficiencia de Fe en las brotaciones desarrolladas durante este periodo, que adquirieron un amarillamiento progresivo de las hojas más jóvenes.

La tabla 4 muestra la concentración de Fe total en las hojas jóvenes y en la raíz fibrosa de las plantas sometidas a ambos tratamientos. Las plantas cultivadas bajo condiciones deficitarias de Fe (-Fe) experimentaron una reducción de la concentración de Fe en estas fracciones del 53.8% y 68.6%, respectivamente, en relación con el tratamiento control (+Fe).

Tabla 4. Concentración de hierro total en las hojas jóvenes y raíz fibrosa de las plantas de citrange Carrizo regados durante 2 meses con una solución nutritiva con (+Fe) o sin (-Fe) 20 μM de hierro.

	Fe total (mg kg^{-1} PS)	
	+Fe	-Fe
Hojas jóvenes	71.19 \pm 0.79 a	32.86 \pm 0.16 b
Raíz fibrosa	219.07 \pm 0.37 a	68.85 \pm 0.43 b

^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.

En cuanto al estado del aparato fotosintético (Tabla 5), las plantas del tratamiento -Fe presentaron una disminución significativa en su contenido de clorofila (estimado como una reducción del 61.7% en el valor del índice de SPAD de estas hojas), en comparación con el de las plantas control (+Fe). Además, la deficiencia de Fe provocó una disminución en el rendimiento cuántico máximo del PS II (Fv/Fm) y en la relación entre la fluorescencia variable e inicial (Fv/Fo); así, como una reducción del 54.3% de la máxima actividad fotosintética o tasa de asimilación de CO₂ (A_{max}) de las hojas cloróticas (-Fe), en comparación con las hojas de las plantas +Fe.

Tabla 5. Índice de SPAD, parámetros de fluorescencia (Fv/Fm y Fv/Fo) y de intercambio gaseoso (A_{CO2}) en hojas jóvenes de plantas de citrange Carrizo regadas durante dos meses con una solución nutritiva con (+Fe) o sin (-Fe) 20 μM de hierro. Fo, fluorescencia mínima; Fm, fluorescencia máxima; Fv, fluorescencia variable (Fv = Fm-Fo); Fv/Fm, variación de la máxima eficiencia del fotosistema II; Fv/Fo, ratio fluorescencia variable e inicial; A_{CO2}, máxima actividad fotosintética.

	+Fe		-Fe	
SPAD	63.18 ± 1.01	a	24.2 ± 1.65	b
Fv/Fm	0.83 ± 0.01	a	0.65 ± 0.01	b
Fv/Fo	5.00 ± 0.10	a	1.86 ± 0.05	b
A _{CO2} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	6.58 ± 0.22	a	3.01 ± 0.12	b

^zCada valor es la media de 6 repeticiones ± 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.

4.2.2 Capacidad de biosíntesis de ácidos orgánicos

4.2.2.1 Concentración de ácidos orgánicos en las raíces

La figura 13A muestra los resultados del análisis del contenido endógeno de aniones orgánicos en el sistema radical de las plantas de ambos tratamientos. Los ácidos orgánicos mayoritarios en el total de aniones encontrados fueron el citrato y el malato, representando más del 90% del

total de ácidos de este órgano. La deficiencia de Fe aumentó la concentración de estos aniones en las raíces, que registraron un incremento del 123.8% y 77.4% de citrato y malato, respectivamente, con respecto a las raíces de las plantas +Fe. Finalmente, el anión más abundante en las raíces de las plantas -Fe fue el citrato, que constituye más del 75% del contenido de ácidos orgánicos en esta fracción de la planta.

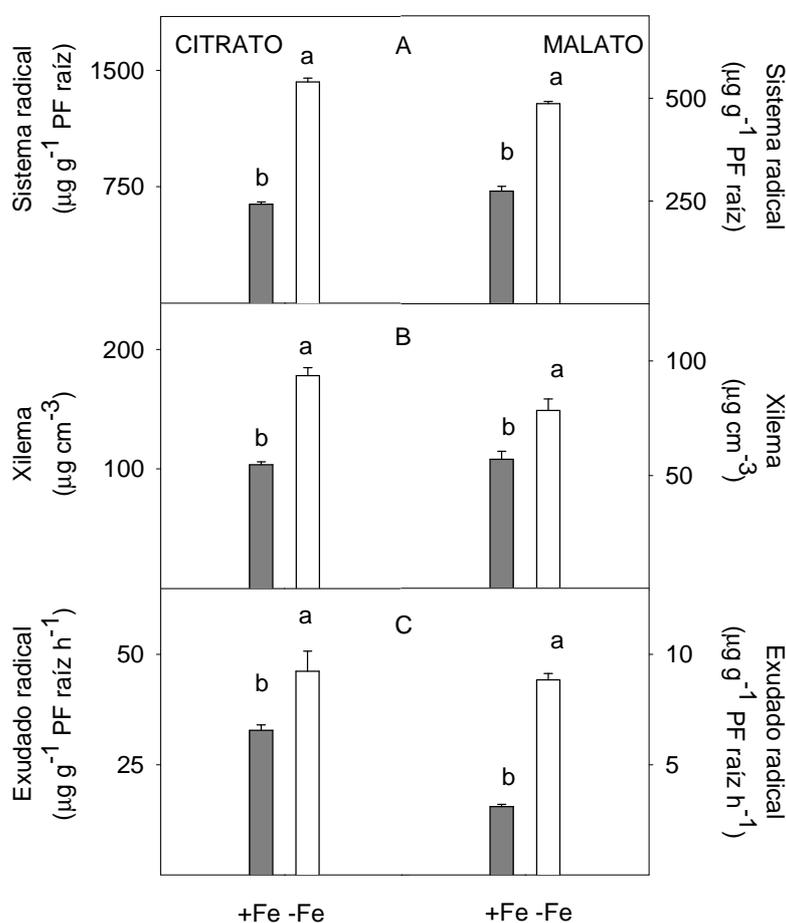


Figura 13. Concentraciones de aniones citrato y malato en (A) el sistema radical, (B) el xilema y (C) el exudado radical de las plantas de citrange Carrizo regadas durante dos meses con una solución nutritiva con (+Fe) o sin (-Fe) 20 μM de hierro. Cada valor es la media de 3 repeticiones \pm error estándar. 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 indican diferencias significativas para cada uno de los aniones.

4.2.2.2 Concentración de ácidos orgánicos en el xilema

Los ácidos orgánicos predominantes en el xilema también fueron el cítrico y el málico y la concentración de éstos registrada en la savia extraída del sistema radical de las plantas -Fe fue superior a la extraída de las plantas +Fe (Figura 13B). En este caso, la deficiencia de Fe provocó un aumento del contenido de ácidos cítrico y málico del 71.9% y 37.5%, respectivamente, en comparación con las plantas control.

4.2.2.3 Concentración de ácidos orgánicos en el exudado radical

Las raíces de las plantas deficientes en Fe liberaron mayor cantidad de citrato y malato, en comparación con las plantas +Fe (Figura 13C), cuando se pusieron a exudar en una solución ajustada a pH 7.0. Las tasas de liberación de citrato y malato tras un periodo de incubación de 12 horas fueron, respectivamente, 40.9% y 184.8% mayores en las plantas -Fe que en las plantas +Fe.

4.2.3 Cambios en la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos orgánicos y del transportador mitocondrial

4.2.3.1 Expresión génica

La figura 14 muestra la expresión relativa de los genes que codifican la actividad de algunos enzimas que intervienen en el metabolismo de biosíntesis de ácidos orgánicos, determinada en RNA extraído de las raíces de las plantas de ambos tratamientos. Las plantas -Fe registraron una expresión de los genes PEPC, cMDH, FUM, mMDH y CS del 55.1, 77.3, 63.3, 54.5 y 117.4%, respectivamente, superior a la de las plantas control

+Fe. Sin embargo, la abundancia de transcritos de los genes ACO y ME no cambió significativamente en las plantas cultivadas sin Fe.

Además, la expresión del gen que codifica la actividad de la proteína responsable del transporte de ácidos entre el interior y el exterior de la mitocondria (transportador de ácidos di-tricarboxílicos, DTC) también se indujo significativamente en las raíces del tratamiento -Fe, aumentando hasta el 61.9% en comparación con el control (+Fe).

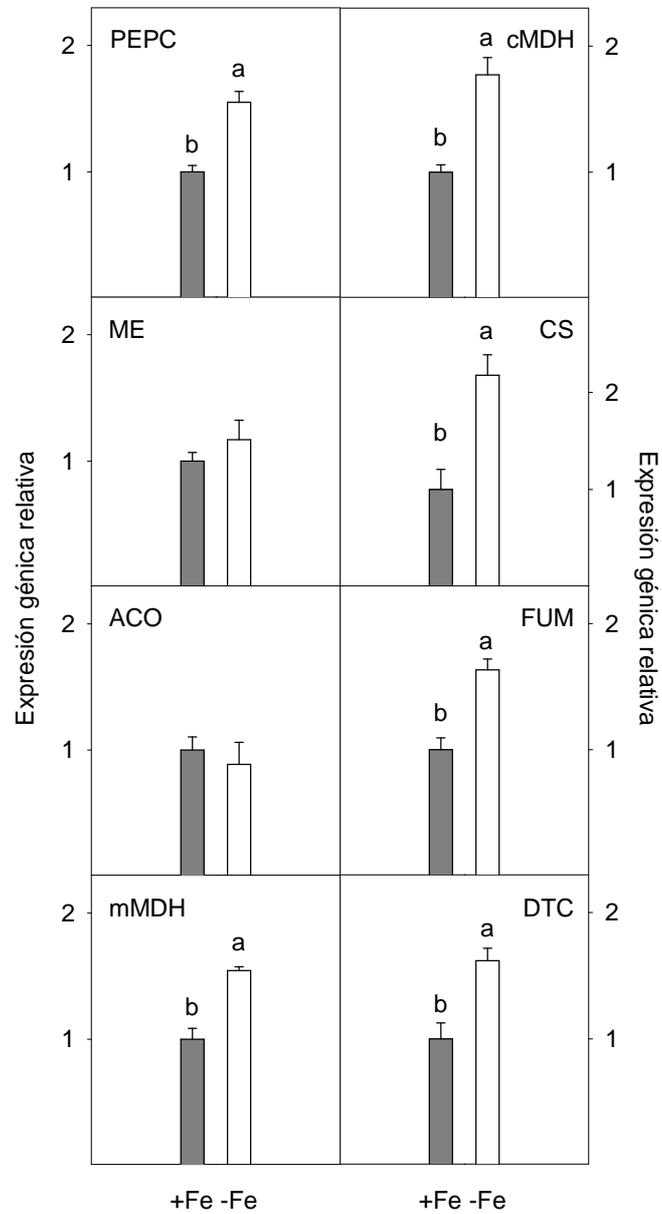


Figura 14. Expresión relativa de los genes que regulan la actividad de las principales enzimas implicadas en la síntesis de ácidos orgánicos y del transportador de ácidos dicarboxílicos mitocondrial (DTC), determinada en raíces de plantas de citrange Carrizo regadas durante dos meses con una solución nutritiva con (+Fe) o sin (-Fe) 20 μ M de hierro. Cada valor es media de tres repeticiones \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 son significativamente diferentes.

4.2.3.2 Actividad enzimática

La tabla 6 muestra los resultados de la medida de las actividades enzimáticas que participan directamente en la biosíntesis de ácidos orgánicos, que se midieron, según el caso, en extractos protéicos de la fracción soluble o mitocondrial de las células de la raíz de las plantas de ambos tratamientos. La deficiencia de Fe dio lugar a una mayor actividad de la enzima PEPC (100.3%) y MDH citosólica (132.6%), así como de las enzimas mitocondriales FUM (158.5%), MDH (117.2%) y CS (53.4%) con respecto a la registrada en las raíces de las plantas control. No obstante, las enzimas ME y ACO no mostraron cambios significativos en su actividad, mientras que la enzima PK redujo significativamente su actividad (30.8%) en ausencia de Fe.

Tabla 6. Análisis de las actividades enzimáticas implicadas en la biosíntesis de ácidos orgánicos de las raíces de las plantas de citrange Carrizo regadas durante dos meses con una solución nutritiva con (+Fe) o sin (-Fe) 20 μ M de hierro.

	Actividad enzimática (nmol NADH mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)	
	+Fe	-Fe
<i>Enzimas citosólicas</i>		
PEPC	68.0 ± 5.8 b	136.2 ± 3.3 a
cMDH	614.5 ± 17.5 b	1429.5 ± 49.5 a
ME	79.4 ± 7.5	68.7 ± 9.1
PK	138.1 ± 5.3 a	95.5 ± 2.3 b
<i>Enzimas mitocondriales</i>		
CS	156.3 ± 21.0 b	239.8 ± 32.3 a
ACO	17.9 ± 4.9	26.1 ± 6.9
FUM	40.2 ± 7.2 b	103.9 ± 28.5 a
mMDH	250.6 ± 19.0 b	544.2 ± 25.8 a

^zCada valor es media de tres repeticiones ± 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 son significativamente diferentes.

4.2.4. Discusión

En este experimento, la deficiencia de Fe redujo severamente la concentración de Fe de las hojas. Este efecto también se acompañó de una marcada reducción de los niveles de clorofila, fluorescencia y parámetros de intercambio gaseoso, como fue observado previamente por otros autores en diferentes plantas (Morales *et al.*, 1991; Abadía *et al.*, 1999; Pestana *et al.*, 2005; Molassiotis *et al.*, 2006; Jelali *et al.*, 2011). Esto confirma que las plantas del patrón citrange Carrizo utilizadas en este experimento desarrollan los síntomas característicos de la deficiencia de Fe (clorosis férrica), cuando son cultivadas durante un periodo prolongado de tiempo utilizando una solución nutritiva con ausencia de Fe.

Para entender mejor el comportamiento de los cítricos cuando están sometidos a condiciones de estrés férrico, es necesario conocer qué mecanismos se activan por la deficiencia de hierro y cómo están regulados. De esta manera, algunos estudios se han centrado en los cambios metabólicos que son inducidos por la clorosis férrica, y que provocan un aumento de las concentraciones de ácidos orgánicos en diferentes partes de la planta como raíces, hojas y xilema (Abadía *et al.*, 2002; Zocchi, 2007 y referencias citadas por estos últimos autores). En este trabajo, las raíces de las plantas cultivadas en ausencia de Fe mostraron mayores niveles de citrato y malato que las raíces con aporte suficiente de dicho elemento (Figura 13), estando este efecto ligado a un aumento de la expresión de los genes que codifican las enzimas que participan en la síntesis de ácidos orgánicos (Figura 14). En consecuencia, las enzimas citosólicas PEPC y cMDH mostraron un incremento significativo de su actividad en condiciones de deficiencia de Fe. La enzima PEPC cataliza la carboxilación del fosfoenolpiruvato a oxalacetato, que puede ser

posteriormente reducido a malato mediante la cMDH (Chollet *et al.*, 1996). Esta estimulación de la enzima PEPC ante la deficiencia de Fe es coincidente con los resultados obtenidos en otras plantas como *Beta vulgaris* (Andaluz *et al.*, 2002), *Pisum sativum* (Jelali *et al.*, 2010b), *Actinidia deliciosa* (Rombolá *et al.*, 2002) y *Cucumis sativus* (De Nisi y Zocchi, 2000). Además, en *Medicago truncatula*, la actividad de PEPCasa fue superior en raíces de plantas deficientes en Fe que en las plantas control, y el gen correspondiente (MtPEPC1) también fue regulado por la deficiencia de Fe (Andaluz *et al.*, 2009). En algunas de estas plantas se observó la inducción de la enzima MDH por la deficiencia de Fe (López-Millán *et al.*, 2009; Jelali *et al.*, 2010a), coincidiendo con el aumento de las concentraciones de malato en las raíces y en el xilema. También se ha descrito que las plantas deficientes en Fe aumentan su capacidad para fijar carbono procedente de bicarbonato, asociada a un aumento de la actividad PEPC con respecto al valor del control, constituyendo una de las principales vías de aporte de compuestos intermediarios del ciclo Krebs o ciclo de los ácidos di-tricarboxílicos (López-Millán *et al.*, 2000). La inducción de esta enzima también se asocia con la tolerancia de distintos genotipos de *Prunus* a la clorosis férrica (Jiménez *et al.*, 2011). Así mismo, es probable que la alcalinización del citoplasma asociado a la extrusión de protones puede causar la activación de la enzima PEPCasa, dando como resultado un aumento de la concentración de ácidos orgánicos para mantener el pH del citoplasma de las células de la raíz (Abadía *et al.*, 2002).

Por otro lado, algunas enzimas mitocondriales que participan en el ciclo de Krebs, pueden sufrir cambios en su actividad en respuesta a la deficiencia de Fe, causando un aumento de las concentraciones de ácidos orgánicos en las raíces (Abadía *et al.*, 2002). Nuestros resultados sugieren

que la biosíntesis de citrato y malato en la mitocondria de las raíces de cítricos debe estar regulada por la deficiencia de Fe, ya que se observó un fuerte aumento de las actividades de los enzimas FUM, mMDH y CS en condiciones deficitarias del elemento, unido a una estimulación de la expresión de los genes que las codifican, en comparación con las raíces de las plantas control. Por el contrario, la actividad de la enzima ACO de la raíz no se vio alterada por la deficiencia de Fe, lo que probablemente contribuye a la acumulación de citrato en las raíces de las plantas -Fe. Otras especies vegetales como tomate (López-Millán *et al.*, 2009), soja (Zocchi *et al.*, 2007), remolacha azucarera (López-Millán *et al.*, 2000), guisante (Jelali *et al.*, 2010a) y kiwi (Rombolá *et al.*, 2002) también registraron un aumento significativo de la concentración de citrato en su sistema radical en respuesta a la deficiencia de Fe. En la mayoría de los casos, este efecto estuvo acompañado de un aumento en las actividades de las enzimas CS y ACO (Zocchi *et al.*, 2007; López-Millán *et al.*, 2000, 2009; Jelali *et al.*, 2010a). Y, se ha propuesto que el aumento de la síntesis de citrato puede estar relacionada con la inducción de la actividad de la enzima CS, mientras que la activación de la enzima ACO podría ser consecuencia de los niveles tan altos de citrato registrados en estas raíces (López-Millán *et al.*, 2009). Por otro lado, la estimulación del ciclo de Krebs en las raíces de cítricos deficientes en Fe parece deberse al aumento de la producción de malato citoplásmico (mediante el aumento de la actividad de las enzimas PEPC y cMDH) más que por la vía del piruvato, ya que se detectó una reducción de la actividad de la enzima PK en condiciones de deficiencia de Fe. La vía utilizada por las enzimas PEPC, cMDH y ME para sintetizar piruvato independientemente de la enzima PK, puede tener un papel esencial en el suministro de este ácido en el ciclo de Krebs, como se demostró en tejidos

no fotosintéticos (Chollet *et al.*, 1996). Sin embargo, el malato citosólico parece tener un papel preferente en la alimentación del ciclo de Krebs en raíces de cítricos deficientes en Fe, especialmente considerando que, en estas condiciones, la actividad ME no se vio afectada. Además, esta hipótesis se apoya en las pruebas que indican que parte del malato generado puede ser transportado al interior de la mitocondria a través de un transportador específico. En este sentido, se observó un aumento significativo de la actividad del gen que codifica el transportador de ácidos di-tricarboxílicos en la mitocondria (DTC) en las raíces de cítricos cultivadas en ausencia de Fe. Esta proteína de transporte, localizada en la doble capa lipídica de la membrana interna de la mitocondria, se encuentra muy extendida en el reino vegetal, donde está altamente conservada. La proteína DTC transporta un amplio espectro de ácidos di- y tri-carboxílicos, y puede aceptar tanto la forma mono-protonada del citrato (H-citrato²⁻) como la forma des-protonada del malato (malato²⁻). Por lo tanto, este transportador puede regular ciertos procesos relacionados con el metabolismo de los ácidos orgánicos, como el transporte de citrato o malato entre el citosol y la mitocondria (Picault *et al.*, 2002).

Además, la deficiencia de hierro provocó un aumento en la concentración de citrato y malato en la savia de las plantas, sugiriendo que una proporción significativa de estos aniones producidos en las raíces son trasvasados al xilema, como ya se observó en otras especies (López-Millán *et al.*, 2009; Rombolá *et al.*, 2002). De hecho, el citrato forma quelatos estables con el hierro en el xilema (citrato-férrico), por lo que este ión desempeña un papel muy importante en el transporte de Fe a larga distancia (Tiffin, 1966a,b) y, recientemente, la proteína (FRD3) ha sido descrita como la responsable de la carga de citrato en el xilema (Durrett *et al.*, 2008).

Por otro lado, es importante destacar que en el presente estudio encontramos que las raíces de las plantas cultivadas en ausencia de Fe exudaban mayor cantidad de citrato y malato que las raíces de las plantas control, coincidiendo con otros informes en los que la deficiencia de Fe aumentó la exudación de ácidos orgánicos (Zocchi *et al.*, 2007; Jelali *et al.*, 2010a). Jones (1998) sugiere que incluso, con bajas tasas de exudación de citrato se consigue la solubilización de cantidades de Fe(III) suficientes como para satisfacer las necesidades de la planta. Teniendo esto en cuenta, nuestros resultados parecen indicar que la función principal de esta mejora en la biosíntesis de citrato en las raíces bajo deficiencia de Fe, es aumentar la disponibilidad de citrato para la translocación de Fe a través del xilema, y, en menor término favorecer la solubilización de ión férrico del medio externo. También es probable que la alcalinización del citoplasma asociado a la extrusión de protones pueda causar la activación de la enzima PEPCasa, provocando un aumento de la concentración de ácidos orgánicos para mantener la homeostasis del pH del citoplasma de las células raíz (Abadía *et al.*, 2002).

En resumen, la deficiencia de Fe provoca la regulación de algunos genes relacionados con el metabolismo de los ácidos orgánicos, mejorando así la actividad de diversas enzimas, como PEPC, cMDH, FUM, mMDH y CS. Estos efectos tiene como resultado el aumento en la biosíntesis de citrato y malato en las plantas cultivadas en ausencia de Fe, y, posteriormente, el aumento de la liberación de estos compuestos al medio externo y al xilema, lo que facilita el proceso de adquisición de Fe debido a la mejora de la solubilización, reducción y transporte del elemento.

4.3 EFECTOS DEL BICARBONATO SOBRE LOS COMPONENTES GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE ADQUISICIÓN DEL HIERRO

El experimento 3 permitió caracterizar la regulación del sistema de absorción de Fe en las raíces de un patrón de cítricos bajo condiciones de clorosis férrica inducida por el bicarbonato.

4.3.1. Desarrollo de la clorosis y crecimiento de las plantas

En este caso se eligió el patrón FA-5, considerado moderadamente tolerante a la clorosis férrica (Castle *et al.*, 2009). Las plantas se cultivaron durante un tiempo con una solución nutritiva completa adicionada de bicarbonato. Al cabo de seis semanas de tratamiento con 10 mM HCO_3^- , las hojas de las nuevas brotaciones de las plantas regadas con bicarbonato (tratamiento +FeBic), manifestaron síntomas de clorosis férrica. En concreto, el limbo de las hojas de las plantas +FeBic adquirió una tonalidad de un verde más pálido -ligeramente amarillento- que el de las plantas control (+Fe). En la tabla 7 se presentan los valores promedio de la biomasa de la parte aérea y el sistema radical de las plantas de ambos tratamientos, así como la concentración de Fe total, el enriquecimiento en ^{57}Fe y el contenido de ^{57}Fe de dichas fracciones. Las plantas cultivadas en el medio +FeBic registraron un descenso del 22.7% en su biomasa en comparación con las plantas +Fe. Comparando las fracciones principales de la planta, se observa que el tratamiento con bicarbonato produjo un efecto marcado sobre la materia seca de la parte aérea, que fue reducida en un 30.8% con respecto al control. Sin embargo, este efecto del bicarbonato como limitante del crecimiento fue menos pronunciado en el sistema radical que no mostró

diferencias significativas entre ambos tratamientos. En consecuencia, la proporción parte aérea/sistema radical disminuyó en un 35% en las plantas tratadas con HCO_3^- .

Tabla 7. Biomasa, concentración de hierro total, ^{57}Fe en exceso y contenido de ^{57}Fe en la parte aérea y el sistema radical de las plantas del patrón FA-5 regadas durante 6 semanas con solución nutritiva (20 μM FeEDDHA) adicionada con 0 ó 10 mM NaHCO_3 (+Fe y +FeBic, respectivamente). El marcado de las plantas con ^{57}Fe se realizó regando las plantas durante 4 días con una solución nutritiva en que la fuente de fertilizante férrico se substituyó por 20 μM $^{57}\text{FeEDDHA}$.

Tratamiento/ Órgano	Biomasa (g PS)		Concentración Fe total ($\mu\text{g g}^{-1}$ PS)		^{57}Fe exceso (%)		Contenido ^{57}Fe total (μg)	
	PA	SR	PA	SR	PA	SR	PA	SR
+Fe	0.52 a	0.14	79.1 a	210.1 a	4.18 a	1.29 b	1.72 a	0.38
+FeBic	0.36 b	0.15	32.1 b	120.2 b	3.39 b	1.92 a	0.39 b	0.34

^ZCada valor es media de tres repeticiones \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 son significativamente diferentes.

4.3.2 Absorción de hierro y su distribución en la planta

Las plantas cultivadas en presencia de HCO_3^- mostraron una reducción en la concentración de hierro tanto en la parte aérea como en el sistema radical en comparación con el tratamiento control. La disminución en la concentración de Fe de la parte aérea y del sistema radical de las plantas +FeBic fue de 59.4% y 42.8%, respectivamente (Tabla 7).

La tabla 7 también muestra el enriquecimiento (o exceso) del Fe total del material vegetal en el isótopo ^{57}Fe , expresado como %; y, el contenido total de ^{57}Fe , expresado como microgramos de ^{57}Fe absorbidos por las distintas fracciones de la planta tras un periodo de marcado de 4 días con una solución nutritiva en que la fuente de fertilizante férrico se substituyó por 20 μM $^{57}\text{FeEDDHA}$. El ^{57}Fe total absorbido en toda la planta fue un 65.2% inferior en las plantas tratadas con bicarbonato (+FeBic) que en las plantas

control. La figura 15 representa la distribución relativa del ^{57}Fe absorbido por la raíz y la parte aérea de las plantas de ambos tratamientos, como el porcentaje de contribución de cada fracción de la planta al contenido total de ^{57}Fe de la planta. El aporte de bicarbonato provocó una mayor acumulación de ^{57}Fe en las raíces (46.5%) que en los controles (18.1%).

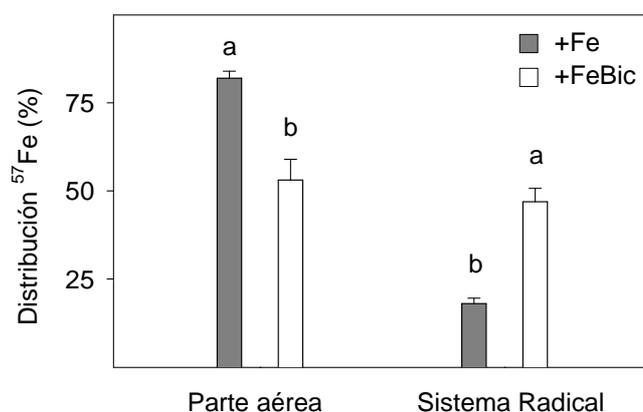


Figura 15. Distribución relativa de ^{57}Fe (%) absorbido por plantas de FA-5 regadas durante 6 semanas con solución nutritiva (20 μM FeEDDHA) y adicionada con 0 ó 10 mM NaHCO_3 (+Fe y +FeBic, respectivamente). El marcado de las plantas con ^{57}Fe se realizó regando las plantas durante 4 días con una solución nutritiva en que la fuente de fertilizante férrico se sustituyó por 20 μM $^{57}\text{FeEDDHA}$. Cada valor es media de tres repeticiones \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 son significativamente diferentes.

La figura 16 representa las curvas de flujo de liberación del ión ferroso (Fe^{2+}) de las raíces de las plantas +Fe y +FeBic. En ambos casos hubo una fase de liberación rápida de hierro de las raíces seguido de una fase más lenta. Se asume que el hierro liberado en la primera fase representa el hierro procedente del espacio libre de la raíz. Las curvas de liberación de ión ferroso se ajustaron a una curva que alcanzó el máximo de liberación en torno a los 20 minutos de incubación en un medio con ditionita, por tanto este periodo se consideró adecuado para la determinación del hierro

extracelular en las raíces. En estas condiciones, las raíces del tratamiento +FeBic liberaron más cantidad de Fe^{2+} (25.2%) que las raíces control (Tabla 8). Por otra parte, la cantidad de hierro liberado del apoplasto de las plantas +FeBic representa el 57.8% del contenido de hierro total del sistema radical (apoplásmico e intracelular), mientras que este porcentaje fue del 31.3% en las plantas control. La concentración restante (intracelular) en las raíces después de la extracción del hierro apoplásmico (por el método descrito por Bienfait *et al.*, 1985) fue de 2.4 veces mayor en los controles que en las plantas +FeBic (Tabla 8).

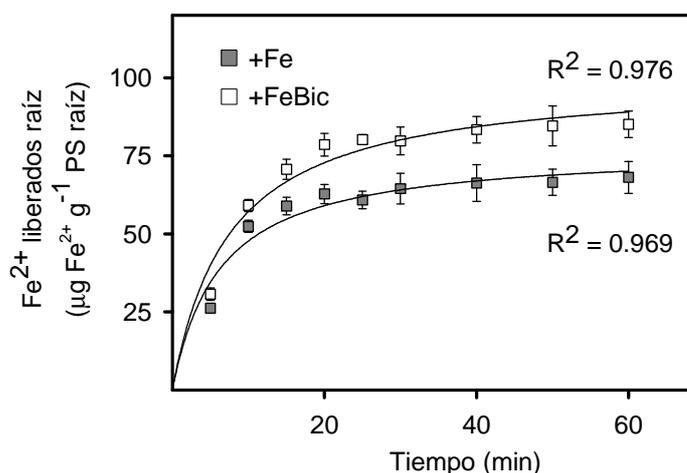


Figura 16. Liberación de Fe del espacio libre de la célula (en $\mu\text{g g}^{-1}$ PS raíz) de las raíces del genotipo FA-5, medido como los iones ferrosos excretados durante un período de incubación de 20 minutos en presencia de Na_2SO_4 según el método descrito por Bienfait *et al.* (1985). Las plantas fueron regadas durante 6 semanas con solución nutritiva ($20 \mu\text{M}$ FeEDDHA) adicionada con 0 ó 10 mM NaHCO_3 (+Fe y +FeBic, respectivamente). La solución nutritiva de incubación no fue renovada durante este ensayo. Cada valor es media de tres repeticiones \pm error estándar. Para la comparación de medias se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y LSD test al 95% de nivel de confianza.

La absorción de ^{57}Fe en la células de la raíz se calculó con los datos de contenido de Fe intracelular y el enriquecimiento en ^{57}Fe de esta fracción (Tabla 8). De manera que, la tasa de absorción de ^{57}Fe de las raíces, medida

tras un período corto de marcado (20 min) fue un 64.4% inferior en las plantas +FeBic que en las plantas +Fe (Figura 17C).

Tabla 8. Hierro apoplásmico liberado y contenido de hierro intracelular en las raíces de plantas de FA-5 regadas durante 6 semanas con solución nutritiva (20 μM FeEDDHA) adicionada con 0 ó 10 mM NaHCO_3 (+Fe y +FeBic, respectivamente). ⁽¹⁾Concentración de hierro Fe^{2+} liberado procedente del espacio libre de la raíz después de 20 minutos de incubación en una solución con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (Bienfait *et al.*, 1985), ⁽²⁾Concentración de Fe remanente en las raíces después de la aplicación del método de Bienfait; $\Delta^{57}\text{Fe}$ = porcentaje de átomos de ^{57}Fe en exceso tras marcado durante 20 minutos con 100 μM $^{57}\text{FeEDDHA}$.

Tratamiento	Concentración Fe total		$\Delta^{57}\text{Fe}$ (%)
	($\mu\text{g g}^{-1}$ PS raíz)		
	Apoplasto ⁽¹⁾	Intracelular ⁽²⁾	
+Fe	62.8 b	137.5 a	1.44
+FeBic	78.6 a	57.2 b	1.24

^zCada valor es media de tres repeticiones \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 columna son significativamente diferentes.

4.3.3 Estado del aparato fotosintético

Las plantas cultivadas en la solución con bicarbonato (+FeBic) presentaron una reducción significativa del 33.9% en el contenido de clorofilas en comparación con las plantas control (+Fe), medido con el índice de SPAD (Tabla 9). El tratamiento +FeBic provocó una reducción del 9.6% en el rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (F_v/F_m) y del 41.2% en la relación entre la fluorescencia variable e inicial (F_v/F_o), en comparación con +Fe. Además, el tratamiento +FeBic también inhibió un 27.1% la actividad fotosintética o tasa de asimilación neta de CO_2 (A_{max}) de las hojas.

Tabla 9. Índice SPAD, parámetros de fluorescencia (Fv/Fm y Fv/Fo) y tasa de asimilación neta de CO₂ (A_{CO2}, μmol m⁻² s⁻¹) medido en hojas jóvenes totalmente expandidas de plantas de FA-5 regadas durante 6 semanas con solución nutritiva (20 μM FeEDDHA) adicionada con 0 ó 10 mM NaHCO₃ (+Fe y +FeBic, respectivamente).

	+Fe	+FeBic
SPAD	66.18 a	43.77 b
Fv/Fm	0.83 a	0.75 b
Fv/Fo	4.73 a	2.78 b
A _{CO2} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	9.09 a	6.63 b

^ZCada valor es media de seis plantas ± 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 columna son significativamente diferentes.

4.3.4 Expresión génica y actividades enzimáticas

Las figuras 17 y 18 muestran la respuesta de los componentes del sistema de absorción de Fe en las raíces de las plantas de ambos tratamientos, mediante el análisis de la expresión de los genes que los regulan y de sus respectivas actividades enzimáticas.

El tratamiento con bicarbonato afectó de diferente manera a la expresión de los genes que codifican la enzima H⁺-ATPasa (HA1 y HA2). Las plantas +FeBic mostraron un incremento de la expresión del gen HA1 del 19.1% con respecto al control, mientras que la del gen HA2 no se vio afectada. Además, la actividad enzimática observada en las plantas +FeBic fue un 39.3% superior que en las plantas control.

Con respecto a la expresión de los genes que controlan la actividad de la enzima FC-R, el tratamiento con bicarbonato indujo la expresión de los dos genes FRO identificados en cítricos. En concreto, se observó una inducción de la expresión de FRO1 y FRO2 en las plantas +FeBic del 72.1% y 144.6%, respectivamente, cuando se comparó con las plantas +Fe. Estos resultados son concordantes con el incremento del 133.9% de la actividad FC-R observado en las plantas del primer tratamiento.

El tratamiento con bicarbonato aumentó en 4.6 veces la abundancia de transcritos del gen IRT1, mientras que no afectó significativamente al gen IRT2.

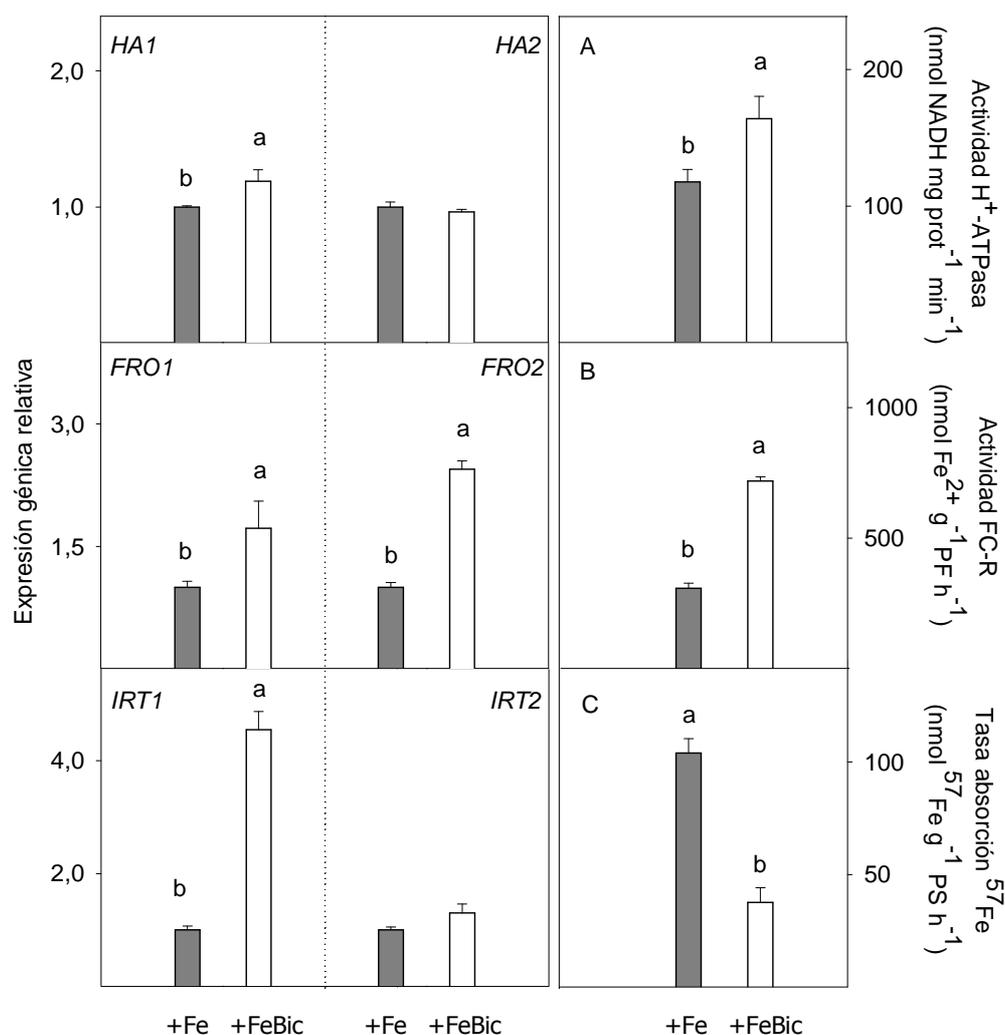


Figura 17. Expresión relativa de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1 e IRT2 medida mediante RT-PCR en tiempo real; (A) actividad H⁺-ATPasa; (B) actividad FC-R; y (C) tasa de absorción de ⁵⁷Fe, en raíces del patrón FA-5. Las plantas fueron regadas durante 6 semanas con solución nutritiva (20 μM FeEDDHA) adicionada con 0 ó 10 mM NaHCO₃ (+Fe y +FeBic, respectivamente). Cada valor es media de tres repeticiones ± 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 son significativamente diferentes.

Y por último, la abundancia de transcritos del gen que codifica la enzima PEPCasa (PEPC1) en las raíces de las plantas tratadas con bicarbonato fue 54.8% superior que en las raíces de las plantas +Fe (Figura 18A). Además, el tratamiento +FeBic experimentó un aumento de 3.1 veces en la actividad enzimática respecto al control (Figura 18B).

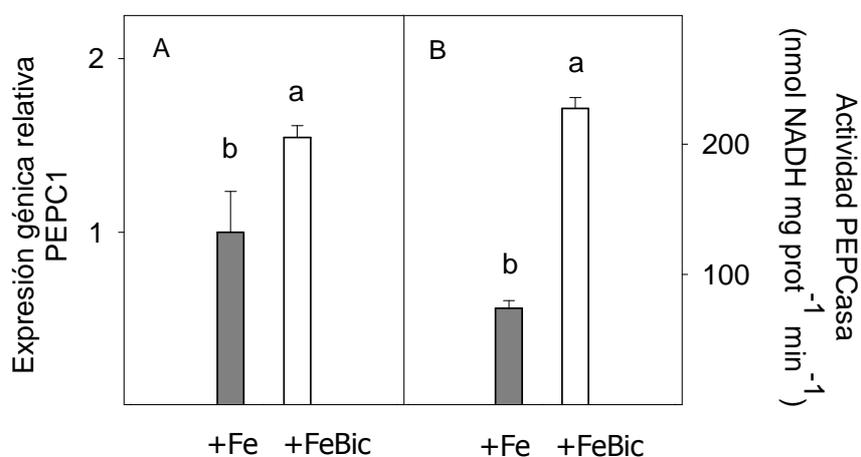


Figura 18. (A) Expresión relativa del gen PEPC1 medida mediante RT-PCR en tiempo real y (B) actividad de la enzima PEPCasa, en raíces del patrón FA-5 regadas durante 6 semanas con solución nutritiva con 20 μM FeEDDHA y con 0 ó 10 mM NaHCO_3 (+Fe y +FeBic, respectivamente). Cada valor es media de tres repeticiones \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 son significativamente diferentes.

4.3.5 Liberación de H^+

La tabla 10 muestra la capacidad de variación del pH de las plantas pretratadas durante 6 semanas con bicarbonato y su control, medida tras la inmersión de las plantas durante 24 horas en un medio de incubación carente de bicarbonato (MI). En estas condiciones, las plantas pretratadas con bicarbonato (+FeBic) presentaron la mayor bajada del pH de la solución de incubación (cerca de 1.5 unidades). Este valor fue menor (alrededor de 0.7 unidades) para las plantas que no se pretrataron con HCO_3^- (+Fe).

Además, la incorporación de HCO_3^- en los medios de incubación (MI+Bic) dio lugar a una caída del pH más atenuada, probablemente debido a la capacidad amortiguadora del ión bicarbonato. En este caso, la reducción de pH registrada en ambos tratamientos no superó las 0.5 unidades, no apareciendo diferencias significativas entre los pre-tratamientos.

Tabla 10. Acidificación del medio de las raíces de las plantas de FA-5 pre-tratadas durante 6 semanas con solución nutritiva (20 μM FeEDDHA) adicionada con 0 ó 10 mM NaHCO_3 (+Fe y +FeBic, respectivamente). Los valores de pH se midieron después de 24 h de incubación en un medio adicionado o no con 10 mM de NaHCO_3 (MI+Bic y MI, respectivamente). La solución nutritiva de incubación no fue renovada durante en este ensayo.

Pre-tratamiento	Medio de incubación	Lectura pH	
		Inicial	24 h
+Fe	MI	8.5	7.78 b
	MI+Bic	8.5	8.24 a
+FeBic	MI	8.5	6.93 c
	MI+Bic	8.5	8.01 a

^zCada valor es media de tres repeticiones \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 columna son significativamente diferentes.

4.3.6 Discusión

Las plantas del patrón FA-5, en las que se indujo la clorosis férrica mediante adición de bicarbonato en la solución nutritiva, manifestaron síntomas visibles de deficiencia de Fe, principalmente, en las hojas más jóvenes brotadas durante el periodo de tratamiento. Además, la adición de NaHCO_3 en la solución de riego provocó un efecto depresivo sobre algunos parámetros fisiológicos como el crecimiento de las plantas, la concentración de hierro, el contenido de clorofila de las hojas y la tasa de fotosíntesis. De esta manera, el tratamiento con bicarbonato redujo el crecimiento de la parte aérea (expresado como peso seco), mientras que la biomasa de las raíces no

se vio afectada por el tratamiento. Este resultado también ha sido descrito en especies como *Olea europaea* (De la Guardia y Alcántara, 2002) y *Arabidopsis thaliana* (Msilini *et al.*, 2009), donde parece que ambas fracciones manifiestan diferente sensibilidad a la presencia de bicarbonato.

Las plantas +FeBic mostraron una disminución significativa de la concentración de Fe tanto en la parte aérea como en las raíces cuando se compararon con las plantas control, lo que indica que el HCO_3^- inhibe la absorción de Fe, como fue confirmado con los ensayos de marcado con ^{57}Fe . Además, los resultados de distribución de ^{57}Fe en la planta indican una limitación del transporte de hierro desde las raíces a la parte aérea en las plantas tratadas +FeBic, de acuerdo a lo descrito en otras especies arbóreas como olivo (De la Guardia y Alcántara, 2002) y melocotonero (Gharsalli y Hajji, 2002). Este efecto ha sido atribuido a la inmovilización de hierro dentro de apoplasto radicular, probablemente debido a un pH apoplásmico elevado, que restringe la translocación de Fe a los brotes (Mengel, 1994; Kosegarten y Koiro, 2001; Zribi y Gharsalli, 2002; Mengel *et al.*, 1994). Esta posibilidad fue confirmada por el estudio de los niveles de Fe del apoplasto radicular, liberado siguiendo el método descrito por Bienfait *et al.* (1985), que se considera la técnica más adecuada para la determinación del hierro acumulado en el espacio libre de las raíces. En nuestro experimento, el hierro acumulado en el apoplasto de las raíces de FA-5 tratadas con bicarbonato fue 25.2% superior que en los controles (Tabla 8).

La inducción de la deficiencia de Fe, mediante incorporación de bicarbonato a la solución nutritiva, provocó la alteración del estado del aparato fotosintético de las plantas. En concreto, nuestros resultados mostraron una disminución en el contenido total de clorofila de las hojas de

las plantas de FA-5 expuestas al tratamiento con bicarbonato, de acuerdo con estudios previos que muestran que el bicarbonato provoca una reducción de la concentración de clorofilas en hojas de plantas de melocotonero (Molassiotis *et al.*, 2006), vid (Ksouri *et al.*, 2007), *A. thaliana* (Msilini *et al.*, 2009) y guisante (Jelali *et al.*, 2011). Además, Pestana *et al.* (2001) encontraron una disminución en la concentración de clorofila en las hojas de cítricos regados con solución nutritiva completa y en presencia de CaCO_3 , alcanzando valores similares a los exhibidos por plantas cultivadas utilizando una solución nutritiva carente de fertilizante férrico. El efecto de los tratamientos que mejoran la deficiencia de Fe en el contenido de clorofila se ha atribuido al papel del Fe en la formación de algunos precursores de la biosíntesis de clorofila (Marschner, 1995).

La presencia de bicarbonato también causó una disminución del rendimiento cuántico máximo del PS II (F_v/F_m) y de la relación entre fluorescencia variable e inicial (F_v/F_o) de las hojas cloróticas. Algunos informes también han mostrado una disminución de estos dos parámetros relacionados con la fluorescencia de la clorofila, en plantas cultivadas sin Fe de remolacha azucarera (Morales *et al.*, 1991), melocotonero (Nedunchezian *et al.*, 1997) y cítricos (Pestana *et al.*, 2005), así como en plantas tratadas con HCO_3^- de guisante (Jelali *et al.*, 2011) y patrones de melocotonero (Molassiotis *et al.*, 2006). Por último, el tratamiento +FeBic indujo una disminución significativa en la tasa de asimilación neta de CO_2 de las hojas de FA-5, en comparación con las hojas de las plantas +Fe, como parece ocurrir en algunos portainjertos de melocotonero (Molassiotis *et al.*, 2006).

Las alteraciones fisiológicas descritas anteriormente parecen deberse, principalmente, a una deficiencia de Fe inducida por el

bicarbonato; ya que los resultados presentados hasta ahora indican claramente que este ión dificulta la absorción de hierro y su transporte. Además, estos efectos son similares a los observados en otras plantas afectadas por clorosis férrica (Abadía *et al.*, 1999; Pestana *et al.*, 2005; Molassiotis *et al.*, 2006; Jelali *et al.*, 2011). Por lo tanto, el siguiente paso fue estudiar los mecanismos por los cuales el HCO_3^- limita la absorción de Fe en las raíces de los cítricos.

En este sentido, se procedió al análisis de la expresión de los genes que regulan el sistema de absorción de Fe descrito en los experimentos anteriores. De este modo, el análisis mediante RT-PCR indicó una mayor expresión de los genes FRO1, FRO2 e IRT1 en las raíces de las plantas de FA-5 tratadas con bicarbonato, en comparación con las raíces del control. Puesto que está ampliamente aceptada la estimulación de estos genes en condiciones de deficiencia de Fe (Robinson *et al.*, 1999; Connolly *et al.*, 2002; Vert *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004), la activación de éstos en presencia de bicarbonato demostraría la inducción de la clorosis férrica en las raíces de FA-5 tratadas con este ión. Por el contrario, Lucena *et al.* (2007) informaron que el tratamiento con bicarbonato a una concentración elevada (10-30 mM) de plantas deficientes en Fe, de guisante, tomate, pepino y *Arabidopsis*, inhibió el aumento de la expresión de los respectivos genes FRO e IRT1, probablemente provocado por la alteración de la expresión de ciertos factores de transcripción presentes en los centros de reacción eficientes del Fe (FER). Sin embargo, estos autores indicaron que el efecto del bicarbonato en los genes que codifican el transportador de hierro y la enzima quelato férrico reductasa depende de la concentración del ión y de la especie vegetal. Por otra parte, la aparente discrepancia con los resultados de nuestro experimento, puede deberse a la utilización, en su

caso, de plantas cultivadas sin Fe, frente a nuestro experimento que se realizó en plantas cultivadas con Fe.

Como era de esperar, el bicarbonato estimuló la expresión de los genes FRO en las raíces de FA-5 que provocó el aumento de la actividad de la enzima FC-R, efecto mediado por la deficiencia inducida de hierro, que incrementa en gran medida la actividad del enzima en las raíces de los cítricos (Manthey *et al.*, 1994), así como en otras plantas (Yi y Guerinot, 1996; Susín *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1999). Sin embargo, parece que existe cierta controversia en la bibliografía sobre el efecto del bicarbonato en la FC-R. En algunos informes, el tratamiento de plantas deficientes en Fe con bicarbonato no mejora la capacidad de reducción de Fe(III) de las raíces, como parece ocurrir en pepino, guisante, tomate y *Arabidopsis* (Romera *et al.*, 1997; Lucena *et al.*, 2007). Sin embargo, otros estudios en peral (Donnini *et al.*, 2009), vid (Ksouri *et al.*, 2007), cacahuete (Zuo *et al.*, 2007), *Arabidopsis* (Msilini *et al.*, 2009) y guisante (Jelali *et al.*, 2010b) muestran resultados concordantes con los nuestros; de manera que, las plantas +FeBic aumentan la actividad FC-R de sus raíces, pero sin alcanzar los niveles detectados en las plantas cultivadas sin Fe. Finalmente, otros informes en plantas de cítricos y melocotonero a los que se suministró HCO_3^- en concentración elevada recogen una reducción de dicha actividad FC-R (Chouliaras *et al.*, 2004a; Molassiotis *et al.*, 2006). No obstante, estos mismos autores, trabajando con portainjertos de cítricos, observaron que tanto las raíces de las plantas cultivadas con una solución nutritiva sin Fe, con un bajo suministro de Fe o con adición de HCO_3^- manifestaron un aumento de la capacidad de reducción, en comparación con la actividad encontrada en las raíces de las plantas con un suministro adecuado de Fe (Chouliaras *et al.*, 2004b).

Por otro lado, la incorporación de bicarbonato en la solución de riego aumentó la expresión del gen HA1 en las raíces de FA-5, que regula la actividad de la principal enzima responsable de la capacidad acidificadora de las raíces, pero no afectó a la expresión del gen HA2. En un trabajo anterior, Santi *et al.* (2005) informaron que el gen CsHA1 de pepino está regulado por el estado nutritivo de la planta, mientras que el gen CsHA2 no respondió a la deficiencia de Fe. Por otra parte, Lucena *et al.* (2007) observaron que la actividad del gen CsHA2 en plantas de pepino deficientes en Fe no se vio alterada por la adición de bicarbonato o de Fe, mientras la actividad del gen CsHA1 se redujo con ambos tratamientos.

Las raíces de FA-5 inducidas a la clorosis mediante adición de bicarbonato, mostraron un aumento de la actividad de la enzima H⁺-ATPasa, probablemente debido a la mejora de la expresión del gen HA1. De acuerdo con esto, el ión HCO₃⁻ aumentó la actividad del enzima en raíces de guisante cultivadas con Fe (Jelali *et al.*, 2010b) y de peral, pero no en algunos patrones de membrillero (Donnini *et al.*, 2009). También, el tratamiento con bicarbonato de una variedad de vid tolerante a la clorosis férrica, indujo una acidificación leve del medio asociada a una mayor actividad H⁺-ATPasa, en relación con la encontrada en las raíces del control (+Fe); sin embargo, estos efectos no se detectaron en una variedad sensible (Ksouri *et al.*, 2007). El aumento de la extrusión de protones mediante la activación de una determinada enzima H⁺-ATPasa localizada en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz es una respuesta característica de las plantas de la estrategia I a la baja disponibilidad de Fe en el medio (Rabotti y Zocchi, 1994; Rabotti *et al.*, 1995; Dell'Orto *et al.*, 2000b), y por lo tanto, el bicarbonato puede actuar indirectamente en este proceso induciendo la deficiencia de Fe en la planta.

Nuestros resultados también mostraron que la actividad de la enzima PEPCasa fue mayor en las raíces de las plantas de FA-5 tratadas con bicarbonato que en las plantas control, y el correspondiente gen PEPC1 también está regulado por el ión HCO_3^- . Este efecto podría estar controlado por la deficiencia de Fe inducida por el HCO_3^- , ya que la actividad de la enzima PEPCasa también aumenta en las raíces de las plantas cultivadas con ausencia total de Fe (De Nisi y Zocchi, 2000; Rabotti *et al.*, 1995; López-Millán *et al.*, 2000, 2009; Andaluz *et al.*, 2002; Rombolá *et al.*, 2002; Jelali *et al.*, 2010b). Una tendencia similar también se observó en plantas de peral (Donnini *et al.*, 2009) y de *A. thaliana* (Msilini *et al.*, 2009) tratadas con bicarbonato. Por el contrario, en ciertos estudios realizados en plantas +FeBic de membrillero (Donnini *et al.*, 2009) y guisante (Jelali *et al.*, 2010b), la actividad PEPCasa se mantuvo cerca de los valores de las plantas control o incluso disminuyó. La causa más probable de la activación de la PEPCasa es la alcalinización del citoplasma debido el tratamiento con bicarbonato, que provoca el aumento de la concentración de ácidos orgánicos para mantener el pH del citoplasma de las células de la raíz (Abadía *et al.*, 2002).

Todos estos resultados, parecen indicar que el bicarbonato activa los mecanismos de respuesta a la deficiencia de hierro en las raíces del patrón FA-5, y esto debería aumentar la absorción de Fe, en lugar de inhibirla como parece detectarse en nuestro experimento. La respuesta a esta controversia puede encontrarse en el efecto amortiguador que provoca el bicarbonato en la capacidad de acidificación del medio de las raíces de las plantas.

Así, de acuerdo con el ensayo de acidificación (Tabla 10), cuando las plantas de ambos pre-tratamientos (+Fe y +FeBic) se introducen en una

solución de incubación sin bicarbonato, se observa una disminución en el pH de dicho medio, aunque este efecto fue menor en las plantas no pre-tratadas con HCO_3^- . Sin embargo, la adición de bicarbonato al medio de incubación reduce la capacidad de acidificación de los dos grupos de plantas. Esto, probablemente, se debe a que el ion HCO_3^- bloquea los H^+ liberados por la bomba de protones de las membranas celulares (H^+ -ATPasa), impidiendo, por tanto la acidificación del medio. Así, estos resultados confirman que el mecanismo de acción del ión bicarbonato sobre el sistema estudiado en este experimento debe ser a través de su poder de amortiguación. En apoyo a esta conclusión, algunos estudios realizados en patrones de melocotonero tratados con HCO_3^- tampoco manifestaron extrusión de H^+ , indicando que este ión podría estar inhibiendo el proceso de acidificación de la rizosfera (Molassiotis *et al.*, 2006). También se han encontrado resultados similares en *A. thaliana* (Msilini *et al.*, 2009) y guisante (Jelali *et al.*, 2010b). Entonces, como es ampliamente conocido, la bajada del pH rizosférico en condiciones de deficiencia de Fe, puede aumentar la movilización de las formas férricas poco solubles presentes en el suelo (Rabotti *et al.*, 1995), aunque la reducción de la solubilidad del hierro como consecuencia de la interrupción del proceso de acidificación por el bicarbonato no puede considerarse como una causa de la inhibición de la absorción de Fe en plantas que crecen en soluciones nutritivas en las que el Fe se aplicó en forma de quelato soluble. Lo más probable es que el bicarbonato presente en el apoplasto radicular neutraliza los protones bombeados fuera del citosol, impidiendo la generación del gradiente electroquímico transmembrana que constituye la fuerza motriz para el transporte del ion ferroso (Zocchi y Cocucci, 1990). Por otra parte, el aumento del pH apoplásmico inducido por el bicarbonato deprime la

actividad FC-R, que es dependiente del pH; y por lo tanto la absorción de Fe^{2+} en el simplasto (Mengel, 1994; Mengel *et al.*, 1994). Además, en presencia de iones de HCO_3^- , encontramos grandes cantidades de Fe atrapadas en el apoplasto de las células de la raíz, probablemente debido a un pH apoplásmico alto que restringe la translocación de Fe (Kosegarten y Koyro, 2001).

De los datos obtenidos en este trabajo, podemos concluir que el bicarbonato impide la capacidad de acidificación del medio de las raíces del patrón FA-5, lo que dificulta la absorción de Fe^{2+} . Como consecuencia, la deficiencia de Fe inducida por este ión aumenta la expresión de algunos genes relacionados con el sistema de adquisición de Fe, como IRT1, FRO1, FRO2, HA1 y PEPC1 y la actividad de las enzimas correspondientes (FC-R, H^+ -ATPasa y PEPCasa).

Finalmente, parece que a nivel de regulación molecular, el bicarbonato puede actuar de dos formas diferentes, dependiendo del estado del Fe. En algunas plantas con deficiencia de Fe (plantas -Fe), el bicarbonato bloquea la expresión de los genes implicados en las respuestas a la baja disponibilidad de Fe (Lucena *et al.*, 2007); mientras que en plantas que tienen un suministro normal de Fe (plantas +Fe), la adición de bicarbonato impide la absorción de Fe y esta inducción de la deficiencia de Fe activa algunos de los genes relacionados con el sistema de adquisición de Fe, como ocurre en los cítricos. En cualquier caso, la alteración de la expresión de estos genes conduce a cambios en los correspondientes procesos fisiológicos que parece que dependen del genotipo, la concentración de bicarbonato y, probablemente de la sensibilidad genotipo al ión HCO_3^- .

4.4 INFLUENCIA DEL BICARBONATO EN LA MOVILIZACIÓN DE LAS RESERVAS DE HIERRO DE LOS COTILEDONES EN UN MEDIO DE CULTIVO CARENTE DE Fe

El experimento 4 permitió determinar el efecto del bicarbonato sobre la translocación del Fe desde los cotiledones y la respuesta de las raíces cuando las semillas germinan en un medio carente de Fe.

4.4.1 Crecimiento de las plántulas y distribución del hierro

Tres semanas después de la siembra de las semillas en los tubos de cultivo “*in vitro*”, las plántulas alcanzaron una longitud total de entre 15 y 20 cm medidos desde el ápice de la raíz hasta el extremo del tallo. El peso fresco de las plántulas crecidas en el medio -FeBic fue similar al de aquellas cultivadas en el medio -Fe (Tabla 11). El efecto del bicarbonato sobre el crecimiento de las plántulas fue mucho más marcado en la fracción del tallo, que redujo un 30.5% su peso fresco con respecto al control; mientras que en la raíz no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos. En consecuencia, el ratio tallo/raíz disminuyó de 2.3 en las plántulas control a 1.3 en las plántulas tratadas con HCO_3^- .

Resultados y Discusión

Tabla 11. Biomasa (peso fresco) de las distintas fracciones (tallo, raíz y cotiledones) de las plántulas de *Citrus limon* cultivadas “*in vitro*” durante 21 días en medio de cultivo sin hierro, adicionado con 0 ó 10 mM NaHCO₃ (-Fe y -FeBic, respectivamente).

Medio de cultivo	Peso fresco (mg)	
	-Fe	-FeBic
Tallo	357.50 a	248.65 b
Raíz	154.28	196.13
Cotiledones	177.26	184.21

^ZCada valor es media de diez plántulas independientes por tratamiento. 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.

A los 21 días de cultivo en los medios descritos anteriormente, se detectó una reducción de la concentración de hierro en el tallo y la raíz de las plántulas que germinaron en el medio con presencia de bicarbonato (Tabla 12). El descenso en la concentración de hierro de estas fracciones de las plantas -FeBic fue de 25.8 y 32.7%, respectivamente. Sin embargo, el contenido de Fe de los cotiledones de las plántulas tratadas con HCO₃⁻ fue 69.8% superior al de las plantas control.

Posteriormente, las plántulas cultivadas en el medio deficiente en Fe y suplementado con bicarbonato (-FeBic) fueron transferidas durante 15 días a otro medio de cultivo con presencia de 20 μM FeEDDHA, y suplementado o no con bicarbonato (+FeBic y +Fe, respectivamente). En estas condiciones, las plantas de ambos tratamientos registraron un aumento de la concentración de Fe tanto en el tallo como en la raíz, aunque fue más atenuado en las plantas +FeBic (Tabla 12). Así, la concentración de Fe en el tallo y la raíz de las plántulas +FeBic registró un aumento de 33.3 y 262.7%, respectivamente, con respecto a los niveles de las plantas -FeBic. Cuando se

comparó este parámetro entre las plantas +Fe y -FeBic el aumento fue de 166.2 y 392.0%, respectivamente.

Tabla 12. (A) Concentración de hierro en las distintas fracciones (tallo, raíz y cotiledones) de plántulas de *Citrus limon* cultivadas "in vitro" durante 21 días en medio de cultivo sin hierro, adicionado con 0 ó 10 mM NaHCO₃ (-Fe y -FeBic, respectivamente). (B) Concentración de hierro en tallos y raíces tras el trasplante de plántulas pre-tratadas con -FeBic durante 15 días en un medio de cultivo que contenía 20 µM FeEDDHA y adicionado con 0 ó 10 mM NaHCO₃ (+Fe y +FeBic, respectivamente). Para los controles se utilizó otro grupo de plántulas transplantadas a un medio -FeBic.

Medio	Concentración de Fe (µg g ⁻¹ PS)				
	(A) 21 d después de siembra		(B) 15 d después de trasplante		
	-Fe	-FeBic	-FeBic	+Fe	+FeBic
Tallo	32.64 b	24.21 c	23.72 c	63.09 a	31.63 b
Raíz	47.57 c	32.02 d	30.30 d	149.14 a	109.93 b
Cotiledones	46.53 b	79.01 a	-	-	-

^ZCada valor es media de tres grupos independientes de diez plantas por tratamiento. 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.

4.4.2 Expresión génica

La figura 19 muestra la respuesta de los genes relacionados con el sistema de absorción de Fe, estrategia I, en las raíces de las plántulas germinadas "in vitro" y cultivadas durante 21 días en condiciones de deficiencia de Fe y con suplemento de ión bicarbonato. El medio que contenía bicarbonato incrementó la acumulación de transcritos de los genes de la enzima reductasa férrica FRO1 (3.4 veces) y FRO2 (2.2 veces) con respecto a las plántulas del tratamiento -Fe. También, la expresión del gen HA1 que codifica la enzima H⁺-ATPasa aumentó un 90% en las plántulas del medio -FeBic cuando se comparó con la de las plántulas -Fe. Por el contrario, la actividad de HA2 no se vio afectada por el tratamiento con bicarbonato. Por otra parte, la abundancia de transcritos del gen IRT1 que

Resultados y Discusión

regula el transportador férrico fue estimulada por el tratamiento -FeBic en 2.1 veces con relación al tratamiento -Fe, mientras que la del gen IRT2 no fue significativamente afectada por los tratamientos. La abundancia de transcritos del gen PEPC1 que regula la enzima PEPC en las plantas cultivadas en el medio -FeBic fue un 70.8% superior que en las plántulas -Fe. Finalmente, la expresión del gen NRAMP3 que codifica para un transportador de Fe que actúa en la vacuola de los cotiledones fue reducida en un 59.0% en presencia de bicarbonato (-FeBic).

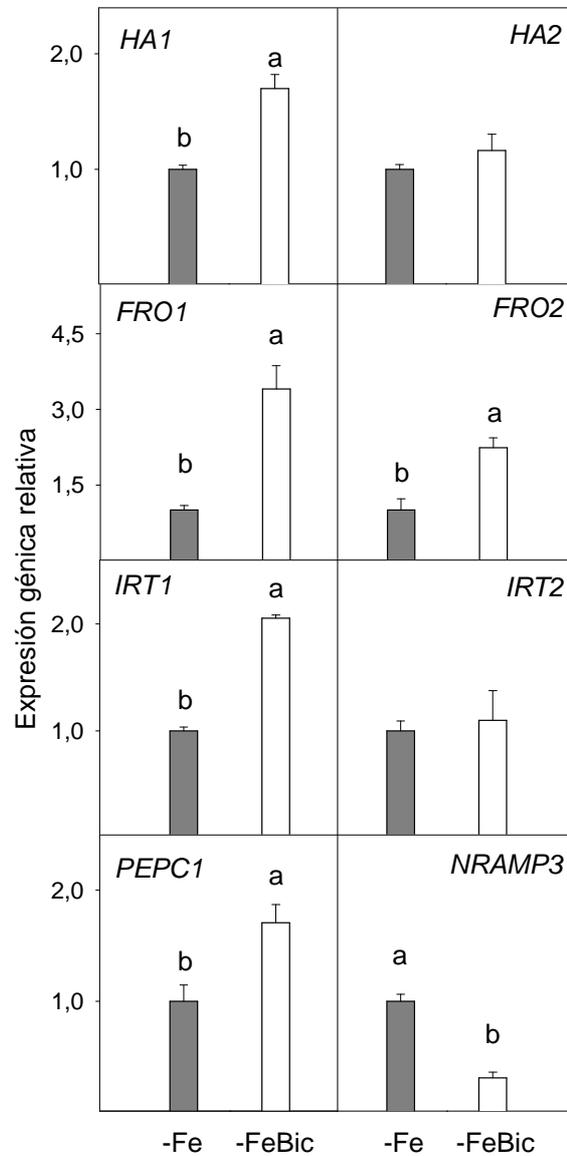


Figura 19. Expresión relativa de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1, IRT2 y PEPC1 en raíces y NRAMP3 en cotiledones medida mediante RT-PCR en tiempo real en plántulas de *Citrus limon* cultivadas "in vitro" durante 21 días en medio de cultivo sin hierro, adicionado con 0 ó 10 mM NaHCO₃ (-Fe y -FeBic, respectivamente). Cada valor es media de tres repeticiones independientes \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 son significativamente diferentes.

Este mismo estudio también se realizó en dos grupos de plántulas del tratamiento -FeBic tras cultivarlas durante 15 días en dos medios de cultivo en los que se adicionó fertilizante férrico (20 μ M Fe) y a uno de ellos también se le incorporó 10 mM NaHCO₃ (tratamientos +Fe y +FeBic, respectivamente). La figura 20 muestra la respuesta de los genes descritos anteriormente ante estos tratamientos. La transferencia de las plántulas a un medio con presencia de Fe redujo la expresión de dichos genes a niveles inferiores a los observados durante el pretratamiento -FeBic, aunque esta reducción fue más acusada en las raíces de las plántulas que se cultivaron en el medio sin bicarbonato (tratamiento +Fe). De esta manera, considerando como “valor relativo de 1” la abundancia de transcritos determinada para cada gen en las plántulas al final del pretratamiento -FeBic, la actividad de los genes FRO1, FRO2, HA1, IRT1 y PEPC1 en las plantas transplantadas al medio +Fe se redujo en un 80.8, 46.3, 62.0, 76.8 y 84.2%, respectivamente, y un 59.8, 20.4, 42.1, 21.3 y 52.6%, respectivamente, en las plantas transplantadas al medio +FeBic. Por el contrario, la expresión de los genes HA2 e IRT2 permaneció inalterada por los tratamientos.

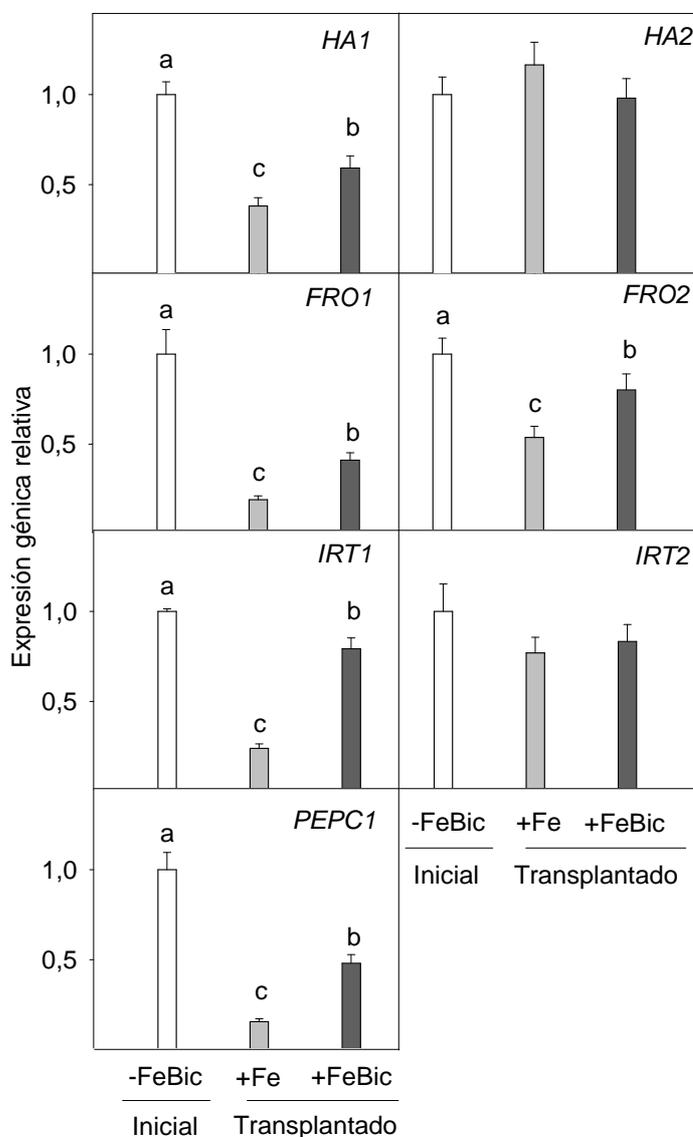


Figura 20. Expresión relativa de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1, IRT2 y PEPC1 medida mediante RT-PCR en tiempo real en puntas de raíz de plántulas de *Citrus limon* pre-cultivadas durante 21 días en un medio de cultivo "in vitro" sin hierro y suplementado con 10 mM NaHCO₃ (-FeBic); y luego trasplantadas durante 15 días a un medio de cultivo que contenía 20 μM FeEDDHA adicionado con 0 ó 10 mM NaHCO₃ (+Fe y +FeBic, respectivamente). Para los controles se utilizó otro grupo de plántulas trasplantadas a un medio -FeBic. Cada valor es media de tres repeticiones ± 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 son significativamente diferentes.

4.4.3 Actividades enzimáticas

La tabla 13 muestra los valores de la actividad de las enzimas relacionadas con los genes anteriormente descritos (FC-R, H⁺-ATPasa y PEPCasa) medidos en puntas de la raíz de las plántulas de los tratamientos -Fe y -FeBic; así como tras la transferencia de las plantas -FeBic a condiciones +Fe y +FeBic. La adición de NaHCO₃ al medio (tratamiento -FeBic) provocó un aumento de la actividad FC-R (69.5%), H⁺-ATPasa (84.7%) y PEPCasa (97.4%), respectivamente, en relación a la actividad registrada en las plantas -Fe. Después, cuando las plántulas -FeBic fueron transferidas a los medios que contenían hierro la actividad de estas enzimas disminuyó drásticamente en las raíces de las plantas +Fe, y de forma menos intensa en las plantas +FeBic.

Tabla 13. (A) Actividad de las enzimas quelato férrico reductasa (FC-R), protón ATP-asa (H⁺-ATPasa) y Fosfoenolpiruvato Carboxilasa (PEPCasa) medida en raíces de plántulas de *Citrus limon* cultivadas durante 21 días en medio de cultivo "in vitro" sin hierro y con 0 ó 10 mM NaHCO₃ (-Fe y -FeBic, respectivamente). (B) Mismas actividades tras el trasplante durante 15 días de plántulas pre-tratadas -FeBic a un medio de cultivo que contenía 20 µM FeEDDHA y con 0 ó 10 mM NaHCO₃ (+Fe y +FeBic, respectivamente). Para los controles se utilizó otro grupo de plántulas transplantadas a un medio -FeBic.

Medio de cultivo	Actividad enzimática				
	(A) 21 d después de siembra		(B) 15 d después de trasplante		
	-Fe	-FeBic	-FeBic	+Fe	+FeBic
FC-R (nmol Fe ²⁺ reducido g ⁻¹ PF h ⁻¹)	489.5 c	829.5 a	896.7 a	238.2 d	619.1 b
H ⁺ -ATPasa (nmol NADH mg ⁻¹ prot min ⁻¹)	160.7 b	296.8 a	320.1 a	95.5 d	137.7 c
PEPCasa (nmol NADH mg ⁻¹ prot min ⁻¹)	132.1 b	260.7 a	281.4 a	71.4 d	101.6 c

^Z Los valores son medias de repeticiones por tratamiento. Los valores con diferente letra indican diferencias significativas a P ≤ 0,05 con la prueba de rangos múltiples de LSD.

4.4.4 Discusión

La adición de bicarbonato a un medio de cultivo carente de hierro tiene un efecto depresivo sobre el desarrollo de las plántulas de cítricos que se desarrollan bajo estas condiciones. La presencia del ión HCO_3^- provoca la reducción del crecimiento del tallo de las plántulas (expresado como peso fresco), mientras que parece que la raíz permanece insensible al tratamiento. En este sentido, informes anteriores mostraron que el bicarbonato afectó más al crecimiento del tallo en algunas especies como guisante (White y Robson, 1990), olivo (De la Guardia y Alcántara, 2002), melocotonero y almendro (Gharsalli y Hajji, 2002) y *Arabidopsis thaliana* (Msilini *et al.*, 2009), que al crecimiento del sistema radical. Así mismo, la incorporación de HCO_3^- al medio de cultivo produjo una disminución significativa en la concentración de Fe en el tallo y la raíz de las plántulas cultivadas en el medio -FeBic, cuando se las comparó con la concentración registrada en las plantas que se desarrollaron en el medio sin presencia de HCO_3^- . Por el contrario, la concentración de Fe en los cotiledones fue superior en las plantas -FeBic que en las -Fe. Como en ambos casos, las semillas fueron germinadas en medios de cultivo carentes de Fe, y por tanto no existía aporte de Fe externo en el sistema, las diferencias en el contenido de hierro en los diferentes órganos observadas entre ambos tratamientos debe ser consecuencia de la translocación del Fe procedente de los cotiledones, que constituye la única fuente de Fe del sistema. Por lo tanto, en condiciones de ausencia de Fe en el medio, el bicarbonato efectivamente impide la translocación del hierro de los cotiledones a la raíz y el tallo, lo cual produce una bajada de la concentración de Fe en estos órganos y un aumento de ésta en los cotiledones, en comparación con lo ocurrido en las plántulas cultivadas en un medio sin Fe ni bicarbonato. Algunos informes anteriores

demonstraron que la exposición de plantas de soja a un tratamiento con bicarbonato provocó la reducción del transporte de Fe desde el sistema radical hacia los órganos de la parte aérea (Fleming *et al.*, 1984). También se observaron resultados similares en especies arbóreas como olivo (De la Guardia y Alcántara, 2002) y melocotonero (Gharsalli y Hajji, 2002). Este efecto ha sido atribuido a la inmovilización del hierro dentro del apoplasto radicular, probablemente, debido a un pH apoplásmico elevado, que restringe la translocación del Fe hacia las distintas brotaciones de la planta (Mengel, 1994; Mengel *et al.*, 1994; Kosegarten y Koiro, 2001; Zribi y Gharsalli, 2002). En nuestro experimento, la adición de bicarbonato al medio de cultivo carente de Fe dio lugar a una significativa alcalinización del apoplasto de los cotiledones, que a su vez, podría ser la causa de la inhibición de la movilización del hierro y su translocación desde los cotiledones. La capacidad del floema para transportar hierro en forma de complejo y la cantidad de hierro transportado por esta vía hacia las raíces, parecen suficientes para provocar ciertas reacciones en el sistema radical para mejorar la eficiencia en la absorción del elemento (Maas *et al.*, 1988). En este sentido, parece posible que el bicarbonato inhiba este transporte floemático desde los cotiledones, probablemente debido al efecto de alcalinización.

Cuando las plántulas cultivadas en el medio -FeBic fueron trasplantadas durante 15 días a otro medio que contenía hierro y suplementado o no con NaHCO₃ (+FeBic o +Fe, respectivamente), dichas plántulas incrementaron marcadamente su contenido de hierro en el tallo y la raíz, aunque en menor medida en las que fueron transferidas al medio de cultivo con presencia de ión HCO₃⁻. Esto sugiere que el bicarbonato también reduce la absorción directa de Fe por las plantas de cítricos cultivadas "*in*

vitro". En este sentido, se observaron efectos similares en otras especies como *Lupinus* y guisante (White y Robson, 1990), olivo y melocotonero (De la Guardia y Alcántara, 2002).

El análisis de la expresión de los genes relacionados con la Estrategia I de absorción de Fe (en concreto de FRO1, FRO2, HA1 e IRT1), determinada mediante PCR en tiempo real, indicó una activación de dichos componentes en las raíces de las plantas deficientes en Fe y tratadas con bicarbonato, cuando se compararon con la registrada por las plantas cultivadas en un medio sin HCO_3^- . Por el contrario, Lucena *et al.* (2007) describieron que el bicarbonato inhibía la expresión de FRO, HA1 e IRT1 en plantas deficientes en Fe de varias especies de guisante, tomate, pepino y *Arabidopsis*, indicando que este efecto podría estar mediado por la alteración de la eficiencia de ciertos factores de transcripción (proteínas FER). La discrepancia con los resultados de nuestro experimento puede ser debida a las condiciones del material vegetal utilizado en ambos ensayos, ya que Lucena *et al.* (2007) trabajaron con raíces de plantas cultivadas en condiciones de ausencia total de Fe; mientras que nosotros utilizamos raíces de plántulas que no pueden ser consideradas como un órgano totalmente deficiente en Fe, ya que recibían un suministro de este elemento que procedía de los cotiledones, pero que seguramente fue bloqueada por el bicarbonato.

Como era de esperar, la inducción de la expresión de los genes FRO y HA1 en la raíz de las plántulas de cítricos tratadas con bicarbonato, también supuso un aumento de las actividades de los enzimas FC-R y H^+ -ATPasa. Sin embargo, existe gran controversia en la bibliografía sobre los efectos del bicarbonato en estas enzimas. En algunos informes, el tratamiento de las plantas deficientes en Fe con bicarbonato inhibió la

capacidad de reducción de Fe(III) del sistema radical, como ocurre en pepino, guisante, tomate y *Arabidopsis* (Romera *et al.*, 1997; Lucena *et al.*, 2007). Sin embargo, más de acuerdo con nuestros datos, los resultados de otros estudios en membrillero (Cinelli, 1995), peral (Donnini *et al.*, 2009), cacahuete (Zuo *et al.*, 2007), vid (Ksouri *et al.*, 2007), *Arabidopsis* (Msilini *et al.*, 2009) y guisante (Jelali *et al.*, 2010b) mostraron que el tratamiento de plantas cultivadas en condiciones de suministro de hierro y bicarbonato (+FeBic) aumentaron la actividad FC-R de las raíces, pero sin alcanzar los niveles detectados en plantas cultivadas en condiciones de ausencia total de Fe en el medio de cultivo. Finalmente, otros estudios indicaron que una elevada concentración de HCO_3^- en la solución nutritiva puede reducir la actividad FC-R en árboles +FeBic de cítricos y melocotonero (Chouliaras *et al.*, 2004a; Molassiotis *et al.*, 2006). Así mismo, el tratamiento con HCO_3^- provocó una mayor actividad de la enzima H^+ -ATPasa en raíces de plantas +FeBic de guisante (Jelali *et al.*, 2010b) y de peral, pero no en varios genotipos de membrillero (Donnini *et al.*, 2009). Además, un estudio realizado sobre dos variedades de vid cultivadas con Fe explicaba que la variedad tolerante a la clorosis férrica mostraba una mejora de la actividad de este enzima en presencia de bicarbonato, mientras que, este efecto no fue detectado en la variedad sensible (Ksouri *et al.*, 2007).

Nuestros resultados también mostraron que la actividad de la enzima PEPCasa fue mayor en las raíces de las plántulas cultivadas en el medio -FeBic que en las plántulas -Fe. Una tendencia similar fue observada en raíces de plantas cultivadas en condiciones +FeBic de peral (Donnini *et al.*, 2009) y *A. thaliana* (Msilini *et al.*, 2009). Por el contrario, la actividad PEPCasa permaneció inalterada en el mismo estudio realizado en plantas de membrillero (Donnini *et al.*, 2009) y de guisante (Jelali *et al.*, 2010b).

Considerados todos estos resultados en su conjunto, el bicarbonato dificulta la translocación del ión Fe desde los cotiledones hacia el embrión en desarrollo, lo cual provoca la reducción del nivel de Fe en el tallo y la raíz de las plántulas. Entonces, el bicarbonato induce la deficiencia de hierro y provoca la activación de los mecanismos de respuesta de la estrategia I en la raíz de las plántulas de cítricos para mejorar la adquisición de Fe, como son el aumento de la expresión de algunos de los genes relacionados con el sistema de absorción (FRO1, FRO2, HA1, PEPC1, IRT1) y de la actividad de las enzimas reguladas por éstos (FC-R, H⁺-ATPasa y PEPCasa) y del transportador férrico. La posibilidad de que el bicarbonato actúe indirectamente a través de la reducción de los niveles de hierro en la raíz, se apoya en los siguientes hechos: i) el tratamiento con bicarbonato provoca menor concentración de Fe en la raíz del tratamiento -Fe, y ii) la transferencia de las plántulas precultivadas con -FeBic a un medio con presencia de hierro (+Fe), ya sea con o sin bicarbonato provoca, en ambos casos, una reducción de los efectos genéticos y metabólicos de este ión. Además, está ampliamente aceptado el hecho de que la deficiencia de Fe estimula la expresión de los genes anteriormente estudiados en las raíces de muchas plantas, así como la actividad de las enzimas codificadas por ellos (Abadía *et al.*, 2002; Kim y Guerinot, 2007, y referencias citadas por estos últimos autores).

Como consecuencia de ello, parece que, a nivel de expresión génica, el bicarbonato puede actuar de forma diferente dependiendo del estado del Fe. Así, en plantas deficientes en Fe, el bicarbonato bloquea la expresión de los genes implicados en las respuestas a la baja disponibilidad de Fe (Lucena *et al.*, 2007); mientras que, en presencia de una fuente de Fe -como son los cotiledones- el bicarbonato puede inhibir el transporte de Fe; y la

deficiencia de Fe inducida por el ión HCO_3^- en este segundo caso, activa algunos de los genes relacionados con el sistema de adquisición de Fe, como ocurre en las raíces de las plántulas de cítricos. Por tanto, la alteración de la expresión de los genes conlleva respuestas metabólicas relacionadas con la deficiencia de hierro.

La inhibición por el bicarbonato del transporte del Fe desde los cotiledones a la plántula en desarrollo observada en *C. limon*, podría deberse a la inmovilización del Fe en las vacuolas de aquellos. En este sentido, se ha propuesto que la vacuola puede constituir un compartimento fundamental para el almacenamiento del hierro en las semillas, de forma que durante el inicio del desarrollo de la plántula, se movilizaría el Fe acumulado en este orgánulo, antes de que sea posible la absorción de este elemento del medio externo (Palmer y Guerinot, 2009). Lanquar *et al.* (2005) indicaron que la movilización de las reservas vacuolares de Fe mediante los transportadores NRAMP3 y NRAMP4 es un proceso crucial para la germinación de las semillas y el desarrollo temprano de las plántulas de *Arabidopsis* en ausencia de hierro externo.

Los genes AtNRAMP3 y AtNRAMP4 que codifican para ambos transportadores muestran un alto grado de homología y su expresión se induce en condiciones de deficiencia de hierro (Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005). Además, las proteínas transportadoras NRAMP3 y NRAMP4 se localizan en el tonoplasto, lo que apoya su función en la movilización de los depósitos vacuolares de Fe hacia el citosol (Thomine *et al.*, 2003; Lanquar *et al.*, 2005). Por consiguiente, la inhibición de la actividad del gen NRAMP3 por el HCO_3^- en cotiledones de *C. limon* impediría la liberación del hierro desde el interior de la vacuola al reducir la actividad de su transportador a través del tonoplasto y, consecuentemente,

su retranslocación a otros órganos. En ausencia de Fe externo, los anteriores efectos, provocarían la disminución de los niveles de Fe en la plántula en desarrollo e inducirían en la raíz las respuestas génicas y fisiológicas a la deficiencia de Fe anteriormente descritas. En apoyo de esto, Thomine *et al.* (2003), reportaron que en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban el gen AtNRAMP3, los niveles de expresión de los genes IRT1 y FRO2 eran más bajos, así como la actividad FC-R.

4.5 EFECTO DE LOS IONES Zn^{2+} Y Mn^{2+} SOBRE LOS COMPONENTES GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE ADQUISICIÓN DEL HIERRO

Este experimento permitió estudiar la influencia de niveles elevados y deficitarios de Zn y Mn sobre el sistema de absorción de Fe en plantas de cítricos.

4.5.1 Concentración de Fe y Zn en el sistema radical y la parte aérea de las plántulas germinadas en medio de cultivo con o sin Zn

La figura 21 muestra la concentración de los iones hierro (Fe) y zinc (Zn) en la parte aérea y en el sistema radical de las plántulas del experimento 5. Las plantas cultivadas bajo condiciones de ausencia de Fe registraron los valores más bajos de concentración de este elemento. En concreto, esta reducción fue de en torno al 60% en ambas fracciones de las plantas -Fe0Zn en relación con la analizada en el tratamiento +Fe0Zn. La adición de Zn al medio de cultivo, provocó una disminución de la concentración de Fe, en las plantas de los tratamientos +Fe. Así, las plantas +Fe100Zn presentaron una reducción en los niveles de concentración de Fe en la parte aérea y el sistema radical del 27.2 y 53.8%, respectivamente, en comparación con las plantas +Fe0Zn. Es de destacar que la concentración de Fe de la parte aérea de las plantas +Fe100Zn se redujo hasta niveles similares a los de las plantas deficientes. Por otro lado, la concentración de Fe de las plantas cultivadas en un medio deficiente en Fe y con presencia de Zn (-Fe100Zn) no presentó diferencias significativas con la de su control -Fe0Zn.

En cuanto a los niveles de Zn, las plantas cultivadas en los medios de cultivo 0Zn, ya fuera en presencia o en ausencia de Fe, no mostraron diferencias significativas en la concentración del elemento (Figura 21). Sin embargo, al analizar este mismo parámetro en las plantas cultivadas en los medio de cultivo con presencia de 100 μM Zn, los dos tratamientos registraron un incremento notable de la concentración de este elemento en ambas fracciones de la planta. No obstante, se detectaron diferencias en la concentración de Zn del sistema radical de ambos tratamientos, de modo que las plantas deficientes en Fe (-Fe100Zn) alcanzaron una concentración de Zn en las raíces 1.6 veces mayor que en las plantas tratadas con Fe (+Fe100Zn).

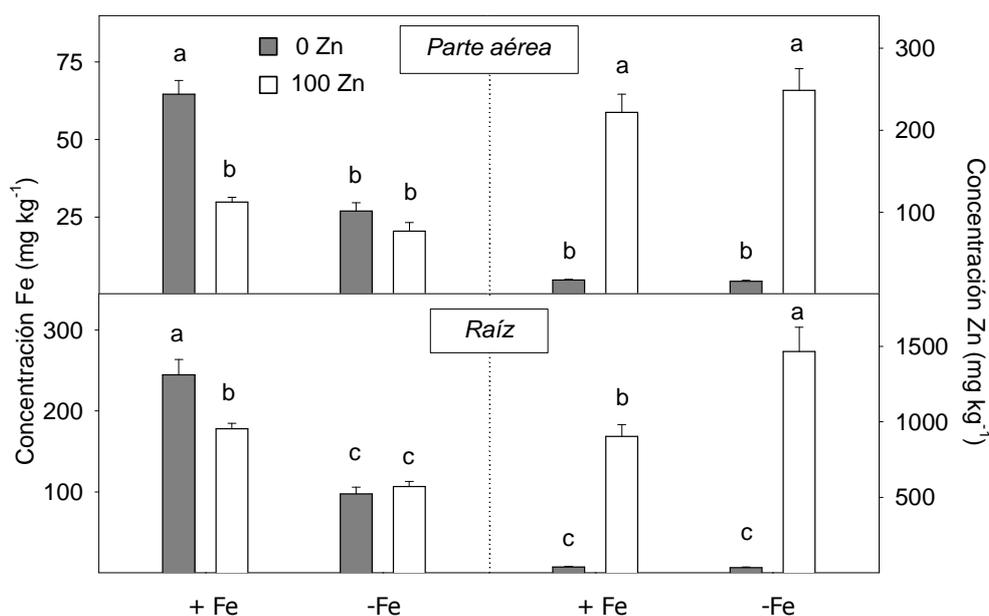


Figura 21. Concentración de hierro y zinc en la parte aérea y el sistema radical de plántulas del patrón naranjo amargo cultivadas “*in vitro*” durante 1 mes en un medio de cultivo compuesto por solución nutritiva con 0 ó 20 μM FeEDDHA (-Fe y +Fe, respectivamente) y suplementada con 0 ó 100 μM ZnSO₄ (0 Zn y 100 Zn, respectivamente). Cada valor es media de tres repeticiones \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 son significativamente diferentes.

4.5.2 Expresión génica en condiciones con o sin Zn

La figura 22 muestra el análisis de la expresión de los genes HA, FRO e IRT, que regulan la actividad de las enzimas H⁺-ATPasa y quelato férrico reductasa y el transportador férrico, respectivamente, determinado a partir del ARN total extraído del sistema radical de las plántulas de los distintos medios de cultivo.

En primer lugar, en lo que respecta a los genes que regulan las H⁺-ATPasas responsables de la capacidad de acidificación de las raíces, el número de transcritos del gen AH1 fue significativamente mayor en las plantas deficientes en Fe, en comparación con el registrado en las plantas cultivadas en presencia de Fe. En ausencia de Zn²⁺, el aumento de la actividad de HA1 en las plantas deficientes en Fe fue casi del doble que en las plantas a las que se adicionó Fe (+Fe). Además, en las plantas +Fe, su expresión se vio también incrementada por la incorporación de 100 µM Zn al medio de cultivo. Por otro lado, el nivel de expresión del gen HA2 fue similar en todos los tratamientos.

En cuanto a la regulación génica del enzima FC-R, el gen FRO1 no respondió a ningún tratamiento, mientras que la expresión del gen FRO2 fue inducida con niveles bajos de hierro. En concreto, en condiciones de ausencia de Zn, la deficiencia de Fe estimuló un 82.2% la expresión del gen FRO2. Además, la adición de Zn aumentó significativamente el número de transcritos de FRO2 en ambos tratamientos (3.1 y 2.4 veces, en las plantas +Fe100Zn y -Fe100Zn, respectivamente) en comparación con sus controles sin Zn.

En ausencia de Zn, el gen IRT1 que codifica la expresión del transportador férrico, aumentó su actividad en las plantas deficientes en Fe respecto a las nutridas con Fe (1.9 veces en las plantas -Fe0Zn en

comparación con las +Fe0Zn). Las plantas cultivadas en medio suplementado con 100 μ M Zn, aumentaron la expresión del gen IRT1 en ausencia y presencia de Fe. Sin embargo, la adición de Zn provocó un aumento más acusado en las plantas +Fe que en las plantas -Fe (10.6 y 4.0 veces, respectivamente). Por otro lado, el número de transcritos del gen IRT2 no se vio afectado ni por la ausencia de Fe ni como consecuencia de la adición de Zn.

Finalmente, la expresión del gen NRAMP3 que codifica para un transportador de iones metálicos localizado en la vacuola, fue inhibido en torno a un 80% en los medios que contenían Fe (+Fe0Zn y +Fe100Zn) con respecto al medio que no contenía ambos microelementos. Además la adición de Zn (100 μ M) al medio carente de Fe (-Fe100Zn) produjo una reducción de la actividad de NRAMP3 de un 54.0% respecto al control (-Fe0Zn).

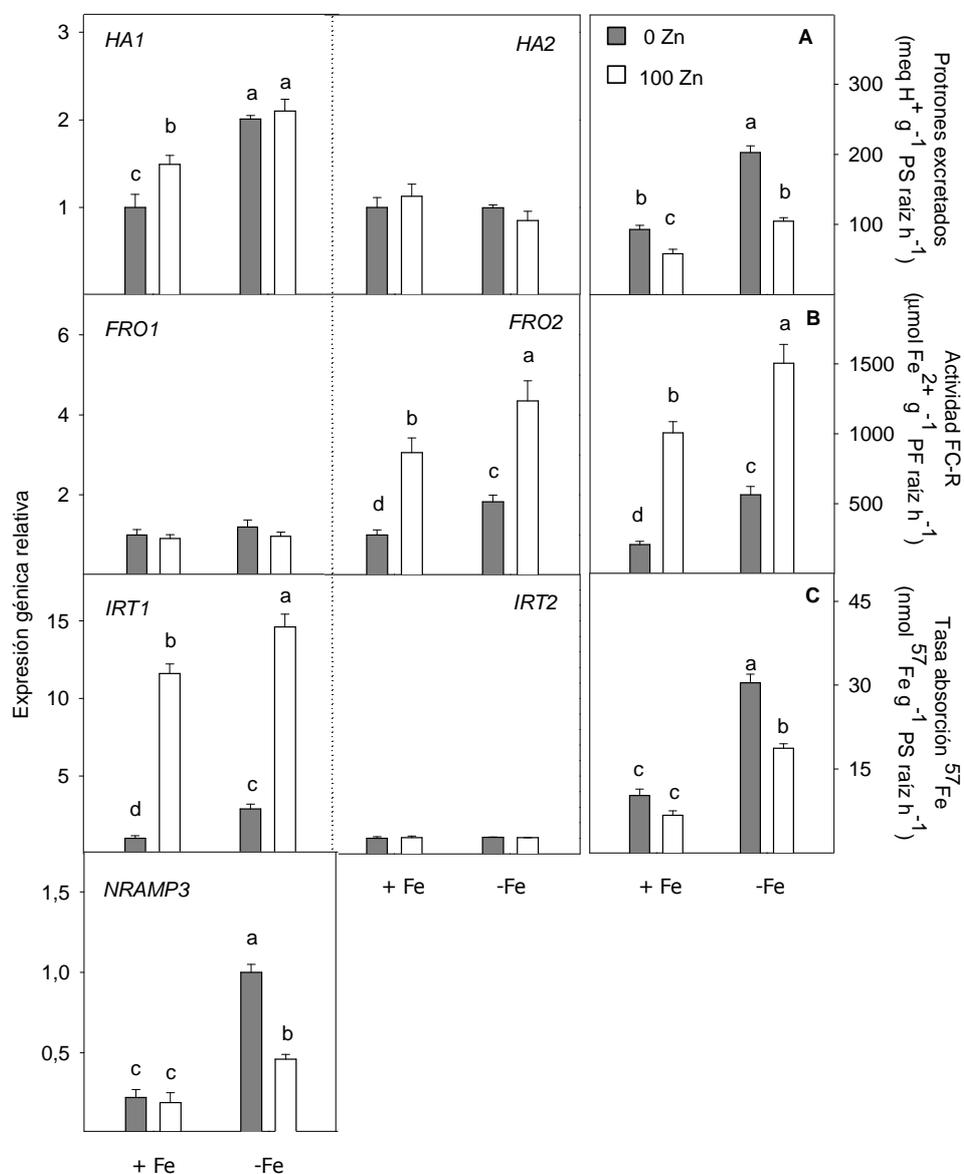


Figura 22. Expresión relativa de los genes HA1, HA2, FRO1, FRO2, IRT1, IRT2 y NRAMP3 medida mediante RT-PCR en tiempo real, (A) liberación de protones, (B) actividad FC-R; y (C) tasa de absorción de ^{57}Fe , determinadas en raíces de plántulas del patrón naranjo amargo cultivadas durante 1 mes en un medio de cultivo “*in vitro*” compuesto por solución nutritiva con 0 ó 20 μM FeEDDHA (-Fe y +Fe, respectivamente) y suplementada con 0 ó 100 μM ZnSO_4 (0 Zn y 100 Zn, respectivamente). Cada valor es media de tres repeticiones \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 son significativamente diferentes.

4.5.3 Acidificación del medio externo en condiciones con o sin Zn

Los resultados de la figura 22A indican que tanto la deficiencia de Fe como la de Zn incrementaron la capacidad de liberar protones al medio externo. Las raíces de las plantas -Fe0Zn fueron las que mostraron máxima estimulación en la capacidad para liberar protones al medio externo, con aumentos del 118.3%, 111.0% y 247.1% con relación a las plantas +Fe0Zn, -Fe100Zn y +Fe100Zn, respectivamente. Por tanto, la incorporación de Zn al medio de cultivo redujo la extrusión de protones en ambos tratamientos. Sin embargo, esta bajada fue más acusada en las plantas deficientes en Fe (48.4%) que en las plantas cultivadas en presencia de Fe (37.3%). De esta manera, la cantidad de protones excretados al cabo de 24 horas por las plantas del tratamiento -Fe100Zn alcanzó niveles similares a los liberados por las plantas +Fe0Zn, mientras que las plantas +Fe100Zn registraron la menor tasa de liberación de protones.

4.5.4 Actividad FC-R en condiciones con o sin Zn

Como complemento al estudio molecular, también se analizó la actividad del enzima encargado de la reducción del ion férrico (FC-R). Los resultados muestran que la capacidad de reducción de Fe^{3+} fue mayor en las raíces de las plántulas cultivadas en ausencia de Fe. La presencia de Zn incrementó la actividad FC-R tanto en presencia como en ausencia de Fe (Figura 22B). Por consiguiente, las plántulas -Fe100Zn fueron las que registraron la actividad enzimática más elevada, con una inducción 2.7 veces mayor que la registrada por su control -Fe0Zn. Cuando se compararon las raíces de los tratamientos +Fe, se observó que la presencia de Zn produjo un incremento de 4.9 veces en la actividad FC-R.

4.5.5 Tasa de absorción de ^{57}Fe en condiciones con o sin Zn

La figura 22C muestra la tasa de absorción de ^{57}Fe de las células de la raíz de las plántulas cuando se someten a un tratamiento durante 20 minutos con $100\ \mu\text{M}$ $^{57}\text{FeEDDHA}$. Los resultados indican que las plantas que originariamente fueron cultivadas en ausencia de Fe presentaron mayor capacidad de absorción de ^{57}Fe que las plantas cultivadas con presencia de Fe. Las plantas -Fe0Zn registraron el valor más alto con un incremento del 195.1% con respecto a +Fe0Zn. La adición de $100\ \mu\text{M}$ Zn al medio de cultivo con aporte normal de Fe (tratamiento +Fe100Zn) redujo la tasa de ^{57}Fe absorbido en un 34.9%, en comparación con su tratamiento control (+Fe0Zn). Por otro lado, la incorporación de Zn al medio de cultivo deficiente en Fe (tratamiento -Fe100Zn) también disminuyó la capacidad de absorción de ^{57}Fe de las plantas en un 38.5% en comparación con su control -Fe0Zn.

4.5.6 Concentración de Fe y Mn en el sistema radical y la parte aérea de las plántulas germinadas en medio de cultivo con o sin Mn

La figura 23 muestra la concentración de los iones hierro (Fe) y manganeso (Mn) en la parte aérea y en el sistema radical de las plántulas germinadas en medio de cultivo con o sin Mn. De manera similar a lo ocurrido en el estudio con o sin zinc, las plántulas cultivadas bajo condiciones de ausencia de Fe registraron los valores más bajos de concentración de este elemento. En este caso, las plantas del tratamiento -Fe0Mn acumularon 70.1 y 85.1% menos Fe en la parte aérea y el sistema radical, respectivamente, que las plantas +Fe0Mn. La incorporación de Mn al medio de cultivo, provocó una disminución de la concentración de Fe en las plantas cultivadas en el medio que contenía Fe (+Fe). Así, las plantas

+Fe250Mn mostraron una bajada en la concentración de Fe en la parte aérea y el sistema radical de 61.9 y 45.7%, respectivamente, en comparación con su tratamiento control (+Fe0Mn). La concentración de Fe de la parte aérea de las plantas +Fe250Mn se redujo hasta niveles similares a los de las plantas deficientes. Por otro lado, la concentración de Fe de las plantas cultivadas en un medio deficiente en Fe y con presencia de Mn (-Fe250Mn) no presentó diferencias significativas con la de su control -Fe0Mn.

Por otro lado, las plantas cultivadas en los medios de cultivo sin manganeso (+Fe0Mn y -Fe0Mn) no mostraron diferencias significativas en la concentración de Mn endógeno. Sin embargo, al incorporar 250 μ M Mn al medio de cultivo se observó un incremento en la concentración de este elemento en ambas fracciones de la plantas. No obstante, la acumulación de Mn en las plantas de los tratamientos con 250Mn fue diferente en función de que el medio contuviera o no hierro. Así, las plantas cultivadas en el medio de cultivo sin Fe (-Fe250Mn) registraron los niveles más altos de Mn tanto en la parte aérea como en el sistema radical, que fueron 1.7 y 3.8 veces superiores, respectivamente, a los encontrados en las plantas +Fe250Mn. Por otro lado, comparando el Mn absorbido por las plantas 250Mn y sus respectivos controles 0Mn, se observó que el Mn acumulado por las plantas deficientes en Fe (-Fe250Mn) fue más de 80 veces superior al de su control (-Fe0Mn) tanto en la parte aérea como en el sistema radical. Sin embargo, esta subida solo fue de entre 10 y 25 veces (parte aérea y sistema radical, respectivamente) cuando se compararon los mismos tratamientos en presencia de Fe (+Fe250Mn y +Fe0Mn).

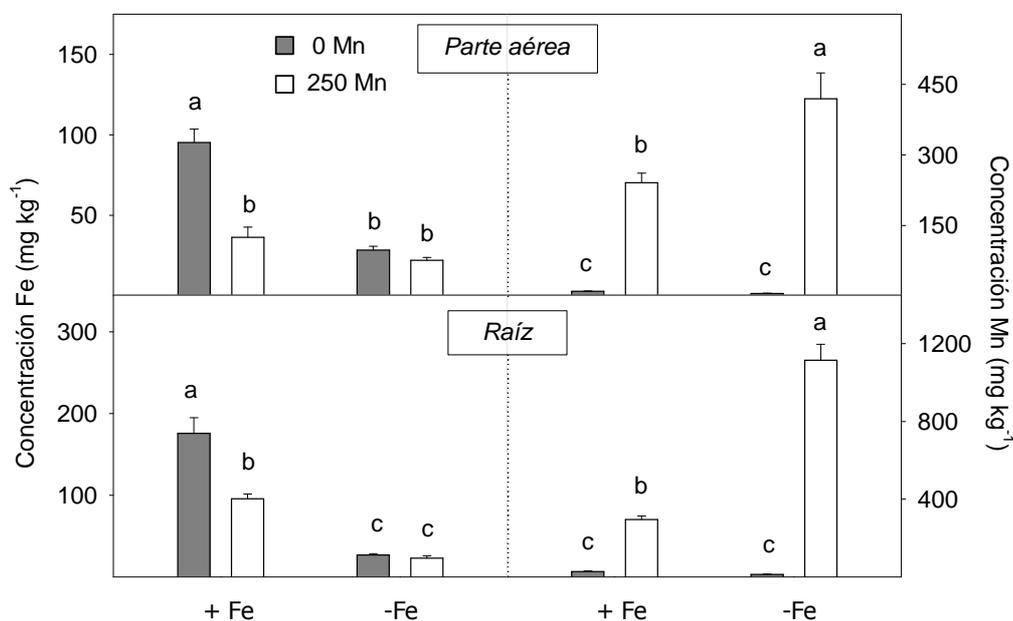


Figura 23. Concentración de hierro y manganeso en la parte aérea y el sistema radical de plántulas del patrón naranjo amargo cultivadas durante 1 mes en un medio de cultivo “*in vitro*” compuesto por solución nutritiva con 0 ó 20 μM FeEDDHA (-Fe y +Fe, respectivamente) y con 0 ó 250 μM MnSO_4 (0 Mn y 250 Mn, respectivamente). Cada valor es media de tres repeticiones \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 son significativamente diferentes.

4.5.7 Expresión génica en condiciones con o sin Mn

La figura 24 muestra el análisis de la expresión de los genes HA, FRO e IRT, que regulan la actividad de las enzimas H^+ -ATPasa y quelato férrico reductasa y el transportador férrico, respectivamente, determinado a partir de ARN total extraído del sistema radical de las plántulas de los distintos medios de cultivo de este experimento.

En primer lugar, en lo que respecta a los genes que regulan las H^+ -ATPasas responsables de la capacidad de acidificación de las raíces, las plantas mantenidas en el medio de cultivo en ausencia de Fe manifestaron

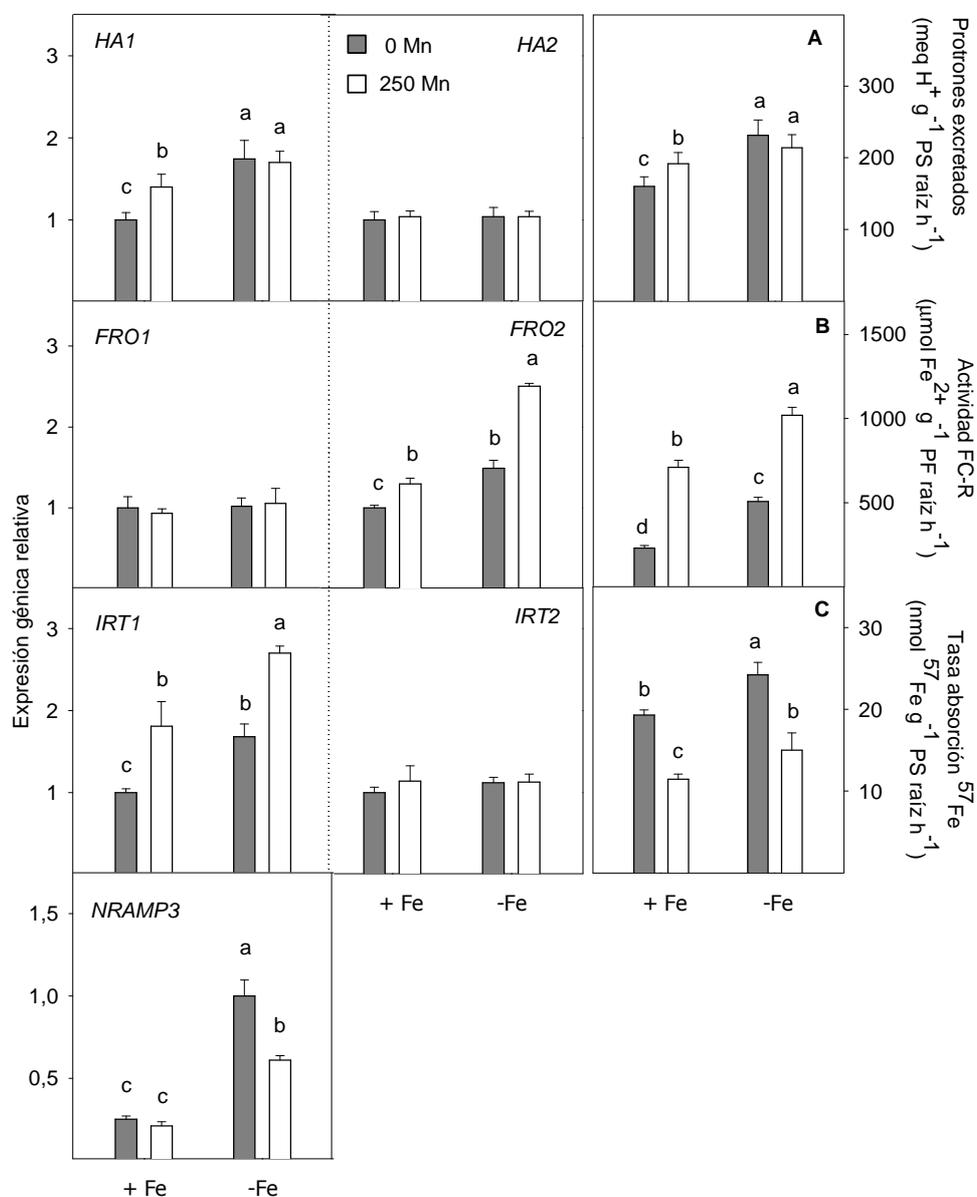
un aumento en la expresión génica relativa del gen HA1, en comparación con la expresión detectada en las plantas cultivadas en los medios de cultivo con Fe. La incorporación de 250 μ M Mn al medio de cultivo indujo un comportamiento diferente en la regulación de HA1 según si las plantas se hubieran cultivado en presencia o en ausencia de Fe. Así, mientras que la adición de Mn al medio -Fe (tratamiento -Fe250Mn) no aumentó la expresión de HA1 en comparación con su tratamiento control -Fe0Mn, el tratamiento +Fe250Mn vio incrementado un 40.1% el número de transcritos de HA1 cuando se comparó con la expresión +Fe0Mn. Sin embargo, la expresión de HA1 en las plantas +Fe250Mn nunca alcanzó el nivel de expresión de las plantas deficientes en Fe. Por otro lado, no se detectó inducción de la expresión del gen HA2 ni como consecuencia de la presencia/ausencia de Fe ni tampoco de Mn.

En cuanto a la expresión de los genes identificados en cítricos como los responsables de regular la capacidad reductora de las raíces, parece que el gen FRO1 no alteró su nivel de expresión con respecto a ningún tratamiento. Sin embargo, la deficiencia de Fe sí activó el gen FRO2. En concreto, las plantas sometidas al tratamiento -Fe0Mn experimentaron una inducción del 52.4% en la expresión de FRO2 en comparación con las plantas del tratamiento +Fe0Mn. Además, la incorporación de 250 μ M Mn al medio de cultivo estimuló significativamente la expresión de FRO2. Así, la expresión de FRO2 en las plantas tratadas con Mn (+Fe250Mn) fue 1.3 veces superior a la registrada en sus plantas control (+Fe0Mn), y algo mayor (1.7 veces) cuando se compararon los mismos tratamientos en ausencia de Fe.

La deficiencia de Fe también estimuló la expresión del gen IRT1 que codifica la expresión del transportador férrico, que aumentó su actividad en

1.7 veces en las plantas -Fe0Mn en comparación con las +Fe0Mn. La adición de Mn al medio de cultivo provocó el aumento de la expresión de IRT1 en ambas condiciones de Fe. Los niveles de transcritos de IRT1 en las raíces de las plantas +Fe250Mn y -Fe250Mn, fueron de 1.8 y 1.6 veces, respectivamente, superiores a las registradas en sus respectivos controles sin Mn. La expresión de IRT1 en las plantas +Fe250Mn sí alcanzó el nivel de expresión detectado en las plantas -Fe0Mn, no existiendo diferencias significativas entre ellos. Nuevamente, el gen IRT2 no alteró su expresión bajo ningún tratamiento.

Por último, la abundancia de transcritos del gen NRAMP3 que codifica la actividad de un transportador de iones metálicos localizado en la vacuola, fue inhibido en más de un 75.0% en los medios que contenían Fe (+Fe0Mn y +Fe250Mn) con respecto al medio que no contenía ambos microelementos. Además la adición de Mn (250 μ M) al medio carente de Fe (-Fe250Mn) produjo una reducción de la actividad de NRAMP3 de un 39.1% respecto al control (-Fe0Mn).



4.5.8 Acidificación del medio externo en condiciones con o sin Mn

Las raíces de las plantas deficientes en Fe, independientemente del nivel de manganeso, fueron las que mostraron mayor estimulación en la capacidad para liberar protones al medio externo. En concreto, en las plantas -Fe0Mn este aumento fue del 44.6% con respecto a las plantas +Fe0Mn (Figura 24A). La incorporación de Mn al medio de cultivo no alteró la capacidad de acidificación de las plantas deficientes en hierro. Por el contrario, en las plantas a las que se suministró Fe, el tratamiento con Mn (+Fe250Mn) aumentó 1.2 veces la cantidad de protones excretados al medio con respecto a las plantas +Fe0Mn.

4.5.9 Actividad FC-R en condiciones con o sin Mn

La figura 24B muestra la actividad del enzima encargado de la reducción del ión férrico en las raíces de las plantas. Cuando las plantas fueron cultivadas en el medio de cultivo sin Mn, las plantas deficientes en Fe (-Fe0Mn) registraron 2.2 veces mayor actividad FC-R que las plantas nutridas con Fe (+Fe0Mn). La presencia de Mn incrementó la actividad FC-R tanto en presencia como en ausencia de Fe. Las plantas de los tratamientos -Fe250Mn y +Fe250Mn mostraron una actividad 2.0 y 3.1 veces superior, respectivamente, a la de sus controles sin Mn (-Fe0Mn y +Fe0Mn).

4.5.10 Tasa de absorción de ^{57}Fe en condiciones de con o sin Mn

La figura 24C muestra la tasa de absorción de ^{57}Fe de las células de la raíz de las plántulas cuando se someten a un tratamiento con 100 μM $^{57}\text{FeEDDHA}$ durante 20 minutos. Las plantas cultivadas en el medio

deficiente en Fe mostraron una tasa de absorción de ^{57}Fe 1.3 veces superior a la encontrada en las plantas nutridas con Fe, con independencia del aporte de Mn. Sin embargo, la adición de Mn al medio (tratamientos +Fe250Mn y -Fe250Mn) redujo considerablemente la tasa de absorción de ^{57}Fe , experimentando ambos tratamientos una disminución de este parámetro próxima al 40%, cuando se compararon con sus respectivos controles sin Mn.

4.5.11 Discusión

En este experimento se ha estudiado la regulación del sistema de absorción de hierro en ausencia y presencia de elevadas concentraciones de Zn^{2+} y Mn^{2+} , con objeto de obtener información sobre las interacciones entre estos iones en dicho proceso.

La adición de Zn^{2+} o Mn^{2+} (100 ó 250 μM respectivamente) a un medio de cultivo "*in vitro*" que contenía Fe (20 μM FeEDDHA) causó una reducción de la concentración de Fe en las raíces y en las hojas de plántulas de naranjo amargo con respecto a las cultivadas en el mismo medio desprovisto de Zn^{2+} y Mn^{2+} . Este efecto parece indicar un antagonismo de estos iones sobre la absorción del Fe^{2+} por la raíz, que se sustentaría también en la inhibición del influjo de ^{57}Fe por los iones Zn^{2+} y Mn^{2+} , observada en los experimentos de absorción a corto plazo. Recíprocamente, la presencia de Fe en el medio reduce los niveles de Zn y Mn en la planta.

La mayor parte de los ensayos sobre nutrición con microelementos se refieren a la aplicación de diferentes dosis de fertilizantes que contienen los mismos, y, en ellos los antagonismos iónicos se asocian a los incrementos y disminuciones relativas de sus concentraciones en los diferentes órganos de la planta. Así, algunos estudios, como los realizados

sobre *A. thaliana* (Shanmugam *et al.*, 2011), guisante (Cohen *et al.*, 1998; soja (Foy *et al.*, 1998; Izaguirre-Mayoral y Sinclair, 2005), maíz (Adiloglu, 2006; Aref, 2011) detectaron una disminución de la concentración de Fe en presencia de concentraciones crecientes de otros microelementos. Asimismo, otros estudios mostraron que al aumentar el aporte de fertilizante férrico se reducían las concentraciones de Zn o Mn en la planta (Fukao *et al.*, 2011; Shanmugam *et al.*, 2011; Ghasemi-Fasaei y Ronaghi, 2008; Kobraee *et al.*, 2011), o bien que la deficiencia de Fe incrementaba la acumulación de otros micronutrientes (Welch *et al.*, 1993; Rodecap *et al.*, 1994).

Se han presentado evidencias indicando que el IRT1, localizado en la membrana plasmática de las células epidérmicas de la raíz (Eide *et al.*, 1996; Vert *et al.*, 2002) constituye el principal transportador de Fe^{2+} al interior de la célula (Henriques *et al.*, 2002), y aunque presenta una alta afinidad por este, también puede transportar otros iones metálicos bivalentes como el Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} o Cd^{2+} (Korshunova *et al.*, 1999). Esta propiedad del IRT1 también se confirma con los resultados obtenidos con mutantes de *A. thaliana*, donde al anular la expresión del gen IRT1, se observó una reducción de los contenidos en Zn, Mn y Co, además del de Fe (Henriques *et al.*, 2002; Vert *et al.*, 2002). En relación con esto, se han identificado unos residuos críticos en los dominios transmembrana II y III de IRT1, que parecen determinar la selectividad del transportador por los iones Fe^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} . Por consiguiente, es posible que estos iones en función de su concentración externa se unan al transportador en mayor o menor grado, llegando a causar la inhibición del transporte del Fe^{2+} .

Por otra parte, la deficiencia de hierro induce en las raíces de los cítricos las respuestas incluidas en lo que se denomina Estrategia I (Kim y

Guerinot, 2007) y que suponen un incremento de la capacidad de acidificación, reducción y transporte (Treeby y Uren, 1993; Manthey *et al.*, 1994). Por consiguiente, concentraciones suficientemente elevadas de Zn o Mn en el medio nutritivo inducen bajos niveles de hierro en los tejidos, que pueden llegar a provocar la activación de las respuestas del sistema de absorción de Fe en el sistema radicular tal como lo hace la deficiencia de Fe. Por ello, en el presente experimento, tanto la presencia de Zn^{2+} como de Mn^{2+} en un medio que contenía 20 μM FeEDDHA, estimuló la expresión de los genes HA1, FRO2 e IRT1, lo cual puede asociarse a la disminución del Fe en las raíces. No obstante, en el caso de los genes FRO2 e IRT1 también se detectó una fuerte estimulación de su actividad en las raíces de plantas cultivadas en un medio desprovisto de Fe, lo cual implica un efecto adicional de ambos microelementos sobre la expresión de estos genes. La actividad de la FC-R siguió la misma pauta que el gen FRO2. En apoyo de esto, diferentes estudios han mostrado que la carencia de Zn o Mn disminuía la capacidad de reducción de Fe(III) en raíces deficientes en Fe, mientras que cuando se suministraba el ión correspondiente la actividad reductora se restauraba (Romera *et al.*, 1997; Bohórquez *et al.*, 2001). Por otra parte, también se ha demostrado la inducción del IRT1 por los micronutrientes en diversas especies, tales como *A thaliana* (Connolly *et al.*, 2002; Shanmugam *et al.*, 2011), guisante (Cohen *et al.*, 2004) o arroz (Lee y An, 2009).

Por tanto, nuestros resultados parecen indicar la existencia de dos efectos diferentes producidos por ambos iones. Por un lado está la inhibición de la absorción del Fe^{2+} por altos niveles de Zn^{2+} o Mn^{2+} , que reduce la concentración de Fe en la raíz, con la consiguiente inducción de la expresión de los genes HA1, FRO2 e IRT1, y por otro el efecto estimulador de ambos sobre FRO2 e IRT1 en raíces a las que no se aporta hierro. El

hecho de que los genes FRO2 e IRT1 sean regulados de forma semejante por los microelementos apoya la posibilidad, planteada por Connolly *et al.* (2003), de que FRO2 e IRT1 formen un complejo que solo es estable cuando ambas proteínas están presentes simultáneamente en la membrana. Por consiguiente, la inducción de FRO2 e IRT1 podría estar coordinada, ya que la reducción del Fe(III) proporciona el substrato para el transportador de Fe²⁺, con lo cual, ante condiciones de deficiencia de hierro, se activarían ambas respuestas simultáneamente para complementarse y facilitar la rápida absorción de Fe cuando desaparezcan los factores que limitan su adquisición.

Parece posible que algunas de las interacciones entre el Fe y el Zn²⁺ o el Mn²⁺ en la raíz puedan ser explicadas por sus efectos en la actividad del transportador NRAMP3 localizado en el tonoplasto, donde desempeña una función en la liberación de algunos iones metálicos. Así, AtNRAMP3 muestra afinidad con diferentes iones bivalentes, entre los que se encuentran el Zn²⁺ el Mn²⁺ y el Cd²⁺, además del Fe²⁺ (Thomine *et al.*, 2000, 2003). La expresión del gen AtNRAMP3 es inducida por la deficiencia de Fe (Thomine *et al.*, 2003), tal como sucede en nuestro estudio (Figuras 22 y 24).

La sobreexpresión de los genes IRT1 y FRO2, así como el incremento de la actividad FC-R en raíces de CC deficientes en Fe tratadas con altas concentraciones de Zn²⁺ o Mn²⁺ respecto a las raíces no tratadas con estos iones, podría deberse a la bajo-regulación del gen NRAMP3 por las elevadas concentraciones de ambos iones (Figuras 22 y 24). Este efecto, impediría la liberación del hierro desde el interior de la vacuola, al reducirse la actividad de su transportador en el tonoplasto, lo que, en condiciones de ausencia de Fe externo, provocaría la disminución de los niveles de Fe en el

citósol e induciría las respuestas génicas y fisiológicas a la deficiencia de Fe anteriormente descritas. En apoyo de esto, Thomine *et al.*, (2003), reportaron que en plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban el gen AtNRAMP3, los niveles de expresión de los IRT1 y FRO2 eran más bajos, así como la actividad FC-R.

Por otra parte, el gen HA1 parece regulado por los niveles de Fe en las raíces, ya que las condiciones de deficiencia de Fe inducen su expresión de forma similar en plantas no tratadas y tratadas con Zn^{2+} o Mn^{2+} . Sin embargo, en las plantas alimentadas con Fe, los tratamientos con Zn^{2+} o Mn^{2+} incrementan significativamente la actividad de AH1, al mismo tiempo que reducían la concentración de Fe en las raíces. La extrusión de protones en las plantas tratadas con Mn siguió esta misma pauta, pero contrariamente la excreción de H^+ aumentó notablemente con la deficiencia de zinc. Este comportamiento podría ser explicado por dos efectos relacionados con el Zn^{2+} , sobre los que se ha informado previamente. Por un lado, Pinton *et al.* (1993), trabajando con vesículas aisladas observaron que la deficiencia de zinc alteraba los lípidos de la membrana plasmática, produciendo un aumento de su permeabilidad y un desacoplamiento en el gradiente de protones a través de la membrana. Otra posibilidad es que las altas concentraciones de Zn^{2+} libre inhiban la hidrólisis del ATP y del transporte del H^+ a través del plasmalemma, como propusieron Kastrup *et al.* (1996). En esta línea, Bienfait *et al.* (1989) también detectaron una disminución de la extrusión de H^+ con el tratamiento con Zn.

En conclusión, el aporte de Zn^{2+} o Mn^{2+} al medio de cultivo inhibió la absorción de Fe por las raíces e indujo algunas de las respuestas a la deficiencia de hierro incluidas dentro de la Estrategia I, tanto a nivel génico (AH1, FRO2 e IRT) como enzimático (FC-R).

5. CONCLUSIONES FINALES

Las raíces de los cítricos responden a la deficiencia de Fe activando los componentes del sistema de absorción de este elemento descrito en plantas dicotiledóneas como “estrategia I”.

1. La deficiencia de Fe estimula la expresión de los genes HA1, FRO2 e IRT1 que codifican para los enzimas FC-R y H⁺-ATPasa y el transportador férrico, respectivamente; que regulan las respuestas de acidificación, reducción y transporte de Fe en las raíces de los cítricos ante una situación de déficit del elemento.
2. La activación del enzima FC-R es determinante en el grado de tolerancia a la clorosis férrica existente entre diferentes genotipos de cítricos.
3. El aumento de la capacidad para almacenar hierro en el apoplasto de la raíz también está relacionado con la resistencia de las plantas de cítricos a la deficiencia de Fe.
4. La deficiencia de Fe provoca la acumulación de ácidos orgánicos en el sistema radical de las plantas, principalmente citrato y malato. Estos compuestos son liberados al medio y al xilema, para facilitar la solubilización, reducción y transporte del Fe.
5. La estimulación de la biosíntesis de ácidos orgánicos en cítricos bajo condiciones de clorosis férrica está regulada por la activación de los genes PEPC1, cMDH, FUM, mMDH y CS, que codifican para

varios enzimas del ciclo de Krebs. Este hecho se confirma con la inducción de las correspondientes actividades enzimáticas.

6. La deficiencia de Fe también estimula la expresión del gen DTC en cítricos que regula la actividad del transportador de ácidos dicarboxílicos entre la mitocondria y el citosol.

7. La presencia de bicarbonato en el medio induce clorosis férrica en las plantas de cítricos, reduciendo su crecimiento y alterando el aparato fotosintético de las hojas. Esto es debido a que el ión HCO_3^- ejerce un efecto tampón sobre la acidificación del medio que inhibe la absorción del hierro por las raíces, lo que se traduce en una reducción de la concentración de Fe en los órganos de la planta. Como resultado, las raíces de las plantas inducen las respuestas a la deficiencia de este elemento.

8. Además, el bicarbonato dificulta el transporte del Fe desde las raíces a la parte aérea y también bloquea la movilización del Fe desde los cotiledones a la radícula en plántulas a las que no se les suministró Fe. Este último efecto podría deberse a la inhibición por el bicarbonato del transportador NRAMP, localizado en el tonoplasto y que regula la liberación del Fe vacuolar.

9. La presencia de concentraciones relativamente elevadas de otros micronutrientes en el medio, como zinc y manganeso, reduce la absorción del Fe. Esto es debido a un efecto competitivo a nivel del

transporte a través de la membrana plasmática, ya que las respuestas a la deficiencia de hierro se activan al disminuir la entrada de Fe en las células radiculares.

10. La reducción de la translocación del Fe de los cotiledones es debido al bloqueo de la actividad del transportador NRAMP de la vacuola.

Finalmente, de los resultados expuestos en este trabajo se deduce que, todos los componentes del sistema de absorción de Fe están metabólicamente inter-correlacionados y, en condiciones de deficiencia de Fe, se estimulan las respuestas dirigidas a incrementar la movilización de Fe en la rizosfera y la capacidad de reducción del mismo por las raíces. La interacción de ambas respuestas potencia la absorción de Fe por el sistema radicular. El grado de tolerancia a la clorosis férrica está determinado por la regulación de estos componentes.

6. 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. En: Iron chelation in plants and soil microorganisms. Barton LL y Hemming BC. eds.; Academic press: New York, USA. pp:327-343.
- 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, Morales F y Abadía A.** 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron- deficient leaves. *Plant Soil* 215:183-192.
- 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.
- Adiloglu S.** 2006. The effect of increasing nitrogen and zinc doses on the iron, copper and manganese contents of maize plant in calcareous and zinc deficient soils. *Asian J. Plant Sci.* 5(3):504-507.
- 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.
- Alcántara E, Romera FJ, Cañete M y De la Guardia MD** 2000. Effects of bicarbonate and iron supply on Fe(III) reducing capacity of roots and leaf chlorosis of the susceptible peach rootstock "Nemaguard". *J. Plant. Nutr.* 23(11&12):1607-1617.
- 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.

Bibliografía

- Álvarez-Fernández A, Abadía J y Abadía A.** 2005. Iron deficiency, fruit yield and fruit quality. En: Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms: Iron in Plants and Microbes. Barton LL y Abadía J eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda. pp:85-101.
- 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.
- Aref F.** 2011. Influence of zinc and boron nutrition on copper, manganese and iron concentrations in maize leaf. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 5(7):52-62.
- Bacon JSD, Palmer MJ y De Kock PC.** 1961. The measurements of acolitase activity in the leaves of various normal and variegated plants. *Biochem J.* 78:198-204.
- 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, Klatte 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.
- 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.

-
- Belkhodja 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.
- Berezky Z, Wang HY, Schubert V, Ganai M y Bauer P.** 2003. Differential regulation of nramp and irt metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. *J. Biol. Chem.* 278:24697-24704.
- Bergmann W.** 1992. *Nutricional disorders of plants.* Gustav Fischer Verlag Jena. Stuttgart, New Cork, pp:741.
- Bergmeyer HU, Gawwehn K y Grassl M.** 1974. Enzymes as biochemical reagents. En: *Methods of Enzymatic Analysis.* Bergmeyer HU. ed.; Academic Press: Nueva York, USA. pp:425-556.
- 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 y Scheffers MR.** 1992. Some properties of ferric citrate relevant to the iron nutrition of plants. *Plant Soil* 143(1):141-144.
- 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.
- 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.

Bibliografía

- Bohórquez JM, Romera FJ y Alcántara E.** 2001. Effect of Fe³⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺ on ferric reducing capacity and greening process of the peach rootstock Nemaguard (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Plant Soil*. 237:157-136.
- 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.
- Bughio N, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Nakanishi H y Mori S.** 2002. Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. *J. Exp. Bot.* 53:1677-1682.
- Bustin SA.** 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29:23-39.
- 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.
- 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.
- Chouliaras V, Dimassi K, Therios I, Molassiotis A y Diamantidis G.** 2004a. Root reducing capacity, rhizosphere acidification, peroxidase and catalase activities and nutrient levels of *Citrus taiwanica* and *Citrus volkameriana* seedlings, under Fe deprivation conditions. *Agronomie* 24:1-6.
- Chouliaras V, Therios I, Molassiotis A y Diamantidis G.** 2004b. Iron chlorosis in grafted sweet orange (*Citrus sinensis* L.) plants: physiological and biochemical responses. *Biol. Plant.* 48:141-144.
- Cinelli F.** 1995. Physiological responses of clonal quince rootstocks to iron deficiency induced by addition of bicarbonate to nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 18(1): 77-89.
- Clarkson DT y Hanson JB.** 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:239-298.

Bibliografía

- Clemens S.** 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212:475-486.
- 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.
- Coulombe BA, Chaney RL y Wiebold WJ.** 1984. Use of bicarbonate in screening soybeans for resistance to iron chlorosis. *J. Plant Nutr.* 7(1-5):411-425.
- Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker R y Briat J-F.** 2000. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 347:749-755.
- 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.
- Dannel F, Pfeffer H y Marschner H.** 1995. Isolation of apoplasmic fluid from sunflower leaves and its use for studies on influence of nitrogen supply on apoplasmic pH. *J. Plant Physiol.* 50:208-213.

- De la Guardia MD y Alcántara E.** 2002. A comparison of ferric chelate reductase and chlorophyll and growth ratios as indices of selection of quince, pear and olive genotypes under iron deficiency stress. *Plant Soil* 241:49-56.
- 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.
- Deal GM y Alcántara E.** 2002. Bicarbonate and low iron level increase root to total plant weight ratio in Olive and Peach rootstock. *J. Plant Nutr.* 25:1021-1032.
- Dell'Orto M, Brancadoro L, Scienza A y Zocchi G.** 2000a. Use of biochemical parameters to select grapevine genotypes resistant to iron-chlorosis. *J. Plant Nutr.* 23(11y12):1767-1775.
- Dell'Orto M, Santi S, De Nisi P, Cesco S, Varanini Z, Zocchi G y Pinton R.** 2000b. Development of Fe-deficiency responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: involvement of plasma membrane H⁺-ATPase activity. *J. Exp. Bot.* 51(345):695-701.
- Ding H, Duan L, Li J, Yan H, Zhao M, Zhang F y Li WX.** 2010. Cloning and functional analysis of the peanut iron transporter AhIRT1 during iron deficiency stress and intercropping with maize. *J. Plant Physiol.* 167:996-1002.
- 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.
- Durrett 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.
- Eckhardt U, Marques AM y Buckout TJ.** 2001. Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol. Biol.* 45:437-448.

Bibliografía

- 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.
- Enomoto Y, Hodoshima H, Shimada H, Shoji K, Yoshihara T y Goto F.** 2007. Long-distance signals positively regulate the expression of iron uptake genes in tobacco roots. *Planta* 227:81-89.
- Felle H.** 1988. Short-term pH regulation in plants. *Physiol. Plant.* 74:583-591.
- Fleming AL, Chaney RL y Coulombe BA.** 1984. Bicarbonate inhibits Fe-stress response and Fe uptake-translocation of chlorosis-susceptible soybean cultivars. *J. Plant Nutr.* 7:699-714.
- Forner JB y Alcaide A.** 1994. Últimas investigaciones en patrones tolerantes. *El Agricultor Cualificado.* 0:21-24.
- Fournier JM, Alcántara E y de la Guardia MD.** 1992. Organic acid accumulation in roots of two sunflower lines with a different response to iron deficiency. *J. Plant Nutr.* 15:1747-1755.
- 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 ⁵⁹labeled Fe²⁺ influx in roots of *Pisum sativum* using a chelator buffer system to control Fe²⁺ 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.
- Fukao Y, Ferjani A, Tomioka R, Nagasaki N, Murata R, Nishimori Y, Fujiwara M y Maeshima M.** 2011. iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 155:1893-1907.
- 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.
- Gharsalli M y Hajji M.** 2002. Comparison of physiological responses of peach and almond seedlings to iron deficiency. *J. Plant Nutr.* 25:1139-1154.

- Ghasemi-Fasaei R y Ronaghi A.** 2008. Interaction of iron with copper, zinc and manganese in wheat as affected by iron and manganese in calcareous soil. *J. Plant Nutr.* 31:839-848.
- 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: Elicitation of root ferric chelate reductase by manipulation of external iron concentrations. *J. Plant Nutr.* 27:1701-1715.
- 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.
- Grotz N, Fox TC, Connolly E, Park W, Guerinot ML y Eide D.** 1998. Identification of a family of zinc transporter genes *from Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7220-7224.
- 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 Eide D.** 1999. Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2:244-249.

Bibliografía

- Guerinot ML y Yi Y.** 1994. Iron: nutritious, noxious and not readily available. *Plant Physiol.* 104(3):815-820.
- Halliwell B y Gutteridge JM.** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1-14.
- “Haploid Clementine Genome, International Citrus Genome Consortium,** 2011, <http://int-citrusgenomics.org/>, <http://www.phytozome.net/clementine>”.
- 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.
- 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.
- Haydon MJ y Cobbett CS.** 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174:499-506.
- Hell R y Stephan UW.** 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216(4):541-551.
- Hendry GAF y KJ Brocklebank.** 1985. Iron-induced oxygen radical metabolism in waterlogged plants. *New Phytol.* 101:199-206.
- 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.
- Ikuma H y Booner WD. 1967.** Properties of higher plant mitochondria. I. Isolation and some characteristics of tightly-coupled mitochondria from dark-grown mung bean hypocotyls. Plant Physiol. 42:67-75.
- 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.
- Izaguirre-Mayoral ML y Sinclair TR. 2005.** Soybean genotypic difference in growth, nutrient accumulation and ultrastructure in response to manganese and iron supply in solution culture. Ann. Bot. 96(1):149-158.
- Jackson C, Dench JE, Hall DO y Moore AL. 1979.** Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica sol gradient centrifugation. Plant Physiol. 64:150-153.
- 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.
- Jelali N, Salah IB, M'sehli W, Donnini S, Zocchi G y Gharsalli M. 2011.** Comparison of three pea cultivars (*Pisum sativum*) regarding their responses to direct and bicarbonate-induced iron deficiency. Sci. Hortic. 129:548-553.

Bibliografía

- 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, Pinochet J, Abadía A, Moreno MA y Gogorcena Y.** 2008. Tolerance response to iron chlorosis of *Prunus* selections as rootstocks. *HortScience.* 43:304-309.
- 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, 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.
- Kaiser BN, Moreau S, Castelli J, Thomson R, Lambert A, Bogliolo S, Puppo A y Day DA.** 2003. The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *Plant J.* 35:295-304.
- Kannangara 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.
- Kastrup BV, Steiger S, Luttge U y Fischer-Schlibes E.** 1996. Regulatory effects of zinc on corn root plasma membrane H⁺-ATPase. *New Phytol.* 134:467-473.
- 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* 581:2273-2280.
- Kobayashi T, Nishizawa NK y Mori S.** 2006. Molecular analysis of iron-deficient graminaceous plants. En: *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms.* Barton LL y Abadía J. eds.; Holanda. pp:395-435
- Kobraee S, NoorMohamadi G, HeidariSharifabad H, DarvishKajori F y Delkhosh B.** 2011. Influence of micronutrient fertilizer on soybean nutrient composition. *Indian J. Sci. Technol.* 4(7):763-769.
- Kochian LV.** 1991. Mechanisms of micronutrient uptake and translocation in plants. En: *Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM y Welch RM (eds) Micronutrients in agriculture, 2nd edn.* Soil Science Society of America, Madison, Wis., pp 229-296.
- 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 y Koyro HW.** 2001. Apoplastic accumulation of iron in the epidermis of maize (*Zea mays*) roots grown in calcareous soil. *Physiol. Plantarum.* 113:515-522.
- 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.

Bibliografía

- 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, Vértes A y Kamnev AA.** 2005. Mössbauer study of iron uptake in cucumber root. *Hyperfine Interact.* 165:289-294.
- Kozłowski TT.** 1984. Plant responses to flooding of soil. *Bioscience* 34:162-167.
- 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 y 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.
- Ksouri R, Debez A, Mahmoudi H, Ouerghi Z, Gharsalli M y Lachaâl M.** 2007. Genotypic variability within Tunisian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) facing bicarbonate-induced iron deficiency. *Plant Physiol. Biochem.* 45:315-322.
- 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 *Stal* 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.
- Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schröder A, Krämer U, Barbier-Brygoo H y Thomine S.** 2005. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO J.* 24:4041-4051.
- 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.
- Laulhère JP, Labouré AM y Briat JF.** 1990. Photoreduction and incorporation of iron into ferritins. *Biochem. J.* 269(1):79-84.
- Lee S y An G.** 2009. Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulation in rice. *Plant Cell Environ.* 32(4):408-416.
- 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.** 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.

Bibliografía

- Lindsay WL.** 1991b. Inorganic equilibria affecting micronutrients in soils. En: Micronutrients in Agriculture. Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM y Welch RM. eds.; Madison WI. ed 2. Soil Sci. Soc. Am. pp:89-112.
- Lindsay WL.** 1995. Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach. En: Iron Nutrition in Soils and Plants. Abadía J. (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Holanda. pp:7-14.
- 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. Manthey JA, Crowley DE y Luster DG (Eds). Lewis Publishers. Florida, USA.
- Longnecker N y Welch RM.** 1990. Accumulation of apoplastic iron in plant roots. Plant Physiol. 92:17-22.
- 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 AF, 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.
- López-Millán AF, Ellis DR Grusak MA.** 2004. Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago truncatula*. Plant Mol. Biol. 54: 583-596.
- López-Millán AF, Morales F, Gogorcena Y, Abadía A y Abadía J.** 2009. Metabolic responses in iron deficient tomato plants. J. Plant Physiol. 166:375-384.
- 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.
- Lucena C, Romera FJ, Rojas CL, García MJ, Alcántara E y Pérez-Vicente R.** 2007. Bicarbonate blocks the expression of several genes involved in the physiological responses to Fe deficiency of Strategy I plants. Funct. Plant Biol.34:1002-1009.

- Lucena JJ.** 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron chlorosis. A review. *J. Plant Nutr.* 23(11-12):1591-1606.
- Maas FM, van de Wetering DAM, van Beusichem ML y Bienfait HF.** 1988. Characterization of phloem iron and its possible role in the regulation of Fe-efficiency reactions. *Plant Physiol.* 87(1):167-171.
- 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.** 1993. Chelation effects on the iron reduction and uptake by low-Fe stress tolerant and non-tolerant citrus rootstocks. *J. Plant Nutr.* 16:881-893.
- 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.
- Maurinol, VG, Drincovich MF, Casati P, Andreo CS, Edwards GE, Ku MSB, Gupta SK y Franceschi VR.** 1997. NADP-malic enzyme, immunolocalization in different tissues of the C4 plant maize and the C3 plant wheat. *J. Exp. Bot.*, 48:799-811.
- 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.** 1982. Principles of plant nutrition. Ed. Int. Potash inst., Berna.

Bibliografía

- Mengel K y Kirkby E.** 2001. Principles of plant nutrition. pp.:849. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.
- Mengel K, Planker R y Hoffmann B.** 1994. Relationship between leaf apoplast pH and iron chlorosis of sunflower (*Helianthus annuus* L.). J. Plant Nutr. 17:1053-1065.
- 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.
- Moorhead GBG y Plaxton W.** 1988. Binding of glycolytic enzymes to a particulate fraction in carrot and sugar beet storage roots. Dependence on metabolic state. Plant Physiol. 86:348-351.
- 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.
- 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.
- Msilini N, Attia H, Bouraoui N, M'rah S, Ksouri R, Lachaâl M y Ouerghi Z.** 2009. Responses of *Arabidopsis thaliana* to bicarbonate-induced iron deficiency. *Acta Physiol. Plant.* 31:49-853.
- 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.
- Nedunchezian N, Morales F, Abadía A y Abadía J.** 1997. Decline in photosynthetic electron transport activity and changes in thylakoid protein pattern in field grown iron deficient peach (*Prunus persica* L.). *Plant Sci.* 129:29-38.
- 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. En: *Micronutrients in Agriculture.* Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM, Welch RM, eds.. SSSA Book Series n° 4. Madison. WI (USA). Pp:187227.
- Norvell WA, Welch RM, Adams ML y Kochian LV.** 1993. Reduction of Fe(III), Mn (III), and Cu (II) chelates by roots of pea (*Pisum sativum* L.) or soybean (*Glycine max*). *Plant Soil* 156:123-126.
- 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.
- Palmer CM y Guerinot ML.** 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plantas. *Nat. Chem. Biol.* 5:333-340.

Bibliografía

- 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.
- Peterson DA.** 1991. Enhanced electron transfer by unsaturated fatty acids and superoxide dismutase. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13:161-166.
- Picault N, Palmieri L, Pisano I, Hodges M y Palmieri F.** 2002. Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277:24204-24211.
- Picault N, Hodges M, Palmieri L y Palmieri F.** 2004. The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 9:138-146.
- 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.
- Pinton R, Cakmak I y Marschner H.** 1993. Effect of zinc deficiency on proton fluxes in plasma membrane-enriched vesicles isolated from bean roots. *J. Exp. Bot.* 44:623-630.
- Pittman JK.** 2005. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol.* 167:733-742.
- Ponnamperuma FN.** 1972. The chemistry of submerged soils. *Adv. Agron.* 24:19-25.
- Price L.** 1968. Iron compounds and plant nutrition. *Annu Rev. Plant Phys.* 19:239-248.

- Rabotti G y Zocchi G.** 1994. Plasma membrane-bound H⁺-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiol. Plant.* 90:779-85.
- 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.
- Rellán-Álvarez R, Andaluz S, Rodríguez-Celma J, Wohlgemuth G, Zocchi G, Álvarez-Fernández A, Fiehn O, López-Millán AF y Abadía J.** 2010. Changes in the proteomic and metabolic profiles of *Beta vulgaris* root tips in response to iron deficiency and resupply. *BMC Plant Biol.* 10:120.
- Rengel Z.** 2000. Uptake and transport of manganese in plants. En: Sigel A, Sigel H, eds. Metal ions in biology systems. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 57-87.
- 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.
- Rodecap KD, Tingey DT y Lee EH.** 1994. Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Environ. Qual.* 23:239-246.
- Rodríguez-Castrillón JÁ, Moldovan M, García Alonso JI, Lucena JJ, García-Tomé ML y 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.
- 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.

Bibliografía

- 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, Alcántara E y de la Guardia MD.** 1997. Influence of bicarbonate and metal ions on the development of Fe(III) reducing capacity by Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Physiol. Plant.* 101:143-148.
- 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. pp: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.
- Santi S, Cesco S, Varanini Z y Pinton R.** 2005. Two plasma membrane H⁺-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem.* 43:287-292.
- 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.** 2006. 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 y Bartels M.** 1997. Topography of the NADH-linked feric chelate (turbo) reductase in plasma membrane from *Plantago* roots. Abstracts of the IX International Symposium on iron nutrition and interactions in plants. University of Hoheneim. Stuttgart. Germany. pp: 58.
- Schmidt W y Fühner C.** 1998. Sensitivity to and requirement for iron in *Plantago* species. *New Phytol.* 138:639-651.
- Schmidt W, Bartels M, Tittel J y Fühner 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.

Bibliografía

- 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.
- Seibert M.** 1993. Biochemical, biophysical and structure characterization of the isolate photosystem II reaction center complex. *The Photosynthetic reaction center.* Norris J y Deisehhofer (eds). Academic Press NY.
- Serrano R.** 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:61-94.
- Shanmugam V, Lo JC, Wu CL, Wang SL, Lai CC, Connolly EL, Huang JL y Yeh KC.** 2011. Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana* – the role in zinc tolerance. *New Phytol.* 190:125-137.
- 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 phytosiderophoros in Vitro, biosynthesis of 2'-deoximugineic acid from Lmethionine and nicotianamine. *Plant Physiol.* 93 (4):1497-1503.
- Sijmons PC y Bienfait HF.** 1984. Mechanism of iron reduction by roots of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Plant Nutr.* 7:687-693.
- Sijmons PC y Bienfait HF.** 1986. Development of Fe³⁺ reduction activity and H⁺ extrusion during growth of iron-deficiency bean plants in a rhizostat. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 181:282-299.
- 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.
- Snowden RED y Wheeler BD.** 1995. Chemical changes in selected wetland species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. *New Phytol.* 131:503-520.
- Srere PA.** 1967. Citrate synthase. *Method. Enzymol.* 13:3-11.

-
- Strasser O, Köhl K y Römheld V.** 1999. Overestimation of apoplasmic Fe in roots of soil grown plants. *Plant Soil*. 210:179-187.
- Stephan W y Schözl G.** 1993. Nicotinamine: mediator of metals in the phloem?. *Physiol. Plant*. 88:522-529.
- Supek F, Supekova L, Nelson H y Nelson N.** 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5105-5110.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Bibliografía

- Thimm O, Essigmann B, Kloska S, Altmann T y Buckhout TJ.** 2001. Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol.* 127:1030-1043.
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM y Schroeder JI.** 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant transporter gene family in *Arabidopsis* with homology to NRAMP genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:4991-4996.
- Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI y Barbier-Brygoo H.** 2003. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J.* 34:685-695.
- 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.
- Treeby M y Uren N.** 1993. Iron deficiency stress responses amongst citrus rootstocks. *Z. Pflanz Bodenk.* 156:75-81.
- 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.
- Vance CP, Stade S y Maxwell CA.** 1983. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation, I. Association with nitrogen fixation and incorporation into amino acids. *Plant Physiol.* 72:469-473.
- Vert GA, Briat JF y Curie C.** 2001. *Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root-periphery iron 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.
- 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.
- 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.
- Waters BM, Lucena C, Romera FJ, Jester GG, Wynn AN, Rojas CL, Alcántara E y Pérez-Vicente R.** 2007. Ethylene involvement in the regulation of the H⁺-ATPase CsHA1 gene and of the new isolated ferric reductase CsFRO1 and iron transporter CsIRT1 genes in cucumber plants. *Plant Physiol. Biochem*. 45:293-301.
- Wegner LH y Zimmermann U.** 2004. Bicarbonate-induced alkalization of the xylem sap in intact maize seedlings as measured in situ with a novel xylem pH probe. *Plant Physiol*. 136:3469-3477.
- Welch RM.** 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Plant Sci*. 14:49-82.
- Welch RM, Norvell WA, Schaefer SC, Shaff JE y Kochian LV.** 1993. Induction of iron (III) and copper (II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status:

Bibliografía

- does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta* 190:555-561.
- 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.
- White PF y Robson AD.** 1990. Response of lupins (*Lupinus angustifolius* L.) and peas (*Pisum sativum* L.) to Fe deficiency induced by low concentration of Fe in solution or by addition of HCO₃⁻. *Plant Soil* 125:39-47.
- Yan J, Yuan F, Long G, Qin L y Deng Z.** 2012. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus. *Mol. Biol. Reports* 39:1831-1838.
- Yang TJ, Lin WD y Schmidt W.** 2010. Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* iron response reveals conserved transition metal homeostasis networks. *Plant Physiol.* 152:2130-2141.
- 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.

- Zhao H y Eide D.** 1996a. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2454-2458.
- Zhao H y Eide D.** 1996b. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biolol. Chem.* 271(38):23203-23210.
- 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.
- Zribi K y Gharsalli M.** 2002. Effect of bicarbonate on growth and iron nutrition of pea. *J. Plant Nutr.* 25:143-2149.
- Zuo Y, Ren L, Zhang F y Jiang RF.** 2007. Bicarbonate concentration as affected by soil water content controls iron nutrition of peanut plants in calcareous soil. *Plant Physio. Biochem.* 45:357-364.

Bibliografía
