

# 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 <sup>+</sup> -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
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
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 <sup>+</sup> -ATPasa .....	61
3.1.4 Actividad de la Quelato férrico reductasa (FC-R) .....	62
3.1.5 Influxo de <sup>57</sup> Fe en las raíces .....	63
3.1.6 Análisis estadístico .....	66
<b>3.2 EXPERIMENTO 2: RESPUESTAS METABÓLICAS DE LAS RAÍCES A LA DEFICIENCIA DE HIERRO INDUCIDA .....</b>	<b>67</b>
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
<b>3.3 EXPERIMENTO 3: EFECTOS DEL BICARBONATO SOBRE LOS COMPONENTES GÉNICOS Y FISIOLÓGICOS DEL SISTEMA DE ADQUISICIÓN DEL HIERRO .....</b>	<b>75</b>
3.3.1 Distribución y transporte del hierro .....	76
3.3.2 Influxo de <sup>57</sup> 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 <sup>+</sup> -ATPasa, FC-R y PEPC .....	80
3.4.4 Análisis estadístico .....	80

3.5 EXPERIMENTO 5. EFECTO DE LOS IONES Zn <sup>2+</sup> Y Mn <sup>2+</sup> 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 <sup>57</sup> 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 <sup>+</sup> -ATPasa y FC-R .....	89
4.1.4 Absorción de <sup>57</sup> Fe por las raíces .....	89

4.1.4.1 Fe total, intracelular y enriquecimiento en <sup>57</sup> Fe .....	89
4.1.4.2 Tasa de absorción de <sup>57</sup> 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 <sup>+</sup> .....	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
<b>5. CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>163</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>169</b>

## TABLAS

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

## FIGURAS

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

### Experimento 3

- Figura 15.** Distribución relativa de  $^{57}\text{Fe}$  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  $\text{H}^+$ -ATPasa y FC-R y tasa de absorción de  $^{57}\text{Fe}$  ..... 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  $^{57}\text{Fe}$  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  $^{57}\text{Fe}$  de plántulas cultivadas con o sin Mn ..... 155

