



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE EDAFOLOGÍA

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE LÍNEAS DE FRIJOL TOLERANTE Y SUSCEPTIBLE A CLOROSIS FÉRRICA

FABIOLA ZAVALA ESTRADA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

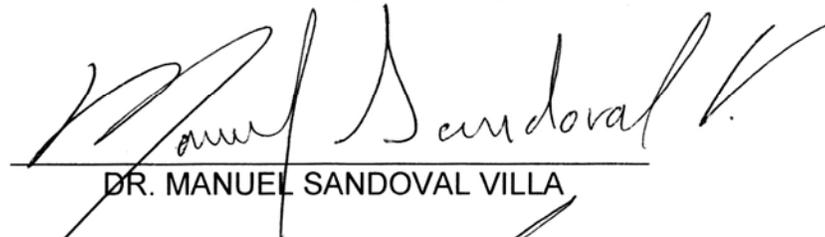
2009

La presente tesis, titulada: **Respuesta fisiológica de líneas de frijol tolerante y susceptible a clorosis férrica**, realizada por la alumna: Fabiola Zavala Estrada, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

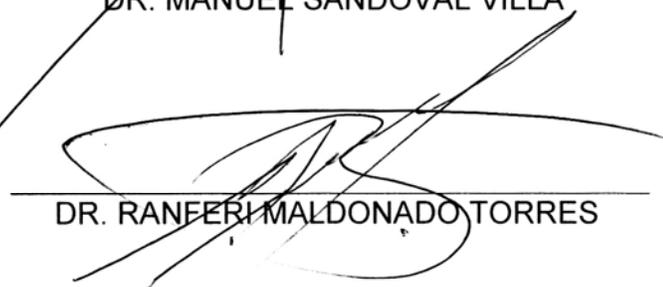
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. MANUEL SANDOVAL VILLA

ASESOR:



DR. RANFERI MALDONADO TORRES

ASESOR:



DRA. MARÍA EDNA ÁLVAREZ SÁNCHEZ

ASESOR:



DRA. MARÍA TERESA COLINAS LEÓN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2009.

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE LÍNEAS DE FRIJOL TOLERANTE Y SUSCEPTIBLE A CLOROSIS FÉRRICA

Fabiola Zavala Estrada, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2009

La clorosis por deficiencia de hierro (Fe) es un estrés abiótico encontrado principalmente en cultivos que crecen en suelos calcáreos o alcalinos (Rombolà y Tagliavini, 2007). Como resultado de la deficiencia de Fe se altera la morfología y fisiología de las plantas (Bertamini y Nedunchezian, 2005). Se determinaron algunos cambios anatómicos en hojas jóvenes y fisiológicos en la raíz de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerante y susceptible a clorosis férrica que ocurren cuando éstas se someten a estrés de hierro para identificar la respuesta diferencial de las dos líneas en estas condiciones. En la hoja clorótica de la línea tolerante la estructura del mesófilo se mostró organizada pero, con el parénquima esponjoso más compactado y con escasos cloroplastos de menor tamaño que en la hoja verde. En la hoja clorótica de la línea susceptible se observó el mesófilo desorganizado, con células de forma y tamaño irregular y, con una aparente ausencia de cloroplastos. En estas hojas de ambas líneas, el desarrollo de los tilacoides fue escaso y, como consecuencia, no hubo formación de grana. La clorosis férrica afectó significativamente las lecturas SPAD y la tasa fotosintética. En la composición nutrimental foliar, la línea tolerante presentó mayor concentración de K y la línea susceptible mayor concentración de Ca, Cu y Zn. La concentración de Fe mostró un incremento conforme aumentó el suministro del mismo en la solución. Sin Fe se incrementó la concentración de N, P, K, Ca, Mg, Mn, Cu y Zn. El pH alcalino provocó disminución significativa en las concentraciones de Fe, Cu y Zn. La condición extrema de deficiencia de Fe provocó incremento en las relaciones P/Fe, Mn/Fe, Cu/Fe, Zn/Fe y K/Fe, en tanto que la relación K/Ca no se afectó. En condiciones limitativas de Fe la capacidad reductora se incrementó, tanto en la línea tolerante como en la susceptible cuando desarrollaron en pH 6. Los cambios en el pH de la solución nutritiva estuvieron asociados con la concentración de Fe suministrada y con la tolerancia a la deficiencia de Fe de las líneas de frijol. La acumulación de materia seca del vástago se afectó cuando las plantas crecieron sin Fe.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, deficiencia de hierro, cloroplastos, fotosíntesis, concentración nutrimental.

PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF TOLERANT AND SUSCEPTIBLE BEAN GENOTYPES TO IRON DEFICIENCY

Fabiola Zavala Estrada, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2009

The iron (Fe) chlorosis is an abiotic stress mainly found in crops growing on calcareous or alkaline (Rombolà and Tagliavini, 2007). As a result of Fe deficiency morphology and physiology of plants is altered (Bertamini and Nedunchezian, 2005). In tolerant and susceptible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes to iron deficiency some morphological changes in leaves and physiological in roots were detected that occurs when plants are exposed to Fe stress in order to identify the gradual response of both bean genotypes. In the chlorotic leaf of the tolerant line the structure of mesophyll was organized but, with spongy parenchyma more compacted and little chloroplasts of so large minor that in the green leaf. In the chlorotic leaf of the susceptible line the mesophyll was disorganized, with cells of form and irregular size and resembling absence of chloroplasts. In these leaves of both lines, there was a small development of thylakoids and therefore there was no formation of grana. The iron chlorosis significantly affected SPAD readings and the photosynthetic rate. In the foliar nutrimental composition, the tolerant genotype presented higher concentration of K and the susceptible genotype higher concentration of Ca, Cu, and Zn. The Fe concentration showed an increase as Fe increased in the nutrient solution. Without Fe the concentration of N, P, K, Ca, Mg, Mn, Cu, and Zn was increased. The pH alkaline caused significant diminution in the concentrations of Fe, Cu, and Zn. The extreme condition of Fe deficiency caused increase in the relationships P/Fe, Mn/Fe, Cu/Fe, Zn/Fe, and K/Fe, whereas the K/Ca relationships were not affected. Under low availability conditions of Fe, the reducing capacity was increased for both genotypes when developed in pH 6. The changes in pH of the nutrient solution were associated to the concentration of Fe supplied and to the tolerance of Fe deficiency of both bean genotypes. The accumulation of dry matter of the shoot was affected when the plants grew without Fe.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, iron deficiency, chloroplasts, photosynthesis, nutrimental concentration.

A mis padres, por todo.

A mis hermanos: **Hugo, Rosa, Arturo y Perla,**
y sobrinos: **Emilio, Aarón, Valeria y Marco Antonio,**
porque son motivo de mi inspiración para continuar siempre adelante.

De manera especial a mi hermana **Esther** por su ayuda siempre desinteresada.

A mis amigos:

Elena Santiago por ser la amiga con quien puedo pensar en voz alta y por estar conmigo justo cuando lo he necesitado.

Ibar Tlatilpa por la ayuda incondicional brindada en todo momento y por los invaluable conocimientos que me ha compartido.

Fabiola

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México que apoyó mis estudios de maestría a través del CONACYT y al Colegio de Postgraduados por la oportunidad brindada.

A los doctores integrantes de mi consejo particular: Dr. Manuel Sandoval Villa, Dr. Ranferi Maldonado Torres y Dra. Ma. Edna Álvarez Sánchez, de quienes reconozco su excelente trayectoria como profesores e investigadores, dignos de ser un buen ejemplo para mí. A todos ellos por la orientación esmerada y valiosas sugerencias que permitieron mejorar el contenido de esta tesis.

A la Dra. Ma. Teresa Colinas León por su disponibilidad para la revisión de esta tesis y por sus acertadas sugerencias.

Al M. C. Antonio García Esteva por el tiempo dedicado a la revisión de este documento, por la ayuda y asesorías proporcionadas sin inconveniente en el momento requerido pero, sobre todo por su amistad y calidad humana.

Al Dr. Porfirio Ramírez Vallejo por proporcionarme el material (semillas) para realizar la presente investigación, siempre amablemente.

Al Dr. Josué Kohashi Shibata por el apoyo y facilidades brindadas durante la elaboración de este documento.

A la M. C. Greta y al Sr. Miguel Vega Zúñiga por el apoyo en el procesamiento de muestras para observar en los microscopios.

A Angélica Marín Campos por su colaboración en la realización de los análisis químicos de material vegetal.

A los profesores que me han transmitido una pequeña, pero importante, parte de sus múltiples conocimientos.

Finalmente, y sin ser menos importante, a Dios porque aún con todos los contratiempos, me ha permitido llegar hasta aquí.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Caracterización de la clorosis férrica	4
2.1.1 Causas de la clorosis férrica	8
2.2 Absorción y translocación de Fe de las raíces a las hojas	13
2.2.1 Estrategia I	14
2.2.2 Estrategia II	17
2.3 Distribución de Fe en los tejidos	20
2.4 Funciones del Fe en las plantas	21
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1 Morfología de hojas afectadas por clorosis férrica	31
5.2 Coloración de la hoja y capacidad fotosintética	34
5.2.1 Lecturas SPAD (medida del color verde de la hoja).....	34
5.2.2 Fotosíntesis neta	37
5.3 Cambios en las concentraciones nutrimentales en hojas	41
5.3.1 Contenido foliar de elementos minerales	41
5.3.2 Fe activo (Fe^{2+})	45
5.4 Capacidad reductora y cambios en el pH de la solución nutritiva	47
5.4.1 Capacidad de reducción de Fe^{3+}	47
5.4.2 pH de la solución	50
5.5 Materia Seca.....	53
VI. CONCLUSIONES	56
VII. LITERATURA CITADA.....	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Lecturas SPAD en hojas jóvenes de frijol por efecto de líneas, suministro de Fe y pH en la solución -----	35
Cuadro 2. Lecturas SPAD en hojas jóvenes de dos líneas de frijol desarrolladas con tres suministros de Fe (mg L^{-1}) en la solución nutritiva -----	36
Cuadro 3. Interacciones de Fe con líneas de frijol y con pH en la tasa de fotosíntesis -----	40
Cuadro 4. Concentración nutrimental en hojas jóvenes de frijol por efecto de dos líneas, tres suministros de Fe (mg L^{-1}) y dos niveles de pH en la solución -----	42
Cuadro 5. Interacción de líneas de frijol y Fe en la concentración de macro y micronutrientes en hojas jóvenes -----	44
Cuadro 6. Relaciones nutrimentales en hojas jóvenes de dos líneas de frijol con o sin aplicación de Fe -----	44
Cuadro 7. Valor de algunas relaciones nutrimentales en dos líneas de frijol bajo tres niveles de Fe en la solución nutritiva -----	45
Cuadro 8. Interacciones de Fe con líneas de frijol y con pH en la producción de materia seca de raíz -----	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelos de absorción del Fe por las raíces de las plantas que desarrollan las Estrategias I y II en condiciones de deficiencia de Fe. -----	19
Figura 2. Papel del Fe en la fotosíntesis-----	23
Figura 3. Apariencia, estructura interna y ultracelular de hojas verdes y cloróticas de líneas de frijol tolerante y susceptible a clorosis férrica-----	32
Figura 4. Dimensiones de los cloroplastos de líneas de frijol tolerante (T) y susceptible (S) desarrolladas en solución nutritiva sin (-Fe) y con 2 mg L ⁻¹ de hierro (+Fe) -----	34
Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de Fe en la solución nutritiva sobre la tasa fotosintética de hojas jóvenes de frijol -----	38
Figura 6. Efecto del pH de la solución nutritiva sobre la tasa fotosintética de hojas jóvenes de frijol -----	39
Figura 7. Concentración media de hierro activo (Fe ²⁺) determinada en hojas jóvenes de dos líneas de frijol. -----	46
Figura 8. Capacidad reductora de Fe ³⁺ en raíces de dos líneas de frijol desarrolladas en solución nutritiva con tres suministros de Fe -----	48
Figura 9. Efecto de dos niveles de pH y tres suministros de Fe en la solución sobre la capacidad de reducción de Fe ³⁺ en raíces de frijol -----	49
Figura 10. Variación del pH en la solución nutritiva por raíces de la línea de frijol (a) tolerante y (b) susceptible sometidas a tres suministros de Fe y dos niveles de pH-----	51
Figura 11. Producción de materia seca de vástago de dos líneas de frijol expuestas a deficiencia y dos suministros de Fe -----	53

I. INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre la adaptación de las plantas a diferentes niveles de disponibilidad de nutrientes son de gran importancia dada la gran diversidad de tipos de suelos de nuestro país y por el alto costo de fertilizantes (Lara *et al.*, 2004). La clorosis ocasionada por deficiencia de Fe se ha documentado desde 1844 (Loué, 1988) e incluso cuando ha sido una de las deficiencias nutrimentales más estudiadas, aún no se entiende completamente este problema y los medios disponibles para evitarla no son del todo satisfactorios (Mengel, 1994).

Las plantas deficientes en Fe son caracterizadas por el desarrollo de clorosis intervenal en hojas jóvenes. En casos severos, las hojas se tornan blancas con lesiones necróticas (Abadía, 1992). Como resultado de la clorosis férrica, las plantas manifiestan varios desordenes estructurales y metabólicos, debido al papel fundamental del Fe en una serie de procesos. El Fe es cofactor en más de 130 enzimas que catalizan reacciones bioquímicas únicas; es constituyente de la cadena transportadora de electrones tanto en cloroplastos como en mitocondrias e interviene en procesos como la fotosíntesis, respiración, reducción de nitratos y sulfatos (Imsande, 1998), fijación de nitrógeno y producción de energía (NADP) (Jones *et al.*, 1991); también es constituyente de hemoproteínas (citocromos, catalasa y peroxidasa) (Lobreaux y Briat, 1997).

La deficiencia de Fe en las plantas se ha asociado a suelos de tipo calcáreo, los cuales cubren aproximadamente 30% de la superficie terrestre (Chen *et al.*, 1982), cuyas características de pH (de 7 a 9) y contenido de carbonatos libres provocan que la proporción de Fe soluble sea extremadamente baja para las plantas e insuficiente para mantener la demanda y un crecimiento óptimo. Consecuentemente, esta deficiencia es la más extendida respecto al resto de los nutrientes esenciales para las plantas (Bates, 1982).

La amplia variabilidad genética ha permitido que las especies vegetales, y los genotipos dentro de especies, muestren diversa capacidad para adquirir el Fe presente en el medio de crecimiento (Mengel y Kirkby, 1987).

La inadecuada disponibilidad del Fe en el medio de crecimiento ha inducido mecanismos de adaptación en las plantas, mismos que pueden ser clasificados, por lo menos, en dos grupos principales denominados Estrategias I y II. La primera se presenta en la mayoría de las plantas (dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas) y se caracteriza por acidificar la rizosfera, incrementar la reducción de Fe^{3+} en la superficie radical por inducción de una reductasa asociada a la membrana y por liberar quelatos reductores como fenoles, flavinas o ácidos orgánicos (Jolley *et al.*, 1996). La segunda se ha observado exclusivamente en gramíneas (Römheld, 1987; Marschner y Römheld, 1995), la cual se caracteriza por la liberación de compuestos quelantes de Fe^{3+} llamados fitosideróforos (Marschner, 1995).

El reciente descubrimiento de un transportador de Fe^{2+} en las raíces de arroz (Bughio *et al.*, 2002) sugiere que las gramíneas también poseen genes para realizar la Estrategia I. Inversamente, las dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas podrían poseer genes de Estrategia II, aunque, la secreción de fitosideróforos no ha sido reportada para este grupo de plantas (Suzuki *et al.*, 1999; Varotto *et al.*, 2002).

Dentro de las especies que se cultivan en México, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más importantes ya que forma parte básica de la dieta alimenticia y que además es considerada una especie susceptible a la deficiencia de Fe (Hansen *et al.*, 2007), cuyo efecto puede reducir hasta en 100% el rendimiento de grano (Clark, 1991). De lo anterior, deriva la importancia de determinar algunos cambios anatómicos en hojas jóvenes y fisiológicos en la raíz de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerante y susceptible a clorosis férrica, que ocurren cuando éstas se someten a estrés de hierro, para identificar la respuesta diferencial de las dos líneas en estas condiciones.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El elemento mineral Fe constituye el 4.2% de la corteza terrestre, siendo el cuarto elemento más abundante de la litosfera, después del oxígeno, silicio y aluminio (Vempati y Loeppert, 1988); el valor medio de Fe estimado en los suelos es de 3.8%. Está invariablemente presente en todos los suelos, sin embargo, el contenido de Fe soluble es extremadamente bajo en comparación con el contenido de Fe total. El Fe puede ser suministrado a las raíces como Fe^{2+} , Fe^{3+} o quelatos de Fe (Mengel y Kirkby, 1987); siendo Fe^{2+} la forma metabólicamente activa (Jones *et al.*, 1991).

Aunque se han desarrollado métodos para corregir la deficiencia de Fe aún no existe un procedimiento completamente efectivo y sustentable desde el punto de vista ecológico y económico. Las alternativas que han sido identificadas necesitan ser evaluadas y adaptadas a diferentes condiciones ambientales (Rombolà y Tagliavini, 2007). Los mismos autores mencionan que las estrategias para una alternativa sustentable deberán: 1) tener bajo impacto en el ambiente, 2) ser viables y 3) tener bajos costos. Actualmente, a pesar de los múltiples estudios que se han realizado respecto a la deficiencia de Fe, las medidas que llevan a cabo los agricultores para prevenir y corregir la clorosis férrica resultan muy caras representando, éstas, una fracción significativa de los costos de producción total (Abadía *et al.*, 2004; Rombolà y Tagliavini, 2007). Los costos para el control y prevención de la clorosis férrica varían de acuerdo al grado del problema, tipo de cultivo y de la estrategia aplicada, así como de su intensidad (Rombolà y Tagliavini, 2007).

La clorosis férrica en plantas suele producirse por la baja disponibilidad de Fe, asociada principalmente a suelos calcáreos, los cuales cubren aproximadamente un tercio de la superficie terrestre (Chen *et al.*, 1982) y cuyas características importantes son pH alto (de 7 a 9) y contenido significativo de carbonatos libres (Gildersleeve y Ocampo, 1989), independientemente de que se encuentre en cantidades adecuadas (Pestana *et al.*, 2003).

En estos suelos, la concentración de especies inorgánicas de Fe en la solución es alrededor de 10^{-10} M, cuando la concentración para un crecimiento óptimo de las plantas fluctúa entre 10^{-6} y 10^{-5} M (Marschner, 1995). Aunque la clorosis férrica no es exclusiva de suelos calcáreos, las mayores dificultades de absorción ocurren en estas condiciones (Brown y Jolley, 1988).

Entre los cultivos anuales mayormente afectados por deficiencia de Fe se encuentran el arroz, soya, frijol, chícharo, lupino, maíz y sorgo. Los cultivos afectados que producen frutos incluyen al tomate, frambuesa, cítricos, kiwi, piña, vid y muchas otras especies de árboles frutales como aguacate, albaricoque, durazno, ciruela, cereza y pera (Rombolà y Tagliavini, 2007). La amplia variabilidad dentro y entre especies ha permitido diversos mecanismos de respuesta para adquirir el Fe presente en el medio de crecimiento (Mengel y Kirkby, 1987), sobre esas bases, los fenotipos son clasificados en Fe-eficientes y Fe-ineficientes o resistentes y susceptibles a la clorosis férrica (Cianzio *et al.*, 1979).

2.1 Caracterización de la clorosis férrica

Clorosis significa falta de clorofila en un órgano vegetal, que se traduce en pérdida del color verde. La deficiencia de Fe es la sintomatología más fácil de reconocer de las provocadas por otros micronutrientes ya que produce un tipo de clorosis realmente característica. La clorosis de las hojas provocada por una deficiencia de Fe, conocida como clorosis férrica, cuando es ligera, se nota un color pálido en las hojas jóvenes de los brotes. En el estado siguiente se manifiesta como un amarillamiento internerval de las hojas probablemente porque la concentración de Fe en las nervaduras es más elevada. Las hojas jóvenes son las más afectadas, dado que el Fe no se desplaza de las hojas viejas (Martínez, 1995). En un estado más severo las nervaduras más finas se vuelven cloróticas, seguidas de las nervaduras más gruesas hasta que toda la hoja queda totalmente clorótica.

Además, como consecuencia de la deficiencia de Fe, se presentan algunos cambios morfológicos y fisiológicos (Bertamini y Nedunchezian, 2005). Conforme incrementa la deficiencia de Fe, el contenido de proteína por hoja, el volumen de células foliares, el número de células por unidad de área o el número de cloroplastos por célula permanecen sin afectación, mientras que el tamaño de los cloroplastos y su contenido proteico disminuyen (Terry, 1983). Sólo con deficiencia severa, se detiene la división celular en los meristemas y se inhibe la producción de primordios foliares en los ápices del brote y de este modo se reduce el crecimiento foliar (Bienfait, 1988).

Cuando el efecto de la deficiencia de Fe es considerado a nivel ultraestructural, es evidente la disminución de membranas de los tilacoides por cloroplasto, mientras que otros organelos que contienen Fe, como mitocondria y peroxisoma, no son afectados (Platt-Aloia *et al.*, 1983). En las membranas tilacoidales, específicamente en la cadena de transporte de electrones están involucrados directamente cerca de 20 átomos de Fe por unidad de fotosistema II (FSII) y fotosistema I (FSI). Este alto requerimiento de Fe para la integridad estructural y funcional de las membranas tilacoidales, y el requerimiento adicional de Fe para la ferredoxina y la biosíntesis de clorofila explican la alta sensibilidad a la deficiencia de Fe de los cloroplastos en general y de los tilacoides en particular (Marschner, 1995).

Maldonado-Torres *et al.* (2006) reportaron que, en hojas de limón mexicano, al incrementarse el grado de clorosis férrica, los cloroplastos mostraron ultraestructura desorganizada, tilacoides desordenadamente apilados y poco desarrollo del grana; además, se afectó significativamente el grosor de los parénquimas de empalizada y esponjoso, así como las dimensiones de las células. En hojas de todas las especies, el principal daño de la deficiencia de Fe se localiza en el cloroplasto. Sin embargo, para las raíces, los cambios morfológicos y fisiológicos causados por la falta de Fe dependen de la especie vegetal (Estrategia I y II) y de su eficiencia para hacer frente a este problema (Marschner, 1995).

En las dicotiledóneas y monocotiledóneas (excepto gramíneas) se provocan cambios como inhibición de la elongación, engrosamiento de los ápices radicales, por la formación de células transfer y formación de abundantes pelos radicales (Marschner y Römheld, 1995). En algunas especies dicotiledóneas, anuales y perennes, se ha observado la formación de raíces proteoides no sólo en respuesta a la deficiencia de fósforo sino también a la deficiencia de Fe. Las raíces proteoides son caracterizadas por su capacidad particularmente alta para reducir Fe^{3+} y excretar protones. Estas propiedades de las raíces proteoides son similares a las de las células transfer de las zonas apicales (Rosenfield *et al.*, 1991). Otra característica de las plantas deficientes de Fe es la acumulación de ácidos orgánicos en la raíz, probablemente por disminución de la actividad de la enzima aconitasa, que cataliza la transformación de citrato en isocitrato y, por consiguiente, mal funcionamiento del ciclo de Krebs (Martínez, 1995). Un exceso de Mo, Cu, Zn o Ni produce efectos similares a los de deficiencia de Fe, seguramente por competencia con los sitios receptores de las células.

El diagnóstico y valoración de la deficiencia de Fe puede llevarse a cabo por diferentes medios. Las opciones disponibles incluyen el análisis mineral de material vegetal (hojas, flores, yemas y madera), análisis foliar de clorofila y también algunos análisis bioquímicos que pueden estar relacionados de alguna manera con el status de Fe de la planta, como algunas enzimas que contienen Fe (Abadía *et al.*, 2004).

El diagnóstico visual puede ser complementado por la determinación del contenido de clorofila en hojas jóvenes. La mayoría de los investigadores que han trabajado con diferentes especies como *Beta vulgaris* (Abadía *et al.*, 1992), *Helianthus annuus* (Alcántara *et al.*, 1988), *Glycine max* (Cianzio *et al.*, 1979) y *Prunus* sp. (Shi y Byrne, 1995) han encontrado elevadas correlaciones positivas, entre el contenido de clorofila y los síntomas visuales. También suele determinarse la concentración de Fe total en hojas; sin embargo, este análisis no resulta definitivo ya que cuando las plantas desarrollan en campo, no siempre existe una relación entre el grado de clorosis y la concentración de Fe total foliar, en ocasiones, el contenido de Fe en las

hojas cloróticas es similar o incluso superior al de las hojas verdes con base en materia seca (Abadía, 1992). A este hecho, Römheld (2000) lo llamó paradoja de la clorosis (“chlorosis paradox”). Las mayores concentraciones de Fe en hojas jóvenes cloróticas que en hojas verdes, sugiere que parte del Fe tomado desde el suelo por la reductasa se inmoviliza y acumula como formas no disponibles o inactivas de Fe en alguna parte de la hoja (Abadía, 1992; Marschner, 1995).

La clorosis férrica modifica las composición mineral foliar de plantas Fe-deficientes respecto a plantas que desarrollan con un suministro adecuado de Fe, aunque el efecto difiere con la especie y condiciones de desarrollo del cultivo (Morales *et al.*, 1998). Tlatilpa (2006), encontró que líneas de frijol, tolerante y susceptible a clorosis férrica, presentaron una respuesta diferencial a este estrés. Sin suministro de Fe, la primera, incrementó la relación P/Mg y la concentración de P y K, mientras que la segunda, aumentó las relaciones N/P, B/P, Ca/P y disminuyó la concentración de P, K y B.

En hojas de limón mexicano, Maldonado-Torres *et al.* (2006) registraron un incremento en la concentración de K, así como una alta relación K/Ca cuando estuvieron deficientes en Fe. De igual manera, Belkhodja *et al.* (1998) reportaron en hojas de duraznero (*Prunus persica*), un incremento en la relación K/Ca y la consideran un buen parámetro para evaluar el estado nutrimental de Fe foliar (para las condiciones en que realizaron el estudio). Estos autores también observaron un incremento marcado en la concentración de K y ligero en la concentración de N, Mg y Mn, mientras que las concentraciones de P, Cu y Zn no fueron afectadas. Estos cambios fueron atribuidos a un incremento en la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática de las células de la raíz, involucrada en la excreción de H⁺, favoreciendo la absorción de K y la acumulación de ácidos orgánicos (málico y cítrico) que ocurren en órganos deficientes en Fe (Marschner, 1995). Köseoglu (1995) menciona que el incremento en la relación P/Fe es un indicador típico de deficiencia de Fe.

2.1.1 Causas de la clorosis férrica

Las causas que originan la clorosis férrica son múltiples y de distinta naturaleza. A continuación se describen los factores más importantes que provocan este desorden.

Disponibilidad de Fe en el suelo

A pesar de que en suelos calcáreos es frecuente la aparición de clorosis férrica (Sánchez-Andréu *et al.*, 1991), este hecho no se produce por que existan bajas concentraciones de Fe, ya que varios factores como pH, potencial redox, tipo de mineral al que está asociado el Fe, etc., hacen que la cantidad que permanece en disolución sea muy baja, inhibiendo en la planta tanto su absorción como incorporación en los procesos metabólicos (Marschner, 1995).

En la mayoría de los minerales primarios del suelo el Fe se encuentra como Fe(II), que durante la meteorización en medios aeróbicos precipita como óxidos e hidróxidos de Fe(III) muy insolubles. Este hecho provoca que en los suelos puedan coexistir óxidos e hidróxidos de Fe con distintas composiciones y grados de cristalización, así como de solubilidad, la cual está estrechamente relacionada con el pH del suelo, de manera que la solubilidad desciende 1000 veces por cada unidad que aumenta el pH, reduciendo la concentración de Fe soluble a niveles menores a 10^{-20} M para un valor de pH alrededor de 7.5 (Lindsay, 1991). En el rango de pH de 7.5 a 8.5 (característico de suelos calcáreos), la concentración aproximada de Fe es de $10^{-10.4}$ M, cantidad insuficiente para el óptimo crecimiento de las plantas que requieren 10^{-9} a 10^{-4} M de Fe soluble en el medio (Guerinot y Yi, 1994).

En suelos bien aireados con pH superior a 4, la cantidad de Fe en solución es menor al requerido por la mayoría de las plantas, lo cual provoca que en estos suelos se presenten síntomas de deficiencia de Fe (Römheld y Marschner, 1986). Dado que el Fe presenta dos estados de oxidación, el potencial redox es otro factor que influye en el contenido de este nutriente en solución (Lindsay y Schwab, 1982).

Concentración de bicarbonatos

El bicarbonato se produce como consecuencia de la disolución del CO₂ de acuerdo con la reacción siguiente: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. Altas concentraciones de bicarbonato en los suelos influyen en la biodisponibilidad del Fe provocando alteraciones en la planta como inhibición del crecimiento, metabolismo de las raíces, absorción del Fe y su translocación al resto de órganos, y los mecanismos de respuesta al estrés de Fe (Susín *et al.*, 1996).

Cuando el bicarbonato y el ácido carbónico se encuentran en la solución del suelo en concentraciones similares, se produce un efecto amortiguador. Como el pH está fuertemente tamponado, el bicarbonato neutraliza tanto los protones que existen en el medio como los liberados por la bomba de protones de la membrana plasmática de las raíces, lo que se traduce en un aumento del pH del apoplasto y del citoplasma radical (Romera *et al.*, 1992a) y en inhibición de la actividad reductasa férrica de la raíz, afectando con esto la absorción de Fe y contribuyendo a su inactivación dentro de la planta (Mengel y Geurtzen, 1986; Susín *et al.*, 1996). La precipitación podría tener lugar en el apoplasto de las hojas y raíces o en tejidos conductores de tallos y peciolo (Römheld, 2000).

Römheld (2000) y Toselli *et al.* (2000) consideraron la idea de que la concentración de Fe similar en hojas sanas y cloróticas era consecuencia del menor tamaño de las hojas con clorosis y no por inactivación del Fe. Sin embargo, los descensos en el contenido de clorofila, mientras aumentaba el contenido foliar de hierro, los llevaron a sugerir que el desarrollo de la clorosis estaba asociado con una inactivación del Fe en el apoplasto de la hoja. Una hipótesis propuesta para explicar la inactivación del Fe en las nervaduras de las hojas, es que ocurre una alcalinización del flujo apoplástico por efecto del contenido de HCO₃⁻ (Römheld, 2000), lo cual perjudica la reducción de Fe³⁺, un prerequisite para la absorción de Fe²⁺ por las células de la hoja (Brüggemann *et al.*, 1993, Kosegarten *et al.*, 1999). Análogo a la raíz, el pH en el apoplasto de las hojas es importante para la absorción de Fe (Mengel, 1994).

Mengel *et al.* (1994), observaron en girasol, una alta correlación entre el grado de clorosis férrica, indicada como concentración de clorofila en hojas y el pH del apoplasto. Por el contrario, en viña cultivada en hidroponía pura en la que la solución contenía 10 mM de carbonatos, Nikolic y Kastori (2000) determinaron que este ión indujo la aparición de clorosis férrica, dado que inhibió la absorción de Fe por las raíces, sin embargo, no se confirmó que hubiera inactivación del Fe en las hojas.

Nutrición nitrogenada

Además de los bicarbonatos, el tipo de nutrición nitrogenada también disminuye la eficiencia del Fe en las hojas (Abadía, 1992). Mengel *et al.* (1994) realizaron un estudio con girasol, el cual creció en solución nutritiva sin Fe, utilizando nitrato de amonio o nitrato de calcio como fuente de N. Las plantas que crecieron solo con nitrato desarrollaron síntomas típicos de clorosis férrica, mientras que las plantas que crecieron con nitrato de amonio tuvieron hojas verdes. Este efecto pudo deberse a que la nutrición a base de nitratos provoca niveles de pH alto en la superficie radical y en el apoplasto de la raíz, puesto que la absorción del nitrato se da por un cotransporte protón/nitrato a través de la membrana plasmática (Ullrich, 1991). No se conoce con exactitud el mecanismo por el que el nitrato induce deficiencias de Fe, pero se cree que en la rizosfera la reducción de nitrato a nitrito y amonio está favorecida termodinámicamente frente a la reducción de Fe(III) a Fe(II), el nitrato puede ser el aceptor final de los electrones liberados por la planta, impidiendo la reducción de Fe(III). También puede ocurrir que una vez se haya producido la reducción del Fe(III), el Fe(II) sea reoxidado por el nitrato presente en el medio. En ambos casos, la concentración de Fe(II) en la rizosfera disminuye, lo que se traduce en síntomas cloróticos. Además es importante considerar que la reducción de nitrato a nitrito consume dos protones del medio, dando lugar a un aumento del pH de la rizosfera y/o a la neutralización de los protones liberados por las raíces, lo que provocará disminución de la actividad reductasa radical y menor solubilidad del Fe en el suelo, creando situaciones de déficit de Fe para la planta (Lucena, 2000).

Presencia del ión fosfato

Parece ser que la clorosis férrica inducida por la presencia de P se agrava cuando el pH, potencial redox o la concentración de fosfato en el medio aumentan. El-Garabby y El-Razek (1982) encontraron que si se adicionaban altas cantidades de fertilizantes fosforados a un suelo calcáreo-arenoso, se producía un efecto antagonista del P sobre el Fe, es decir altas concentraciones de P disminuyen la absorción y movilización del Fe en el suelo, debido a la formación de fosfatos férricos insolubles o a la adsorción de los fosfatos sobre la superficie de los coloides férricos. Otro de los efectos por el que el P puede inducir la aparición de clorosis férrica, es que interfiere en el transporte interno de Fe en la planta debido a su precipitación en las hojas viejas como fosfatos de hierro insolubles (Rediski y Bibbulph, 1953), óxidos o a la formación de complejos con fitoferritina (Oh *et al.*, 1996). Por el contrario, Tiffin (1970) afirmó que el hecho de que el transporte de Fe en la planta se produzca en forma de complejo Fe-citrato, debe proteger a este nutrimento de la precipitación como fosfato.

Interacciones entre el hierro y otros nutrimentos

Las altas concentraciones de Cu, Zn, Cd y Ni en el medio, pueden afectar la respuesta de las plantas ante un estrés por Fe. Alcántara *et al.* (1994) encontraron que concentraciones superiores a 20 μM de Ni, 5 μM de Cu y 5 μM de Cd, inhibían considerablemente el funcionamiento de la reductasa férrica de la raíz en plántulas cloróticas de pepino (*Cucumis sativus* L.), mientras que el Mn, Zn, Pb y Mo tenían un efecto limitado incluso a concentraciones superiores a los 20 μM . La inhibición que presente esta enzima dependerá del cultivo y de las concentraciones en que se encuentren los metales en la solución del suelo. Estos iones también compiten en absorción con el Fe(II), así cuando el Zn está presente en altas concentraciones puede competir con el Fe^{2+} por las zonas de transporte o bien, producir una menor afinidad de dicho ión por los sistemas de transporte debido a que se producen alteraciones estructurales o bioquímicas (Zaharieva y Römheld, 2000).

Belkhodja *et al.* (1998) encontraron elevadas concentraciones de K en hojas y flores de durazneros deficientes en Fe y sugirieron que este aumento podía ser consecuencia del incremento de la actividad de las ATPasas implicadas en la secreción de protones de la membrana plasmática radical durante el crecimiento.

Baja concentración de materia orgánica

Una baja concentración de materia orgánica en el suelo (entre 1 a 2%), también puede ser otro de los factores que induzca la aparición de clorosis férrica, debido a que ésta, mejora la estructura del suelo, disminuye el pH y puede actuar como quelante del Fe. La asociación del Fe con los agentes quelantes de la materia orgánica del suelo da lugar a la formación de complejos que incrementan considerablemente la solubilidad, concentración y la movilidad del Fe (Cesco *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando se aplica materia orgánica fresca al suelo se puede producir, ya sea, aumento en la concentración de CO₂ que acabará transformándose en bicarbonato, incrementando su concentración en la solución del suelo (Mengel y Kirkby, 1987); o bien, en suelos compactos y húmedos, incremento en la concentración de etileno (Peret y Koblet, 1984), hormona que inhibe diversos procesos fisiológicos.

Humedad

En suelos encharcados se produce acumulación de CO₂ debido a la menor velocidad de difusión de los gases en el agua, con lo que tendría lugar por un lado, un aumento de la concentración de bicarbonato y por otro, de protones en solución que disminuiría el pH del suelo (Loeppert *et al.*, 1994).

Bajas temperaturas

Las bajas temperaturas disminuyen el desarrollo radical y por lo tanto, provocan reducción en la capacidad de absorción de Fe por la planta (Chaney, 1984). En un estudio sobre el proceso de absorción de Fe, Lahav y Turner (1984) encontraron que el máximo de absorción se producía por arriba de 37/30 °C (día/noche) y descendía hasta los 17/10 °C. En general, las causas que favorecen la presencia de clorosis férrica están relacionadas con el comportamiento del Fe en el sistema suelo-planta.

Salinidad

Todavía no se han descubierto los mecanismos de la clorosis férrica inducida por la salinidad; al parecer, altas concentraciones de NaCl pueden influir en la estabilidad de los quelatos de Fe (Nabhan *et al.*, 1977). El aumento de la fuerza iónica en los suelos con gran salinidad suele inhibir la movilización del Fe por el ácido caféico (Römheld y Marschner, 1986) y los fitosideróforos (Awad *et al.*, 1988). Aunque, también se considera que es poco probable que una fuerza iónica elevada inhiba la acción de la Fe(III)-reductasa y consecuentemente los procesos de transporte en la membrana (Römheld y Marschner, 1986). Altas concentraciones de Na en el suelo, suelen provocar dispersión de las arcillas, lo que se refleja en un deterioro de la estructura del suelo, relación suelo-agua y de la fase gaseosa, incrementando la susceptibilidad a la clorosis férrica.

2.2 Absorción y translocación de Fe de las raíces a las hojas

Las plantas necesitan de un aporte continuo de Fe para mantener un estado nutritivo adecuado, ya que este elemento no es fácilmente removilizado hacia los tejidos jóvenes (Mengel y Kirkby, 1987). En plantas superiores se considera que la absorción de Fe se realiza predominantemente por las raíces nuevas en crecimiento y a través de los pelos radicales (Chaney, 1984). La absorción se produce generalmente como Fe^{2+} ; sin embargo, en suelos bien aireados la forma predominante es el Fe^{3+} , por tanto, para la absorción de Fe bajo estas condiciones, es necesario que primero sea reducido en la membrana plasmática de la raíz por una reductasa férrica (Bienfait, 1985). Esta enzima es capaz de reducir aceptores externos de electrones de alto potencial, tales como el ferricianuro o el oxígeno, pero no compuestos de Fe quelado, debido a que éstos poseen potenciales redox más bajos.

En condiciones de deficiencia o baja disponibilidad de Fe en el medio, algunas plantas han desarrollado, a lo largo de la evolución, una serie de mecanismos para cubrir sus necesidades de este micronutriente; se trata de una característica

genética y aquellas que tienen la capacidad de hacer más disponible el Fe de la rizosfera para la absorción por las raíces y, además, de incrementar su disponibilidad en la planta son consideradas como “Fe-eficientes” (Römheld *et al.*, 1982; Marschner y Römheld, 1995). Las plantas que tienen menor capacidad de respuesta o prácticamente no existe, al desarrollarse con un bajo suministro de Fe, son usualmente llamadas “Fe-ineficientes” y presentan, como consecuencia, síntomas de clorosis (Abadía *et al.*, 2000a). Dentro de las plantas Fe-eficientes se considera que existen, por lo menos, dos mecanismos para la adquisición de Fe en condiciones de deficiencia (Figura 1) y que mejoran tanto la movilización de Fe en la rizosfera como su tasa de absorción (Charlson y Shoemaker, 2006) denominados Estrategia I y Estrategia II (Römheld, 1987).

2.2.1 Estrategia I

Este tipo de respuesta se observa en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, excepto gramíneas (Figura 1), las cuales solubilizan el Fe^{3+} para prevenir el estrés por deficiencia de Fe (EDF) (Römheld y Marschner, 1986). Durante el EDF, estas plantas incrementan la reducción de Fe^{3+} en la superficie radical (por inducción de una reductasa férrica a nivel de membrana plasmática), acidifican la rizosfera (excreción de protones) y liberan quelatos reductores (principalmente fenoles, flavinas y ácidos orgánicos) (Jolley *et al.*, 1996). Estas tres actividades fisiológicas son llamadas colectivamente respuesta al estrés de Fe (REF) y al parecer no son independientes, sino que es un mecanismo global cuya respuesta se ve afectada si alguna de ellas disminuye (Brown y Jolley, 1988). Las altas concentraciones de HCO_3^- contrarrestan las respuestas de las plantas de Estrategia I.

Aumento de la capacidad reductora de la membrana plasmática de la raíz

Estas especies inducen una reductasa férrica dependiente del pH, lo que provoca una disminución del pH en la rizosfera (González *et al.*, 1999) que solubiliza el Fe^{3+} y promueve su reducción a Fe^{2+} antes de atravesar la membrana celular (Bienfait, 1988).

Basado en datos de experimentos con raíces intactas, Bienfait (1985) propuso un modelo con dos tipos de sistemas reductores de la membrana plasmática: el sistema “estándar” y el sistema “turbo” (Bienfait, 1988; Chaney y Bell, 1987). El sistema estándar puede reducir Fe^{3+} con un aceptor de electrones externo mediante un potencial redox alto como ferricianida (FECD) (+360 mV) y posiblemente con oxígeno (+820 mV), que puede ser el aceptor natural de electrones. Este sistema es constitutivo en todas las plantas y no reduce quelatos férricos, los cuales muestran potenciales redox bajos (+100 a +250 mV). La función biológica de este sistema parece que no es la absorción de Fe, sino la modulación del potencial de membrana o producción de especies de oxígeno altamente activo (Moog y Brüggemann, 1994) y es capaz de reducir únicamente a la FECD.

El sistema turbo se activa en condiciones de deficiencia de Fe en la epidermis de raíces jóvenes; es una enzima transmembranal (FC-R) capaz de reducir el Fe quelado con electrones provenientes del NADPH citoplasmático, lo que no es posible mediante la reductasa estándar (Moog y Brüggemann, 1994; Susín *et al.*, 1996). Este sistema es utilizado por la mayoría de las plantas (excepto gramíneas que carecen del sistema turbo) para adquirir Fe soluble, no mostrando relación aparente con la absorción de otros cationes como el Zn y Mn (Yi y Guerinot, 1996) y reduce tanto FECD como quelatos férricos. La FC-R, inducida por la deficiencia de Fe, sigue la cinética de Michaelis-Menten con un Km de 45 $\mu\text{mol Fe}^{3+}\text{-EDTA}$ y una Vmax de 42 $\text{nmol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Moog *et al.*, 1995).

El sistema turbo sigue la siguiente ruta: la excreción de protones es acoplada al citrato, éste es isomerizado a isocitrato, el cual reduce al NADP; el NADPH dona electrones directa o indirectamente al sistema turbo en la membrana plasmática de las células epidérmicas (Bienfait, 1996). La activación de la reductasa turbo hace que la capacidad reductora de las raíces en situación de deficiencia de Fe, aumente hasta 20 veces con respecto al testigo (Moog y Brüggeman, 1994).

Disminución del pH de la rizosfera

Este efecto es debido a la inducción de una bomba de H^+ , que depende del ATP de la membrana plasmática (Toulon *et al.*, 1992). La capacidad que tiene la ATPasa para bajar el pH de la rizosfera y facilitar la solubilidad del Fe, está restringida a los ápices radicales (Landsberg, 1986).

Por lo general, esta acidificación de la rizosfera en respuesta a la deficiencia de hierro va a depender del balance en la absorción catión/anión y del metabolismo del N (Marschner *et al.*, 1986). Al aumentar la capacidad de excretar protones, se produce una disminución del pH, con lo que se consigue un aumento de la solubilidad del Fe presente en el suelo y de la actividad turbo reductasa, dado que esta enzima alcanza su máxima actividad a pH 6.5 (Holden *et al.*, 1991), de manera que la mejora en la excreción de protones por la ATPasa es importante para una eficaz reducción de Fe^{3+} . Jolley *et al.* (1988) destacan el papel del K^+ en el funcionamiento de la bomba de protones. Así, plantas de tomate y soya no son capaces de responder al estrés férrico en ausencia de K^+ , ni sustituyendo este ión por Na^+ o Rb^+ . Al parecer el K es un estimulador específico de la ATPasa.

Liberación de otros reductores y/o quelantes

Chaney y Bell (1987) observaron que cuando la concentración de Fe en el medio es suficiente para la planta, la liberación de reductores es escasa, mientras que en plantas sometidas a estrés férrico la liberación de éstos se favorece. Brown y Jolley (1988) encontraron que en plantas de tomate sometidas a estrés férrico, se produce un aumento de sustancias reductoras en el medio. En algunos casos, la disminución del pH de la rizosfera está asociada con un incremento en la liberación de ácidos orgánicos por las raíces, principalmente ácido cítrico y oxálico, potentes quelantes del Fe (Tyler y Ström, 1995). Por otro lado, Welkie y Miller (1993) mencionan que no sólo se aumenta la concentración de ácidos orgánicos en la rizosfera sino también en el resto de la planta.

Modificaciones de la morfología de la raíz

Las plantas de Estrategia I también pueden producir cambios morfológicos en la raíz. A nivel macroscópico se produce un engrosamiento de las zonas subapicales y la aparición de pelos radicales, para aumentar la superficie de adsorción (Welkie y Miller, 1993). Microscópicamente se ha observado la formación de células “transfer” en la epidermis de la zona de engrosamiento, que tienen por función incrementar la superficie de contacto entre pared celular y citoplasma (Landsberg, 1994; Schmidt y Bartels, 1996). Las células transfer contienen gran cantidad de mitocondrias que realizan alta actividad respiratoria para generar la energía necesaria para el transporte iónico durante la excreción de protones (Landsberg, 1994).

2.2.2 Estrategia II

Este tipo de respuesta lo desarrollan las gramíneas ante situaciones de deficiencia de Fe (Figura 1). Es un mecanismo más eficaz que la Estrategia I, ya que en ocasiones las plantas no llegan a presentar ningún síntoma de clorosis férrica. Durante el EDF, las gramíneas incrementan la producción y secreción de compuestos quelantes de Fe de bajo peso molecular (aminoácidos no proteicos) llamados fitosideróforos (Marschner *et al.*, 1987), los cuales incluyen NA, ácido 2'-deoximuginéico, ácido muginéico y ácido 3-(epi)hidroximuginéico (Römheld y Marschner, 1990) que solubilizan el Fe^{3+} formando complejos Fe(III)-fitosideróforo muy estables. La liberación de fitosideróforos se correlaciona positivamente con diferencias genotípicas en la resistencia a clorosis férrica.

Fitosideróforos como el ácido muginéico, forman complejos muy estables con el Fe(III) pero no con el Fe(II) (Takagi *et al.*, 1984). En la membrana plasmática de las células radicales de las gramíneas está presente, como un segundo componente de la Estrategia II, un sistema de transporte altamente específico para los complejos Fe(III)-fitosideróforo, que los transfiere al citoplasma (Römheld y Marschner, 1990).

Se sabe que estos aminoácidos no proteicos acarrean también otros cationes como el Zn, Mn y Cu (Bienfait, 1988; Römheld, 1991), pero el transportador en la membrana plasmática sólo tiene baja afinidad por los correspondientes complejos. Bajo deficiencia de Fe no sólo aumenta la liberación de fitosideróforos sino también la velocidad de absorción del complejo Fe(III)-fitosideróforo, indicando una mayor capacidad de transporte debido tanto a un incremento en el número como en la velocidad de recambio del transportador (Marschner, 1995). Para la biosíntesis de los fitosideróforos la metionina es el precursor común y la NA un intermediario (Shojima *et al.*, 1990).

Metionina \Rightarrow Nicotinamina \Rightarrow Ác. 2-desoximugineico \Rightarrow Ác. mugineico \Rightarrow Ác. 3-hidroximugineico

El ciclo de la síntesis de la metionina presenta una gran activación en las raíces de las plantas deficientes en Fe por la demanda de metionina para la síntesis de fitosideróforos.

Aunque las gramíneas manifiestan la Estrategia II para adquisición de Fe, existen evidencias que también expresan fisiología de Estrategia I. Por ejemplo, varios reportes indican que cebada, maíz, arroz y sorgo reducen Fe^{3+} en la superficie radical, acidifican la rizosfera y/o secretan reductores de Fe, aunque a niveles más bajos que las dicotiledóneas. Sin embargo, estas actividades de REF no se inducen bajo EDF (Kannan, 1980; Fleming y Foy, 1982; Boone *et al.*, 1983; von Wiren *et al.*, 1993). El reciente descubrimiento de un transportador de Fe^{2+} localizado en las raíces de arroz (Bughio *et al.*, 2002) sugiere que las gramíneas poseen genes para realizar la Estrategia I. Inversamente, las dicotiledóneas podrían poseer genes de Estrategia II. Si bien, la secreción de fitosideróforos no ha sido reportada para dicotiledóneas y monocotiledóneas (no gramíneas), la existencia de homólogos de NA y YS1 en *Arabidopsis thaliana* sugieren que plantas de Estrategia I podrían expresar algunos genes comunes para la síntesis de fitosideróforos (Suzuki *et al.*, 1999; Varotto *et al.*, 2002).

Römheld (1991) propone una separación física de la raíz en zonas que liberan fitosideróforos y zonas en las que se absorben Fe(III)-fitosideróforos. En estas zonas existiría una intensa colonización de bacterias que protegerían a los fitosideróforos de la degradación por los microorganismos y de la competencia por el Fe con los sideróforos.

Sistema de transporte Fe(III)-fitosideróforos

El transporte de los quelatos Fe(III)-fitosideróforos a través de la membrana celular se produce mediante una proteína específica, eludiendo el paso de la reducción del Fe(III) a Fe(II). La presencia de BPDS (agente quelante de Fe^{2+}) no inhibe la adsorción de Fe en gramíneas (Blaylock *et al.*, 1989), lo que demuestra que el transporte se produce en forma de Fe(III)-fitosideróforo. La translocación del Fe en plantas de arroz a las que se ha suministrado Fe(III)-fitosideróforo, es superior a la observada cuando se abastecen con Fe(III)-EDTA (Takagi *et al.*, 1984), confirmando así que el sistema de transporte de Fe(III)-fitosideróforo es altamente selectivo.

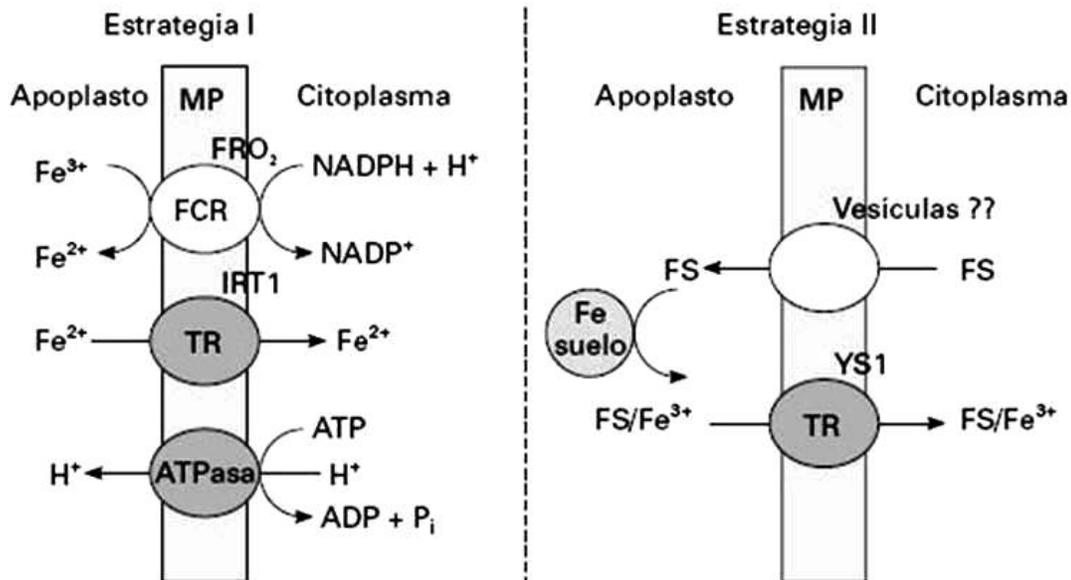


Figura 1. Modelos de absorción del Fe por las raíces de las plantas que desarrollan las Estrategias I y II en condiciones de deficiencia de Fe.

2.3 Distribución de Fe en los tejidos

El recorrido del Fe desde la raíz hasta las células de las hojas tiene varias etapas críticas que podrían inducir la aparición de clorosis férrica. La primera es que, como ya se mencionó, para que las plantas tomen el Fe de la solución del suelo es necesario que realicen la reducción de Fe(III) a Fe(II) en la membrana plasmática de las células radicales. Una vez que se ha producido la reducción de Fe(III) a Fe(II), el ión ferroso se transporta vía simplasto a través de la membrana plasmática mediante transportadores específicos (Fox y Guerinot, 1998), al parecer en forma de Fe(II)-nicotinamida (Stephan, 2002). En el simplasto del sistema radical, el Fe(II) se oxida a Fe(III). El transporte a las partes superiores de la planta se realiza principalmente vía xilema. Se cree que sigue la dirección del flujo de masas, creado y mantenido por la transpiración. Parece razonable que debido al elevado valor del pH fisiológico que presenta la planta ante situaciones que provocan la clorosis, la movilidad del ión Fe(III) sea baja. Por tal motivo, el Fe se transporta mayormente por el xilema en forma férrica quelatado por el anión citrato, concretamente como dicitrato ($\text{Fe}_2\text{Cit}_2^-$) (Tiffin, 1970; Mengel y Kirkby, 1987). El dicitrato- Fe^{3+} después de su transporte por el xilema, llega a las hojas y requiere nuevamente ser reducido de Fe^{3+} a Fe^{2+} en la membrana plasmática de las células foliares, pasa al floema y en el citoplasma de este tejido es acomplejado por nicotinamina (NA) para su distribución vía citoplásmica a los sitios de demanda (Stephan y Scholz, 1993). White *et al.* (1981) propusieron un modelo en el que se predecía que todo el Fe presente en el xilema estaba en forma Fe(III)-citrato; sin embargo, no quedó clara la naturaleza molecular del complejo Fe-citrato.

Estudios usando ^{59}Fe -citrato y ^{14}C -Fe-citrato sugieren que la absorción de Fe por células del mesófilo dependen de una reducción obligatoria de iones férricos, similar a la situación que se presenta en raíces (Brüggeman *et al.*, 1993). La reducción de citrato- Fe^{3+} puede ser mediada por una quelato reductasa férrica (FC-R) situada en la membrana plasmática de la hoja, probablemente, ayudada por la formación de radicales superóxido (Brüggeman *et al.*, 1993; De la Guardia y Alcántara, 1996). Este

proceso de reducción de Fe es dependiente de la luz y parece que es capaz de usar como sustratos quelatos de Fe artificiales [Fe(III)-EDTA] y naturales [Fe(III)-citrato y Fe(III)-malato]. La actividad FC-R de las células del mesófilo de las hojas, a diferencia de lo que ocurre en raíces, no se favorece por la deficiencia de Fe. El pH óptimo se encuentra de 5.5-6.0, típico del espacio apoplástico; a valores mayores la actividad disminuye marcadamente tanto en protoplastos Fe-deficientes como Fe-suficientes (Abadía *et al.*, 2002). Esta dependencia del pH representa otra etapa crítica que podría inducir a la aparición de clorosis férrica. Aunque el transporte se realiza principalmente vía xilema, Maas *et al.* (1988) encontraron Fe en savia del floema, aunque parece que su capacidad para transportar este ión está relacionada con la respuesta de las plantas a la falta de Fe, pues la concentración de Fe en el floema fue mayor en plantas deficientes que en plantas normales.

Las raíces no son el único órgano que presenta respuesta ante la deficiencia de Fe, ya que en plantas de remolacha con clorosis férrica se observó que la aplicación foliar de Fe-EDTA incrementó el contenido de Fe en las raíces y disminución en la respuesta de este órgano a la deficiencia de Fe (Maas *et al.*, 1988).

2.4 Funciones del Fe en las plantas

El Fe es un elemento esencial para la vida de las plantas, por lo que no pueden realizar su ciclo vital en su ausencia, ya que está involucrado en el metabolismo de las plantas como fotosíntesis, respiración y asimilación de nitrógeno (Marschner, 1995); desarrolla un importante papel como componente de enzimas involucradas en la transferencia de electrones (reacciones redox), como los citocromos, donde es oxidado reversiblemente de Fe^{2+} a Fe^{3+} (Briat *et al.*, 1995; Taiz y Zeiger, 2006). Además, es requerido en otros procesos, como la reducción de sulfato y eliminación del peróxido de hidrógeno (Marschner, 1995).

La importancia del Fe en la fotosíntesis, no es sólo por su acción en la síntesis de clorofila (Miller *et al.*, 1984) sino también por su influencia en la morfología de los cloroplastos (Terry y Abadía, 1986). En las plantas, la mayor parte del Fe se encuentra en forma de fosfoproteína denominada fitoferritina, la cual constituye en las hojas una reserva de Fe dentro de los cloroplastos y para las necesidades de la fotosíntesis. Hasta un 80% de fitoferritina ha sido determinada en los cloroplastos (Loué, 1988). Aproximadamente un 63% del Fe presente en las hojas se encuentra formando parte o unido a proteínas, que de acuerdo con Miller *et al.* (1984), se distribuye de la siguiente manera:

- a) Proteínas con grupos hemo, tales como citocromos, nitrato y nitrito reductasa, sulfito reductasa, peroxidasa y catalasa. Representan aproximadamente un 9% del Fe en las hojas.
- b) Ferritina, se encuentra almacenada en plastos y cloroplastos como proteína de almacenamiento para evitar toxicidad. Representa aproximadamente el 35-80% del Fe en las hojas.
- c) Proteínas sin grupos hemo, como la ferredoxina, aconitasa, nitrogenasa, nitrito reductasa, sulfito reductasa y otros complejos tilacoidales y mitocondriales. Suponen aproximadamente el 19% del Fe en las hojas.

El Fe participa en diversos niveles en la cadena de transporte de electrones en el cloroplasto (Figura 2) y en la mitocondria (Loué, 1988), donde forma parte de diversos componentes como la ferredoxina, citocromos, etc.

Además, también actúa como cofactor de la biosíntesis de clorofila (Miller *et al.*, 1984). Tanto el Fe como el Mg desempeñan un papel clave en la síntesis de la molécula de clorofila. A partir de la protoporfirina se encuentra al Fe como constituyente del grupo hemo en los sistemas redox, pero no de la clorofila (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

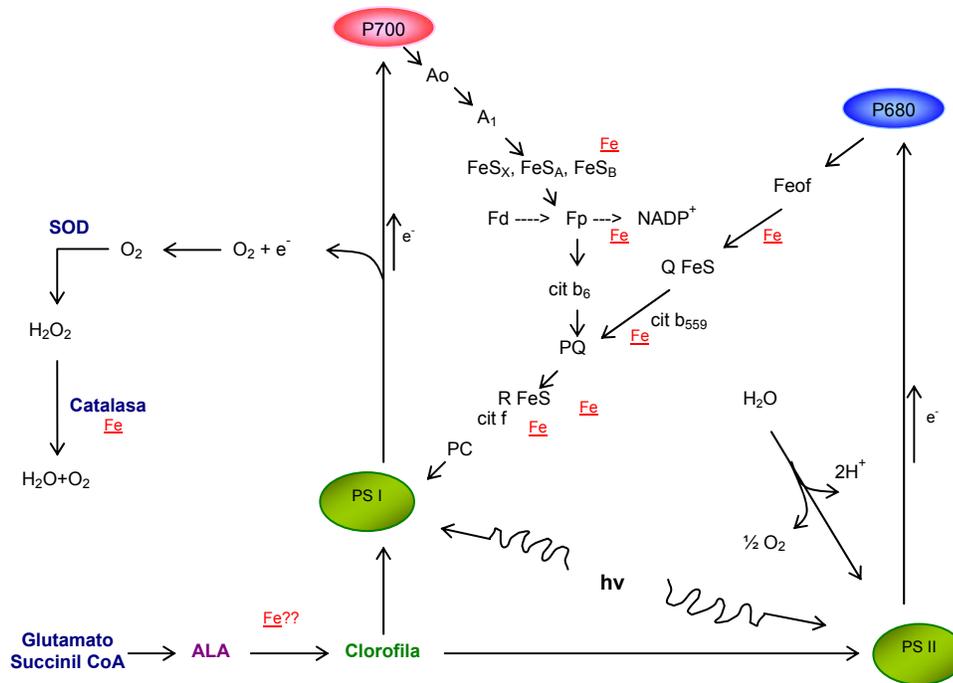


Figura 2. Papel del Fe en la fotosíntesis. ALA: ácido δ -aminolevulínico; SOD: superóxido dismutasa; FeS: centros ferrosulfurados; Fd: ferredoxina; Fp: ferredoxina NADP reductasa; cit: citocromo; RFeS: centro de Rieske; PC: plastocianina; QFeS: quinona; Feof: feofitina.

El Fe interviene en la respiración en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, formando parte de los citocromos y de los complejos mitocondriales en los que también hay otros componentes ferrosulfurados (Miller *et al.*, 1984; Lehninger, 1991). En el ciclo de Krebs, el Fe forma parte de la aconitasa, enzima que cataliza la transformación de citrato a isocitrato (Salisbury y Ross, 1994; Marschner, 1995).

El Fe interviene en el proceso de fijación de nitrógeno, al formar parte de la nitrogenasa, leghemoglobina y ferredoxina; en la reducción de nitrato a nitrito (reacción catalizada por la nitrato reductasa en el citoplasma), donde la ferredoxina interviene en la reducción del NADH, además de proporcionar electrones a la nitrato reductasa para la reducción de nitrito a amonio (que ocurre en los cloroplastos y es catalizada por la nitrito reductasa) (Miller *et al.*, 1984); en la reducción del sulfato, el Fe interviene al formar parte de la sulfito reductasa y en la eliminación del peróxido de hidrógeno al formar parte de las peroxidasa y catalasas.

Cuando las plantas se encuentran sometidas a deficiencia de Fe disminuyen, por lo general, la actividad de algunas enzimas que lo necesitan para su funcionamiento, tales como la citocromo oxidasa, nitrato reductasa, peroxidasa y catalasa. Otras veces, aumentan la actividad de alguna de ellas, si bien esto sólo parece darse en los genotipos eficientes (Miller *et al.*, 1984).

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

- ❖ Estudiar algunos cambios anatómicos y fisiológicos en hojas jóvenes de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerante y susceptible a deficiencia de hierro y evaluar algunos cambios fisiológicos en la raíz, para identificar la respuesta diferencial que ocurre cuando ambas líneas de frijol se exponen a deficiencia de Fe.

Objetivos específicos

1. Evaluar en dos líneas de frijol sometidas a deficiencia de hierro, las alteraciones ocurridas a nivel de ultraestructura celular foliar.
2. Determinar el contenido de clorofila y evaluar la capacidad fotosintética en plantas de frijol deficientes en hierro.
3. Determinar los cambios en las concentraciones y relaciones nutrimentales foliares de dos líneas de frijol con diferente grado de afectación por clorosis férrica.
4. Evaluar en raíces de la línea tolerante y susceptible a clorosis férrica, la capacidad reductora de Fe, cambios en el pH a nivel rizosfera y acumulación de materia seca.

Hipótesis General

- ❖ La deficiencia de hierro modifica la morfología y fisiología de las líneas de frijol en estudio.

Hipótesis

1. La deficiencia de hierro promueve cambios en la estructura de los cloroplastos y en células foliares.
2. La deficiencia de hierro afecta el contenido de clorofila y la capacidad fotosintética de las plantas deficientes en hierro.
3. La deficiencia de hierro altera la concentración nutrimental y sus relaciones en hojas.
4. La respuesta fisiológica de raíces de las dos líneas de frijol se afecta en diferente grado con la deficiencia de hierro.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

En una investigación previa, Tlatilpa (2006) clasificó un grupo de 44 líneas de frijol en verdes (tolerantes) y cloróticas (susceptibles) de acuerdo con las lecturas SPAD obtenidas. Partiendo de esos resultados, en este estudio se utilizaron semillas de la línea más tolerante (496) y la más susceptible (33) a deficiencia de hierro; se germinaron en charolas de poliestireno con agrolita como sustrato. Cuando las plántulas presentaban el primer par de hojas simples completamente desarrolladas, se trasplantaron en recipientes de 1.5 L, que contenían solución nutritiva preparada con las siguientes concentraciones (me L^{-1}) de macronutrientes: 7 K^+ , 9 Ca^{+2} , 4 Mg^{+2} , 12 NO_3^- , 1 H_2PO_4 , 7 SO_4^{-2} y micronutrientes (mg L^{-1}): 0.62 Mn, 0.44 B, 0.11 Zn, 0.020 Cu, 0.48 Mo sugeridas por Steiner (1984).

El experimento se estableció en invernadero con luz natural. Los tratamientos se distribuyeron completamente al azar en arreglo factorial $2 \times 3 \times 2$, con cuatro repeticiones, donde los factores fueron dos líneas de frijol, tres suministros (0, 0.5 y 2 mg L^{-1}) de Fe-EDTA en la solución indicada anteriormente y dos niveles de pH (6.0 y 8.5), uno óptimo y otro alcalino para establecer una condición de baja disponibilidad de Fe (similar a la que se presenta en suelos calcáreos). La unidad experimental fue un recipiente de 1.5 L con dos plantas.

La solución nutritiva se cambió semanalmente y se aireó cada 2 h durante 15 minutos. El pH se ajustó cada tres días, adicionando H_2SO_4 o NaOH, de acuerdo al tratamiento. En estas condiciones, las plantas desarrollaron durante cuatro semanas. Al final del experimento se realizaron las siguientes determinaciones:

a) *Observaciones del mesófilo y anatomía del cloroplasto en microscopio.* Para la observación del mesófilo en el microscopio compuesto (Carl Zeiss) se muestreó el foliolo central de la hoja trifoliada completamente expandida más joven de la línea tolerante desarrollada en condiciones óptimas de Fe y pH, como testigo (verde), y de las dos líneas cuando crecieron sin Fe (cloróticas), como tratamientos

contrastantes para observar la anatomía del mesófilo. Se cortaron trozos de hoja de 10x10 mm, se fijaron con FAA (formaldehído al 10%, ácido acético 5%, isopropílico 52% y agua 33%) durante 12 h y posteriormente se lavaron con abundante agua durante 15 minutos. La deshidratación de la muestra se realizó en un cambiador automático de tejidos (Fisher Tissuamaton) con una serie gradual de alcohol isopropílico (30, 40, 50, 70, 90 y 100% de pureza) y una mezcla de alcohol isopropílico:xileno (75:25, 50:50, 25:75 y 0:100%), posteriormente se trató con parafina corriente y parafina pura a 60 °C, durante 8 h con cada una. Las secciones se montaron en un bloque de parafina pura y se cortaron en un micrótopo a un grosor de 10 µm. Los cortes obtenidos se fijaron con adhesivo de cromo y se desparafinaron con xileno al 100% y con alcohol isopropílico al 100, 70 y 50% de pureza. Finalmente, el contraste se realizó con safranina y verde fijo (Sass, 1968).

Para observar las alteraciones a nivel cloroplasto, en el microscopio electrónico de transmisión, se prepararon cortes de las mismas hojas (verdes y cloróticas) empleadas para el procedimiento anterior, de la siguiente manera: se cortaron fragmentos pequeños (<1.0 mm) de hojas y se sumergieron en glutaraldehído (3%) y amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.0 (Karnovsky, 1963) y se posfijaron durante 2 h con tetraóxido de osmio al 1%, repitiéndose el lavado con amortiguador de fosfatos 0.1 M a pH 7.0. El material se deshidrató con una serie gradual de alcohol etílico (30, 50, 70, 80, 96 y 100% de pureza). Finalmente, las muestras se incluyeron en resinas para su fijación y obtención de cortes. Las preparaciones se cortaron en secciones ultradelgadas con cuchillo de diamante, posteriormente, los cortes se contrastaron con acetato de uranilo al 4% (Reynolds, 1963).

- b) *Estimación del color verde de la hoja.* Las lecturas se realizaron en hojas jóvenes verdes y cloróticas de todos los tratamientos con un lector portátil SPAD-502, Minolta. Este instrumento analítico proporciona una estimación cuantitativa del color verde de la hoja. La mayor lectura indica mayor intensidad de color.

- c) *Tasa de fotosíntesis*. Se cuantificó por medio de un analizador de gases en infrarrojo (IRGA) LI-6200, LI-COR, Inc., Lincoln, sistema portátil que consta de una cámara en la que se encierra a la hoja y se cuantifica el intercambio gaseoso de ésta con el medio. De cada planta se seleccionó una hoja representativa, considerando que fueran similares en tamaño, recientemente maduras y sanas. Las evaluaciones se hicieron de las 11:00 a las 12:00 h.
- d) *Contenido foliar de elementos minerales*. Las hojas jóvenes una vez limpias y secas en la estufa, se molieron en un molino de acero inoxidable hasta pasar por malla 20. Para la determinación de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn, las muestras vegetales se digestaron con una mezcla diácida de ácido nítrico y perclórico en proporción 2:1. Las lecturas se obtuvieron por espectrofotometría AES-ICP, en un equipo Varian, Liberty II. Para la determinación de N total, el material se digestó con una mezcla de ácido sulfúrico y ácido salicílico; posteriormente se destiló por arrastre de vapor (Bremer, 1965).
- e) *Fe activo (Fe^{2+})*. Para esta determinación se muestrearon hojas jóvenes de plantas verdes y cloróticas, se colocaron en bolsas de polietileno para ser transportadas al laboratorio donde se lavaron abundantemente con agua corriente, con una solución de HCl 0.1 N y finalmente con agua destilada. El exceso de agua se eliminó con papel absorbente. Se pesaron 2 g de muestra fresca y se cortaron en pequeños trozos de 1 - 2 mm con tijeras de acero inoxidable. Los trozos se colocaron en frascos de vidrio, donde se les agregó 20 mL de una solución extractante de 1-10 Orto-fenantrolina al 15% (Katyál y Sharma, 1980), se taparon y se dejaron reposar durante 16 h en oscuridad. El contenido se filtró y se le determinó Fe^{2+} por medición de transmitancia a 510 nm en un espectrofotómetro SPECTRO 22RS. Para eliminar el error debido a la variación en el contenido de humedad, las muestras frescas, obtenidas del filtrado, se secaron en una estufa con circulación forzada de aire a 70 °C (hasta mantener peso constante).

- f) *Capacidad reductora*. Se determinó en 200 mg de materia fresca de segmentos de ápices de raíz en crecimiento activo, mediante su inmersión en 62 mL de una solución constituida por 50 mM de regulador MES (pH 6.3), 1.0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.8 mM de KNO_3 , 0.6 mM de MgSO_4 , 0.3 mM FeHEDTA y 0.2 mM de BPDS (ácido bathofenantrolinedisulfónico). La reacción se condujo en oscuridad durante 3 h a 33 °C en agitación. El Fe reducido se determinó mediante la formación del quelato $\text{Fe}(\text{BPDS})_3$ por medición de absorbancia a 536 nm en un espectrofotómetro SPECTRO 22RS (Manthey *et al.*, 1994).
- g) *pH de la solución nutritiva*. Durante la segunda semana, después de establecer el experimento, no se ajustó el pH de la solución nutritiva, con la finalidad de registrar el comportamiento del mismo en cada tratamiento. En la tercera y cuarta semana de duración del experimento, el pH se ajustó nuevamente cada tres días.
- h) *Materia seca*. Para esta determinación, las plantas se dividieron en vástago y raíz, las cuales se colocaron en una estufa con circulación de aire forzado a 70 °C durante 48 h y posteriormente se pesaron en una balanza semianalítica.

Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico SAS 9.1. Se realizó el análisis de varianza de los efectos factoriales de las variables consideradas y posteriormente se realizaron pruebas de comparación de medias (Tukey $p=0.05$).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Morfología de hojas afectadas por clorosis férrica

En la Figura 3 se muestra la apariencia de las hojas normales (A) y cloróticas (E, I) muestreadas, las variaciones en la estructura del mesófilo vistas en corte transversal, observadas en el microscopio compuesto e imágenes de los cloroplastos observados en el microscopio electrónico de transmisión. En el corte transversal de la hoja verde (B y C) se observan los parénquimas en palizada y esponjoso bien organizados y definidos, con abundantes cloroplastos de gran tamaño en comparación con las hojas cloróticas. La estructura interna de estos cloroplastos (D) es característica, la cual consta de un sistema de tilacoides (t) estrechamente apretados en pilas con forma de discos llamado grana (g) y los tilacoides estromáticos (te), que atraviesan el estroma (e) entre los grana interconectándolos (Esau, 1982). En la hoja clorótica de la línea tolerante (F y G) se presenta el mesófilo organizado pero, el parénquima esponjoso más compactado y con menos espacios intercelulares que en la hoja verde, con escasos cloroplastos, de menor tamaño. Variaciones morfológicas similares, asociadas con clorosis férrica, han sido descritas para hojas de durazno (Fernández *et al.*, 2008). En la hoja de la línea susceptible afectada por clorosis (J y K), el mesófilo se muestra desorganizado, con células de forma y tamaño irregular y con una aparente ausencia de cloroplastos. Estudios anteriores realizados por Spiller y Terry (1980) en plantas de remolacha con moderada clorosis férrica revelaron que la reducción de la actividad fotoquímica fue atribuida a la reducción del número de unidades fotosintéticas por superficie de área foliar. En las hojas cloróticas de las dos líneas, el grado de desarrollo de los tilacoides es escaso (H y L) y como consecuencia no hubo formación de grana. Resultados similares han sido reportados para hojas de remolacha azucarera donde la falta de Fe provocó una disminución significativa del número de membranas del tilacoide, pobre orientación laminar con muy poco o nada de grana, pero un gran estroma (Platt-Aloia *et al.*, 1983). En las membranas tilacoidales en la cadena de transporte de electrones están involucrados cerca de 20 átomos de Fe por unidad de FSI y FSII. Este alto requerimiento de Fe

para la integridad estructural y funcional de las membranas tilacoidales, y el requerimiento adicional de Fe para la ferredoxina y la biosíntesis de clorofila explican la alta sensibilidad a la deficiencia de Fe de los cloroplastos en general y de los tilacoides en particular (Marschner, 1995).

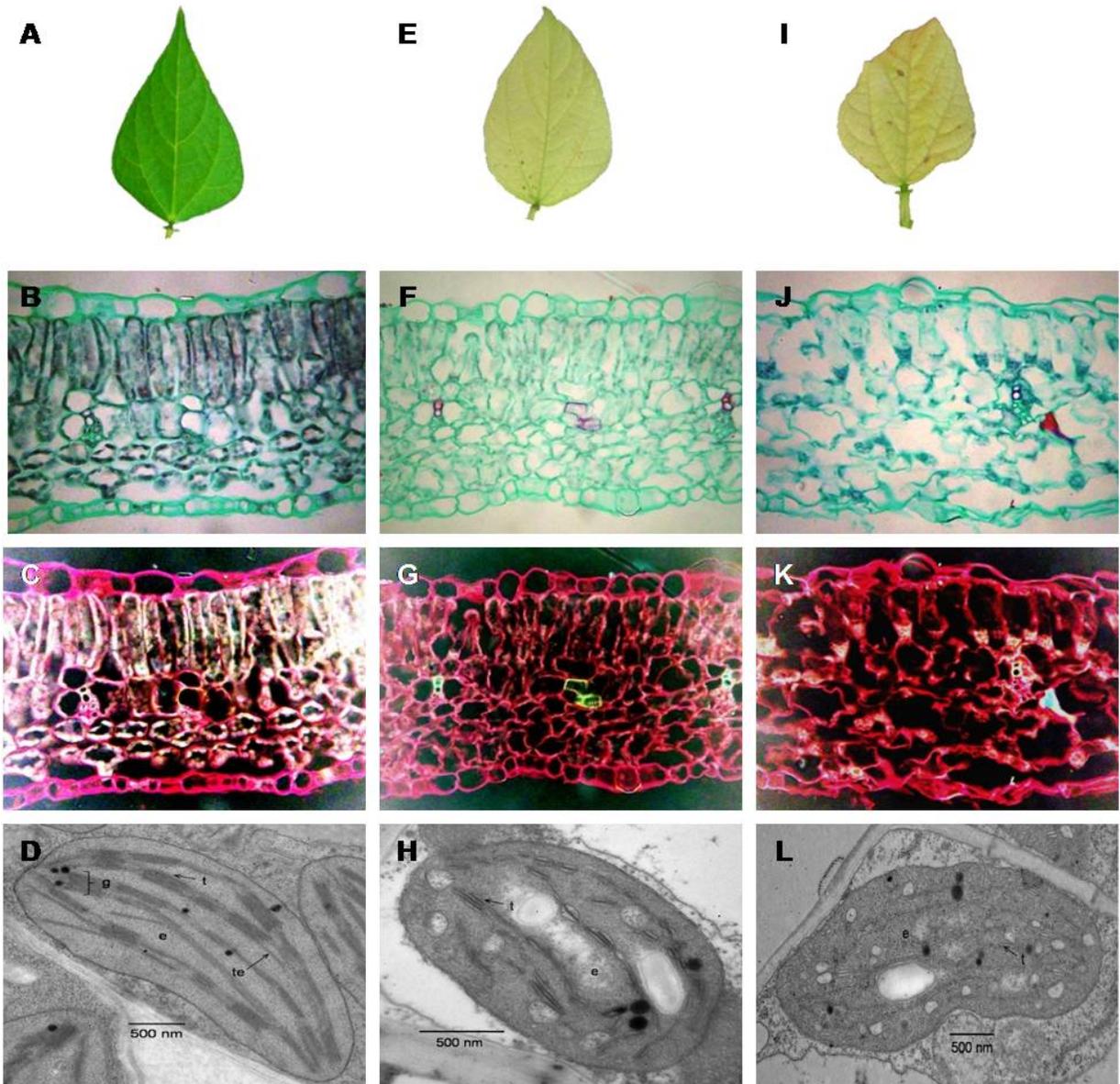


Figura 3. Apariencia, estructura interna y ultracelular de hojas verdes y cloróticas de líneas de frijol tolerante y susceptible a clorosis férrica. Aspecto de la hoja verde de la línea tolerante (A, B, C, D), con 2 mg L^{-1} de Fe en la solución, y hojas cloróticas de la línea tolerante (E, F, G, H) y susceptible (I, J, K, L) desarrolladas sin Fe. Sección transversal (B, F, J) e imagen negativa de la sección transversal (C, G, K) observadas en el microscopio compuesto y micrografías electrónicas de transmisión de la estructura de los cloroplastos (D, H, L).

El espesor de las hojas verdes y cloróticas de la línea tolerante fue de 0.15 y 0.14 mm, respectivamente, mientras que el de la línea susceptible fue de 0.19 mm, probablemente por la mayor porosidad y desorganización que se observó en la estructura interna y no por aumento en grosor de los parénquimas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Morales *et al.* (1998), quienes en un trabajo con hojas de pera y durazno Fe-suficientes y Fe-deficientes no encontraron diferencias significativas en el grosor de estas hojas; y con los resultados obtenidos por Fernández *et al.* (2008) en hojas de durazno verdes y cloróticas, que observaron cambios en la estructura interna de las hojas, no así en el espesor del mesófilo. Sin embargo, coinciden parcialmente con Maldonado-Torres *et al.* (2006), que un estudio con plantas Fe-suficientes y Fe-deficientes de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) observaron que la clorosis provocó cambios morfológicos a nivel celular y ultracelular, y que el espesor del mesófilo en las hojas cloróticas fue mayor que en las verdes, debido a un incremento en longitud y grosor de las células de parénquima en palizada y esponjoso.

El efecto de la deficiencia de Fe sobre el tamaño de los cloroplastos se presenta en la Figura 4, donde se observa que las medidas de largo y ancho de los cloroplastos de las dos líneas se afectaron significativamente cuando la solución nutritiva estuvo carente de Fe, con respecto a los cloroplastos del tratamiento con 2 mg L⁻¹ de Fe. El mayor efecto de la deficiencia de Fe ocurre sobre el tamaño de los cloroplastos y el contenido proteico de los mismos que sobre el número de células por unidad de área o el número de cloroplastos por célula. Aunque con deficiencia severa se inhibe la división celular y, de este modo, se reduce el crecimiento foliar (Terry y Abadía, 1986; Marschner, 1995).

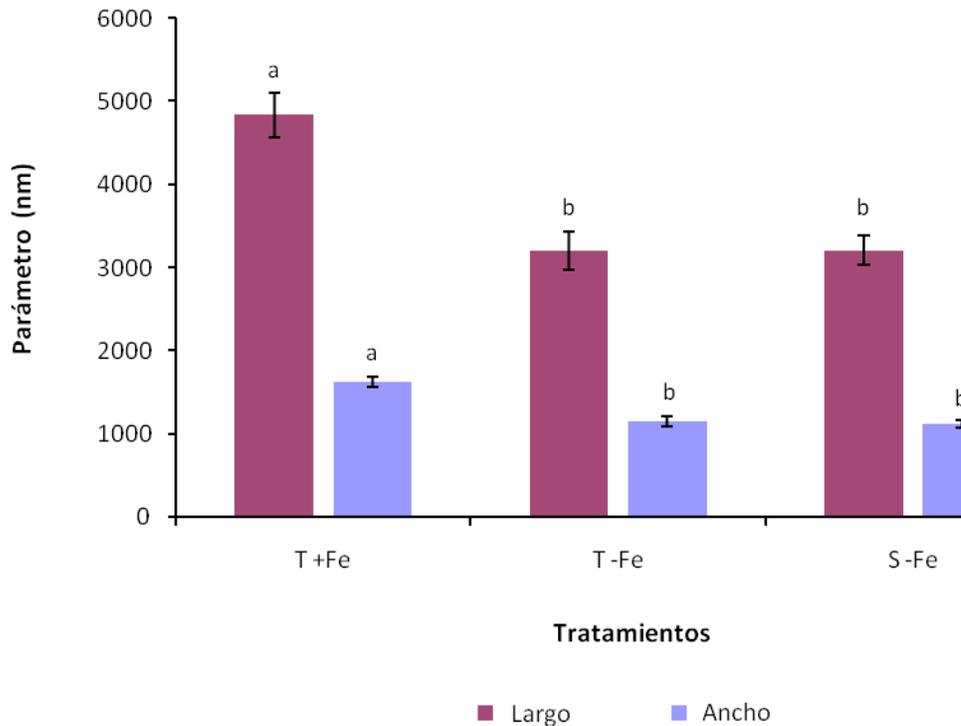


Figura 4. Dimensiones de los cloroplastos de líneas de frijol tolerante (T) y susceptible (S) desarrolladas en solución nutritiva sin (-Fe) y con 2 mg L⁻¹ de hierro (+Fe). Los valores representan la media de 15 determinaciones ± error estándar. Letras iguales sobre las barras de cada parámetro son estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$).

5.2 Coloración de la hoja y capacidad fotosintética

5.2.1 Lecturas SPAD (medida del color verde de la hoja)

En el Cuadro 1, se muestran las lecturas SPAD como respuesta de dos líneas de frijol, tres suministros de Fe y dos valores de pH en la solución nutritiva, determinadas en hojas jóvenes con diferentes grados de clorosis. Las mayores lecturas se presentaron en la línea tolerante, concentración de 2 mg L⁻¹ de Fe en la solución y en pH 6.0, en tanto que, en la línea susceptible, la concentración de 0 mg L⁻¹ de Fe y pH 8.5 se mostraron las lecturas SPAD más bajas, lo cual indica mayor clorosis (amarillamiento). El amarillamiento es debido a un enriquecimiento en los carotenoides, principalmente xantofilas (Marschner, 1995). La clorosis férrica puede ser causada por ausencia o suministro subóptimo de Fe (Marschner, 1995), o por

condiciones de pH alcalino donde la disponibilidad de Fe es baja (Guerinot y Yi, 1994; Álvarez-Fernández *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Lecturas SPAD en hojas jóvenes de frijol por efecto de líneas, suministro de Fe y pH en la solución.

Factores	Lectura SPAD [†]
Línea	
Tolerante	22.28 a
Susceptible	14.69 b
DMS	2.416
Fe (mg L⁻¹)	
2	32.013 a
0.5	21.731 b
0	1.713 c
DMS	3.566
pH	
6	20.454 a
8.5	16.517 b
DMS ^{††}	2.416

[†] Medias con la misma letra, dentro de la columna, son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

^{††} DMS: diferencia mínima significativa.

Ksouri *et al.* (2006) observaron en hojas de *Vitis vinifera* L., que los síntomas de clorosis aparecen tempranamente y con síntomas pronunciados cuando las plantas fueron sometidas a una deficiencia de Fe indirecta (solución nutritiva con un nivel óptimo de Fe + 10 mM de HCO₃⁻) que cuando crecieron en condiciones de deficiencia directa (solución con bajo nivel de Fe). La deficiencia directa no es tan severa como la indirecta, dado que, la primera va acompañada de una acidificación del medio, con lo cual se favorece la absorción de Fe, mientras en la segunda, los HCO₃⁻ mantienen un pH alto en el medio y neutralizan los iones H excretados por la bomba de protones de la raíz (Romera *et al.*, 1992b). Estos protones son necesarios para la movilización y solubilidad de los componentes férricos presentes (Ohwaki y Sugahar, 1997). El pH alcalino del medio afectará los principales mecanismos de respuesta de las plantas a la deficiencia de Fe: la liberación de H⁺ se inhibe al deteriorarse la bomba de protones (Römheld y Marschner, 1986).

Al considerar la interacción línea x Fe (Cuadro 2), las lecturas SPAD fueron mayores en plantas tolerantes que crecieron en solución con 2 mg L⁻¹ de Fe, mientras que, los valores fueron estadísticamente iguales cuando la línea tolerante creció con 0.5 mg L⁻¹ de Fe y la línea susceptible con 2 mg L⁻¹ de Fe. Estos resultados muestran que, cuando ambas líneas se desarrollaron con la misma concentración de Fe en el medio, la susceptible tuvo un mayor grado de clorosis, lo cual implica que es menos eficaz en la utilización del Fe. Las plantas tolerantes han desarrollado ciertos mecanismos de adaptación a la deficiencia de Fe, en tanto las susceptibles no responden o no lo hacen con la misma intensidad que las otras (Bertamini y Nedunchezian, 2005). En plantas de remolacha susceptibles a deficiencia de Fe, la concentración de clorofila en la hoja disminuye en mayor grado que en tolerantes (Campbell y Nishio, 2000).

Cuadro 2. Lecturas SPAD en hojas jóvenes de dos líneas de frijol desarrolladas con tres concentraciones de Fe en la solución nutritiva.

Fe (mg L ⁻¹)	Línea	Lectura SPAD [†]
0	Tolerante	2.46 d
0	Susceptible	0.96 d
0.5	Tolerante	28.18 b
0.5	Susceptible	15.36 c
2	Tolerante	36.27 a
2	Susceptible	27.75 b
DMS ^{††}		6.208

[†] Medias con la misma letra, dentro de la columna, son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

^{††} DMS: diferencia mínima significativa.

Los síntomas de clorosis fueron más pronunciados en ambas líneas, cuando no se suministró Fe en la solución, debido a que la deficiencia de Fe disminuye la concentración de pigmentos fotosintéticos (Ksouri *et al.*, 2006), por lo que las lecturas SPAD fueron menores. Aún cuando el Fe no forma parte de la molécula de clorofila, se considera esencial para su síntesis al formar parte de una molécula previa llamada protoclorofila (Marschner, 1995), por lo que, un inadecuado abastecimiento de Fe afecta de forma severa la biosíntesis y el mantenimiento de los niveles de clorofila. En hojas deficientes de Fe, declinan en el mismo grado los contenidos de clorofila y β -caroteno, mientras que ciertas xantofilas pueden aumentar (Terry y

Abadía, 1986; Morales *et al.*, 1990) presentándose así el amarillamiento típico de deficiencia de Fe. Este cambio en la composición de los pigmentos de los cloroplastos bajo deficiencia de Fe está probablemente relacionado con los cambios estructurales, ya que la mayoría de las xantofilas están localizadas en la envoltura del cloroplasto y no en los tilacoides (Marschner, 1995). Razeto y Valdés (2006) encontraron mayor concentración de clorofila, medida por el método SPAD, en árboles de nectarino con follaje normal, intermedia en los moderadamente cloróticos y menor en los severamente cloróticos, por lo cual consideran a este parámetro indirecto como un indicador preciso del nivel de clorosis férrica.

5.2.2 Fotosíntesis neta

La Figura 5 muestra el efecto que provocaron las concentraciones de Fe de la solución nutritiva en la tasa fotosintética de hojas jóvenes de frijol. En los tratamientos con 0.5 y 2 mg L⁻¹ de Fe la fotosíntesis neta fue estadísticamente igual, aunque se observa una tendencia a disminuir con el nivel subóptimo de Fe. Cuando las plantas crecieron en el medio sin Fe, la tasa de fijación de CO₂ fue menor y significativamente diferente a la registrada en los tratamientos con Fe. En hojas deficientes en Fe todos los pigmentos fotosintéticos y componentes de la cadena de transporte de electrones no disminuyen en el mismo grado. La actividad del FSI es más afectada que la del FSII, con el resuministro de Fe a hojas cloróticas, aumenta más la función del FSI, como transmisora de electrones, que la del FSII (Pushnik y Miller, 1989). Únicamente cuando la deficiencia es más severa, la actividad del FSII baja drásticamente y es más difícil restaurar (Morales *et al.*, 1991).

Terry y Abadía (1986) reportan que deficiencias extremas de Fe provocan reducción en el tamaño del follaje, en la capacidad de fijación y reducción de CO₂, además de efectos en la velocidad de transporte de electrones. Una baja en la concentración de clorofila no sólo tiene repercusión en la capacidad fotosintética sino también en una mayor absorción de luz por clorofila. La luz absorbida y no usada en la fotosíntesis puede llegar a foto-inhibir procesos y foto-oxidar compuestos (Abadía *et al.*, 2000b).

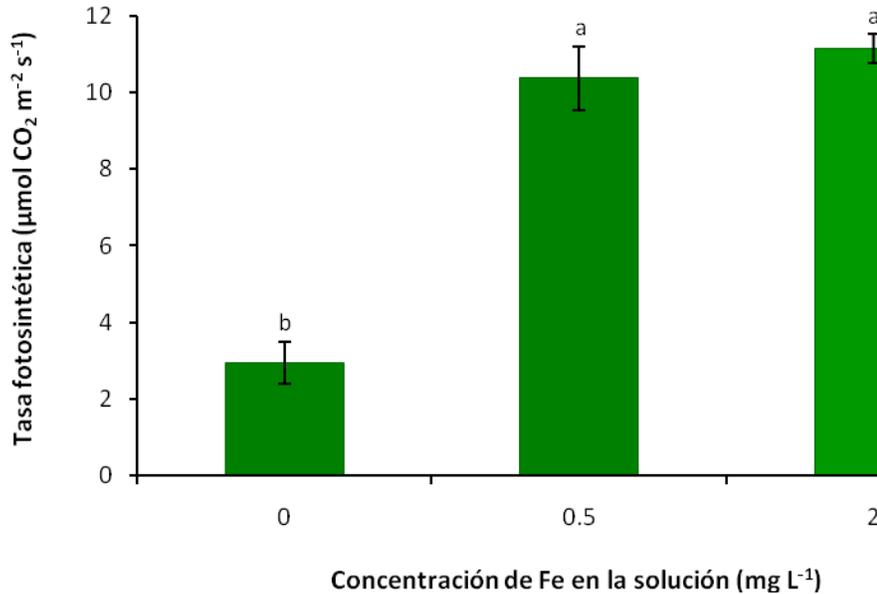


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de Fe en la solución nutritiva sobre la tasa fotosintética de hojas jóvenes de frijol. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n = 9, 8$ y 9 para $0, 0.5$ y 2 mg L^{-1} de Fe, respectivamente). Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$).

En la Figura 6 se muestra el efecto del pH de la solución sobre la tasa fotosintética de hojas jóvenes de frijol. En las plantas que crecieron en pH 8.5 se observó una disminución significativa de la fijación de CO_2 con respecto a las que crecieron en pH 6. En condiciones de pH alcalino, los cultivos presentan problemas de clorosis férrica, no por escasez de Fe total, sino debido a una deficiente disponibilidad de este elemento (Lindsay, 1984; Loeppert, 1986) provocada por la disminución de su solubilidad, inhibiendo en la planta tanto su absorción como incorporación en los procesos metabólicos (Marschner, 1995). Mengel y Malissiovas (1981) indicaron que la redistribución de Fe en la parte aérea puede ser fuertemente disminuida en suelos con altas concentraciones de HCO_3^- debido a que estos aniones originan un incremento en el pH del apoplasto de la hoja (6.2 -7.0). La falta de Fe en el follaje disminuye la estabilidad de la membrana de los tilacoides, la síntesis de clorofilas, carotenoides (carotenos y xantofilas) y la actividad de los fotosistemas, originando una merma significativa de la fotosíntesis neta (Römheld y Marschner, 1991).

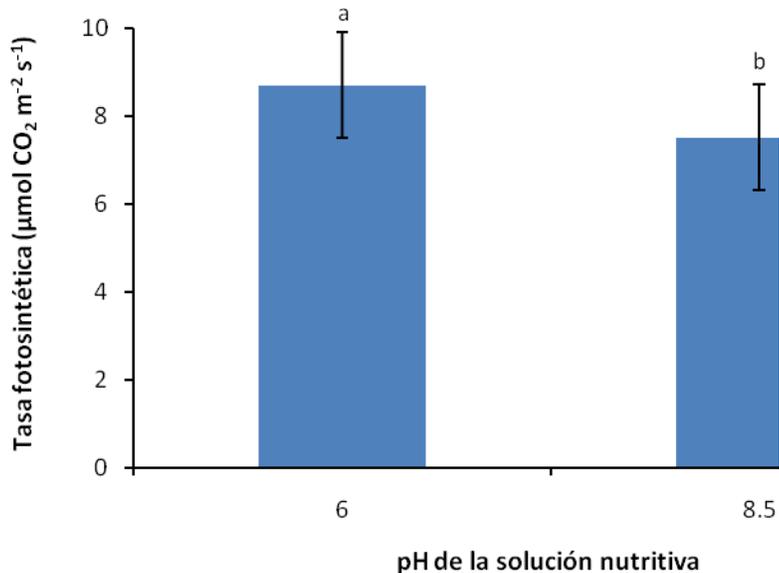


Figura 6. Efecto del pH de la solución nutritiva sobre la tasa fotosintética de hojas jóvenes de frijol. Los valores representan las medias \pm error estándar ($n = 12$ y 14 para pH 6 y 8.5, respectivamente). Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$).

El efecto de las interacciones Fe x línea y Fe x pH sobre la fijación de CO₂ en hojas jóvenes de frijol se presenta en el Cuadro 3. Los valores más altos de fotosíntesis neta se obtuvieron en las dos líneas de frijol cuando se agregaron 2 mg L⁻¹ de Fe a la solución nutritiva y únicamente en la línea tolerante cuando se suministraron 0.5 mg L⁻¹ de Fe; estos valores fueron estadísticamente superiores a la tasa fotosintética de la línea susceptible desarrollada con 0.5 mg L⁻¹ de Fe, lo cual puede ser indicador de la menor capacidad que mostraron estas plantas en la utilización del Fe. Sin suministro de Fe, la fotosíntesis neta de ambas líneas se afectó severamente, siendo los valores estadísticamente diferentes a los obtenidos con aplicación de Fe. En un estudio sobre el proceso de reverdecimiento de hojas severamente cloróticas, Pushnik y Miller (1989) encontraron en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que la actividad fotosintética mostró una fuerte interrelación con la concentración de clorofila, mientras que la respiración foliar permaneció sin afectarse por el estado del Fe. Para los autores, estas observaciones indicaron que la deficiencia de Fe de la hoja principalmente afecta la fisiología de los cloroplastos.

Cuadro 3. Interacciones de Fe con líneas de frijol y con pH en la tasa de fotosíntesis.

Fe	Línea	Tasa fotosintética [†]	Fe	pH	Tasa fotosintética [†]
mg L ⁻¹		($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	mg L ⁻¹		($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
2	Tolerante	11.80 a	2	6	11.58 a
2	Susceptible	10.62 ab	2	8.5	10.79 a
0.5	Tolerante	12.33 a	0.5	6	10.69 a
0.5	Susceptible	8.42 b	0.5	8.5	10.05 a
0	Tolerante	2.45 c	0	6	3.85 b
0	Susceptible	3.56 c	0	8.5	2.22 b

[†] Medias con la misma letra, dentro de las columnas, son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$)

El pH alcalino (8.5) no afectó la fotosíntesis neta de plantas que tuvieron Fe en el medio, de modo que estos datos fueron estadísticamente iguales a los de plantas desarrolladas con Fe y pH óptimo (6); sin embargo, cuando no se suministró Fe, la tasa fotosintética disminuyó significativamente, independiente del valor de pH de la solución, lo cual era de esperarse pues aún con pH 6 no hubo Fe disponible en el medio.

En general, dentro de los tres factores (línea, Fe y pH), el que afectó significativamente a la tasa fotosintética fue la falta de Fe en la solución, ya que en ausencia de este micronutriente, en las dos líneas de frijol (tolerante y susceptible) y en las dos condiciones de pH se presentó una menor fotosíntesis neta. Las hojas deficientes de Fe se caracterizan por tener bajos contenidos de almidón y azúcares, debidos al deterioro del transporte fotosintético de electrones, al bajo contenido de clorofila y ferredoxina, y la baja regeneración de ferredoxina reducida. Adicionalmente, la lenta regeneración del bisfosfato de ribulosa, que actúa como sustrato para el CO₂ en el ciclo de Calvin, contribuye al bajo contenido de carbohidratos. Esto es lo que podría limitar la fotosíntesis (Arulanathan *et al.*, 1990) y posiblemente explicar, en parte, la menor tasa de fijación de CO₂ por unidad de clorofila en hojas Fe-deficientes comparadas con hojas Fe-suficientes (Sharma y Sanwal, 1992).

5.3 Cambios en las concentraciones nutrimentales en hojas

5.3.1 Contenido foliar de elementos minerales

En el Cuadro 4 se presentan algunas concentraciones nutrimentales en hojas jóvenes de frijol. La comparación de medias entre líneas muestra que la tolerante tuvo mayor concentración de K, mientras que la susceptible mayor concentración de Ca, Cu y Zn. La mayor concentración de K puede atribuirse a que este elemento está involucrado en la función de dos enzimas asociadas con la actividad de respuesta al estrés por Fe, la ATPasa y la Fe^{3+} -reductasa, además con el simporte de H^+ y con la acumulación de citrato para el transporte de Fe (Marschner *et al.*, 1986) que presentan los fenotipos Fe-eficientes (Cianzio *et al.*, 1979). Aunque el impacto del K sobre la actividad de la Fe^{3+} -reductasa podría ser indirecto. Tagliavini y Rombolà (2001) hipotetizaron que la actividad y regulación de la ATPasa del plasmalema podría proveer niveles de pH apoplástico favorables y mejorar así la actividad Fe^{3+} -reductasa.

Welkie y Miller (1993), y Belkhodja *et al.* (1998) mostraron que las hojas afectadas por clorosis férrica no modifican su concentración de Ca, sino más bien se incrementa la absorción y acumulación de K. En cuanto a los micronutrientes, hay literalmente cientos de interacciones conocidas. Una de las más claramente definidas entre los mecanismos de respuesta al estrés por Fe es la interacción con Zn (Jolley *et al.*, 2004). Bajo deficiencia de Zn, una variedad de frijol (*Phaseolus vulgaris*) Zn-ineficiente activó dos de los tres mecanismos de respuesta al estrés por Fe e incrementó la absorción de Fe, acentuando más la deficiencia de Zn; mientras que la variedad Zn-eficiente minimizó la absorción de Fe, disminuyendo su actividad Fe^{3+} -reductasa, para prevenir de esta manera un desbalance Zn/Fe (Jolley y Brown, 1991). Un comportamiento similar ocurrió en este caso con deficiencia de Fe, donde la concentración de Zn de la línea tolerante (Fe-eficiente) fue menor y estadísticamente diferente a la concentración de la línea susceptible. De igual manera, en la línea susceptible se presentó mayor concentración de Cu que en la

tolerante. En estudios sobre la nutrición de tabaco en soluciones nutritivas, se observó una severa clorosis férrica inducida por el aumento de Cu; ésta se manifestó por una distribución anormal de Fe, con tres veces más Fe en las raíces de plantas ricas en Cu que en plantas normales en Cu (Kobayashi *et al.*, 2003).

Cuadro 4. Concentración nutrimental en hojas jóvenes de frijol por efecto de dos líneas, tres concentraciones de Fe (mg L^{-1}) y dos niveles de pH en la solución.

Factor	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
Línea [†]	----- mg g^{-1} -----					----- mg kg^{-1} -----			
T	37.54 a ^{††}	5.80 a	27.92 a	12.36 b	4.54 a	117.4 a	203.0 a	14.99 b	66.77 b
S	40.13 a	5.35 a	24.29 b	15.98 a	5.08 a	134.4 a	223.9 a	19.35 a	76.23 a
DMS [‡]	3.02	0.79	3.35	2.48	0.70	29.35	49.73	2.73	8.61
Hierro									
0	45.36 a	8.06 a	37.29 a	16.69 a	5.83 a	95.42 b	432.8 a	32.00 a	103.4 a
0.5	37.94 b	4.31 b	19.66 b	12.84 b	4.53 b	134.5 ab	111.4 b	10.45 b	55.14 b
2	33.19 c	4.36 b	21.35 b	12.97 b	4.06 b	147.7 a	96.18 b	9.07 b	55.97 b
DMS	4.45	1.16	4.94	3.67	1.04	43.32	73.40	4.03	12.71
pH									
6	38.83 a	5.50 a	26.21 a	14.25 a	4.61 a	142.1 a	192.8 a	19.32 a	76.05 a
8.5	38.83 a	5.65 a	25.99 a	14.09 a	5.01 a	109.6 b	234.2 a	15.03 b	66.95 b
DMS	3.02	0.79	3.35	2.48	0.70	29.35	49.73	2.73	8.61

[†] T: tolerante; S: susceptible.

^{††} Medias con la misma letra, dentro de la columna para cada factor, son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

[‡] DMS: diferencia mínima significativa.

Entre los tres niveles de Fe se observaron diferencias en la composición mineral foliar. La deficiencia de Fe extrema provocó significativamente mayores concentraciones de N, P, K, Ca, Mg, Mn, Cu y Zn, mientras que con un suministro bajo (0.5 me L^{-1}) o adecuado en Fe (2 me L^{-1}), desde luego, la concentración de Fe mostró un incremento conforme aumentó la concentración del mismo en la solución. La deficiencia de Fe estimula la acumulación de K (Welkie y Miller, 1993; Maldonado-Torres *et al.*, 2006), Mg (Belkhodja *et al.*, 1998), Mn (Alam *et al.*, 2001), Cu y Zn (Jolley *et al.*, 2004) en hojas jóvenes. La mayor concentración de N en plantas que crecieron sin Fe puede deberse, por una parte, a un efecto de dilución del N en el follaje ya que las plantas que tuvieron Fe desarrollaron mayor materia seca y por otra a una acumulación de nitratos como consecuencia de una menor actividad de la nitrato reductasa. En hojas deficientes en Fe se disminuye el contenido de ferredoxina, una proteína no hemo que actúa como transmisora de electrones en

varios procesos metabólicos, y esta caída afecta la actividad de la enzima nitrato reductasa (Brown y Jones, 1976; Marschner, 1995). La movilización y absorción de Mn puede incrementarse con la deficiencia de Fe en dicotiledóneas y monocotiledóneas (excepto gramíneas) usando la Estrategia I (Alam *et al.*, 2001).

Las concentraciones de N, P, K, Ca, Mg y Mn no fueron afectadas por el pH de la solución, en tanto que el pH alcalino (8.5), provocó una disminución significativa en las concentraciones de Fe, Cu y Zn, con respecto al pH 6. El pH ácido en la rizosfera, promueve que las raíces de las plantas absorban más cationes que aniones (Schaller, 1987). Las plantas que absorben más cationes que aniones causan acidificación del suelo (Curtin y Wen, 2004). El pH de la solución nutritiva tiene un papel fundamental en la absorción de nutrimentos (Urrestarazu, 2004) ya que afecta las reacciones de disociación, complejación y precipitación. Estas reacciones químicas impactan significativamente la especiación y disponibilidad de elementos (De Rijck y Schrevens, 1997).

En el Cuadro 5 se muestra la interacción de líneas de frijol y el nivel de Fe en la solución en la concentración de nutrimentos en las hojas. Cuando se aplicó Fe a la solución, no hubo diferencias significativas en la concentración de P, K, Mn, Cu y Zn en las dos líneas, pero cuando no se agregó Fe, la concentración de estos elementos se incrementó y fue significativamente diferente. Estos resultados coinciden parcialmente con otros estudios como el de Heras *et al.* (1976), quien reportó que en hojas cloróticas de *Prunus persica* hubo más N, K, Ca, Mg y Mn que en hojas verdes. En otro experimento similar se obtuvieron incrementos de N, P, K y Mg, mientras que las concentraciones de Ca, Zn, Mn y Fe disminuyeron (Köseoglu, 1995). Por su parte, Abadía *et al.* (1989) reportaron que los niveles de P, Mg, Na, Fe, Mn, Cu y Zn, en hojas de peral Fe-deficientes, no fueron diferentes con respecto a las hojas no cloróticas. Por lo anterior, es claro que el efecto de la clorosis férrica en la composición mineral de las hojas difiere con la especie, el cultivar y las condiciones de desarrollo del cultivo (Morales *et al.*, 1998).

Cuadro 5. Interacción de líneas de frijol y Fe en la concentración de macro y micronutrientes en hojas jóvenes.

Fe	Línea [†]	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	
(mg L ⁻¹)		----- mg g ⁻¹ -----					----- mg kg ⁻¹ -----				
0	T	44.57 a ^{††}	8.02 a	38.17 a	14.14 ab	5.56 a	97.12 a	410.42 a	25.96 b	94.36 a	
0	S	46.16 a	8.11 a	36.43 a	19.24 a	6.11 a	93.72 a	455.19 a	38.04 a	112.44 a	
0.5	T	36.28 bc	4.59 b	21.32 b	11.89 b	4.34 ab	113.53 a	111.53 b	9.97 c	51.56 b	
0.5	S	39.61 ab	4.03 b	18.01 b	13.79 ab	4.72 ab	155.48 a	111.29 b	10.93 c	58.73 b	
2	T	31.77 c	4.79 b	24.28 b	11.04 b	3.72 b	141.51 a	87.10 b	9.06 c	54.40 b	
2	S	34.61 bc	3.92 b	18.42 b	14.90 ab	4.41 ab	153.87 a	105.25 b	9.07 c	57.54 b	
DMS ^{†††}		7.75	2.02	8.60	6.38	1.81	75.41	127.77	7.01	22.13	

[†] T: línea tolerante; S: línea susceptible.

^{††} Medias con la misma letra, dentro de la columna, son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

^{†††} DMS: diferencia mínima significativa.

En hojas jóvenes de frijol, las relaciones P/Fe, Mn/Fe, Cu/Fe, Zn/Fe y K/Fe fueron significativamente mayores cuando no se agregó Fe a la solución (Cuadro 6), lo cual es indicador de una menor concentración de Fe respecto a los otros elementos. Estos resultados coinciden con otros autores (Barak y Chen, 1984; Hanze *et al.*, 1985), que mencionan que estas relaciones pueden considerarse indicadores adecuados de la deficiencia de Fe en plantas. En la relación K/Ca no hubo diferencia significativa en los tres niveles de Fe. Aunque esta relación ha sido utilizada como indicador de resistencia a clorosis férrica (Hamzé *et al.*, 1986), los resultados de este estudio coinciden con Abadía *et al.* (1989), quienes reportaron un incremento en la concentración de N, K y Ca en hojas de peral al aumentar la severidad de la clorosis férrica, mientras que la relación K/Ca no fue afectada.

Cuadro 6. Relaciones nutrimentales en hojas jóvenes de dos líneas de frijol con o sin aplicación de Fe.

Hierro	P/Fe	K/Ca	Mn/Fe	Cu/Fe	Zn/Fe	K/Fe
(mg L ⁻¹)						
0	0.098 a [†]	2.57 a	5.12 a	0.38 a	1.23 a	0.45 a
0.5	0.035 b	1.66 b	0.88 b	0.08 b	0.44 b	0.16 b
2	0.032 b	1.98 ab	0.69 b	0.07 b	0.39 b	0.16 b
DMS ^{††}	0.018	0.80	1.08	0.08	0.22	0.01

[†] Medias con la misma letra, dentro de la columna, no difieren estadísticamente (Tukey $P \leq 0.05$).

^{††} DMS: diferencia mínima significativa.

En la interacción Fe x línea, se encontró que las relaciones P/Fe, Mn/Fe, Cu/Fe, Zn/Fe y K/Fe fueron mayores en las dos líneas cuando no se agregó Fe (Cuadro 7).

Aunque la relación K/Ca también fue alta en ausencia de Fe, estos valores no fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos cuando se aplicó Fe. Estos resultados son función de la acumulación relativa de los nutrientes involucrados, que afecta o es afectada por la absorción y el metabolismo del Fe en las plantas (Hernández *et al.*, 1996); por lo que el incremento de estas relaciones nutrimentales, que pueden ser indicativas de la deficiencia de Fe, se debe a que la absorción de Fe es menor respecto a los otros nutrientes. Fernández *et al.* (2008) mencionan que los cambios en la composición mineral usualmente encontrados en hojas Fe-deficientes están más asociados con la concentración foliar de Fe que con la clorosis por sí sola.

Cuadro 7. Valor de algunas relaciones nutrimentales en dos líneas de frijol bajo tres niveles de Fe en la solución nutritiva.

Fe	Línea	P/Fe	K/Ca	Mn/Fe	Cu/Fe	Zn/Fe	K/Fe
(mg L ⁻¹)							
0	Tolerante	0.10 a [†]	3.17 a	5.19 a	0.33 a	1.21 a	0.48 a
0	Susceptible	0.09 a	1.97 ab	5.04 a	0.43 a	1.26 a	0.42 a
0.5	Tolerante	0.04 b	1.92 ab	0.99 b	0.09 b	0.46 b	0.19 b
0.5	Susceptible	0.28 b	1.40 b	0.78 b	0.08 b	0.42 b	0.13 b
2	Tolerante	0.04 b	2.53 ab	0.68 b	0.07 b	0.40 b	0.19 b
2	Susceptible	0.03 b	1.42 b	0.71 b	0.07 b	0.38 b	0.13 b
DMS ^{††}		0.03	1.39	1.88	0.14	0.38	0.17

[†]Medias con letras iguales dentro de la columna, son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

^{††}DMS: diferencia mínima significativa.

5.3.2 Fe activo (Fe²⁺)

En la Figura 7 se presenta la concentración media de Fe²⁺ determinada en hojas jóvenes de frijol. La prueba de comparación de medias indica que no hubo diferencias significativas entre las líneas tolerante y susceptible con tres niveles de Fe en la solución. Aún cuando en algunas investigaciones se ha encontrado que el Fe²⁺ correlaciona con los daños derivados del inadecuado abastecimiento de Fe (Köseoglu y Acikgoz, 1995; Sadzawka *et al.*, 2000; Maldonado-Torres *et al.*, 2006; Razeto y Valdés, 2006), existen otros estudios (Chaney, 1984; Hernández *et al.*, 1996); en los que no se han encontrado diferencias en la concentración de Fe²⁺ en

las plantas sometidas a diferentes niveles de disponibilidad de Fe en el medio de crecimiento, que presentaron variabilidad en los síntomas de clorosis y en su susceptibilidad a la deficiencia de Fe. Dado que la concentración de Fe total no refleja adecuadamente el estado nutricional de este micronutriente en la planta (Hurley *et al.*, 1986; Köseoglu y Acikgoz, 1995; Abadía *et al.*, 2000b), diversos autores han postulado al análisis de Fe activo en la hoja como un indicador del nivel de abastecimiento de Fe en la planta (Katyal y Sharma, 1980; Abadía *et al.*, 2000b), dado que es el que está involucrado directamente en la biosíntesis de la clorofila y sus precursores (Miller *et al.*, 1984), motivo por el cual se le ha denominado “Fe activo”.

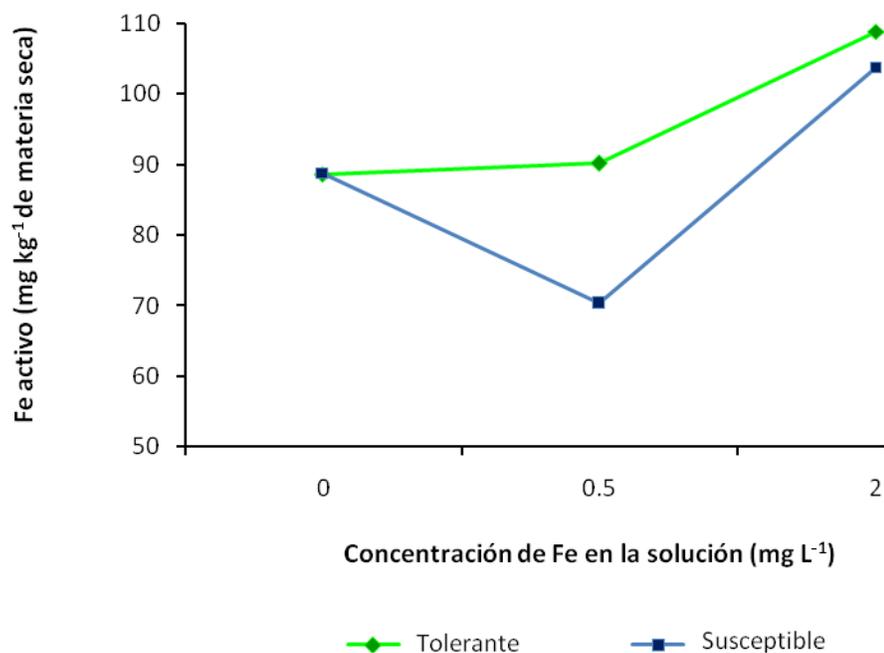


Figura 7. Concentración media de hierro activo (Fe^{2+}) determinada en hojas jóvenes de dos líneas de frijol.

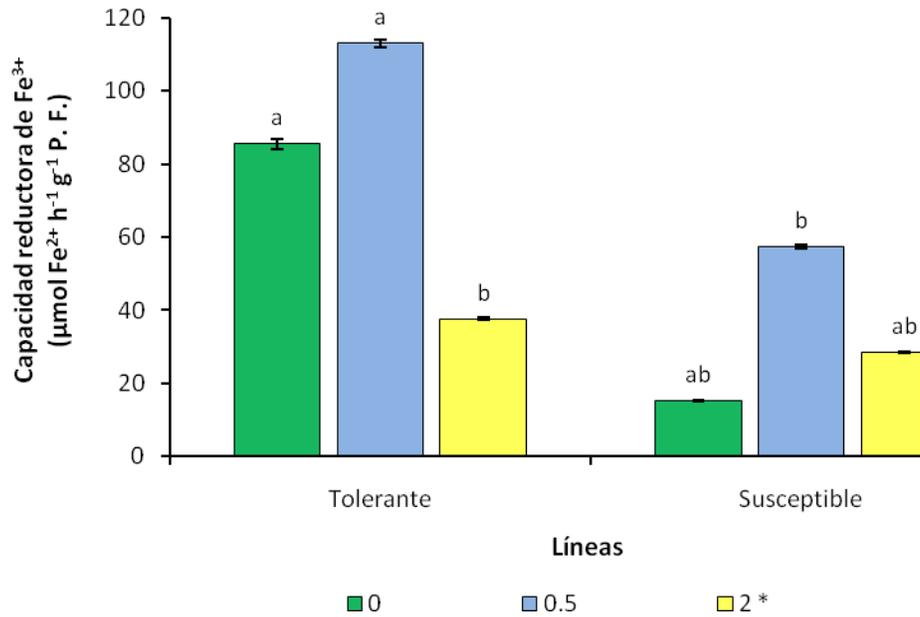
Aunque estadísticamente no se presentaron diferencias significativas, se observa una ligera tendencia en la línea tolerante a tener mayor concentración de Fe^{2+} conforme se incrementa el suministro de Fe a la solución, mientras que en la línea susceptible la concentración más alta de Fe^{2+} se tuvo cuando se adicionaron 2 mg L^{-1} de Fe y en las concentraciones de 0 y 0.5 mg L^{-1} de Fe no se permite establecer

alguna tendencia clara al respecto. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Chaney (1984), quien indica que aún cuando los niveles de Fe^{2+} han sido ligeramente superiores en las hojas verdes, comparadas con las cloróticas, los métodos hasta ahora empleados no contribuyen a la confiabilidad del diagnóstico respecto al estado nutrimental del hierro en la planta. En adición a esto, Lucena (1997) menciona que el análisis de Fe^{2+} es complicado y con resultados variables, debido principalmente al hecho de emplear tejido fresco. Recientemente, Razeto y Valdés (2006) evaluaron una técnica de análisis de Fe activo en tejido seco de hojas y brotes de durazno y, la reportan como posible indicador del nivel de abastecimiento de Fe en la planta. Sin embargo, también sugieren investigaciones adicionales para obtener resultados más definitivos.

5.4 Capacidad reductora y cambios en el pH de la solución nutritiva

5.4.1 Capacidad de reducción de Fe^{3+}

La capacidad reductora de raíces se modificó con los diferentes suministros de Fe dentro y entre líneas de frijol (Figura 8). Cuando la solución nutritiva no tuvo Fe, la capacidad de reducción de Fe^{3+} de raíces de la línea tolerante se incrementó 2.3 veces y cuando se agregaron 0.5 mg L^{-1} de Fe a la solución, esta capacidad se incrementó 3 veces, con respecto a la misma línea desarrollada con un nivel óptimo de Fe. Cuando la línea susceptible creció en un medio sin Fe, la capacidad reductora de las raíces disminuyó 0.5 veces y con 0.5 mg L^{-1} de Fe aumentó 2 veces en comparación con la línea susceptible que tuvo 2 mg L^{-1} de Fe en la solución.



* Concentración de Fe (mg L⁻¹) en la solución nutritiva

Figura 8. Capacidad reductora de Fe³⁺ en raíces de dos líneas de frijol desarrolladas en solución nutritiva con tres suministros de Fe.

Entre líneas, la tolerante mostró una mayor capacidad de reducción de Fe³⁺ que la línea susceptible en los tres niveles de Fe. Sin suministro de Fe, la capacidad reductora de la línea tolerante se incrementó 5.6 veces, en 1.97 con 0.5 mg L⁻¹ de Fe y en 1.32 veces con 2 mg L⁻¹ de Fe comparada con la capacidad reductora que presentaron las raíces de la línea susceptible. En condiciones de deficiencia o baja disponibilidad de Fe en el medio, algunas plantas han desarrollado, una serie de mecanismos para cubrir sus necesidades de Fe. Se trata de una característica genética y aquellas que tienen la capacidad de hacer más disponible el Fe de la rizosfera para la absorción por las raíces y, además, de incrementar su disponibilidad en la planta son consideradas como “Fe-eficientes” (Römheld *et al.*, 1982; Marschner y Römheld, 1995). Las plantas que tienen menor capacidad de respuesta o prácticamente no existe, al desarrollarse con un bajo suministro de Fe, son usualmente llamadas “Fe-ineficientes” y presentan, como consecuencia, síntomas de clorosis (Abadía *et al.*, 2000a).

Al considerar el efecto del pH y el nivel de Fe en la capacidad reductora, los mayores valores se obtuvieron a pH 6 con 0 y 0.5 mg L⁻¹ de Fe (Figura 9) y se observó una disminución a pH 8.5. Estos resultados coinciden con Susín *et al.* (1996), quienes reportaron que el mayor poder reductor de las raíces por actividad de las reductasas se presenta alrededor de pH 5.5 y se incrementa con deficiencia de Fe (Sueyoshi *et al.*, 1997).

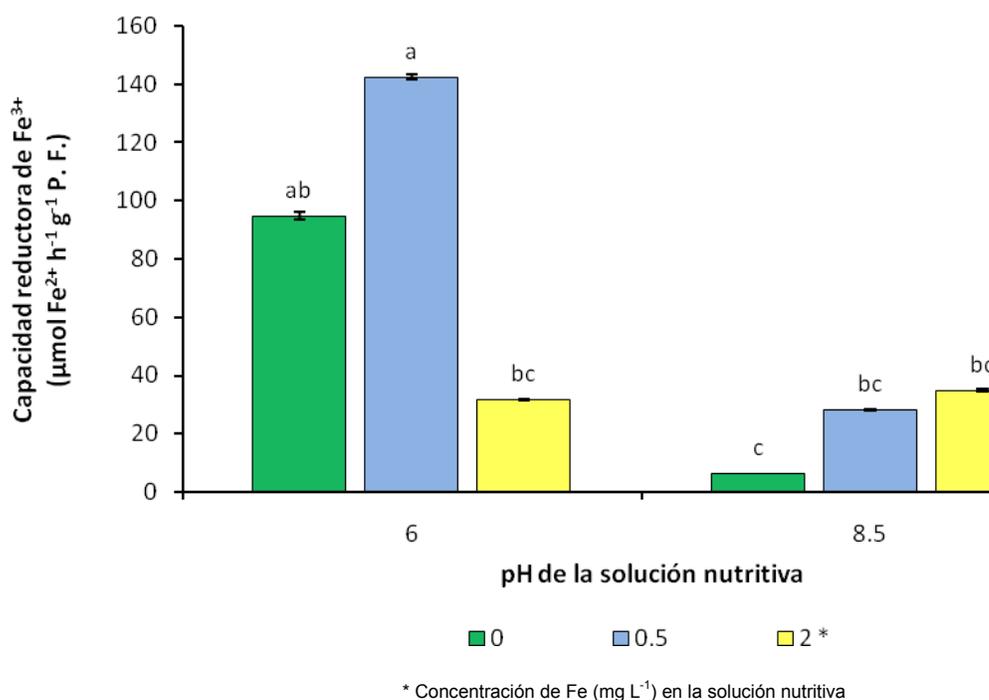


Figura 9. Efecto de dos niveles de pH y tres suministros de Fe en la solución sobre la capacidad de reducción de Fe³⁺ en raíces de frijol.

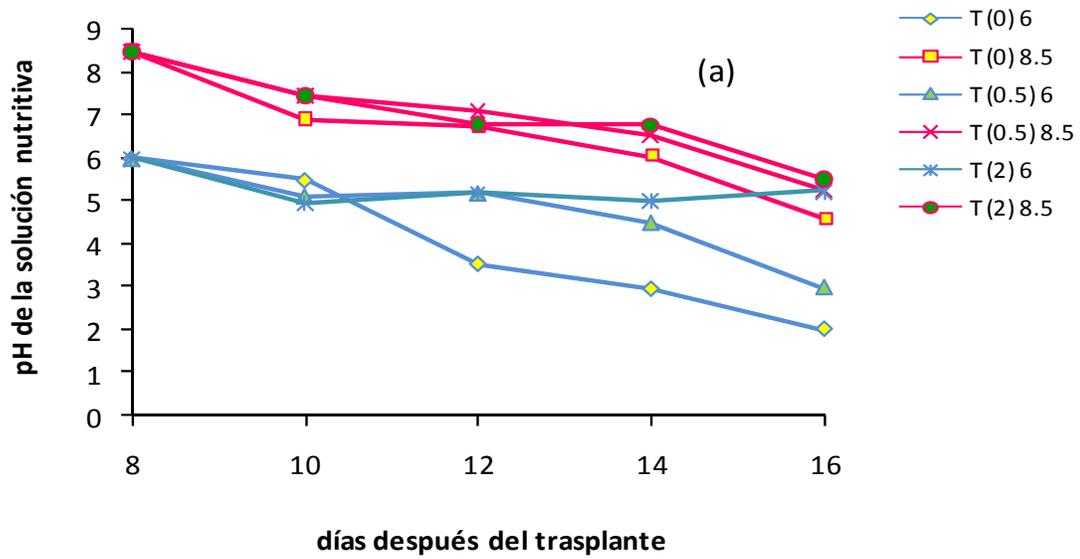
Las plantas que llevan a cabo la Estrategia I inducen una reductasa férrica dependiente del pH, lo que provoca una disminución del pH en la rizosfera (González *et al.*, 1999) que solubiliza el Fe³⁺ y promueve su reducción a Fe²⁺ antes de atravesar la membrana celular (Bienfait, 1988). Bienfait (1985) propuso un modelo con dos tipos de sistemas reductores de la membrana plasmática: el sistema “estándar o constitutivo” y el sistema “turbo o inducible”. El sistema turbo se activa en condiciones de deficiencia de Fe, en dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, es una enzima transmembranal capaz de reducir el Fe quelado con electrones provenientes del NADPH citoplasmático, lo que no es posible mediante la

reductasa estándar característica de todas las plantas (Marschner y Römheld, 1994; Moog y Brüggemann, 1994; Susín *et al.*, 1996). La activación de la reductasa turbo hace que la capacidad reductora de las raíces en situación de deficiencia de Fe, aumente hasta 20 veces con respecto al testigo (Moog y Brüggeman, 1994).

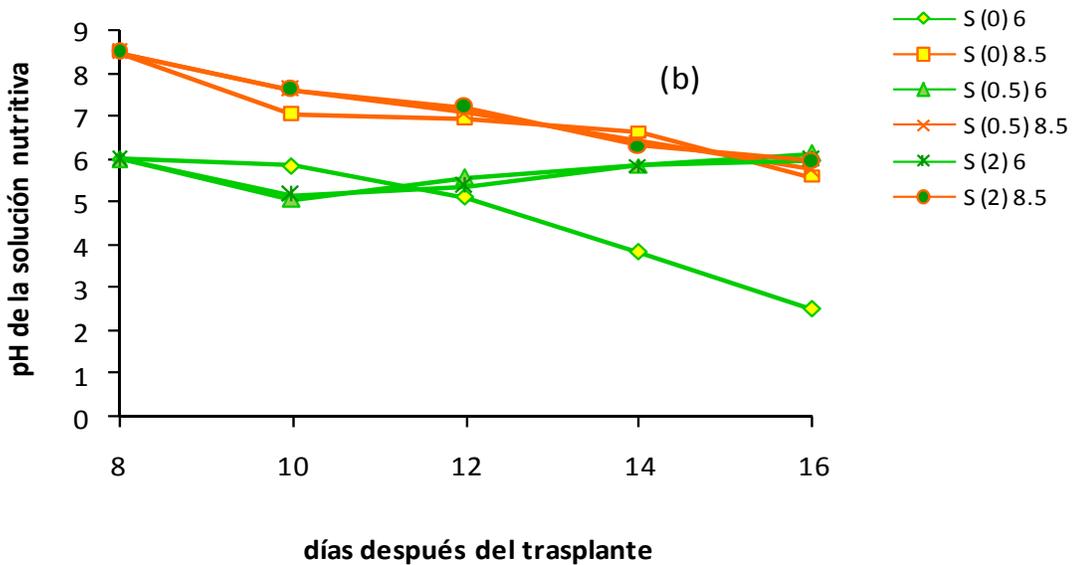
5.4.2 pH de la solución

La Figura 10 presenta la variación del pH de la solución nutritiva medido cada dos días durante la segunda semana de transcurso del experimento. Cuando la línea tolerante tuvo 0.5 mg L^{-1} de Fe y pH 6, la acidificación de la solución fue lenta y el valor de pH final fue de 2.9. En la solución sin Fe, la acidificación ocurrió más rápidamente hasta registrar un pH de 2.0. En contraste, cuando esta misma línea creció en condiciones óptimas, el pH osciló alrededor de 6. De igual manera, la línea susceptible con 0.5 y 2 mg L^{-1} de Fe en la solución y pH 6, mantuvo el valor de pH alrededor de 6 durante los ocho días, mientras en la solución sin Fe, se alcanzó un valor de pH de 2.5 en el octavo día. La capacidad que tiene la ATPasa para bajar el pH de la rizosfera y facilitar la solubilidad del Fe, está restringida a los ápices radicales (Landsberg, 1986). Al aumentar la capacidad de excretar protones, se produce una disminución del pH, con lo que se consigue un aumento de la solubilidad del Fe presente en el suelo y de la actividad turbo reductasa, dado que esta enzima alcanza su máxima actividad a pH 6.5 (Holden *et al.*, 1991), a valores mayores la actividad disminuye marcadamente (Abadía *et al.*, 2002).

En los tratamientos con pH 8.5, para las dos líneas, se presentó una tendencia a la acidificación, sin embargo, bajo esta condición, el mínimo valor de pH al que llegó la línea susceptible fue superior a 5.5 cuando no tuvo Fe en la solución, mientras que, la línea tolerante alcanzó valores de 5.5 y 5.3 cuando se le agregaron 2 y 0.5 mg L^{-1} de Fe-EDTA, respectivamente. Cuando la línea tolerante creció en solución sin Fe, el pH llegó a un valor de 4.6.



T: línea tolerante. El número entre paréntesis indica la concentración de Fe en la solución.
El número sin paréntesis indica el valor de pH de la solución.



S: línea susceptible. El número entre paréntesis indica la concentración de Fe en la solución.
El número sin paréntesis indica el valor de pH de la solución.

Figura 10. Variación del pH en la solución nutritiva por raíces de la línea de frijol (a) tolerante y (b) susceptible sometidas a tres suministros de Fe y dos niveles de pH.

Aunque se sabe que la ATPasa alcanza su máxima actividad a pH 6.5 (Holden *et al.*, 1991) y a valores mayores disminuye marcadamente (Abadía *et al.*, 2002), la tendencia a acidificar la solución en condiciones de pH alcalino (8.5) aún con el suministro de NO_3^- como única fuente de nitrógeno, el cual tiende a alcalinizar el medio por la forma en que se absorbe, se asocia, por un lado, al mecanismo de respuesta al estrés por déficit de Fe que llevan a cabo las plantas Fe-eficientes (más marcado en la línea tolerante que en la susceptible) y, por otro, a que en pH alcalino la absorción de NO_3^- disminuye debido a un efecto de competencia en el que los iones OH^- inhiben los sistemas de absorción y transporte de NO_3^- (Rao y Rains, 1976).

El comportamiento de ambas líneas mostró una tendencia hacia la acidificación pero, en general, bajo las mismas condiciones de pH y concentración de Fe en la solución, la línea tolerante a clorosis férrica alcanza valores de pH más bajos que la línea susceptible; esta magnitud de respuesta puede radicar en las diferencias en cuanto a su susceptibilidad. La acidificación del medio externo, en plantas Fe-eficientes, es una respuesta adaptativa a la nula o baja disponibilidad de Fe (Römheld *et al.*, 1982; Marschner y Römheld, 1995) y dicha respuesta deriva de la extrusión de protones del citosol hacia el apoplasto (Römheld *et al.*, 1984). Las plantas tolerantes han desarrollado ciertos mecanismos de adaptación a la deficiencia de Fe, mientras que las susceptibles no responden o no lo hacen con la misma intensidad que las otras (Bertamini y Nedunchezian, 2005).

Todas las plantas (excepto gramíneas) pueden disminuir el pH de la rizosfera para aumentar la disponibilidad de Fe. Tres componentes integran esta estrategia I: inducción de reductasas a nivel de la membrana plasmática, incremento en la excreción de protones y aumento en la liberación de quelatos reductores (Moog y Brüggemann, 1994).

5.5 Materia Seca

La acumulación de materia seca del vástago de ambas líneas (Figura 11) disminuyó significativamente cuando las plantas crecieron en un medio carente de Fe, pero, no hubo diferencia significativa entre líneas cuando se desarrollaron a la misma concentración de Fe (0, 0.5 ó 2 mg L⁻¹) en la solución.

En promedio, la línea tolerante produjo 75.9% más materia seca y la susceptible 81.5%, cuando se les suministró 2 mg L⁻¹ de Fe en la solución, respecto a la acumulación de éstas mismas sin adición de Fe. En un estudio con plantas de *Parietaria difusa* desarrolladas en solución nutritiva carente de Fe, se presentaron síntomas de clorosis y disminución del crecimiento (Dell'Orto *et al.*, 2003). Lo anterior está relacionado con la participación del hierro en la síntesis de clorofila y el funcionamiento de los sistemas captadores de energía luminosa, lo que a su vez está íntimamente ligado con los procesos de fotosíntesis y la producción de materia seca.

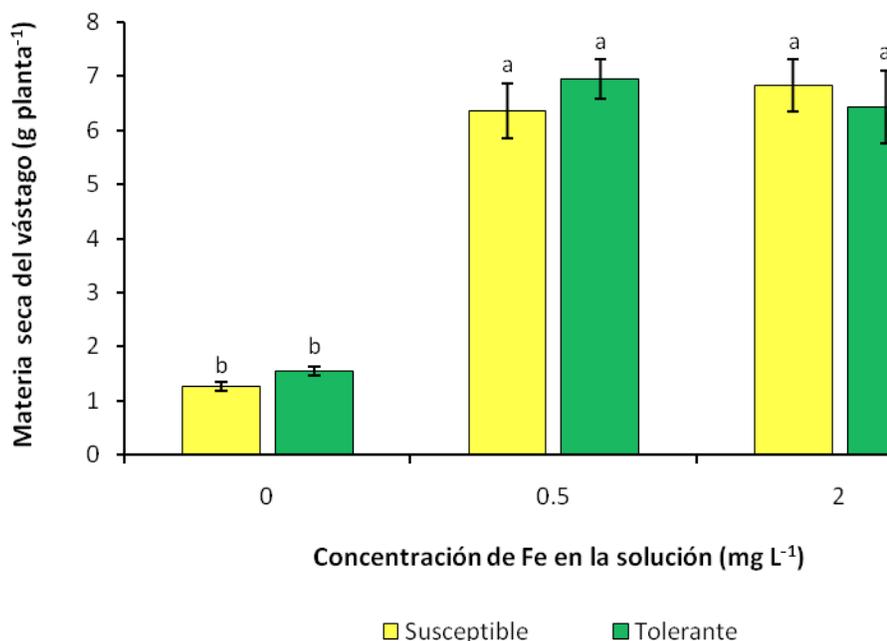


Figura 11. Producción de materia seca de vástago de dos líneas de frijol expuestas a deficiencia y dos suministros de Fe. Los valores representan las medias \pm error estándar (n = 8). Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales ($P \leq 0.05$).

En el Cuadro 8 se presenta la interacción del Fe con las líneas y con el pH de la solución en la producción de materia seca del sistema radical. La mayor acumulación de materia seca de raíz se presentó en la línea susceptible con suministro subóptimo de Fe (0.5 mg L^{-1}). Este valor fue estadísticamente diferente al que mostró la línea tolerante con la misma condición de Fe en la solución y a los que presentaron las dos líneas con 2 mg L^{-1} de Fe. La menor acumulación se dio cuando las líneas crecieron sin Fe y los valores también difirieron significativamente de los anteriores. En plantas deficientes de Fe, Campbell y Nishio (2000) encontraron que el crecimiento del ápice radical disminuye y retarda el crecimiento del tejido radical y la producción de raíces laterales, además de la formación de numerosos pelos radicales que correlaciona con un descenso significativo de clorofila. El detrimento de la adquisición de Fe puede ser pronosticado como una consecuencia de la inhibición del crecimiento radical (Alhendawi *et al.*, 1997).

Cuadro 8. Interacciones de Fe con líneas de frijol y con pH en la producción de materia seca de raíz.

Fe (mg L^{-1})	Línea	Materia Seca de raíz [†] (g planta^{-1})	Fe (mg L^{-1})	pH	Materia Seca de raíz [†] (g planta^{-1})
0	Tolerante	0.22 c	0	6	0.24 c
0	Susceptible	0.19 c	0	8.5	0.17 c
0.5	Tolerante	0.92 b	0.5	6	0.98 ab
0.5	Susceptible	1.31 a	0.5	8.5	1.26 a
2	Tolerante	0.69 b	2	6	0.70 b
2	Susceptible	0.99 b	2	8.5	0.99 ab
DMS ^{††}		0.303	DMS		0.303

[†] Medias con la misma letra, dentro de las columnas, son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

^{††} DMS: diferencia mínima significativa.

En la interacción Fe x pH (Cuadro 8) se observaron diferencias significativas. Hubo mayor producción y acumulación de materia seca con adición (óptima y subóptima) de Fe a pH 8.5 y a pH 6 con 0.5 mg L^{-1} de Fe. La cantidad de materia seca acumulada en ambos valores de pH sin adición de Fe fueron los más bajos y estadísticamente diferentes.

La deficiencia de Fe produce respuestas fisiológicas en la raíz (Abadía *et al.*, 2000b), como la transformación de células de raíces epidérmicas en células “transfer” (Schmidt y Bartels, 1996) y acidificación de la rizosfera (Alcántara *et al.*, 1991). El desarrollo de cambios morfológicos y fisiológicos en raíz es otra respuesta encontrada en dicotiledóneas deficientes en Fe. La proliferación de pelos radicales es una modificación inducida en las plantas de estrategia I, por deficiencia de Fe (Römheld y Marschner, 1981; Landsberg, 1996). En *Casuarina glauca* la deficiencia de Fe es uno de los principales factores, además del P, en la inducción de la formación de raíces “cluster” (proteoides), inclusive la adición de Fe al medio nutritivo revierte la formación de raíces cluster por deficiencia de P. Además, la formación de este tipo de raíces parece ser una respuesta morfológica eficiente para enfrentar el estrés causado por la deficiencia de Fe (Arahou y Diem, 1997).

En general, los parámetros de crecimiento están negativamente correlacionados con los parámetros de clorosis. En *Trifolium* sp. cultivado en suelo calcáreo, Wei *et al.* (1994) obtuvieron elevados coeficientes de correlación negativos entre el índice de clorosis y el peso de materia seca del brote, de la raíz, peso de la materia seca total y la relación peso seco de la raíz/peso seco de la parte aérea ($r \geq 0.7$, $P < 0.01$).

VI. CONCLUSIONES

En la hoja clorótica de la línea tolerante se observó el mesófilo (parénquima en palizada y esponjoso) organizado y con pocos espacios intercelulares, mientras que en la línea susceptible, el mesófilo se mostró desorganizado, con células de forma y tamaño irregular. Asimismo, el tamaño de los cloroplastos, en las dos líneas, disminuyó significativamente cuando no se suministró Fe y el grado de desarrollo de los tilacoides fue escaso y como consecuencia no hubo formación de grana.

El suministro de Fe a la solución nutritiva y el pH 6 repercutieron en una mayor concentración de clorofila, mientras que sin abasto de Fe y el pH 8.5 provocaron un mayor grado de clorosis. Bajo la misma concentración de Fe, la línea susceptible presentó lecturas SPAD más bajas que la línea tolerante.

La fotosíntesis neta disminuyó significativamente cuando las plantas desarrollaron en solución nutritiva sin Fe, tanto con pH óptimo como alcalino, mientras que cuando se suministró Fe al medio, el pH 8.5 no afectó la tasa fotosintética.

En la composición nutrimental foliar, la línea tolerante presentó mayor concentración de K y la línea susceptible mayor concentración de Ca, Cu y Zn. La concentración de Fe mostró un incremento conforme aumentó el suministro del mismo en la solución. Sin Fe se incrementó la concentración de N, P, K, Ca, Mg, Mn, Cu y Zn. El pH alcalino provocó disminución significativa en las concentraciones de Fe, Cu y Zn. La ausencia de Fe en la solución provocó incremento en las relaciones P/Fe, Mn/Fe, Cu/Fe, Zn/Fe y K/Fe, en tanto que la relación K/Ca no se afectó.

En condiciones limitativas de Fe (0.5 mg kg^{-1}) la capacidad reductora de las raíces se incrementó, tanto en la línea tolerante como en la susceptible cuando desarrollaron en pH 6, mientras que sin Fe solo se incrementó en la línea tolerante.

Los cambios en el pH de la solución nutritiva estuvieron asociados con la concentración de Fe suministrada y con la tolerancia a la deficiencia de Fe de las líneas de frijol. Cuando las plantas se encontraron en condiciones óptimas las variaciones del pH fueron mínimas.

La producción de materia seca de vástago y de raíz de ambas líneas de frijol disminuyó significativamente cuando las plantas crecieron sin Fe en la solución nutritiva. Sin embargo, la acumulación de materia seca de raíz se incrementó con nivel subóptimo de Fe en la línea susceptible, al igual que en condiciones de pH alcalino.

VII. LITERATURA CITADA

- Abadía A., M. Sanz, J. de las Rivas, and J. Abadía. 1989. Photosynthetic pigments and mineral composition of iron deficient pear leaves. *J. Plant Nutr.* 12: 827-838.
- Abadía, J. 1992. Leaf responses to Fe deficiency: a review. *J. Plant Nutr.* 15: 1699-1713.
- Abadía, J., F. Morales, and A. Abadía. 2000a. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant Soil* 215: 183-192.
- Abadía, J., M. Tagliavini, R. Grasa, R. Belkhodja, A. Abadía, M. Sanz, E. Araujo F., C. Tsiouridis, and B. Marangoni. 2000b. Using the flower Fe concentration for estimating chlorosis status in fruit tree orchards: a summary report. *J. Plant Nutr.* 23: 2023-2033.
- Abadía, J., A. F. López M., A. Rombolà, and A. Abadía. 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil* 241: 75-86.
- Abadía, J., A. Álvarez-Fernández, A. D. Rombolà, M. Sanz, M. Tagliavini, and A. Abadía. 2004. Technologies for the diagnosis and remediation of Fe deficiency. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 965-971.
- Alam, S., S. Kamei, and S. Kawai. 2001. Response of iron-deficient barley plants to manganese in nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 24: 147-158.
- Alcántara, E., F. J. Romera, and M. de la Guardia. 1988. Genotypic differences in bicarbonate induced iron chlorosis in sunflower. *J. Plant Nutr.* 11: 65-75.
- Alcántara, E., M. D. de la Guardia, and F. J. Romera. 1991. Plasmalemma redox activity and H⁺ extrusion in roots of Fe-deficient cucumber plants. *Plant Physiol.* 96:1034-1037.
- Alcántara, E., F. J. Romera, M. Cañete, and M. D. de la Guardia. 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: 1893-1898.
- Alhendawi, R. A., V. Römheld, E. A. Kirkby, and H. Marschner. 1997. Influence of increasing bicarbonate concentrations on plant growth, organic acid accumulation in roots and iron uptake by barley, sorghum and maize. *J. Plant Nutr.* 20:1731-1753.

- Álvarez-Fernández, A., P. García-Lavina, C. Fidalgo, J. Abadía, and A. Abadía. 2004. foliar fertilization to control iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Soil* 263:5-15.
- Arahou, M., and H. G. Diem. 1997. Iron deficiency induces cluster (proteoid) root formation in *Casuarina glauca*. *Plant Soil* 196: 71-79.
- Arulanathan, A. R., M. Rao I., and Terry N. 1990. Limiting factors in photosynthesis. VI. Regeneration of ribulose 1, 5- biphosphate limits photosynthesis at low photochemical capacity. *Plant Physiol.* 93: 1466-1475.
- Awad, F., V. Römheld, and H. Marschner. 1988. Mobilization of ferric iron from a calcareous soil by plant-borne chelators (Phytosiderophores). *J. Plant Nutr.* 11: 701-713.
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España.
- Barak, P., and Y. Chen. 1984. The effect of potassium on iron chlorosis in calcareous soils. *J. Plant Nutr.* 7: 125-133.
- Bates, G. W. 1982. Parallels in plant and human iron nutrition. *J. Plant Nutr.* 5: 269-276.
- Belkhodja, R., F. Morales, M. Sanz, A. Abadía, and J. Abadía. 1998. Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant Soil* 203: 257-268.
- Bertamini, M., and N. Nedunchezian. 2005. Grapevine growth and physiological responses to iron deficiency. *J. Plant Nutr.* 28: 737-749.
- Bienfait, H. F. 1985. Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. *J. Bioenerg. Biomem.* 17: 73-83.
- Bienfait, H. F. 1988. Mechanisms in Fe-efficiency reactions of higher plants. *J. Plant Nutr.* 11: 605-629.
- Bienfait, H. F. 1996. Is there a metabolic link between H⁺ excretion and ferric reduction by roots of Fe-deficient plants? – A viewpoint. *J. Plant Nutr.* 19: 1211-1222.
- Blaylock, M., V. Jolley, and J. Brown. 1989. Gallium (III) does not actively substitute for iron (III) in iron/gallium competition studies. *J. Plant Nutr.* 12: 465-484.

- Boone, C., J. Bristow, and G. van Loon. 1983. The relative efficiency of ionic iron (III) and iron (II) utilization by the rice plant. *J. Plant Nutr.* 6: 201-218.
- Bremer, J. M. 1965. Total Nitrogen. *In*: C. Black (ed). *Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9.* Amer. Soc. Agron. Madison, WI.
- Briat, J., I. Fobis-Loisy, N. Grignon, S. Lobreaux, N. Pascal, G. Savino, S. Thoiron, N. von Wiren, and O. van Wuytswinkel. 1995. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants. *Biol. Cell* 84: 69-81.
- Brown, J. C., and I. E. Ambler. 1974. Iron stress response in tomato. *Physiol. Plant.* 31: 221-224.
- Brown, J. C., and W. E. Jones. 1976. Nitrate reductase activity in calcifugous and calcicolous tomatoes as affected by iron stress. *Physiol. Plant.* 38:273-277.
- Brown, J. C., and Jolley, V. D. 1988. Strategy I and Strategy II mechanism affecting iron availability to plants may be established too narrow or limited. *J. Plant Nutr.* 11: 1077-1098.
- Brüggemann, W., K. Maas-Kantel, and P. R. Moog. 1993. Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. *Planta* 190: 151-155.
- Bughio, N., H. Yamaguchi, N. Nishizawa, H. Nakanishi, and S. Mori. 2002. Cloning an iron-regulated transporter from rice. *J. Exp. Bot.* 53: 1677-1682.
- Campbell, S. A., and J. N. Nishio. 2000. Iron deficiency studies of sugar beet using an improved sodium bicarbonate-buffered hydroponic growth system. *J. Plant Nutr.* 23: 741-757.
- Cesco, S., V. Römheld, Z. Varanini, and R. Pinton. 2000. Solubilization of iron by water-extractable humic substances. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163: 285-290.
- Chaney, R. L. 1984. Diagnostic practices to identify iron deficiency in higher plants. *J. Plant Nutr.* 7: 47-67.
- Chaney, R. K., and P. F. Bell. 1987. The complexity of iron nutrition: lessons for plant soil interaction research. *J. Plant Nutr.* 10: 963-994.
- Charlson, D. V., and R. C. Shoemaker. 2006. Evolution of iron acquisition in higher plants. *J. Plant Nutr.* 29: 1109-1125.

- Chen, Y., J. Navrot, and P. Barak. 1982. Remedy of lime-induced chlorosis with iron-enriched muck. *J. Plant Nutr.* 5: 927-940.
- Cianzio, S. R., W. E. de Fehr, and I. C. Anderson. 1979. Genotypic evaluation for iron deficiency chlorosis in soybeans by visual scores and chlorophyll concentrations. *Crop Sci.* 19: 644-646.
- Clark, R. B. 1991. Iron: unlocking agronomic potential. *Solutions* 35: 24-28.
- Curtin, C., and G. Wen. 2004. Plant cation-anion balance as affected by the ionic composition of the growing medium. *Plant Soil* 267: 109-115.
- De la Guardia M. D., and E. Alcántara. 1996. Ferric chelate reduction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves: influence of light, oxygen, iron-deficiency and leaf age. *J. Exp. Bot.* 47: 669-675.
- Dell'Orto, M., P. de Nisi, A. Pontiggia, and G. Zocchi. 2003. Fe deficiency response in *Parietaria diffusa*: a calcicole plant. *J. Plant Nutr.* 26: 257-268.
- De Rijck, C., and E. Schrevens. 1997. pH influenced by the elemental composition of nutrient solutions. *J. Plant Nutr.* 20: 911-923.
- El-Garabby, G. A., and M. El-Razek. 1982. Responses of snapbeans to applications of P and Fe in calcareous soils. *J. Plant Nutr.* 5: 721-728.
- Esau, K. 1982. Anatomía de plantas con semilla. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Fernández, V., T. Eichert, V. Del Río, G. López-Casado, J. A. Heredia-Guerrero, A. Abadía, A. Heredia, and J. Abadía. 2008. Leaf structural changes associated with iron deficiency chlorosis in field-grown pear and peach: physiological implications. *Plant Soil* 311: 161-172.
- Fleming, A., and C. Foy. 1982. Differential response of barley varieties to Fe stress. *J. Plant Nutr.* 5: 457-468.
- Fox, T. C., and L. Guerinot M. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 669-696.
- Gildersleeve, R. R., and W.R. Ocampo. 1989. Greenhouse evaluation of subterranean clover species for susceptibility to iron-deficiency chlorosis. *Crop Sci.* 29:949-951.

- González-Vallejo, E. B., J. A. González-Reyes, A. Abadía, A. F. López-Millan, F. Yunta, J. J. Lucena, and J. Abadía. 1999. Reduction of ferric chelates by leaf plasma membrane preparations from Fe-deficient and Fe-sufficient sugar beet. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 601-611.
- Guerinot, M. L., and Y. Yi, 1994. Iron: nutritious, noxious and not readily available. *Plant Physiol.* 104: 815-820.
- Hamzé, M., J. Ryan, and M. Zaabout. 1986. Screening of citrus rootstocks for lime-induced chlorosis tolerance. *J. Plant Nutr.* 9: 459-469.
- Hansen, N. C., B. G. Hopkins, J. W. Ellsworth, and V. D. Jolley. 2007. Iron nutrition in field crops. p. 23-59. *In*: L. L. Barton, and J. Abadía (eds.). *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*. Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Hanze, M., J. Rianse, R. Shwari, and H. Zaabout. 1985. Iron treatment of lime induced chlorosis: implications for chlorophyll, Fe^{2+} , Fe^{3+} and K^+ in leaves. *J. Plant Nutr.* 8: 437-448.
- Heras L., M. Sanz y L. Montañes. 1976. Corrección de la clorosis férrica en melocotonero y su repercusión sobre el contenido mineral, relaciones nutritivas y rendimientos. *An. Aula Dei* 13: 261-289.
- Hernández R., I., G. Alcántar G., J. I. Tirado T. y G. Carrillo C. 1996. Susceptibilidad y mecanismos de adaptación de genotipos de frijol a la clorosis férrica. *Agrociencia* 30: 13-19.
- Holden, M. J., G. Luster D., L. Chaney R., J. Buckout T., and C. Robinson. 1991. Fe^{3+} -chelate reductase activity of plasma membranes isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots: comparison of enzymes from Fe-deficient and Fe-sufficient roots. *Plant Physiol.* 97: 537-544.
- Hurley, A., R. Walser, T. Davis, and D. Barney. 1986. Net photosynthesis, chlorophyll and foliar iron in apple trees after injection with ferrous sulfate. *HortSci.* 21: 1029-1031.
- Imsande, J. 1998. Iron, sulfur and chlorophyll deficiencies: a need for an integrative approach in plant physiology. *Physiol. Plant.* 103: 139-144.
- Jolley, V. D., and J. C. Brown. 1991. Factors in iron-stress response mechanism enhanced by Zn-deficiency stress in Sanilac, but not Saginaw navy bean. *J. Plant Nutr.* 14: 257-265.

- Jolley, V. D., C. Brown J., M. Blaylock, and S. Camp. 1988. A role for potassium in the use of iron in plants. *J. Plant Nutr.* 11: 1159-1175.
- Jolley, V. D., K. A. Cook, N. C. Hansen, and W. B. Stevens. 1996. Plant physiological responses for genotypic evaluation of iron efficiency in strategy-I and strategy-II plants: A review. *J. Plant Nutr.* 19: 1241-1255.
- Jolley, V. D., N. C. Hansen, and A. K. Shiffler. 2004. Nutritional and management related interaction with iron deficiency stress response mechanisms. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 973-981.
- Jones, Jr. J. B., B. Wolf, and H. A. Mills. 1991. *Plant analysis handbook*. Micro-Macro Publishing. Georgia. U. S. A.
- Kannan, S. 1980. Differences in iron stress response and iron uptake in some sorghum varieties. *J. Plant Nutr.* 2: 347-358.
- Karnovsky, M. J. 1963. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolability for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27: 137.
- Katyal, J. C., and B. D. Sharma. 1980. A new technique of plant analysis to resolve iron chlorosis. *Plant Soil* 55: 105-119.
- Kobayashi, T., T. Yoshimara, T. Jiang, F. Goto, H. Nakanishi, S. Mori, and N. Nishizawa. 2003. Combined deficiency of iron and other divalent cations mitigates the symptoms of iron deficiency in tobacco plants. *Physiol. Plant.* 119: 400-408.
- Kosegarten, H. U., B. Huffmann, and K. Mengel. 1999. Apoplastic pH and Fe³⁺-reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiol.* 121: 1069-1079.
- Köseoglu, A., and V. Acikgoz. 1995. Determination of iron chlorosis with extractable iron analysis in peach leaves. *J. Plant Nutr.* 18: 153-161.
- Ksouri, R., S. M'rah, M. Gharsalli, and M. Lachaâl. 2006. Biochemical responses to true and bicarbonate-induced iron deficiency in grapevine genotypes. *J. Plant Nutr.* 29: 305-315.
- Lahav, E., and W. Turner D. 1984. The effect of temperature on the iron content of banana suckers. *J. Plant Nutr.* 7: 725-732.
- Landsberg E. C. 1986. Function of rhizodermal transfer cells in the stress response mechanism of *Capsicum annuum* L. *Plant Physiol.* 82: 511-517.

- Landsberg, E. C. 1994. Transfer cell formation in sugar beet roots induced by latent Fe deficiency. *Plant Soil* 165: 197-205.
- Landsberg, E. C. 1996. Hormonal regulation of iron-stress response in sunflower roots: a morphological and cytological investigation. *Protoplasma* 121: 317-323.
- Lara M., J. L., R. Vázquez A., E. Olivares S. y J. F. Pissani Z. 2004. Tolerancia a clorosis férrica de diferentes cultivares de frijol en suelos calcáreos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27: 43-47.
- Lehninger, A. L. 1991. *Bioquímica*. Ed. Omega. Barcelona, España.
- Lindsay, W. L. 1984. Soil and Plant relationship associated with iron deficiency with emphasis on nutrient interactions. *J. Plant Nutr.* 7: 489-500.
- Lindsay, W. L. 1991. Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability. *In*: Y. Chen, and Y. Hadar (eds.). *Iron nutrition and interactions in plants*. Kluwer Academic Publishers. Holanda.
- Lindsay, W. L., and A. Schwab. 1982. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr.* 5: 821-840.
- Lobreaux, S., and Briat. 1997. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem. J.* 274: 601-606.
- Loeppert, R. H. 1986. Chemistry and interaction of Fe with soil carbonate. *J. Plant Nutr.* 9: 195-214.
- Loeppert, R. H., L. C. Wei, and R. Ocuwpaugh. 1994. Soil factors influencing the mobilization in calcareous soils. *In*: J. A. Manthey, D. E. Crowley, and D. G. Luster (eds.). *Biochemistry of metal micronutrients in the rizosphere*. Lewis Publishers. Florida, USA.
- Loué, A. 1988. *Los microelementos en la agricultura*. Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Lucena, J. 1997. Methods of diagnosis of mineral nutrition of plants: a critical review. *Acta Hortic.* 448: 179-192.
- Lucena, J. J. 2000. Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review. *J. Plant Nutr.* 23: 1591-1606.

- Maas, F. M., A. M. Van de Weterin D., L. Van Beusichem M., and F. Bienfait H. 1988. Characterization of phloem iron and its possible role in the regulation of Fe-efficiency reactions. *Plant Physiol.* 87:167-171.
- Maldonado-Torres, R., J. D. Etchevers B., G. Alcántar G., J. Rodríguez A., and M. T. Colinas L. 2006. Morphological changes in leaves of mexican lime affected by iron chlorosis. *J. Plant Nutr.* 29: 615-628.
- Manthey, J. A., D. L. McCoy, and D. E. Crowley. 1994. Stimulation of rhizosphere iron reduction and uptake in response to iron deficiency in citrus rootstock. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 211-215.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic press. London, UK.
- Marschner, H., and V. Römheld. 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil* 165: 261-274.
- Marschner, H., and V. Römheld. 1995. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil* 165: 261-274.
- Marschner, H., V. Römheld, and M. Kissel. 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9: 695-713.
- Marschner, H., V. Römheld and M. Kissel. 1987. Localization of phytosiderophore release and iron uptake along intact barley roots. *Physiol. Plant.* 71: 157.
- Martínez G., L. 1995. Elementos de Fisiología Vegetal. Mundi-Prensa. España.
- Mengel, K. 1994. Iron availability in plant tissues – iron chlorosis on calcareous soil. *Plant Soil* 165: 275-283.
- Mengel, K., and N. Malissiovas. 1981. Bicarbonate as inducing factor of iron chlorosis in vine (*Vitis vinifera*). *Vitis* 20: 235-243.
- Mengel, K., and G. Geurtzen. 1986. Iron chlorosis on calcareous soils. Alkaline nutritional condition as the cause for the chlorosis. *J. Plant Nutr.* 9: 161-173.
- Mengel, K., and E. A. Kirkby. 1987. Principles of plant nutrition. 4th edition. International Potash Institute. Worblaufen-Bern, Switzerland.
- Mengel, K., R. Plänker, and B. Hoffmann. 1994. Relationship between leaf apoplast pH and Fe chlorosis of sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *J. Plant Nutr.* 17: 1053-1064.

- Miller, G. W., Pushnik J. C., and Welkie, G. W. 1984. Iron chlorosis, a world wide problem, the relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *J. Plant Nutr.* 7: 1-22.
- Moog, P. R., and W. Brüggemann. 1994. Iron reductase systems on the plant plasma membrane: a review. *Plant Soil* 165: 241-260.
- Moog, P. R., T. A. van der Kooij, W. Brüggemann, J. W. Schiefelbein, and P. J. Kuiper. 1995. Responses to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana*: the turbo iron reductase does not depend on the formation of root hairs and transfer cells. *Planta* 195: 505-513.
- Morales F., A. Abadía, and J. Abadía. 1990. Characterization of the xanthophylls cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 94: 607-613.
- Morales F., A. Abadía, and J. Abadía. 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., R. Grasa, A. Abadía, and J. Abadía. 1998. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *J. Plant Nutr.* 21: 815-825.
- Nabhan, H. M., J. Vanderdeleen, and A. Cottenie. 1977. Chelate behavior in saline-alkaline soil conditions. *Plant Soil* 46:603.
- Nikolic, M., and R. Kastori. 2000. Effect of bicarbonate and Fe supply on Fe nutrition of Grapevine. *J. Plant Nutr.* 23: 1619-1627.
- Oh, S. H., S. W. Cho, T. H. Kwon, and M. S. Yang. 1996. Purification and characterization of phytoferritin. *J. Biochem. Mol. Biol.* 29: 540-544.
- Ohwaki, Y., and K. Sugahar. 1997. Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Soil* 189: 49-55.
- Perret, P., and W. Koblet. 1984. Soil compactation induced iron-chlorosis in grape vineyards. Presumed involvement of exogenous soil ethylene. *J. Plant Nutr.* 7: 533-539.
- Pestana M., A. de Varennes, and E. Araújo F. 2003. Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. *Food Agric. Environ.* 1: 46-51.

- Platt-Aloia, K. A., W. W. Thomson, and N. Terry. 1983. Changes in plastid ultrastructure during iron-mediated chloroplast development. *Protoplasma* 114: 85-92.
- Pushnik, J. C., and W. Miller G. 1989. Iron regulation of chloroplast photosynthetic function: mediation of PSI development. *J. Plant Nutr.* 12: 407-421.
- Rao, K. P., and D. W. Rains. 1976. Nitrate absorption by barley. *Plant Physiol.* 57: 59-62.
- Razeto, B. y G. Valdés. 2006. Análisis de hierro soluble en tejidos para diagnosticar el déficit de hierro en nectarino. *Agricultura Técnica* 66: 216-220.
- Rediski, J. H., and D. Biddulph. 1953. The absorption and translocation of iron. *Plant Physiol.* 28:576-593.
- Reynolds, E. S. 1963. The use lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208-212.
- Rombolà A. D., and M. Tagliavini. 2007. Iron nutrition of fruit tree crops. p. 61-83. *In:* L. L. Barton and J. Abadía (eds.). *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms.* Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Romera, F. J., E. Alcántara, and M. D. de la Guardia. 1992a. Role of roots and shoots in the regulation of the Fe efficiency response in sunflower and cucumber. *Physiol. Plant.* 85: 141-146.
- Romera, F. J., E. Alcántara, and M. D. De la Guardia. 1992b. Effect of bicarbonato, phosphate and high pH on the reducing capacity of the Fe-deficient sunflower and cucumber plants. *J. Plant Nutr.* 15: 1519-1530.
- Römheld, V. 1987. Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol. Plant.* 70: 231-234.
- Römheld, V. 1991. The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. *Plant Soil* 130: 127-134.
- Römheld, V. 2000. The chlorosis paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves of grapevine. *J. Plant Nutr.* 23: 1629-1643.

- Römheld, V., and H. Marschner. 1981. Iron deficiency stress induced morphological and physiological changes in root tips of sunflower. *Physiol. Plant.* 53: 354-360.
- Römheld, V., and H. Marschner, 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. pp. 155-204. *In: Advances in plant nutrition. Vol. 2.* Tinker, B. and A. Läuchli (Eds.). Praeger Scientific. NY, USA.
- Römheld, V., and H. Marschner. 1990. Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores. *Plant Soil* 123: 147-153.
- Römheld, V., and H. Marschner. 1991. Function of micronutrients in plant. *In: Mortvedt, J. J., Cox, F. R., Shuman, L. M. and Welch, R. M. (eds.). Micronutrients in Agriculture. Second edition.* Soil Science Society of America. Madison, WI, USA.
- Römheld, V., H. Marschner, and D. Kramer. 1982. Response to Fe deficiency in roots of "Fe-efficient" plant species. *J. Plant Nutr.* 5: 489-498.
- Römheld, V., C. Müller, and H. Marschner. 1984. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiol.* 76: 603-606.
- Rosenfield, C. L., D. W. Reed, and M. W. Kent. 1991. Dependency of iron reduction on development of a unique root morphology in *Ficus benjamina* L. *Plant Physiol.* 95: 1120-1124.
- Sadzawka, A., R. Ruiz y J. Villanueva. 2000. Estimación del Fe (II) foliar para el diagnóstico de la clorosis férrica en plantas. *Actas 51º Congreso Agronómico de Chile. Simiente (Chile)* 70: 86-87.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. 1994. *Fisiología Vegetal.* Grupo Editorial Iberoamérica. México.
- Sánchez-Andréu, J., J. Jordá, and M. Juárez. 1991. Reactions of FeEDTA and FeEDDHA applied to calcareous soils. *In: Y. Chen and Y. Hadar (eds.). Iron nutrition and interactions in plants.* Kluwer Academic Publisher. Holanda.
- Sass, S. E. 1968. *Botanical microtechnique.* 3a ed. University Press. Ames Iowa.
- Schaller, G. 1987. pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering of soils. *Plant Soil* 97: 439-444.

- Schmidt, W., and M. Bartels. 1996. Formation of root epidermal transfer cell in *Plantago*. *Plant Physiol.* 110: 217-225.
- Sharma, S., and G. Sanwal G. 1992. Effect of Fe deficiency on the photosynthetic system of maize. *J. Plant Physiol.* 140: 527-530.
- Shi, Y., and Byrne, D. H. 1995. Tolerance of *Prunus* rootstocks to potassium carbonate induced chlorosis. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 120: 283-285.
- Shojima, S., K. Nishizahua N., S. Fushiya, S. Nozoe, T. Irifune, and S. Mori. 1990. Biosynthesis of phytosiderophores. *In vitro* biosynthesis of 2'-deoxymegineic acid from L-methionine and nicotinamine. *Plant Physiol.* 93: 1497-1503.
- Spiller, S., and N. Terry. 1980. Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiol.* 65: 121-125.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. 6th International Congress on Soilles Culture. International Society for Soilles Culture. Wageningen, The Netherlands.
- Stephan, U. W. 2002. Intra- and intercellular iron trafficking and subcellular compartmentation within roots. *Plant Soil* 241: 19-25.
- Stephan, U. W., and G. Scholz. 1993. Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? *Physiol. Plant.* 88: 522-529.
- Sueyoshi, K., O. Hirata, and Y. Oji. 1997. Characterization of plasma membrane-bound Fe³⁺-chelate reductase from Fe-deficient and Fe-sufficient cucumber roots. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43: 149-156.
- Susín, S.; A. Abadía; J. A. González-Reyes; E. Gelpi, and J. Abadía. 1996. The pH requirement for iron in vivo activity of iron-deficiency-induced "turbo" ferric chelate reductase. *Plant Physiol.* 110: 11-123.
- Suzuki, K., K. Higuchi, H. Nakanishi, N. Nishizawa, and S. Mori. 1999. Cloning of nicotianamine synthase genes from *Arabidopsis thaliana*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45: 993-1002.
- Tagliavini, M., and A. D. Rombolà. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Eur. J. Agron.* 15: 71-92.

- Taiz, L., and E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. 4th edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. U. S. A.
- Takagi, S., K. Nomoto, and T. Takemoto. 1984. Physiological aspects of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant Nutr.* 7: 469-477.
- Terry, N. 1980. Limiting factors in photosynthesis. I. Use of iron stress to control photochemical capacity *in vivo*. *Plant Physiol.* 65:114-120.
- Terry, N. 1983. Limiting factors in photosynthesis. IV. Iron stress mediated changes in light-harvesting and electron transport capacity and its effects on photosynthesis *in vivo*. *Plant Physiol.* 71: 855-860.
- Terry, N., and Abadía J. 1986. Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr.* 9: 609-646.
- Tiffin, L. O. 1970. Translocation of iron citrate and phosphorus in xylem exudates of soybean. *Plant Physiol.* 45: 280-283.
- Tlatilpa S., I. F. 2006. Tolerancia a clorosis férrica de fenotipos de frijol. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Toselli, M., B. Marangoni, and M. Tagliavini. 2000. Iron content in vegetative and reproductive organs of nectarin trees in calcareous soils during the development of chlorosis. *Eur. J. Agron.* 13: 279-286.
- Toulon, V., H. Sentenac, B. Thibaud J., C. Davidian J., C. Moulineau, and C. Gringnon. 1992. Role of apoplast acidification by the H⁺ pump. Effect on the sensitivity of pH and CO₂ of iron reduction by roots of *Brassica napus* L. *Planta* 186: 212-218.
- Tyler, G., and L. Ström. 1995. Differing organic acid exudation pattern explains calcifuges and acidifuge behavior of plants. *Ann. Bot.* 75: 75-78.
- Ullrich, W. R. 1991. Transport of nitrate and ammonium through plant membranes. pp. 121-137. *In*: K. Mengel and D. J. Pilbeam (Eds.). *Nitrogen metabolism in plants*. Oxford University Press. Oxford, Great Britain.
- Urrestarazu G., M. 2004. La disolución de fertirrigación. pp. 263-303. *In*: M. Urrestarazu G. (ed.). *Tratado de cultivo sin suelo*. 3^a edición. Madrid, España.

- Varotto, C., D. Aiwaïld, P. Pesaresi, P. Jahns, F. Salamini, and D. Leister. 2002. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 31: 589-599.
- Vempati, R. K., and R. H. Loeppert, 1988. Chemistry and mineralogy of Fe-containing oxides and layer silicates in relation to plant available iron. *J. Plant Nutr.* 11: 1557-1572.
- von Wiren, N., V. Römheld, and H. Marschner. 1993. Evaluation of strategy I mechanism in iron efficient and inefficient maize cultivars. *Plant Soil* 155/156: 445-448.
- Wei, L. C., W. R. Ocumpaugh, and R. H. Loeppert. 1994. Differential effect of soil-temperature on iron-deficiency chlorosis in susceptible and resistant subclovers. *Crop Sci.* 34: 715-721.
- Welkie, G. W., and G. W. Miller. 1993. Plant iron uptake physiology by nonsiderophore system. pp. 345-369. *In: Iron chelation in plants and soil microorganisms.* Berton, L. L. and B. C. Hemming (eds.). Academic Press, San Diego, CA (EE. UU.).
- White, M. C., A. M. Decker, and R. L. Chaney. 1981. Metal complexation in xylem fluid. I. Chemical composition of tomato and soybean stem exudate. *Plant Physiol.* 67: 292-300.
- Yi, Y., and M. L. Guerinot. 1996. Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 10: 835-844.
- Zaharieva, T., and V. Römheld. 2000. Specific Fe²⁺ uptake system in Strategy I plant inducible under Fe deficiency. *J. Plant Nutr.* 23: 1733-1744.