



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS DE MANEJO SOSTENIBLE PARA EL
CONTROL DE CLOROSIS FÉRRICA EN ARÁNDANOS VARIEDAD
STAR**

Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencias Agropecuarias, Mención
Producción Frutícola

ALETIA FRANCISCA MONTERO GONZÁLEZ

Director de Tesis
JOSÉ IGNACIO COVARRUBIAS PEÑA

Profesores consejeros
RODRIGO CALLEJAS RODRÍGUEZ
MARÍA LORETO PRAT DEL RIO

SANTIAGO - CHILE
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS DE MANEJO SOSTENIBLES PARA EL
CONTROL DE CLORISIS FÉRRICA EN ARÁNDANOS VARIEDAD STAR**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magíster en Ciencias
Agropecuarias, Mención Producción Frutícola

ALETIA FRANCISCA MONTERO GONZÁLEZ

Calificaciones

DIRECTOR DE TESIS

José Ignacio Covarrubias Peña
Ingeniero Agrónomo, MS, Dr.

Aprobado

PROFESORES CONSEJEROS

Rodrigo Callejas Rodríguez
Ingeniero Agrónomo, Dr.

Aprobado

María Loreto Prat del Rio

Ingeniero Agrónomo, MS. Dr.

Aprobado

Santiago, Chile
2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la realización de éste trabajo.

A mi familia que ha sido un pilar fundamental en mi vida, dándome apoyo incondicional y depositando su plena confianza en mí.

A mi director de tesis, José Ignacio Covarrubias por su constante apoyo, consejo y dedicación.

A mis amigos y compañeros, por su alegría y gratos momentos compartidos, y a todos aquellos con los que he vivido momentos importantes en la universidad, especialmente María José Olguin y Francisco González, por su apoyo incondicional en la realización de la tesis.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
Situación nacional del arándano	1
Características del cultivo	1
Hierro en el suelo	2
Hierro en las plantas	3
Funciones del hierro en la planta	3
Asimilación de hierro por la planta.	4
Estrategias convencionales de control de la clorosis férrica.	6
Estrategias sustentables de control de la clorosis férrica.....	8
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS DE MANEJO SOSTENIBLES PARA LA PREVENCIÓN DE CLOROSIS FÉRRICA EN ARÁNDANOS VARIEDAD STAR.	17
RESUMEN.....	17
ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Lugar de estudio	22
Diseño experimental y tratamientos	22
Manejo del ensayo	24
Evaluaciones	25
Parámetros vegetativos	25
Parámetros fisiológicos	25
Análisis estadístico	27

RESULTADOS.....	28
Crecimiento vegetativo y contenido de clorofila	28
Contenido de macro y microelementos esenciales.....	31
Actividad enzimática.....	33
Concentración de ácidos orgánicos en raíz	33
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición mineral del sustrato final de las macetas.....	23
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos para el ensayo en arándanos para corregir deficiencia de Fe.	23
Cuadro 3. Área foliar registrada en las plantas sometidas a los distintos tratamientos durante la temporada.	29
Cuadro 4. Porcentaje Radiación Fotosintéticamente Activa interceptada por el follaje (PARi) registrada en las plantas sometidas a los distintos tratamientos durante la temporada.	29
Cuadro 5. Concentración de macronutrientes determinada en hojas de arándanos sometidos a los distintos tratamientos.	32
Cuadro 6. Concentración de micronutrientes determinada en hojas de los arándanos sometidos a los distintos tratamientos.	32
Cuadro 7. Actividad (nmol NADH mg rad min ⁻¹) de las enzimas PEPC, MDH, NADP ⁺ -IDH y CS determinadas en extractos de raíces de los arándanos sometidos a los distintos tratamientos.	33
Cuadro 8. Concentración (mg g PF ⁻¹) de los ácidos cítrico y málico en extractos de raíces de los arándanos sometidos a los distintos tratamientos.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Largo (cm) de brotes durante la temporada en las plantas sometidas a los distintos tratamientos.	28
Figura 2. Correlación entre la concentración clorofila extractable y los valores SPAD registrados en 16 hojas de arándano.	30
Figura 3. Valor SPAD de la primera hoja expandida, durante la temporada en los distintos tratamientos.	31

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Situación nacional del arándano

Chile es el principal proveedor de arándano del Hemisferio Sur, con una participación del 76% respecto del total. La industria chilena del arándano ha pasado a ocupar un liderazgo a nivel mundial, siendo este el segundo país con mayor exportación de esta fruta durante la temporada 2014-2015, con un aumento del 22% con respecto a lo registrado la temporada 2013-2014. Los principales destinos de tales exportaciones fueron Estados Unidos (67%), Europa (23%) y Lejano Oriente (10%), alcanzando un volumen exportado de 91.000 toneladas de arándano fresco (ODEPA, 2015). Al 2015, Chile cuenta con aproximadamente 15.500 hectáreas de arándano, de las cuales el 46% se encuentran en plena producción, el 27% en producción creciente, el 17% en formación y el 10% en producción decreciente. La mayor superficie de plantación del cultivo se encuentra en la zona sur, con 8.840 ha (ODEPA, 2015). Sin embargo, debido a diversos factores agronómicos con favorables implicancias en la rentabilidad económica del cultivo (cosechas tempranas, condiciones climáticas favorables, menor susceptibilidad a enfermedades, etc.), se ha verificado en los últimos años, un incremento significativo en el establecimiento del arándano en la zona central de Chile, alcanzando una superficie de plantación de 6.064 ha (ODEPA, 2015). Esta expansión del cultivo hacia la zona central de Chile, entre la Región de Coquimbo y la Región del Maule, ha impulsado la introducción del arándano en una elevada diversidad de ambientes edafoclimáticos, y en muchos casos, en áreas donde los suelos presentan limitaciones severas para su cultivo. Entre las principales limitaciones relativas a propiedades fisicoquímicas del suelo se encuentra el pH neutro-alcalino, la presencia de elevadas concentraciones de carbonatos y la escasa porosidad (Mancilla y Reginato, 2011). Tales limitantes, han inducido problemas nutricionales en los arándanos, especialmente carencias de hierro.

Características del cultivo

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), es un arbusto nativo de Norteamérica, pertenece a la familia *Ericaceae* y al género *Vaccinium*, constituido por cinco especies: *V. corymbosum* L. (Highbush), *V. ashei* Reade (Rabbiteye), *V. myrtulloides* Mitchx (Lowbush), *V. angustifolium* Ait (Lowbush), *V. brittonii* Port. Ex Brickn (Lowbush) y es considerado dentro del grupo de los berries (Strik y Finn, 2008). Las especies de mayor importancia comercial son el arándano de arbusto alto *V. corymbosum* L., arándano de arbusto bajo *V. angustifolium* Ait., y arándano ojo de conejo *V. ashei* Reade. En general, el arándano presenta un crecimiento arbustivo que puede alcanzar hasta tres metros de altura, dependiendo del genotipo, llegando a conformar un seto continuo dentro de la plantación. Según las variedades, las plantas pueden presentar un hábito más o menos erecto (Retamales et al., 2014).

El sistema radicular es superficial, fibroso y de poca extensión. La raíz está desprovista de pelos radicales, de modo que son las raíces jóvenes las que efectúan principalmente la absorción (Hancock et al., 1992; Flores et al., 2011). Sus hojas son simples y se distribuyen en forma alterna a lo largo de la ramilla, de forma ovalada a lanceolada o aserrada dependiendo de la variedad, de color verde oscuro y generalmente con abundante pilosidad en el envés y en general, las especies domésticas son caducifolias (Gough, 1994; Retamales y Hancock, 2012). Las flores se producen en inflorescencias (racimos), generalmente axilares que se diferencian en verano, y la flor es pedunculada (Retamales y Hancock, 2012). El fruto es una baya casi esférica que, dependiendo de la especie y cultivar, puede variar en tamaño y en color desde azul claro hasta negro. La epidermis del fruto está provista de secreciones cerosas que le dan una terminación muy atractiva al fruto (Undurraga et al., 2013). El arándano crece dentro de una amplia gama de climas, debido a que sus requerimientos de frío varían entre 400 a 1.100 horas. Los arándanos altos y “ojo de conejo” son más resistentes a la sequía y tienen menos requerimiento de frío (Bañados, 2006).

El arándano es considerado una planta calcífuga, por lo tanto es una especie adaptada a condiciones de pH ácido del suelo, obteniendo un mejor crecimiento y productividad cuando crecen en un pH entre 4,0 y 5,5 (Retamales y Hancock, 2012). Esta condición permite incrementar la disponibilidad de algunos nutrientes, tales como el hierro y manganeso, cuyos requerimientos porcentuales en la planta de arándano son superiores a los de otras especies frutales (Hirzel y Rodríguez, 2003). Por lo anterior, el arándano se clasifica como una especie altamente susceptible al déficit de hierro (Retamales y Hancock, 2012). Tal carencia nutricional, puede causar una drástica reducción en la longevidad del huerto, el crecimiento de raíces y brotes y el rendimiento (Hanson y Hancock, 1996).

El hierro en el suelo

El hierro es el segundo metal más abundante en la corteza terrestre después de aluminio. Los minerales primarios son la principal fuente de hierro en el suelo, los cuales incluyen principalmente silicatos ferromagnéticos, y a partir de la meteorización de estos minerales primarios se libera hierro soluble a la solución, el cual puede ser utilizado por los organismos del suelo, unirse a distintos ligandos orgánicos, o bien ser transformado a minerales secundarios. Sin embargo, estos se transforman fundamentalmente en óxidos e hidróxidos de Fe (III), de distinta composición y grado de cristalización y estos son los que controlan su solubilidad en el suelo (Lindsay, 1979; Murad y Fischer, 1988; Mengel, 2000). En el suelo el hierro está presente en sus dos estados de oxidación, siendo el Fe (III) la especie soluble predominante en condiciones aeróbicas.

La solubilidad del hierro es, sin embargo, extremadamente baja, especialmente en suelos alcalinos (Lemanceau et al., 2009). Las causas de la carencia de hierro en las plantas son múltiples y de distinta naturaleza. Entre ellas destacan la escasa disponibilidad de hierro como producto de la concentración de ion bicarbonato en el suelo, y otros factores como las interacciones entre el hierro y otros nutrientes, excesos de humedad, y temperaturas extremas (Juárez et al., 2007). Respecto de la disponibilidad de este metal, existen varios factores que

la modifican, tales como el pH, potencial redox y tipo de mineral al que está asociado. La solubilidad de los óxidos e hidróxidos de Fe (III) presentes en el medio está muy relacionada con el pH del suelo (Kim y Guerinot, 2007). En los suelos ácidos, con pH menores a 5, el hierro está presente principalmente en estado ferroso (Fe^{+2}), forma predominantemente absorbida por las raíces de las plantas dicotiledóneas como el arándano. En suelos alcalinos, con pH superior a 7, el estado férrico (Fe^{+3}) prevalece, y debido a la alta afinidad de tal forma química para formar compuestos insolubles, la solubilidad del hierro se reduce drásticamente, al igual que su absorción radicular. Así, el hierro disponible disminuye notablemente con un pH igual o superior a 7, mientras que es más disponible a pH cercanos o menores a 6 (Razeto, 2009). Como regla general, el Fe (II) es tomado preferentemente por las plantas en comparación con el Fe (III), pero esto depende de las especies (estrategias I y II) (Marschner, 2012). Por otra parte, la solubilidad del Fe en un suelo también depende del contenido de materia orgánica del mismo. Así, la asociación del hierro con los agentes quelantes de la materia orgánica da lugar a la formación de complejos que incrementan considerablemente la concentración y la movilidad de este nutriente en la disolución del suelo (Lobartini y Orioli, 1988; Cesco et al., 2000).

Los suelos calcáreos se caracterizan por altos contenidos de carbonatos, altas concentraciones del ion Ca^{+2} en la solución y alto pH, sin embargo, el factor más importante que provoca la clorosis inducida es el bicarbonato. Este ion afecta la absorción de hierro y su translocación al interior de la planta. Existen evidencias científicas de que la clorosis férrica frecuentemente encontrada en lugares calcáreos, se produce por una parte por el efecto del bicarbonato como tampón alcalino en el suelo, y por otra parte por desórdenes fisiológicos inducidos por un exceso de HCO_3^- en el medio radicaal, que resulta en la inmovilización del Fe al interior de la planta (Mengel et al., 1979; Mengel, 2000), y por tanto se dificulta la nutrición férrica del vegetal. Además, la presencia de bicarbonato afecta los principales mecanismos de respuesta de la planta a la carencia de hierro: se neutralizan los protones liberados por el vegetal, la alcalinización reduce la secreción de compuestos fenólicos y dificulta la reducción del Fe(III) en la membrana plasmática (Römheld y Marschner, 1986; Marschner, 2012). Todo ello conduce a una disminución en la toma y transporte de hierro por la planta.

El hierro en las plantas

Funciones del hierro en la planta

La importancia del hierro en las plantas, se debe a que es un micronutriente esencial que interviene en numerosos sistemas enzimáticos con y sin grupos hemo, participando en procesos de óxido-reducción especialmente en mitocondrias y cloroplastos (Mengel, 2000). Dentro de las hemo-proteínas, se encuentran los citocromos que son los componentes de los sistemas redox en los cloroplastos, en la nitrato reductasa y en las mitocondrias (Clarkon y Hanson, 1980; Marschner, 2012). La catalasa y la peroxidasa son hemo-enzimas cuya actividad disminuye bajo déficit de hierro. La peroxidasa favorece la eliminación de H_2O_2 en los cloroplastos (Römheld y Marschner, 1991; Ranieri et al., 2001; Marschner, 2012).

Aquellas proteínas constituidas sin grupo hemo, son las que presentan enlaces Fe-S, donde el hierro está coordinando al grupo tiol de la cisteína y/o al azufre. A este grupo pertenece la ferredoxina, xantina, oxidasa, aconitasa y peróxido dismutasa. La ferredoxina es una de las más importantes debido a su participación en un gran número de procesos metabólicos como la fotosíntesis, asimilación reductora del nitrato y sulfato, y en la fijación del nitrógeno atmosférico (Ranieri et al., 2001; Marschner, 2012).

El hierro además interviene en la fotosíntesis, debido a que cataliza la síntesis de clorofila. El principal efecto de la carencia de hierro en las hojas se produce en los cloroplastos, donde el déficit del metal altera su estructura y funciones. En particular, se ve reducido el número de tilacoides y de granas, además de la reducción de todos los pigmentos que absorben la luz, tales como clorofilas a y b y carotenos. Estos últimos disminuyen en menor proporción que las clorofilas ante un déficit de hierro. Por otra parte, en las plantas con carencia de hierro se ve reducido también el transporte fotosintético de electrones (el hierro es uno de los constituyentes de numerosos transportadores de electrones) (Miller et al., 1984; Soldatini et al., 2000). Consecuentemente, la carencia de hierro en las plantas genera una reducción de la capacidad fotosintética que se traduce en una disminución en la tasa de producción de azúcares, almidón y algunos aminoácidos, llegando finalmente a la alteración en la síntesis de las proteínas (Terry y Zayed, 1995). Los síntomas de la carencia de hierro en plantas se manifiestan mediante una clorosis intervenal marcada, la cual se expresa en hojas jóvenes, pudiendo llegar en casos más severos a ser desprovistas completamente de la clorofila (hojas blancas), consecuencia del desequilibrio entre los contenidos de clorofila y carotenos (Marschner, 2012).

Absorción del hierro por la planta

Las especies vegetales difieren en sus mecanismos fisiológicos para absorber y solubilizar el hierro en la solución suelo y la rizósfera. Se ha propuesto que estas diferencias se deben principalmente a la capacidad de la especie vegetal para solubilizar y movilizar hierro en la rizósfera y mejorar su disponibilidad para la absorción de la planta (Mengel, 2000). En situaciones en las que existe una carencia de hierro en el medio, las plantas superiores han desarrollado mecanismos para aumentar la disponibilidad del Fe en la solución del suelo. En base a ello, las plantas se dividen en dos grupos dependiendo del modelo de respuesta que desarrollan ante este déficit: plantas de estrategia I y estrategia II (Marschner et al., 1986; Römheld, 1987; Schmidt, 1999; Puig et al., 2007; Guerinot, 2010; Marschner, 2012).

La estrategia I de absorción del hierro, es típica de especies dicotiledóneas, como lo es el arándano, y monocotiledóneas no gramíneas. Estas plantas absorben el hierro desde el suelo como Fe^{+2} . En suelos de pH alcalino, el Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} y, en consecuencia, tal mineral está presente en el suelo como una forma química no soluble y disponible para las plantas (Marschner, 2012). En tales casos, las plantas que desarrollan la Estrategia I de absorción del hierro responden a la carencia mediante cambios fisiológicos como son la liberación de H^+ y moléculas reductoras, así como el incremento en la actividad de la enzima hierro quelato reductasa (FCR), y cambios morfológicos como la proliferación de raíces laterales para incrementar el área de absorción (López-Millan et al., 2001; Dell'Orto et al., 2003). La FCR se encuentra en la membrana plasmática de las células de la rizodermis y cataliza la reducción

del Fe^{+3} presente en la rizósfera, lo cual permite la absorción del hierro reducido (Fe^{+2}) por la planta. La FCR es una enzima capaz de reducir el Fe con electrones provenientes de NADPH citoplasmático (Moog y Bruggemann, 1994; Rabotti y Zocchi, 1994; Susín et al., 1996; Rombolà et al., 2002). Por otra parte, las plantas de estrategia I tienen la capacidad de exudar protones a través de la membrana plasmática de la raíz hacia la rizósfera, mediante un incremento en la actividad de la enzima ATPasa, disminuyendo el pH de la solución del suelo y aumentando la solubilidad del Fe^{+3} (Kim y Guerinot, 2007). El mecanismo de reducción del pH de la rizósfera parece estar relacionado con el anterior, debido a que la acidificación de la rizósfera, además de contribuir a la solubilización del hierro del suelo, mejora la actividad de la enzima FCR, la que se estimula por bajo pH y que mejora la afinidad por el sustrato de la reductasa, lo que puede atribuirse a una neutralización de la carga negativa de las superficie celulares y por lo tanto impedir la repulsión de los quelatos de hierro cargados negativamente por los lugares de reducción (Schmidt, 2006). Además, las plantas de Estrategia I incrementan la exudación radicular de compuestos quelantes del hierro, tales como algunos fenoles y ácidos orgánicos, en respuesta a la deficiencia de Fe. Estos compuestos fenólicos también pueden afectar la disponibilidad de Fe en la rizósfera a través de la formación de complejos de quelatos de Fe (Cesco et al., 2010). La capacidad quelante de estos compuestos podría permitir que se disuelvan óxidos de hierro o minerales de Fe poco solubles, mejorando la velocidad de disolución (Kraemer et al., 2006).

Otra de las respuestas encontradas a nivel radicular, que las especies tolerantes a la clorosis férrica pueden desarrollar ante un déficit de hierro, son cambios metabólicos que incluyen la acumulación de ácidos orgánicos en las raíces, principalmente citrato y malato, y cambios en el estado de oxidación del citoplasma (Ollat et al., 2003). Además se ha encontrado, en raíces de remolacha azucarera deficientes de hierro, un aumento en la concentración de ácido ascórbico y glutatión reducido, y cambios en la actividad de enzimas que son componentes del ciclo ascórbico-glutatión, que participan en la defensa antioxidante de las células (Zaharieva et al., 2004). En incremento en la concentración de ácidos orgánicos se produce mediante un aumento en la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en el citoplasma de las células de las raíces, y de distintas enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (López-Millán et al., 2001; Agnolon et al., 2002; Rombolà et al., 2002; Andaluz et al., 2002; Ollat et al., 2003). Esta acumulación de ácidos orgánicos coincide con el aumento de la liberación de protones y la actividad de la FCR en diferentes especies (Brancadoro et al., 1995). Sin embargo, estos efectos no siempre se desarrollan en paralelo (Abadía et al., 2002). Se ha propuesto que la alcalinización del citoplasma asociada con la liberación de protones podría activar la actividad de la enzima PEPC y de distintas enzimas de ciclo tricarbónico como la malato deshidrogenasa (MDH), citrato sintetasa (CS) isocitrato deshidrogenasa (IDH), lo que puede mantener el ciclo de los ácidos tricarbónicos, incrementando la acumulación de los ácidos orgánicos (Yang et al., 1994; Rabotti et al., 1995; López-Millán et al., 2001). La enzima PEPC cataliza la incorporación de bicarbonato en un ácido orgánico C_3 , el fosfoenol piruvato, generando oxalacetato, el cual es transformado a malato mediante la actividad de la enzima malato deshidrogenasa (Covarrubias y Rombolà, 2013). Tales reacciones, constituyen la base de los mecanismos de la planta para mantener el pH citoplasmático.

En las plantas que desarrollan la estrategia II de absorción del hierro, típica de especies monocotiledóneas (gramináceas), los cambios morfológicos y fisiológicos inducidos por

deficiencia de hierro descritos para plantas de estrategia I están ausentes (Marschner, 2012). Estas especies son generalmente menos susceptibles a la clorosis férrica y usan una estrategia diferente para la adquisición del hierro. Tales especies, responden ante una deficiencia de hierro mediante la acumulación y liberación radicular de aminoácidos que no forman proteínas. Algunos de estos aminoácidos han sido identificados como ácido avénico y el ácido mugineico, los cuales derivan de la nicotinamina, y se agrupan bajo el nombre de fitosideróforos (PS) (Bashir et al., 2006; Guerinot, 2010; Gregory et al., 2013). Las gramíneas poseen una proteína transportadora en la membrana plasmática de las células radiculares, que se caracteriza por su elevada afinidad con los fitosideróforos, y que los transfiere hacia el citoplasma, para proporcionar el Fe requerido por las plantas en situaciones de carencia. Los fitosideróforos también forman complejos con otros metales pesados como el zinc, cobre y manganeso, sin embargo, el transportador en la membrana plasmática tiene una baja afinidad por los correspondientes complejos (Marschner et al., 1986; Ma et al., 1993; von Wirén et al., 1996; Broadley et al., 2007; White and Broadley, 2009; Marschner, 2012).

Los fitosideróforos se sintetizan a partir de la L-metionina (Met) via nicotinamina (NA). La nicotinamina no sólo es un precursor de la biosíntesis de PS, sino también es un fuerte agente quelante de Fe^{+2} , pero no de Fe^{+3} , siendo también esencial para el buen funcionamiento de los procesos de Fe^{+2} dependientes (Marschner, 2012). Para la biosíntesis de los fitosideróforos la metionina es el precursor común y la nicotinamina un intermediario (Shojima et al., 1990, Ma et al., 1996). El ciclo de síntesis de la metionina sufre una gran activación en la raíces de las plantas deficientes en hierro, por la demanda de metionina para la síntesis de fitosideróforos (Kobayashi et al., 2006). Los fitosideróforos forman complejos PS- Fe^{+3} mediante una quelación natural del mineral en la rizósfera, y tal complejo es absorbido por las plantas a través de un sistema de transporte específico del hierro a través de la membrana plasmática (Ma et al., 2003). La liberación de los PS sigue un ritmo diurno característico y es rápidamente reducida con la liberación de hierro (Marschner, 2012).

Estrategias convencionales de control de la clorosis férrica

La deficiencia de hierro en las plantas es un problema nutricional de difícil corrección (Razeto, 2009). En Chile, para corregir este problema se utilizan métodos de acidificación de suelo, ya sea antes de plantar, como también durante el cultivo. Para ello, normalmente se emplea el azufre elemental (S) como una enmienda que permite acidificar el suelo, dado que la reacción del azufre con el agua y el oxígeno del suelo, en presencia de microorganismos quimioautotróficos especializados (*Thiobacillus* y otras especies), genera ácido sulfúrico como reacción intermedia, lo que finalmente libera protones (H^+) que reducen el pH en el suelo (Navarro y Navarro, 2003). Este método no es completamente eficaz, ya que, dependiendo del pH inicial y la capacidad de amortiguación del suelo (CIC, CEC), se deben aplicar cantidades extremadamente altas de azufre para cambiar el pH al nivel óptimo (5 para el arándano), afectando la disponibilidad de otros nutrientes (Horneck et al., 2004) y la biomasa del suelo (muerte de biomasa microbiana) (Hanson, 2006).

Otra alternativa para reducir el pH del suelo es la aplicación de ácidos. Experiencias en arándanos en aplicaciones vía riego en suelos alcalinos de naturaleza calcárea (pH 8,2), han

reportado un aumento en la disponibilidad de hierro, boro y zinc, con lo cual se mejoró en forma importante los rendimientos. Pero también se ha observado que no todos los ácidos producen los efectos esperados debido a que provocan un aumento en la salinidad; los ácidos fosfórico y sulfúricos son los más efectivos (Ferreyra et al., 2008). El más utilizado en la agricultura es el ácido sulfúrico, el cual es frecuentemente incorporado a través del riego por goteo. Esta enmienda inorgánica acidifica los suelos con mayor eficacia respecto del azufre elemental, especialmente en suelos débilmente tamponados (Horneck et al., 2004). En términos generales, esta técnica es eficiente para reducir el pH e incrementar la solubilidad del hierro en el suelo, sin embargo, el ácido sulfúrico es peligroso para el operario agrícola, aumenta la salinidad del suelo (conductividad eléctrica) afectando la disponibilidad de otros nutrientes (Ferreyra et al., 2008), y además, las aplicaciones repetidas de ácido sulfúrico en el suelo pueden inducir efectos perjudiciales sobre la biomasa microbiana (Hanson, 2006).

Por otra parte, los quelatos de hierro sintéticos, a lo largo del tiempo han demostrado ser la solución más efectiva para la corrección del déficit de hierro. Su eficacia es directamente proporcional a su capacidad para mantener hierro en forma disponible para la planta, en cantidad y durante el tiempo necesario para que ésta lo tome (Lucena, 2003). Los quelatos de hierro pueden utilizarse como fertilizantes, ya sea añadiéndolos al suelo o mediante pulverización foliar. En aplicaciones al suelo, sin embargo, es importante considerar la estabilidad del quelato, la cual está estrechamente vinculada al pH del suelo. A pH de suelo elevados, el Ca^{+2} presente en el suelo en altas concentraciones puede desplazar al Fe^{+3} de los quelatos menos estables, resultando tal reacción en un aumento de los quelatos de Ca y precipitando el hierro como óxido (Mengel, 2000). El quelato Fe-EDDHA es estable entre pH 4 y 10, y es altamente eficiente para corregir carencias de hierro en cultivos establecidos en una amplia gama de suelos. Esto debido a que el Fe^{+3} del quelato es reducido por la raíz a Fe^{+2} , mediante la FCR, y esta reducción produce una desestabilización del quelato de hierro dando lugar a su disociación, liberándose por una parte el agente quelante y por otra el Fe^{+2} , que es absorbido por la raíz (Lucena, 2003). Sin embargo, los quelatos tienen un alto costo de adquisición en el mercado, requieren de repetidas aplicaciones y, debido a su elevada estabilidad y solubilidad, aumentan el riesgo de lixiviación de metales y agentes quelantes en napas freáticas profundas del suelo (Rombolá y Tagliavini, 2006).

En definitiva, son múltiples las evidencias científicas que indican que las prácticas basadas en aplicaciones de quelatos de hierro sintéticos y ácidos inorgánicos presentan consecuencias ambientales severas. Tales evidencias, sugieren fuertemente la necesidad de adoptar alternativas para el manejo de la nutrición férrica en cultivos agrícolas localizados en suelos alcalino-cálcicos, utilizando estrategias eficaces y sostenibles con el medio ambiente.

Estrategias sostenibles de control de la clorosis férrica

Estudios recientes focalizados en la absorción de hierro en especies gramíneas, han evidenciado que el hierro acomplejado con los PS exudados por las raíces de tales plantas, puede ser absorbido por plantas dicotiledóneas, tan eficazmente como los quelatos sintéticos. La eficacia de prevención de la clorosis mediante asociación con gramíneas, depende de la capacidad de las gramíneas utilizadas para la exudación de fitosideróforos (Ammari y Rombolà, 2010). En una investigación llevada a cabo por Ma et al., (2003), se demostró que la especie *Festuca rubra* L., es altamente eficiente en la secreción de fitosideróforos y se caracteriza por un ritmo circadiano de secreción el cual está influenciado por la temperatura de la raíz. En otro estudio sobre vides establecidas en macetas con un suelo calcáreo (20% de cal activa), se observó que la asociación de las parras con la especie gramínea *Festuca rubra* L., incrementó significativamente el nivel de clorofila de las hojas y contribuyó a mitigar significativamente el déficit de hierro en las vides (Covarrubias et al., 2014).

En general se ha sugerido que la cubiertas vegetales pueden ejercer efectos benéficos en los huertos, incluso asociando diferentes especies. En un huerto de frambuesas, se probaron distintas mezclas de cultivos de cobertera registrándose que la mezcla de trébol blanco + *Festuca rubra* entregó resultados positivos en rendimiento y mejoró el contenido de nutrientes en el suelo (Ovalle et al., 2007). En otro ensayo se probó la asociación de *Festuca ovina* con plantas de vid, y tal asociación logró ser una solución eficaz y además un método sostenible para la corrección de clorosis, en comparación con la aplicación de quelatos u otro fertilizantes (Bavaresco et al., 2010). Por otra parte, en una investigación realizada en perales cultivados en un suelo calcáreo, se ha evidenciado una corrección de la deficiencia en aquellos árboles que crecieron en asociación con especies gramíneas sobre la hilera de plantación (Tagliavini et al., 2000).

Asimismo, se debe considerar otros aspectos de esta asociación con los cultivos. Algunos estudios han demostrado que la presencia de especies de gramíneas pueden estimular la expresión de algunos genes, que codifican proteínas responsables de la absorción de hierro, y tales cambios han sido atribuidos principalmente al nivel de hierro en el suelo, las condiciones de cultivo y etapa fenológica de este (Ding et al., 2009; Ding et al., 2010). Cesco et al. (2006), llevo a cabo un ensayo con cítricos en macetas, en donde estudió el comportamiento de estas especies en asociación con gramíneas. Los resultados obtenidos por tales autores apoyan el concepto de que los PS liberados por las especies gramíneas pueden contribuir a la nutrición férrica de árboles frutales; no obstante, hay que señalar que otros factores, como los cambios en el contenido de agua en el suelo, las diferencias en la capacidad de movilizar el hierro y la demanda de nutrientes de las gramíneas, puede afectar la capacidad de los cultivos de cobertura para proporcionar hierro a las plantas. Así también, en un ensayo en olivos en donde se probaron seis tipos de cobertura, la cebada (*Hordeum vulgare* L.) y espiquilla de burro (*Brachypodium distachyum* L.) mostraron ser exitosas en la corrección de los síntomas de deficiencia de hierro y de otros micronutrientes (Mn, Cu y Zn), sin embargo, se evidenció la necesidad de una gestión adecuada en las coberturas con el fin de evitar la competencia por agua (Cañasveras et al., 2014).

Otra fuente natural rica en hierro, de reciente aparición en el mercado, son los compuestos derivados de sangre animal (Tessarín et al., 2012). La harina de sangre animal se compone principalmente de proteínas que contienen alrededor de 20 a 30 g Fe·kg⁻¹, como hierro en estado ferroso (Fe⁺²), formando un complejo con el grupo hemo de la molécula de hemoglobina, el cual es fácilmente absorbible por las plantas. Tales formulados, por sus características químicas y su capacidad quelante, se postula que podrían constituir una fuente efectiva de hierro para las plantas. En condiciones de campo, la aplicación de harina de sangre (70 g por árbol, equivalente a 180 mg de Fe por árbol) disminuyó los síntomas de clorosis férrica en peras. Por ello, es uno de los principales productos utilizados en Europa como fertilizante en huertos orgánicos (Yunta et al., 2013). Así fue demostrado también en ensayo en vid donde se aplicó sangre animal en condiciones de carencia de hierro, dejando en manifiesto la eficacia de este producto en comparación a quelatos sintéticos, no solo aportando hierro sino también mediante la incorporación de nitrógeno al sistema (Tessarín et al., 2012). En un estudio realizado por Kalbasi y Shariatmadari, citado por Yunta et al., (2013), se demostró que la aplicación de Fe mediante harina de sangre animal, obtuvo una eficacia análoga para corregir la deficiencia de Fe en un cultivo de soya, respecto de la aplicación al suelo de un quelato de hierro *o-o*-EDDHA/Fe. En tal estudio, el rendimiento y el contenido de Fe en las plantas que recibieron harina de sangre fueron mayores respecto del control, y no mostraron diferencias respecto de las plantas que recibieron quelatos de hierro.

Sin embargo, la alta tasa de retención observada en suelos con materiales de Ca o suelos calcáreos (altos en contenido de Ca), sugiere tener en cuenta una posible limitación en el uso de este compuesto cuando el terreno es muy rico en cal, debido a que los procesos de agregación podrían ser predominantes sobre la precipitación libre de hierro. Además, los procesos de adsorción/agregación en la relación raíz-suelo pueden ser modificados por la actividad de la raíz, por lo que se debe considerar la eficacia del compuesto harina de sangre en evaluaciones específicas a través de cada cultivo de plantas (Yunta et al., 2013).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadía, J.; A.F. López-Millán; A.D. Rombolà and A. Abadía. 2002, abr. Organic acids and iron deficiency: a review. *Plant and Soil*, 241(1): 75-86.

Agnolon, F.; S. Santi; Z. Varanini and R. Pinton. 2002, abr. Enzymatic responses of cucumber roots to different levels of Fe supply. *Plant and Soil*, 241(1): 35-41.

Ammari, T. and A.D. Rombolà. 2010, jun. Overcoming iron deficiency chlorosis in citrus through intercropping with perennial grass species. *Acta Horticulturae*, 1: 327-332.

Andaluz, S.; A.F. López-Millán; M.L. Peleato; J. Abadía and A. Abadía. 2002, abr. Increases in phosphoenolpyruvate carboxylase activity in iron-deficient sugar beet roots: analysis of spatial localization and post-translational modification. *Plant and Soil*, 241(1): 43-48.

Bañados, M. 2006. Blueberry production in South America. (pp.165-172). En: VIII:International Symposium on Vaccinium Culture: trabajo presentado como ponencia (8^a, 3-8 mayo 2004, Sevilla,España y Oerias, Portugal). Libro de Resúmenes. Eds. L. Lopes da Fonseca y F. Romero. Sevilla, España: Leuven, Belgium. 601p.

Bavaresco, L.; M.I. Gonçalves; M. Gatti and F. Ferrari. 2010, jun. Effects of traditional and new methods on overcoming lime-induced chlorosis of grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 6(2): 186-190.

Bashir, K.; H. Inoue; S. Nagasake; M. Takahashi; H. Nakanishi and S. Mori. 2006, oct. Cloning and characterization of deoxymugineic acid synthase genes from graminaceous plants. *Journal of biological chemistry*, 281(43):32395- 402.

Brancadoro, L.; G. Rabotti; A. Scienza and G. Zocchi. 1995, abr. Mechanisms of Fe-efficiency in roots of *Vitis* spp. in response to iron deficiency stress. *Plant and Soil*. 171(2): 229-234.

Broadley, M.R.; P.J. White; J.P. Hammond; I. Zelko and A. Lux. 2007, feb. Zinc in plants. *New Phytologist*, 173(4): 677–702.

Calandra, P.; D. Ortiz; G. Pozo y B. Noziglia. 2012. Manual para la redacción de referencias bibliográficas. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 84p.

Cañasveras, J.C.; M.C. del Campillo; V. Barrón and J. Torrent. 2014, ago. Intercropping with grasses helps to reduce iron chlorosis in olive. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(3): 554-564.

Cesco, S.; G. Neumann; N. Pinton; R. and L. Weisskopf. 2010, abr. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil*, 329(1-2): 1-25.

Cesco, S.; A.D. Rombolà; M. Tagliavini; Z. Varanini and R. Pinton. 2006, ago. Phytosiderophores released by graminaceous species promote ^{59}Fe -uptake in citrus. *Plant and Soil*, 287(1): 223-233.

Cesco S.; V. Römheld; Z. Varanini and R. Pinton. 2000, jun. Solubilization of iron by water-extractable humic substances. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163(3): 285-290.

Clarkson, D.T. and J.B. Hanson. 1980, jun. The mineral nutrition of higher plants. *Plant Physiology*, 31: 239-298.

Covarrubias, J.I.; A. Pisi and A.D. Rombolà. 2014, dic. Evaluation of sustainable management techniques for preventing iron chlorosis in the grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine research*, 20(1): 149-159.

Covarrubias, J.I. and A.D. Rombolà. 2013, sep. Physiological and biochemical responses of the iron chlorosis tolerant grapevine rootstock 140 Ruggeri to iron deficiency and bicarbonate. *Plant and Soil*, 370(1-2): 305-315.

Dell'Orto, M.; P. De Nisi; A. Pomtiggia and G. Zocchi. 2003, oct. Fe deficiency responses in *Parietaria diffusa*: A Calcicole plant. *Journal of Plant Nutrition*, 26(10-11): 2057-2068.

Ding, H.; L. Duan; J. Li; H. Yan; M. Zhao; F. Zhang and W.X. Li. 2010, ago. Cloning and functional analysis of the peanut iron transporter AhIRT1 during iron deficiency stress and intercropping with maize. *Journal Plant Physiol*, 167(12): 996-1002.

Ding, H.; L. Duan; H. Wu; R. Yang; H. Ling; W.X. Li. 2009, jul. Regulation of AhFRO1, an Fe (III)-chelate reductase of peanut, during iron deficiency stress and intercropping with maize. *Physiologia Plantarum*, 136(3): 274-283.

Ferreira, R.; G. Sellés; R. Rui; P. Gil y C. Barrera. 2008. Manejo de la clorosis férrica en palto. (Bol. Inf. N°81), Centro Regional de Investigación La Cruz, INIA, Ministerio de Agricultura. [En línea]. Quillota, Chile: INIA. 60p. Recuperado en: <www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR35156.pdf> Consultado el: 28 de mayo de 2014.

Flores, D.; M. Vásquez and J. Mildemberg. 2011, may - ago. Efecto de la fertilización cálcica sobre el crecimiento vegetativo de arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.). *Horticultura Argentina*, 30 (72): 20-26.

Gough, R.E. 1994. Growth and Development. (cap. 3, pp.11-65). In: The Highbush Blueberry and Its Management. New York, USA: Food Products Press. 272p

Gregory, P and S. Nortcliff. 2013. Properties and management of cationic elements for crop growth: Beneficial and phytotoxic element. (cap. 6, pp.160-194). En su: Soil Conditions and Plant Growth. [En línea]. Eleventh. USA: A.White. 461 p. Recuperado en: <https://www.google.cl/search?tbm=bks&q=soil+conditions+and+plant+growth>. Consultado el: 23 de julio de 2015.

Guerinot, M.L. 2010. Iron in Cell Biology of Metals and Nutrients. (cap. 4, pp.75-94). En: Hell, R. and Mendel, R. (eds.). Cell Biology of Metals and Nutrients. Germany: SPRINGER. 299p.

Hancock, J.; J. Retamales; P. Lyrene; C. Moggia and M. Lolas. 1992, jul - spt. Blueberry culture in Chile-current status, future prospects. *HortTechnology*, 2(3): 310-315.

Hanson, E.J. 2006. Nitrogen fertilization of highbush blueberry. (pp. 547-551). En: VIII: International Symposium on Vaccinium Culture (8ª, 3-8 mayo 2004, Sevilla, España y Oeiras, Portugal). Trabajo presentado como ponencia. Sevilla, España: Leuven, Belgium. 601p.

Hanson, E.J. and J. Hancock. 1996, mar. Managing the nutrition of highbush blueberries. (Bol.Ext. E-2011), Michigan State University Extension. Michigan: East Lansing. 8p.

Hirzel, J. y N. Rodríguez. 2003, sept. Acidificación de suelos para plantación de arándanos. (Bol.Inf. N°86), Centro Regional de Investigación Quilamapu, INIA, Ministerio de Agricultura. [En línea].Chillan, Chile: INIA. 2p. Recuperado en: www.inia.cl/medios/quilamapu/pdf/bioleche/BOLETIN86.pdf. Consultado el: 20 de mayo de 2014.

Horneck, D.; J. Hart; R. Stevens; S. Petrie and J. Altland. 2004, feb. Acidifying soil for crop production west of the Cascade Mountains (Western Oregon and Washington). (Bol. Ext. E-EM8857), Oregon State University. Oregon. 11p.

Juárez, M.; M. Cerdán y A. Sánchez-Sánchez. 2007. Hierro en el suelo-planta. Departamento Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Alicante, España. 22p.

Kim, S.A. and M.L. Guerinot. 2007, abr. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *Plant Transporters and Channels*, 581 (12): 2273-228.

Kobayashi, T.; N. Nishizawa and S. Mori. 2006. Molecular analysis of iron-deficient graminaceous plants (cap. 20, pp.395-435). En: J. Abadía; L. Barton (eds.). Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. 1ª. Berlin: Springer. 477p.

Kraemer, S.M.; D.E. Crowley and R. Kretzschmar. 2006, oct. Geochemical aspects of phytosiderophores-promoted iron acquisition by plants. *Advances Agronomy*, 91: 1-46.

- Lindsay, W. L. 1979. Chemical equilibria in soils. John Wiley & Sons, New York, USA, 449 p.
- Lemanceau, P.; P. Bauer; S. Kraemer and J.F. Briat. 2009, jun. Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. *Plant and Soil*, 321 (1): 513-535.
- Lobartini, J. and G. Orioli. 1988. Absorption of iron humate in nutrient solution by plants. *Plant and Soil*. 106(2): 153-157.
- López-Millán, A.; F. Morales; A. Abadía and J. Abadía. 2001, jun. Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the organic acid metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Physiologia Plantarum*, 112(1): 31-38.
- Lucena, J. 2003, feb. Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in strategy I plants. *Journal of Plant Nutrition*, 26(10-11): 1969-1984.
- Ma, J.F.; H. Ueno; D. Rombola and T. Iwashita. 2003, sep. Characterization of phytosiderophores secretion in *Festuca rubra*. *Plant and Soil*, 256 (1): 131-137.
- Ma, J.F. and K. Nomoto. 1996, jul. Effective regulation of iron acquisition in graminaceous plants. The role of mugineic acids as phytosiderophores. *Physiologia Plantarum*, 97(3): 609-617.
- Ma, J.F. and K. Nomoto. 1993, jun. Two related biosynthetic pathways for mugineic acids in gramineous plants. *Plant Physiology*, 102(2): 373– 378.
- Mancilla, A. y G. Reginato. 2011, sep. Clorosis férrica en arándano. *Antumapu*, 9(1-2): 20-26.
- Marschner, P. 2012. Function of nutrients micronutrients: Iron. (cap.7, pp.191-200). En su: Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3^a. The University of Adelaide, Australia: Elsevier. 651p.
- Marschner, H.; V. Romheld and M. Kisell. 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition*, 9(3-7): 695-713.
- Mengel, K. 2000. Hierro: El hierro en la fisiología. (cap.13, pp.491-507). En su: Principios de nutrición vegetal. 4^a. Basel-Switzerland, Suiza: International Potash Institute. 692p.
- Mengel, K.; H.W. Scherer and N. Malissiovar. 1979. Chlorosis from the aspect of soil chemistry and vine nutrition. *Mitt Klosterneuburg*, 29: 151-156.
- Miller, G.W. ; J.C. Pushnik and G.W. Welkie. 1984. Iron chlorosis, a worldwide problem, the relation of chlorophyll biosynthesis to iron. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5): 1-22.

Moog, P.R. and W. Bruggmann. 1994, jun. Iron reductase systems on the plant plasma membrane. A review. *Plant and Soil*, 165(2): 241-260.

Murad, E.; W.R. Fischer. 1988. The geobiochemical cycle of iron. (cap.1, pp.1-18). En su: Iron in soils and clay minerals. J.W. Stucki eds. D. Reidel Publishing Company. 843p.

Navarro, S. y G. Navarro. 2003. Los elementos químicos y la vida vegetal: macro y micronutrientes esenciales y elementos beneficiosos. (cap.8, pp.140-143). En su: Química agrícola. 2^a. Madrid, España: Mundi-Prensa. 487p.

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). [En línea]. Santiago, Chile.

Recuperado en:

<<http://www.odepa.cl/estadisticas/productivas/>>. Consultado el: 26 de junio 2015.

Ollat, N.; B. Laborde; M. Neveux; P. Diakou-Verdin; C. Renaud and A. Moing. 2003, feb. Organic acid metabolism in roots of various grapevine (*vitis*) rootstocks submitted to iron deficiency and bicarbonate nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 26(10-11): 2165-2176.

Ovalle, C.; M.I. González; A. del Pozo y J. Hirzel. 2007, jul-sep. Cubiertas vegetales en producción orgánica de frambuesa: Efectos sobre el contenido de nutrientes del suelo y en el crecimiento y producción de las plantas. *Agricultura Técnica*, 67(3): 271-280.

Puig, S.; H. Mira; E. Dorcey; V. Sancenón; N. Andrés-Colás; A. García-Molina; J.L. Burkhead; K.A. Gogolin; S.E. Abdel-Ghany; D.J. Thiele; J.R. Ecker; M. Pilon and L. Peñarrubia. 2007, ene. Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochemical and biophysical research communications*, 354(2): 385-390.

Rabotti, G. and G. Zocchi. 1995, abr. Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficiency in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. *Plant Physiology*, 107(1):1195-1199.

Rabotti, G. and G. Zocchi. 1994, abr. Plasma membrana-bound H⁺-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiologia Plantarum*, 90 (4): 779-785.

Ranieri A.; A. Castagna; B. Baldan and G.F. Soldatini. 2001, jul. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany*, 52 (354): 25-35.

Razeto, B. 2009. Nutrient deficiencies: Iron. (cap.1, pp.56-72). En: Symptoms of nutrient imbalances in fruit trees. 1^a. Santiago, Chile: SQM. 189p.

Retamales, J.; M. Palma; Y. Morales; G. Lobos; C. Moggia and C. Mena. 2014, mar. Blueberry production in Chile: Current status and future developments. *Revista Brasileña de Fruticultura*, 36 (1): 58-67.

Retamales, J. and J. Hancock. 2012. Blueberries. 1^a. Oxfordshire, UK: CABI.323p.

Rombolà, A.D. and M. Tagliavini. 2006. Iron nutrition of fruit tree crops. (cap.3, pp.61-83). En: J. Abadía; L. Barton (eds.). Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. 1^a. Berlin:Springer. 477p.

Rombolà, A.D.; W. Brüggemann; A.F. López-Millán; M. Tagliavini; J. Abadía; B. Marangoni and P.R. Moog. 2002, ago. Biochemical responses to iron deficiency in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Tree Physiology*, 22 (12): 869-875.

Römheld, V. and H. Marschner. 1991. Functions of micronutrients in plants. (cap. 9, pp. 297-328). En: J. J. Mordvedt; F. R. Cox; L. M. Snuman; R. M. Welch (eds.). Micronutrients in agriculture. 2^a. SSSA Book Series. Madison, WI. USA. 760p.

Römheld, V. 1987, jun. Different strategies for iron-acquisition in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 70(2): 231-234.

Römheld, V. and H. Marschner. 1986, jun. Evidence for a specific up-take system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology*, 80(1): 175–180.

Schmidt, W. 2006. Iron stress responses in roots of strategy I plants. (cap. 11, pp.229-250). En: J. Abadía; L. Barton (eds.). Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. 1^a. Berlin: Springer. 477p.

Schmidt, W. 1999, ene. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141(1): 1-26.

Shojima, S.; N. Nishizawa; K. Fushlya; S. Nozoe; T. Irifune and S. Mori. 1990, ago. Biosynthesis of phytosiderophores. In vitro biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid from L-methionine and nicotianamine. *Plant Physiology*, 93(4): 1497-1503.

Soldatini, G.F.; M. Tognini; A. Castagna; B. Baldan and A. Ranieri. 2000, nov. Alterations in thylakoid membrane composition induced by iron starvation in sunflower plants. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11-12): 1717-1732.

Strik, B.C. and C.E. Finn. 2008, mar. Blueberry Cultivars for Oregon. (Tech.doc.), Oregon State University. Oregon, USA: University. 12p.

Susín, S.; A. Abadía; J.A. González-Reyes; J. Lucena and J. Abadía. 1996, ene. The pH requirement for in vivo activity of the iron-deficiency-induced "Turbo" ferric chelate reductase. A comparison of the iron-deficiency-induced iron reductase activities of intact plants and isolated plasma membrane fractions in sugar beet. *Plant Physiology*, 110(1): 111-123.

Tagliavini, M.; J. Abadía; A.D. Rombola; A. Abadía; C. Tsipouridis and B. Marangoni. 2000, nov. Agronomic means for the control or iron deficiency chlorosis in deciduous fruit trees. *Journal of Plant Nutrition*, 23 (11-12): 2007-2022.

Terry, N and A. Zayed. 1995. Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency (pp. 283-294). En su: Iron Nutrition in Soils and Plants. [En línea]. SPRINGER-SCIENCE+ Busniess Media. Spain. 401p. Recuperado en: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-0503-3_41#page-1>. Consultado el: 11 de Junio de 2015.

Tessarín, P.; F. Yunta; E. Ingrosso; A.C. Boliani; J.I. Covarrubias and A.D. Rombolà. 2012. Improvement of grapevine iron nutrition by a bovine blood-derived compound. (pp. 335-338). En: VII: International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops (ISHS) (7^a, 19-25 Mayo 2012, Chanthaburi, Thailand). Chanthaburi, Thailand.

Undurraga P. y S. Vargas. 2013, ago. Manual de arándano. (Bol. Tec. N°263), Centro Regional de Investigación Quilamapu, INIA, Ministerio de Agricultura. [En línea]. Chillan, Chile: INIA. 120 p. Recuperado en: <<http://www.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39094.pdf>> Consultado el: 24 de julio de 2015.

Von Wirén, N.; H. Marschner and V. Römheld. 1996, ago. Roots of iron-efficient maize also absorb phyto siderophore-chelated zinc. *Plant Physiology*, 111(4):1119–1125.

Yang, X.E.; V. Römheld and H. Marschner. 1994, jul. Effect of bicarbonate on root growth and accumulation of organic acids in Zn-inefficient and Zn-efficient rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, 164(1):1-7.

Yunta, F.; F. Di Foggia; V. Bellido; M. Morales; P. Tessarín; S. Lope-Rayó; A. Tinti; K. Kovács; Z. Klencsár; F. Fodor and A. Rombolà. 2013, may. Blood meal-based compound. Good choice as iron fertilizer to be used in organic farming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (17): 3995-4003.

Zaharieva, T.B.; Y. Gogorcena and J. Abadia. 2004, abr. Dynamics of metabolic responses to iron deficiency in sugar beet roots. *Plant Science*, 166(4): 1045-1050.

CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS DE MANEJO SOSTENIBLE PARA LA PREVENCIÓN DE CLOROSIS FÉRRICA EN ARÁNDANOS VARIEDAD STAR.

RESUMEN

La expansión del cultivo de arándanos ha impulsado su introducción en áreas donde los suelos presentan limitaciones químicas severas para su cultivo. El objetivo de este estudio fue evaluar algunas implicancias fisiológicas de estrategias sostenibles para la corrección de la clorosis férrica en arándanos variedad Star. En el experimento, se establecieron plantas en macetas con suelo calcáreo, implementando los siguientes tratamientos: (1) asociación del cultivo con las especies gramíneas *Festuca rubra* L. o *Poa pratensis* L. y (2) aplicación de un producto formulado a base de sangre animal. Tales estrategias fueron contrastadas con un control positivo (aplicación de quelato Fe-EDDHA al suelo) y un control absoluto (sin aplicación). Los resultados obtenidos indican que la aplicación de Fe-EDDHA incrementó el crecimiento de los brotes emitidos en primavera en comparación con las plantas asociadas con gramíneas. Respecto del crecimiento de los brotes emitidos durante el verano, las plantas tratadas con sangre animal y Fe-EDDHA mostraron un mayor desarrollo vegetativo respecto al testigo y a las plantas asociadas con gramíneas. El índice SPAD indicó que las plantas tratadas con sangre animal presentaron un contenido de clorofila análogo a las plantas tratadas con Fe-EDDHA y al control absoluto, y mayor en comparación con las plantas asociadas con especies gramíneas. Las determinaciones de actividad de las enzimas y concentración de ácidos orgánicos en raíces no evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados sugieren que la aplicación de sangre animal es una estrategia válida para el control de la clorosis férrica en el arándano, mientras que los cultivos de cobertera posiblemente ejercen una fuerte competencia por agua y nutrientes con los arándanos. Por otra parte, el genotipo de arándano "Star" no reacciona al déficit de Fe mediante mecanismos fisiológicos de respuesta a nivel radicular, lo cual podría explicar en parte la elevada susceptibilidad a tal carencia nutricional exhibida generalmente a nivel de campo.

Palabras claves: hierro, nutrición, cultivo de cobertera, Fe-Hemo.

ABSTRACT

The expanding cultivation of blueberries has promoted the introduction of such species in areas where soils have severe chemical limitations for growing ideally. The aim of this study was to evaluate the physiological implications of sustainable strategies for the correction of iron chlorosis in blueberries var. Star. In the experiment plants were established in pots with a calcareous soil and the following treatments were implemented: (1) association with grasses species; (2) applying a product formulated with animal blood. These treatments were contrasted with a positive control (application of Fe-EDDHA chelate to the ground) and absolute control (no application of Fe-EDDHA). The results indicate that the application of Fe-EDDHA increased the shoot growth in spring compared issued in spring with plants associated with grasses. Regarding the growth of buds during the summer, plants treated with animal blood and Fe-EDDHA showed greater vegetative growth than the control plants associated with grasses. The SPAD index showed that plants treated with animal blood showed a similar value with plants treated with Fe-EDDHA and the absolute control plants, and had a larger value compared to plants associated with grass species. The results obtained in the determinations of enzyme activity and concentration of organic acids in roots did not show significant differences between treatments. The results suggest that the application of animal blood is a valid strategy to control iron chlorosis in blueberries, while cover crops may compete for water and nutrients with blueberries. Moreover, genotype blueberry "Star" does not respond to iron deficiency by physiological response mechanisms at the root level, which could partly explain the high susceptibility to such nutritional deficiency typically displayed at the field level.

Keywords: iron, nutrition, intercropping, Fe-Heme.

INTRODUCCIÓN

Chile es el principal proveedor de arándanos del Hemisferio Sur, pasando a ocupar la posición de líder a nivel mundial. Chile cuenta con aproximadamente 15.500 hectáreas de arándano, de las cuales 8.840 ha se encuentran establecidas en la zona sur. Sin embargo, debido a diversos factores agronómicos con favorables implicancias en la rentabilidad económica del cultivo (cosechas tempranas, condiciones climáticas favorables, menor susceptibilidad a enfermedades, etc.), se ha verificado en los últimos años, un incremento significativo en el establecimiento del arándano en la zona central de Chile, alcanzando una superficie de plantación de 6.064 ha en tal zona (ODEPA, 2015). Esta expansión del cultivo hacia la zona central de Chile, entre la Región de Coquimbo y la Región del Maule, ha impulsado la introducción del arándano en una elevada diversidad de ambientes edafoclimáticos, y en muchos casos, en áreas donde los suelos presentan limitaciones severas para su cultivo. Entre las principales limitaciones relativas a propiedades fisicoquímicas del suelo se encuentra el pH neutro-alkalino, la presencia de elevadas concentraciones de carbonatos y la escasa porosidad (Mancilla y Reginato, 2011). Tales limitantes, han inducido problemas nutricionales en los arándanos, especialmente carencias de hierro.

El arándano es una planta de Estrategia I de absorción del hierro. Estas plantas absorben el hierro desde el suelo como Fe^{+2} . En suelos de pH alcalino, el Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} y, en consecuencia, tal mineral está presente en el suelo como una forma química no soluble y disponible para las plantas (Marschner, 2012). En tales casos, las plantas que desarrollan la Estrategia I de absorción del hierro responden a la carencia mediante cambios fisiológicos como son la liberación de H^+ y moléculas reductoras, el incremento en la concentración de ácidos orgánicos y sus enzimas de síntesis en las raíces, el incremento en la actividad de la enzima hierro quelato reductasa (FCR), y cambios morfológicos como la proliferación de raíces laterales para incrementar el área de absorción (López-Millan et al., 2001; Dell'Orto et al., 2003).

En Chile, para corregir este problema se utilizan métodos de acidificación de suelo mediante la aplicación de ácidos inorgánicos, los cuales son eficientes para reducir el pH e incrementar la solubilidad del hierro en el suelo, sin embargo son peligrosos para el operario agrícola, aumentan la salinidad del suelo (conductividad eléctrica) (Ferreya et al., 2008), y además las aplicaciones repetidas en el suelo pueden inducir efectos perjudiciales sobre la biomasa microbiana (Hanson, 2006). Por otra parte, la aplicación de quelatos de hierro sintéticos es una de las técnicas más utilizadas y eficaces para la corrección del déficit de hierro. Sin embargo, los quelatos tienen un alto costo de adquisición en el mercado, requieren de repetidas aplicaciones y, debido a su elevada estabilidad y solubilidad, aumentan el riesgo de lixiviación de metales y agentes quelantes en napas freáticas profundas del suelo (Rombolá y Tagliavini, 2006).

Estudios recientes focalizados en la absorción de hierro en especies gramíneas, han evidenciado que el hierro acomplejado con los PS exudados por las raíces de tales plantas, puede ser absorbido por plantas dicotiledóneas, tan eficazmente como los quelatos sintéticos. La eficacia de prevención de la clorosis mediante asociación con gramíneas, depende de la

capacidad de las gramíneas utilizadas para la exudación de fitosideróforos (Ammari y Rombolà, 2010). En una investigación llevada a cabo en vides establecidas en macetas con un suelo calcáreo (20% de cal activa), se observó que la asociación de las parras con la especie gramínea *Festuca rubra* L., incrementó significativamente el nivel de clorofila de las hojas y contribuyó a mitigar significativamente el déficit de hierro en las vides (Covarrubias et al., 2014). En otro ensayo se probó la asociación de *Festuca ovina* con plantas de vid, y tal asociación logró ser una solución eficaz y además un método sostenible para la corrección de clorosis, en comparación con la aplicación de quelatos u otro fertilizantes (Bavaresco et al., 2010).

Otra fuente natural rica en hierro, de reciente aparición en el mercado, son los compuestos derivados de sangre animal (Tessarín et al., 2012). La harina de sangre animal se compone principalmente de proteínas que contienen alrededor de 20 a 30 g Fe/kg, como hierro en estado ferroso (Fe^{+2}), formando un complejo con el grupo hemo de la molécula de hemoglobina, el cual es fácilmente absorbible por las plantas. Tales formulados, por sus características químicas y su capacidad quelante, se postula que podrían constituir una fuente efectiva de hierro para las plantas. En condiciones de campo, la aplicación de harina de sangre (70 g por árbol, equivalente a 180 mg de Fe por árbol) disminuyó los síntomas de clorosis férrica en peras. Por ello, es uno de los principales productos utilizados en Europa como fertilizante en huertos orgánicos (Yunta et al., 2013). Así fue demostrado también en ensayo en vid donde se aplicó sangre animal en condiciones de carencia de hierro, dejando en manifiesto la eficacia de este producto en comparación a quelatos sintéticos, no solo aportando hierro sino también mediante la incorporación de nitrógeno al sistema (Tessarín et al., 2012).

HIPÓTESIS

Estrategias de manejo sostenible basadas en el uso de cultivos de cobertera con especies gramíneas y la aplicación de fuentes naturales de hierro, previenen eficazmente la carencia de hierro en los arándanos, mejorando su disponibilidad en el suelo y la absorción en condiciones controladas.

OBJETIVO

Determinar el efecto de manejos sostenibles para prevenir el déficit de hierro en variables vegetativas y fisiológicas de los arándanos.

Objetivos específicos

Determinar el efecto de manejos sostenibles para prevenir el déficit de hierro en variables vegetativas de los arándanos.

Evaluar el efecto de manejos sostenibles para prevenir el déficit de hierro sobre mecanismos fisiológicos de respuesta al déficit de hierro en las raíces de los arándanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El ensayo se realizó durante las temporadas 2014-2015, en la Estación Experimental Antumapu (33°34'11,198"S; 70°37'54,5"O), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la Av. Santa Rosa 11.315, Comuna de La Pintana, Región Metropolitana, Chile.

Los análisis de concentración de clorofilas en las hojas, actividad enzimática y extracciones de ácidos orgánicos en raíces se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Vegetal, perteneciente al Departamento de Producción Agrícola. Las determinaciones de ácidos orgánicos en raíces se realizaron en el Laboratorio de Análisis Cromatográfico y Antioxidantes, perteneciente al Departamento de Agroindustria y Enología.

Diseño experimental y tratamientos

Se utilizaron 25 plantas micropropagadas de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) de la variedad Star de 7 meses de edad, adquiridas en el vivero Blueberry, ubicado en parcela 18, colonia Kennedy, comuna de Paine. Las plantas fueron aclimatadas por 3 semanas en invernadero y luego trasplantadas a macetas de 45 L. Las macetas fueron rellenas con sustrato constituido por una mezcla de 30 L de suelo agrícola proveniente de la Estación Experimental Antumapu (pH 7,9), 15 L de vermiculita para otorgar mayor aireación y 1,2 kg de cal agrícola para tamponar el sustrato a pH sobre 7,0. La mezcla resultante generó un sustrato con un pH 8,1; 10% de carbonatos totales y 2,5 % de cal activa. La composición mineral del sustrato se presenta en el Cuadro 1. Tales condiciones del sustrato cuentan con las propiedades físico-químicas predisponentes para inducir deficiencias de Fe en los arándanos (Retamales y Hancock, 2012). Sucesivamente, las macetas fueron forradas con papel aluminio con el objeto de evitar temperaturas superiores a 30°C en el suelo, y se realizaron ventanas por dos costados a las macetas, las cuales permitieron acceder al sistema radicular para la recolección de muestras. Tales ventanas se mantuvieron cerradas hasta el momento de los muestreos. Las macetas con las plantas fueron puestas bajo malla (sombreadero), a una distancia de 0,45 x 1 m y se instaló un sistema de riego por goteo con un gotero (2 L h⁻¹) por planta. En primavera, los arándanos fueron uniformados en cuanto a desarrollo mediante una poda, dejando 3 brotes principales por planta de 10-20 cm.

Cuadro 1. Composición mineral del sustrato utilizado en el experimento.

Fertilidad			
pH (agua, relación 1:2,5)	(1:2,5)	7,9	Lig. Alcalino
C. Eléctrica (en extracto)	(dS m ⁻¹)	10	Salino
Materia orgánica	(%)	1,9	Bajo
Nitrógeno disponible	(mg kg ⁻¹)	40	Medio
Fósforo disponible	(mg kg ⁻¹)	9	Bajo
Potasio disponible	(mg kg ⁻¹)	82	Bajo
Microelementos disponibles			
Hierro	(mg kg ⁻¹)	14,8	Adecuado
Manganeso	(mg kg ⁻¹)	11,9	Alto
Zinc	(mg kg ⁻¹)	1,6	Adecuado
Cobre	(mg kg ⁻¹)	7,7	Adecuado
Boro	(mg kg ⁻¹)	2,3	Alto
Otras determinaciones			
Carbonato total	(CaCO ₃ %)	10	
Caliza activa	(CaCO ₃ %)	2,5	

Fuente: Laboratorio de análisis agrícolas AGROLAB.

Los tratamientos implementados en el experimento fueron los siguientes: (1) control sin aplicaciones de fuentes de Fe; (2) aplicaciones al suelo del quelato Fe-EDDHA utilizando el producto comercial Basafer[®] Plus (6% p/p SA, Compo); (3) aplicaciones al suelo del producto formulado a base de sangre de cerdo utilizando el producto Hemo Fe 550 (5500 ppm Fe, Farpro Modena); (4) asociación con la gramínea *Poa pratensis* L. y; (5) asociación con la gramínea *Festuca rubra* L. (Cuadro 2.).

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos implementados en el experimento.

Tratamientos	Concentración (i.a)/ Densidad	Dosis de aplicación
T1: Control	-	-
T2: Fe-EDDHA	50.000 mg kg ⁻¹ Fe	0,5 g / 500mL
T3: Hemo Fe	5.500 mg kg ⁻¹ Fe	4,5 g / 500mL
T4: <i>Poa pratensis</i> (L.)	10.000 m ²	
T5: <i>Festuca rubra</i> (L.)	10.000 m ²	

Se implementó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA), donde la unidad experimental fue una planta, al igual que la unidad de observación del ensayo. En el ensayo se establecieron 5 tratamientos con 5 repeticiones, aplicados a cada planta con similar nivel de desarrollo.

Manejo del ensayo

Las aplicaciones del quelato de Fe y sangre de cerdo se realizaron en forma manual. El número de aplicaciones de tales productos se estableció de acuerdo a la intensidad del color verde de la primera hoja completamente expandida (en donde se manifiesta la clorosis férrica), el cual fue determinado mediante el valor SPAD (SPAD MINOLTA 502, Osaka, Japón), procurando mantener un color verde intenso (índice SPAD >25). Las dosis tanto para Fe-EDDHA y Hemo Fe fueron preparadas en envases de 500 ml adicionando agua destilada; en cada unidad de observación se aplicaron 100 mL de la solución por cada aplicación. Durante la temporada se realizaron 17 aplicaciones para cada unidad. Adicionalmente, a cada tratamiento se le aplicó una solución de sulfato de amonio para aportar nitrógeno ($0,1\text{g}\cdot\text{maceta}^{-1}$) y favorecer el desarrollo vegetativo en la fase inicial del crecimiento de las plantas. Para ello se preparó una solución de 14,4 g de sulfato de amonio en 3 L de agua destilada, incorporando 100 ml por planta de la solución en cada aplicación. Se realizaron 5 aplicaciones durante la temporada.

Las gramíneas fueron sembradas durante el otoño del año 2014, con una densidad de 10.000 semillas m^2 . Para esto se preparó una cama de semillas en las macetas, luego fueron sembradas manualmente de forma homogénea en las macetas correspondientes a cada tratamiento. Para finalizar se cubrieron con arena y, durante la primera semana, fueron regadas 2 veces al día con un pulverizador manual para mejorar su germinación. Durante la temporada, estas fueron segadas cada 15 días y se tomó el peso fresco de las gramíneas de cada tratamiento con una balanza de precisión. Luego las muestras fueron secadas en una estufa con aire forzado durante 72 horas a 70°C para obtener el peso seco final. Posteriormente las muestras secas fueron incorporadas a cada maceta de su respectivo tratamiento.

Las plantas fueron regadas periódicamente por goteo, procurando mantener un nivel constante de humedad en el suelo cercano a capacidad de campo (40% de saturación). Para contrarrestar las necesidades de agua de las especies gramíneas, se agregará un suministro adicional en tales macetas (aproximadamente un 20% en comparación a las aplicadas a los demás tratamientos). Se controló el potencial hídrico del suelo mediante tensiómetros de 30 cm de largo, de rango -100/0 cb (Irrometer, Veto, Chile). Para ello se utilizó una curva de retención de agua del sustrato, la cual indicó que entre 30 y 60 cb de presión de los tensiómetros el sustrato se encontraba a capacidad de campo, y sobre los 60 cb se debía iniciar el riego. Adicionalmente, se realizó una fertilización periódica en todas las plantas con una solución nutritiva $\frac{1}{2}$ Hoagland que contenía todos los macro y microelementos esenciales excepto Fe. La conductividad eléctrica del sustrato fue monitorizada periódicamente con un conductivímetro portátil, de rango 0 + 19,99 mS (Modelo L0159952, Veto, Chile), procurando realizar un lavado de sales cada vez que la CE superó el valor $1,5\text{ dS m}^{-1}$. Los lavados se realizaron aplicando una cantidad de agua equivalente al doble del volumen de las macetas. Durante el experimento se realizaron 5 lavados de sales.

Evaluaciones

Parámetros vegetativos

Largo del brote (cm). Se midió semanalmente en tres brotes por planta, previamente marcados con cinta de color. La longitud de tales brotes se midió desde la segunda yema partiendo desde la base del brote, mediante una cinta métrica.

Radiación fotosintéticamente activa interceptada (PARI) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Se determinó mediante un ceptómetro portátil (AccuPar LP 80, Decagon, Devices, Inc. WA. USA), de 80 cm con 80 sensores de luz. La medición se realizó en tres momentos de la temporada 2014-2015 (septiembre, enero y abril), a medio día solar (momento de mayor radiación durante el día) en todas las plantas del ensayo. La evaluación se realizó considerando 5 puntos de medición en forma horizontal bajo el follaje. El área foliar (LAI) se calculó mediante la metodología de Norman (1989).

Parámetros fisiológicos

Intensidad de verde y concentración de clorofila foliar. Se midió semanalmente la intensidad del color verde en la primera hoja expandida de los mismos brotes a los cuales se les evaluó largo, mediante un medidor de clorofila portátil (SPAD MINOLTA 502, Osaka, Japón). Cada valor de SPAD se obtuvo del promedio de 2 mediciones por la hoja, cada una a un lado de la nervadura central. El valor SPAD se correlaciona significativamente con la concentración de clorofila de las hojas (Syvertsen, 1987). Por ello, se colectaron, al azar, 3 hojas por planta con distintos grados de clorosis. A cada una de ellas, se les midió el índice SPAD y se sacaron 2 discos ($1,13 \text{ cm}^2$), los cuales fueron congelados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para las determinaciones de clorofilas. La concentración de las clorofilas a y b, se determinaron a partir de la extracción de estas con acetona al 80%, previamente enfriada a $-10 \text{ }^\circ\text{C}$, mediante la metodología de Lichtenthaler (1983). Los extractos fueron sometidos a lecturas de absorbancia a 663 nm y 645 nm de longitud de onda en laboratorio mediante un espectrofotómetro UV-VIS (V630 JASCO, Japón). Con los resultados de las absorbancias en cada extracto, se calculó concentración de clorofilas a partir de las ecuaciones descritas por Arnon (1949). Con los resultados obtenidos, se elaboró una curva de calibración, la cual fue utilizada para conocer la concentración de clorofila de las hojas a partir del valor SPAD.

Concentración de macro y microelementos esenciales. Se determinó la concentración de macro (N, P, K, Ca, Mg) y micronutrientes (Fe, Zn, Mn, B, Cu) en muestras de hojas colectadas de cada unidad experimental en el mes de enero. Para determinar tales parámetros, se colectaron muestras constituidas por 10 hojas por planta y fueron enviadas al Laboratorio Agrolab.

Análisis enzimático. Se determinó la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), citrato sintasa (CS) e, isocitrato deshidrogenasa (IDH). Para ello, se colectaron muestras de ápices radiculares (20-30 mm) en cada unidad experimental a través de las ventanas desmontables ubicadas en los costados laterales de las

macetas en el mes de marzo. El extracto de enzimas se llevó a cabo moliendo 100 mg de las muestras de raíces en un mortero con nitrógeno líquido y 50% PVPP (p/p). Posteriormente el tejido fue colocado en tubos Eppendorf, a los cuales se adiciono 1 ml del buffer de extracción que contenía 400 mM de Tricina (pH 7,6); 5 mM MgSO_4^- , 0,25 mM EDTA; 10% (v/v) glicerol; 0,5% (p/v) BSA; 5 mM NaHOC_3 , 2 mM OMSF, 10 mM ascorbato de sodio y 1% (v/v) Triton. Los extractos se centrifugaron a 15.000 rpm mediante la centrifuga refrigerada Sigma (1-14K, Germany) a 4 °C por 10 min. Luego, 600 μL de los extractos libres de material particulado fueron desalinizados mediante su paso por columnas Sephadex G-25 (PDmidiTrap G-25, GE Healthcare,UK), previamente equilibrados con el buffer de extracción. Los extractos desalinizados se llevaron a un volumen de 1,5 mL, y fueron utilizados para los correspondientes análisis enzimáticos.

Fosfoenolpiruvato carboxilasa. La actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) se determinó por el acople de su actividad al de la enzima malato deshidrogenasa (MDH), mediante la oxidación de NADH (Vance et al., 1983; Jiménez, 2007). Para esto se usó 25 μL de extracto en 1 mL de 5 mM NaHCO_3^- ; 0,2 mM NADH; 2 mM DTT; 3 unidades ml^{-1} MDH (Sigma); 2,2 mM PEP; 2,5 mM MgSO_4^- ; 0,25 mM EDTA y 100 mM Tricina a pH 8,1. El consumo de NADH se determinó por espectrofotometría mediante el monitoreo del decrecimiento en la absorbancia a 340 nm, a 25 °C.

Malato deshidrogenasa. La actividad de la enzima MDH se determinó mediante el aumento de la absorbancia a 340 nm, debido a la reducción enzimática de NAD^+ a 25 °C (Smith, 1974). La reacción se llevó a cabo con 5 μL de extracto en 1 mL de 3 mM NAD^+ , 29 mM malato, 5 mM MgCl_2 y 100 mM buffer DEA, a pH 9,2

Citrato sintasa. La actividad de la enzima se midió mediante la reducción del Acetil CoA a CoA con DTNB a 412 nm y 25 °C (Srere, 1967). La mezcla de reacción contenía 25 μL de extracto en 1 mL con 0,4 mM acetyl CoA, 0,1 mM DTNB, 0,5 mM oxalacetato y 200 mM Tris-HCl a pH 8,1.

Isocitrato deshidrogenasa. La actividad de la enzima NADP^+ -IDH se determinó mediante el monitoreo en la reducción de NADP^+ a 340 nm a 37 °C (Goldberg and Ellis, 1974). La reacción se llevó a cabo con 25 μL de extracto en 1 mL de 3,9 mM MgCl_2 , 0,42 mM NADP^+ , 6,7 mM isocitrato de sodio y 100 mM buffer TEA, a pH 7,3.

Concentración de ácidos orgánicos en raíces. Las concentraciones de ácidos orgánicos en raíces fueron determinadas según el protocolo descrito por Neumann (2006). Una fracción de las muestras de ápices radiculares colectadas para los análisis enzimáticos, se introdujeron en un mortero previamente enfriado a 4 °C. Luego el tejido fue triturado y homogenizado con N líquido en el mortero. Para la extracción y la fase móvil, se preparó un buffer con 2 L de agua MilliO, 4,9 g KH_2PO_4 (18 mM), ajustado a pH 2,1 con H_3PO_4 . Los ácidos orgánicos fueron cuantificados mediante HPLC con una columna LiChrospher 250 x 4 mm 5 μm RP-18 (Supelcco Inc., PA 16823-0048, USA). La duración de los cromatogramas fue de 40 minutos por muestra, con una inyección de 100 μL a una velocidad de 0,5 mL min^{-1} y se utilizó una longitud de onda de detección de 210 nm.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado mediante un análisis de la varianza (ANDEVA). En caso de encontrar diferencias significativas entre tratamientos, los datos fueron sometidos a la prueba de rango múltiple de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. El análisis estadístico se realizó mediante el software estadístico INFOSTAT (FCA-UNC, Argentina).

RESULTADOS

Crecimiento vegetativo y contenido de clorofila

Durante la temporada vegetativa de los arándanos, se distinguieron dos “flushes” de crecimiento de los brotes, el primero de ellos durante la primavera y el segundo en el verano (Figura 1). De los dos “flushes” identificados, el de verano fue el más intensivo en relación al crecimiento de los brotes. Durante el crecimiento de primavera, sobre los primeros 30 días a partir de la brotación de las plantas, los resultados arrojan diferencias significativas entre la aplicación de Fe-EDDHA y las plantas asociadas con gramíneas, por otra parte las plantas tratadas con Fe-Hemo y el control mostraron resultados intermedios (Figura 1). Los brotes correspondientes al desarrollo de verano, registraron un crecimiento promedio de 12 cm de largo para los tratamientos con Fe-EDDHA y Fe-Hemo. Durante tal período, las plantas que fueron tratadas con Fe-EDDHA y Fe-Hemo mostraron un mayor crecimiento de brotes respecto del control, y las plantas asociadas con gramíneas (Figura 1). Sin embargo, es importante destacar que la asociación con *Festuca rubra* L. indujo un largo de brote mayor respecto de la asociación con *Poa pratensis* L. (Figura 1).

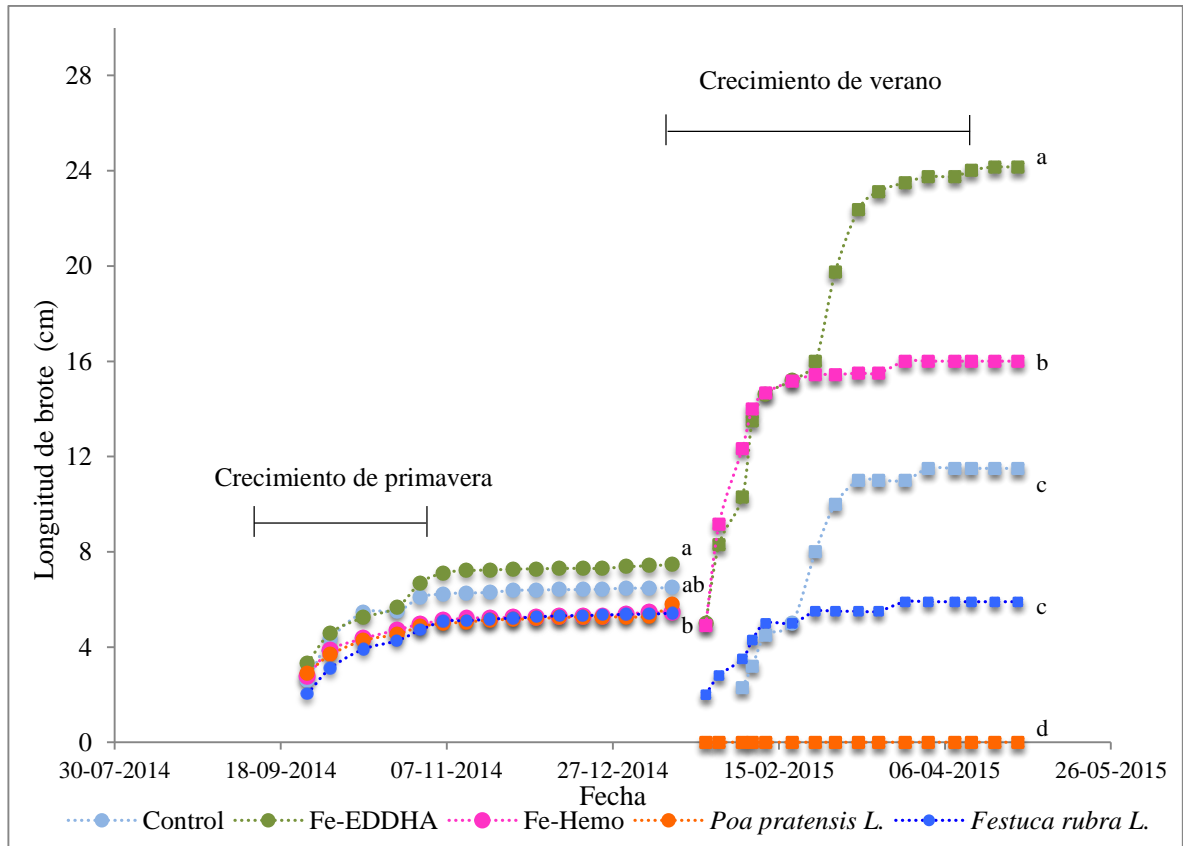


Figura 1. Largo (cm) de brotes durante la temporada en las plantas sometidas a los distintos tratamientos. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Fisher ($p < 0.05$).

Respecto del índice de área foliar (LAI) y la radiación fotosintéticamente activa interceptada (PARi) por el follaje de las plantas, los resultados registrados en tres momentos durante la temporada no evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 3. Área foliar registrada en las plantas sometidas a los distintos tratamientos durante la temporada.

Tratamientos	Índice de área foliar (LAI)		
	07-11-2014	26-01-2015	27-04-2015
	(m ² m ⁻²)		
Control	0,07 a	0,17 a	0,12 a
Fe-EDDHA	0,07 a	0,17 a	0,11 a
Fe-Hemo	0,07 a	0,17 a	0,10 a
<i>Poa pratensis</i> L.	0,06 a	0,17 a	0,09 a
<i>Festuca rubra</i> L.	0,06 a	0,17 a	0,09 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

Cuadro 4. Porcentaje Radiación Fotosintéticamente Activa interceptada por el follaje (PARi) registrada en las plantas sometidas a los distintos tratamientos durante la temporada.

Tratamientos	PARi		
	07-11-2014	26-01-2015	27-04-2015
	(%)		
Control	5,0 a	10,50 a	8,59 a
Fe-EDDHA	4,8 a	10,46 a	8,31 a
Fe-Hemo	5,0 a	10,58 a	7,67 a
<i>Poa pratensis</i> L.	4,2 a	10,50 a	6,48 a
<i>Festuca rubra</i> L.	4,2 a	10,28 a	6,65 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

Respecto del contenido de clorofila de las hojas para los distintos tratamientos, la recta de calibración entre el valor SPAD y la concentración de clorofila en extractos de hoja arrojó una relación altamente significativa ($R^2 = 0,88$) entre las variables (Figura 2).

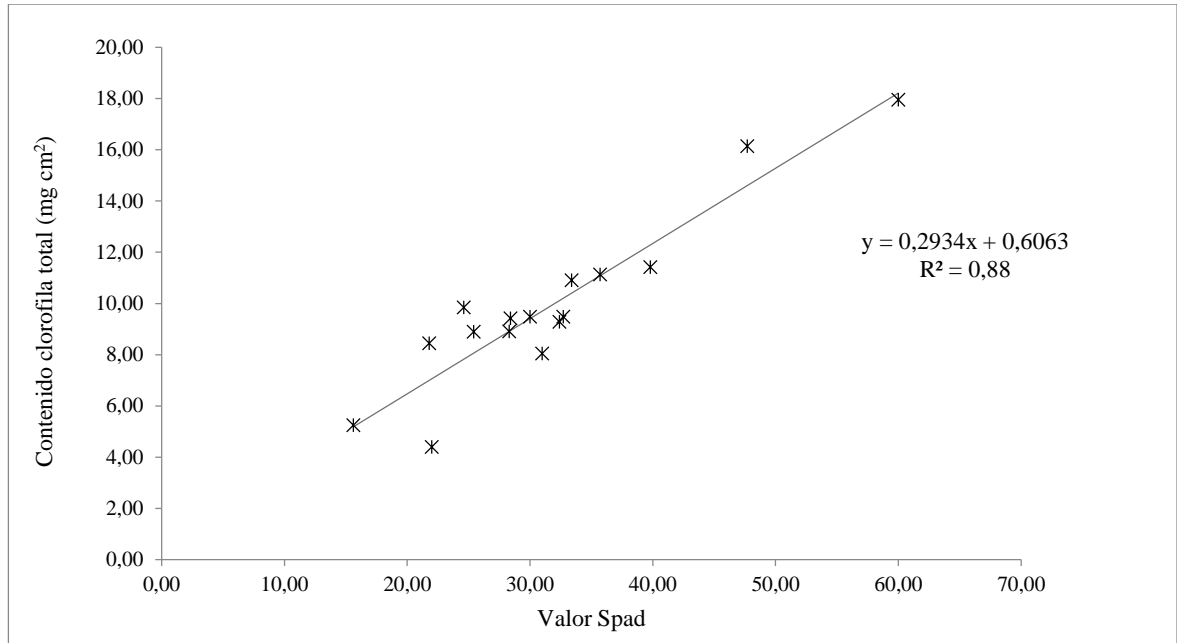


Figura 2. Correlación entre la concentración clorofila extractable y los valores SPAD registrados en 16 hojas de arándano.

Los datos relativos a la concentración de clorofila estimada mediante el valor SPAD, determinada durante los primeros 30 días de crecimiento de las plantas, indican que los tratamientos no influenciaron en la concentración de clorofila foliar (Figura 3). Sin embargo, desde los 60 días de crecimiento vegetativo en adelante, se observa un efecto significativo de los tratamientos. Durante tal período, la aplicación de Fe-Hemo incremento significativamente la concentración de clorofila foliar respecto de la asociación con gramíneas, mientras las plantas tratadas con Fe-EDDHA y las de control no se diferenciaron significativamente del Fe-Hemo (Figura 3).

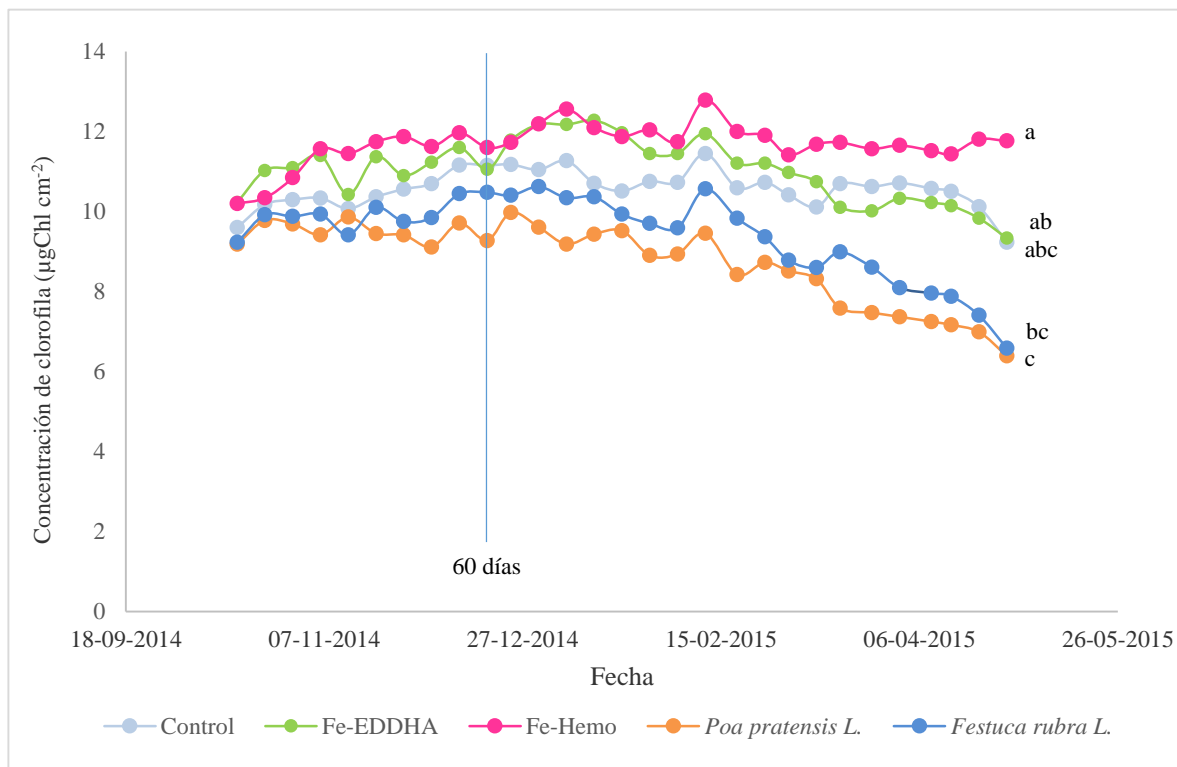


Figura 3. Valor SPAD de la primera hoja expandida durante la temporada en los distintos tratamientos. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Fisher ($p < 0.05$).

Concentración de macro- y micro-elementos en las hojas

En los cuadros 5 y 6, se presentan los resultados del análisis foliar realizado a las hojas de las plantas, y en el Anexo 1, se presenta la tabla de los rangos de concentraciones óptimos para cada elemento mineral en el arándano. Los resultados de la concentración de nitrógeno (N) arrojan diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 5), en el cual, las plantas asociadas con *Poa pratensis L.* presentaron una concentración 1,5 veces mayor respecto del tratamiento con Fe-Hemo, el control y a las plantas asociadas con *Festuca rubra L.* (Cuadro 5). En las plantas tratadas con Fe-Hemo registró la concentración de N más baja. Adicionalmente, las plantas sometidas a los tratamientos presentaron un nivel de N bajo el rango adecuado para el arándano (Anexo 1).

Respecto de los otros macro-elementos, la concentración de fósforo (P) no presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos, mientras que para el potasio (K), las plantas asociadas con *Poa pratensis L.* presentaron una mayor concentración respecto del resto de los tratamientos, los cuales no presentaron diferencias entre ellos (Cuadro 5). En tanto para el contenido de calcio (Ca) y magnesio (Mg), se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. El aporte de Fe-Hemo mediante la sangre de cerdo incrementó la concentración de Ca en 1,5 veces respecto del control, mientras el resto de los

tratamientos presentaron niveles intermedios. Por otra parte, el Fe-Hemo y la asociación con *Festuca rubra* L. incrementó la concentración de Mg respecto del control y la aplicación de Fe-EDHHA (Cuadro 5). Las concentraciones foliares de P, K y Mg se encontraron dentro del rango adecuado para el arándano, mientras que para el Ca los niveles estuvieron sobre el rango óptimo (Anexo 1).

Cuadro 5. Concentración de macronutrientes determinada en hojas de arándanos sometidos a los distintos tratamientos.

Tratamientos	Nitrógeno (%)	Fósforo (%)	Potasio (%)	Calcio (%)	Magnesio (%)
Control	1,00 b	0,08 a	0,53 b	0,62 b	0,20 b
Fe-EDDHA	1,02 ab	0,07 a	0,52 b	0,67 ab	0,20 b
Fe-Hemo	0,78 c	0,07 a	0,45 b	0,95 a	0,28 a
<i>Poa pratensis</i> L.	1,17 a	0,08 a	0,73 a	0,81 ab	0,24 ab
<i>Festuca rubra</i> L.	0,86 bc	0,08 a	0,40 b	0,91 ab	0,26 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

Respecto de la concentración de microelementos en las hojas, tanto para hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu) y boro (B), no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 6). Sin embargo, es importante destacar que la asociación con *Poa pratensis* L. y la aplicación de Fe-Hemo incrementaron tendencialmente la concentración de Fe en comparación al control (Cuadro 6). En todos los tratamientos los valores se presentaron dentro de los rangos adecuados requeridos por el arándano (Anexo 1).

Cuadro 6. Concentración de micronutrientes determinada en hojas de los arándanos sometidos a los distintos tratamientos.

Tratamientos	Hierro (mg kg ⁻¹)	Manganeso (mg kg ⁻¹)	Zinc (mg kg ⁻¹)	Cobre (mg kg ⁻¹)	Boro (mg kg ⁻¹)
Control	100,8 a	31,0 a	12,6 a	3,8 a	52,6 a
Fe-EDDHA	103,2 a	35,6 a	12,4 a	3,2 a	77,8 a
Fe-Hemo	111,5 a	45,3 a	14,2 a	3,0 a	61,5 a
<i>Poa pratensis</i> L.	112,8 a	41,2 a	12,4 a	3,4 a	75,8 a
<i>Festuca rubra</i> L.	107,6 a	44,6 a	13,0 a	3,8 a	75,0 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

Actividad enzimática

Al final de la temporada 2014-2015, se determinó la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), citrato sintetasa (CS) e isocitrato deshidrogenasa (IDH) en extractos de ápices radiculares. Los resultados de tales análisis indican que los tratamientos no influenciaron la actividad de las enzimas descritas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Actividad (nmol NADH mg rad min⁻¹) de las enzimas PEPC, MDH, NADP⁺-IDH y CS determinadas en extractos de raíces de los arándanos sometidos a los distintos tratamientos.

Tratamientos	Actividad enzimática		
	PEPC	MDH	CS
	(nmol NADH mg rad min ⁻¹)		
Control	0,67 a	5,64 a	0,31 a
Fe-EDDHA	0,50 a	5,95 a	0,30 a
Fe-Hemo	0,82 a	7,54 a	0,34 a
<i>Poa pratensis</i> L.	0,52 a	3,94 a	0,28 a
<i>Festuca rubra</i> L.	0,42 a	6,51 a	0,38 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

Concentración de ácidos orgánicos en raíz

Al finalizar el ensayo, los principales ácidos orgánicos presentes en los ápices radiculares fueron el cítrico y málico. Los resultados de tales análisis indican que los tratamientos no influenciaron la concentración de tales ácidos orgánicos en los extractos de raíces (Cuadro 8).

Cuadro 8. Concentración (mg g PF⁻¹) de los ácidos cítrico y málico en extractos de raíces de los arándanos sometidos a los distintos tratamientos.

Tratamientos	Concentración ácidos orgánicos	
	Citrato	Malato
	(mg g PF ⁻¹)	
Control	0,67 a	0,26 a
Fe-EDDHA	0,91 a	0,44 a
Fe-Hemo	0,68 a	0,28 a
<i>Poa pratensis</i> L.	0,64 a	0,19 a
<i>Festuca rubra</i> L.	0,57 a	0,23 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El crecimiento de brotes en los arándanos ocurre en “flushes” (1, 2 o 3 por temporada) y el desarrollo de estos es altamente dependiente del vigor del brote, cultivar, estado nutricional y factores ambientales (Bryla, 2006). Los resultados obtenidos en el presente experimento evidenciaron un menor desarrollo de los arándanos durante la primavera, en comparación con el crecimiento registrado durante el verano. Por otra parte, si bien se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en el crecimiento de los brotes durante la primavera, las medias registradas fueron muy similares entre ellas, presentando en promedio brotes de 6 cm de largo (Figura 1). En tal período, el mayor crecimiento de brotes fue inducido por la aplicación de Fe-EDDHA respecto del resto de los tratamientos, lo que podría indicar que el quelato es una fuente de Fe altamente disponible y de mayor velocidad de acción respecto de las otras estrategias en estudio, incluso en plantas de 7 meses de edad sometidas a un estrés inicial de adaptación con escasa resistencia a cambios de sustrato, ambiente, y otras variables ambientales.

En el presente experimento se observó un segundo período crecimiento de brotes, mayoritariamente provenientes de yemas de la corona, registrado durante el verano. En tal período, las aplicaciones de Fe-Hemo y Fe-EDDHA incrementaron el crecimiento de los brotes respecto del control. El positivo efecto del Fe-Hemo en el crecimiento de los brotes podría ser atribuido a que los compuestos derivados de sangre animal representan una fuente natural de Fe y otros nutrientes, especialmente nitrógeno (N) (Ciavatta et al., 1997). Además, el Fe-Hemo posee altas concentraciones de diferentes aminoácidos (Anexo 2), los que contribuyen finalmente al aporte de N orgánico para el desarrollo de los arándanos, y estimulan el crecimiento de brotes durante el verano. En tal contexto, los resultados de crecimiento de brotes indican que esta fuente de Fe resultó ser eficaz para el control de clorosis férrica en los arándanos.

Por otra parte, el acotado crecimiento registrado en las plantas asociadas con *Poa pratensis* L. puede estar vinculado a un escaso desarrollo radicular de los arándanos inducido por la presencia de la gramínea. Las fuertes mermas en el crecimiento de los arándanos exhibidas por los tratamientos con asociación de gramíneas, las cuales arrojaron un crecimiento menor que el tratamiento testigo, podrían ser una consecuencia de la competencia por agua y nutrientes entre estas y las plantas evaluadas, y tal efecto pudo verse exacerbado ante el incipiente estado de desarrollo de las plantas. Además, la restricción del crecimiento de las raíces causada por las limitaciones de espacio impuestas por las macetas, agrava la competencia entre las especies. Considerando lo anterior, es posible que la dosis de siembra de las especies gramíneas utilizada en el ensayo fue muy elevada, y que a pesar del suplemento extra de agua, sulfato de amonio y macro- y micro- nutrientes que recibieron tales macetas, los arándanos no lograron satisfacer sus requerimientos hídricos y nutricionales.

En otros estudios, ya se ha reportado la fuerte competencia que las gramíneas pueden ejercer con el cultivo asociado. En un ensayo conducido en vides establecidas en macetas, Covarrubias et al. (2014) evidenciaron que la presencia de la especie *Festuca rubra* L. redujo

fuertemente el área foliar y la biomasa vegetal de plantas, producto de la competencia que estas ejercieron con las vides cultivadas. En otro ensayo realizado en un viñedo de secano, el cultivo de cobertera redujo significativamente el vigor de las plantas y sus rendimientos (Palliotti et al., 2007).

Por otra parte, en el presente experimento la *Poa pratensis* L. presentó un menor desarrollo vegetativo respecto de *Festuca rubra* L. Esto se podría deber a que la *Poa pratensis* L. posee una alta demanda hídrica, y es poco tolerante a las altas temperaturas en su proceso de germinación (Álvarez, 2006), lo cual influyó su crecimiento durante el otoño (periodo de siembra), en donde se presentaron elevadas temperaturas en la zona. Esto probablemente resultó en una menor densidad de germinación. En contraste, *Festuca rubra* L. posee una mejor tolerancia a la sequía y altas temperaturas (Álvarez, 2006), y concordante con ello, en las macetas se observó una germinación más uniforme y de mayor densidad. Además, en un ensayo conducido por Ma et al. (2003), se demuestra que *Festuca rubra* L. es capaz de exudar una elevada cantidad de fitosideróforos en medios carentes de Fe, lo cual también explicaría la mayor eficiencia de esta gramínea en su propio desarrollo vegetativo y en el de los arándanos, al contrario de *Poa pratensis* L.

El área foliar estimado en las plantas en base a la PAR, no mostró variaciones significativas atribuibles a los tratamientos, a pesar de las diferencias registradas entre los tratamientos para el crecimiento de los brotes. Tales resultados, contrastantes entre ellos, sugieren que probablemente el ceptómetro no logró censar con precisión la totalidad de la luz interceptada por los arándanos, ya que se trabajó con plantas de bajo vigor. Además, los arándanos presentan un hábito de crecimiento irregular, sin un eje formado, y sus brotes vegetativos se posicionan en forma abierta, lo que probablemente dificulta la medición. Por otra parte, cabe destacar que el equipo posee una elevada sensibilidad a la inclinación de la barra durante la medición, lo que podría influir negativamente la precisión de los datos obtenidos, pues un pequeño cambio en la inclinación determina grandes diferencias en los resultados (Miranda, 2013).

Las aplicaciones de Fe-Hemo y Fe-EDDHA incrementaron significativamente la concentración de clorofila de las hojas respecto de las plantas asociadas con gramíneas (Figura 3), pero sin diferenciarse del control. La clorofila es el principal pigmento que absorbe la luz, y una de sus funciones fisiológicas es captar fotones para llevar a cabo la fotosíntesis. La cantidad de radiación que una planta de arándano es capaz de captar no sólo determina el potencial de producción de hidratos de carbono mediante la fotosíntesis, sino que también define la calidad de la fruta y la morfología de la planta (longitud del tallo, tamaño de la hoja, la densidad de estomas) (Retamales y Hancock, 2012). Por otra parte, el déficit de Fe reduce los niveles de clorofila a, b y total en las hojas, debido a que uno de sus roles principales en las plantas es catalizar la formación directa del pigmento clorofílico, indispensable en el proceso para la obtención de azúcares primarios (Kim et al., 2007). El efecto de las aplicaciones de Fe-Hemo sobre la concentración de clorofila foliar es interesante, ya que tal estrategia evidenció una eficacia mayor a las aplicaciones de Fe-EDDHA en tal variable. En un experimento conducido en vides, Tessarin et al. (2012) demostraron que la adición de sangre animal al suelo incrementó el contenido de clorofila de la hoja con una efectividad similar a los quelatos de Fe. Esto debido a que la planta es capaz de asimilar el contenido de Fe proveniente de estos productos y restaurar la síntesis de

clorofila en las hojas de manera más rápida. Por otra parte, el efecto de la asociación con especies gramíneas puede deberse a que el Fe asimilado por los arándanos bajo tales condiciones es aún insuficiente para poder restaurar la estructura de las clorofilas en las hojas, probablemente porque el Fe presente en el tejido es utilizado preferentemente para corregir o restablecer otros parámetros fisiológicos dañados. Por otra parte, es importante considerar que el proceso de adquisición de hierro a través de los fitosideróforos es más lento, debido a que el proceso se divide en diversas etapas, desde la biosíntesis hasta absorción del complejo PS-Fe⁺³ por las raíces (Römheld, 1991).

Las estrategias para la prevención de carencias de Fe que se evaluaron en este ensayo, influyeron en el contenido de N de las hojas de los arándanos. Los resultados indican un mayor nivel de N en las plantas asociadas con la gramínea *Poa pratensis* L. En contraste, la asociación con la gramínea *Festuca rubra* L. redujo significativamente la concentración de N en comparación la *Poa pratensis* L. Resulta relevante considerar que los restos vegetales provenientes de los cortes que se realizaban a las gramíneas eran incorporados a las macetas, lo cual podría contribuir a explicar la mayor concentración de N registrada en los arándanos asociados a *Poa pratensis* L., ya que en el periodo estival se produce una activa mineralización de la materia orgánica, la cual es favorecida por las condiciones ambientales del suelo. Por otra parte, los arándanos asociados con *Festuca rubra* L. mostraron una baja concentración de N en el análisis, y tal gramínea presentó una elevada producción de biomasa (evaluada como peso fresco y seco) en comparación a *Poa pratensis* L., lo cual indica que tiene mayor potencial de competencia. Según Peacock y Christensen (1998) en poáceas y cereales jóvenes el contenido de nitrógeno es mayor y la descomposición es rápida. Sin embargo, cuando estas están maduras y han acumulado biomasa, como podría ser el caso de la *Festuca rubra* L. en el presente experimento, en general contienen menos nitrógeno, lo cual resulta en un índice significativamente más lento de descomposición, y los microorganismos ante esto deben utilizar el nitrógeno del suelo para descomponer el residuo vegetal. Por otro lado, hay que considerar además que los arándanos asociados con *Poa pratensis* L. presentaron el menor desarrollo vegetativo (Figura 1), lo cual podría influir en la concentración de N foliar por efecto dilución, a diferencia de los resultados obtenidos en los arándanos asociados con *Festuca rubra* L. donde las plantas se encontraban más desarrolladas (Figura 1). Un efecto similar al descrito evidenciaron los resultados relativos a la concentración de K en las hojas de los arándanos asociados con *Poa pratensis* L. Por su parte, las plantas tratadas con Fe-Hemo presentaron el valor más bajo de N, sin embargo, tales plantas se caracterizaron por un elevado crecimiento vegetativo en comparación con las plantas asociadas con gramíneas. En tal caso, la relación entre el crecimiento de las plantas y la concentración de N se atribuye principalmente a un efecto dilución.

Las concentraciones de Ca y Mg en las hojas de los arándanos no fueron alteradas por los tratamientos. Adicionalmente se observa que los niveles de Ca están por sobre el rango óptimo sugerido para el arándano. Lo anterior podría ser atribuido a la elevada concentración de Ca del sustrato utilizado, ya que las plantas calcífugas como los arándanos, en presencia de un sustrato rico en Ca⁺², no regulan la entrada de este ion y este puede acumularse en cantidades excesivas en los tejidos. Cuando la absorción de Ca excede las necesidades de la planta, parte de este puede formar oxalatos de Ca que también contribuyen en la defensa y la desintoxicación de metales pesados (Franceschi y Nakata, 2005). Además se debe considerar

que el exceso de Ca en las células interfiere con iones de Mg y K en el metabolismo, alterando sus funciones (Retamales y Hancock, 2012).

Por otra parte, los tratamientos no influenciaron las concentraciones de P, Fe, Mn, Zn, Cu y B a nivel foliar. Sin embargo, es importante destacar la tendencia observada a un mayor contenido de Fe en las hojas de los arándanos asociados con *Poa pratensis* L. y en aquellos tratados con Fe-Hemo en comparación al control, el cual presentó el contenido más bajo de tal mineral en el tejido. En tal contexto, diferentes ensayos han demostrado la eficacia del Fe-Hemo como un fertilizante para la agricultura orgánica, debido al alto contenido de Fe que la sangre de cerdo entrega a las plantas. En un estudio conducido por Yunta et al. (2013), se evaluó la estabilidad, la concentración total de Fe disponible y la tasa de absorción sobre sustratos con diferentes pH de un producto formulado a base de cerdo similar al utilizado en el presente estudio. Tales resultados evidenciaron el interesante potencial del Fe-Hemo como fertilizante férrico sostenible para su uso en suelos calcáreos. Otro estudio llevado a cabo por Tessarin et al. (2012), focalizado a estudiar la carencia de Fe en diferentes portainjertos de vid, indicó que la sangre animal como fertilizante férrico presenta mejores resultados en comparación con los quelatos de Fe sintéticos. Si bien en el presente experimento no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en el contenido de Fe foliar, las evidencias descritas confirman la factibilidad de reemplazar los quelatos de Fe sintéticos por fuentes de Fe-Hemo, las cuales representan una alternativa eficiente, eficaz y sostenible para controlar el déficit de Fe en arándanos cultivados en suelos calcáreos.

En el caso de la asociación con gramíneas, las plantas asociadas a *Poa pratensis* L., presentaron una tendencia a concentrar más Fe en las hojas en comparación con los arándanos testigo. El incremento en la concentración de Fe foliar inducida por las gramíneas, en términos generales, se debe en parte a su capacidad para solubilizar el Fe del suelo a través de la secreción de fitosideróforos (Cesco et al., 2006). Diversos estudios (Ovalle et al., 2007; Ma et al., 2003; Cesco et al., 2006;) indican que la eficacia en la prevención de la clorosis férrica depende de las especies gramíneas que se utilizan, siendo algunas de estas más eficaces respecto de otras. Por ejemplo, en un ensayo realizado en el portainjerto citrumelo, se probaron asociaciones con tres especies de gramíneas. Los resultados de tal investigación indicaron que *Festuca rubra* L. fue eficaz en la corrección de la clorosis, mientras las otras dos especies no presentaron potencial para la prevención de la clorosis. Sin embargo, los resultados de la presente investigación evidenciaron solo tendencias inducidas por las gramíneas, lo cual contrasta con los resultados reportados en la literatura. Tales evidencias sugieren que la eficacia del tratamiento responde principalmente a las condiciones del estudio, al cultivo utilizado, a la cantidad de fitosideróforos secretados al suelo y a su ritmo de secreción por cada especie (Ammari y Rombolà, 2010). Además, las experiencias reportadas y los resultados del presente ensayo indican que el empleo de cultivos de cobertera como técnica de prevención de la clorosis férrica, requiere de una selección de las especies a utilizar y el estudio de su comportamiento en el medio ambiente.

Con respecto a los mecanismos fisiológicos de respuesta al déficit de Fe a nivel radicular, en el presente experimento las plantas no respondieron a los tratamientos mediante cambios en la actividad de las enzimas PEPC, MDH y CS, y la concentración de los ácidos orgánicos citrato y malato. Los aumentos en la actividad de PEPC, MDH y CS a nivel radicular inducidas por el déficit de Fe han sido ampliamente reportados en diversas plantas cultivadas

sometidas a déficit de Fe, y la actividad de tales enzimas ha sido propuesta por algunos autores, como un marcador bioquímico de la condición de Fe-deficiencia en especies tolerantes (Rombolà et al., 2002; Rombolà y Tagliavini, 2006; Jiménez et al, 2007; Covarrubias et al., 2014). Además los aumentos en las concentraciones de ácidos orgánicos en raíces de plantas deficientes en Fe corresponden a una respuesta fisiológica propia de plantas tolerantes a tal deficiencia nutricional, y se producen tanto en especies de plantas de Estrategia tipo I y II (Abadía et al., 2002). Por otro lado cabe destacar que el aumento en la actividad de la enzima PEPC ante una deficiencia de Fe puede ser diferente para distintos genotipos dentro de la misma especie (Rombolà et al., 2000). Los resultados obtenidos en este ensayo indican que los arándanos “Star”, no respondieron mediante los mecanismos descritos, y esto posiblemente se debe a la naturaleza y origen de la especie. Las plantas calcífugas como el arándano han sido evolucionadas en suelos ácidos, y por ello es altamente probable que no cuenten con la habilidad de ejecutar este tipo de respuestas bioquímicas. Lo anterior podría explicar la escasa tolerancia del arándano a suelos de pH neutro-alcalino, y consecuentemente los síntomas de déficit de Fe que comúnmente se observan en condiciones de campo.

CONCLUSIONES

El uso de sangre animal se presenta como un producto con gran potencial como fertilizante férrico, siendo una estrategia válida y sostenible para la corrección/prevención de la clorosis férrica en el arándano.

La asociación con especies gramíneas no fue eficaz en la corrección/prevención de la clorosis férrica, probablemente por la competencia que estos cultivos ejercieron por el agua y nutrientes con el arándano en su fase inicial de desarrollo. Los estudios futuros deberían centrarse en la identificación de especies de gramíneas Fe-eficientes con bajo requerimiento de agua y nutrientes, además considerar el uso de mezclas de cubiertas vegetales (leguminosas, gramíneas, etc.) para potenciar las características y obtener resultados.

Entre los manejos sostenibles que se estudiaron, ninguno presentó efectos sobre respuestas fisiológicas a nivel radicular frente a la deficiencia de hierro en el arándano, lo cual podría ser característico de la de la especie y/o variedad, y explicaría la escasa capacidad de defensa del arándano a la clorosis férrica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadía, J.; A.F. López-Millán; A.D. Rombolà and A. Abadía. 2002, abr. Organic acids and iron deficiency: a review. *Plant and Soil*, 241(1): 75-86.

Álvarez, M. 2006. Césped. 1^a. Bs.As, Argentina: Albatros SACI. 112p.

Ammari, T. and A.D. Rombolà. 2010, jun. Overcoming iron deficiency chlorosis in citrus through intercropping with perennial grass species. *Acta Horticulturae*, 1: 327-332.

Aron, D.I. 1949, jun. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1): 1-15.

Bavaresco, L.; M.I. Gonçalves; M. Gatti and F. Ferrari. 2010, jun. Effects of traditional and new methods on overcoming lime-induced chlorosis of grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 6(2): 186-190.

Bryla, D. 2006. Irrigation of Blueberry. Seminario Internacional de Fertiriego. (3^{er}, 10 al 12 de agosto de 2006, Santiago, Chile. Soquimich comercial SQM.

Calandra, P.; D. Ortiz; G. Pozo y B. Noziglia. 2012. Manual para la redacción de referencias bibliográficas. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 84p.

Ciavatta, C.; M. Govi; L. Sitti and C. Gessa. 1997. Influence of blood meal organic fertilizer on soil organic matter: A laboratory study. *Journal of Plant Nutrition*, 20(11): 1573-1591.

Cesco, S.; A.D. Rombolà; M. Tagliavini; Z. Varanini and R. Pinton. 2006, ago. Phytosiderophores released by graminaceous species promote ⁵⁹Fe-uptake in citrus. *Plant and Soil*, 287(1): 223-233.

Covarrubias, J.I.; A. Pisi and A.D. Rombolà. 2014, dic. Evaluation of sustainable management techniques for preventing iron chlorosis in the grapevine. *Australian Journal of Grape and Wine research*, 20(1): 149-159.

Dell'Orto, M.; P. De Nisi; A. Pomtiggia and G. Zocchi. 2003, oct. Fe deficiency responses in *Parietaria diffusa*: A Calcicole plant. *Journal of Plant Nutrition*, 26(10-11): 2057-068.

Ferreira, R.; G. Sellés; R. Rui; P. Gil y C. Barrera. 2008. Manejo de la clorosis férrica en palto. (Bol.Inf. N°81), Centro Regional de Investigación La Cruz, INIA, Ministerio de Agricultura. [En línea]. Quillota, Chile: INIA. 60p. Recuperado en: <www.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR35156.pdf>. Consultado el: 28 de mayo de 2014.

Franceschi, V.R. and P.A. Nakata. 2005, jun. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Plant Biology*, 56: 41-71.

Goldberg, D. and G. Ellis. 1974. Isocitrate dehydrogenase. (pp. 183-189). En: Bergmeyer H.U. (ed). *Methods of enzymatic analysis*. 2^a. New York: Verlag Chemie/Academic Press. 2302p.

Hanson, E.J. 2006. Nitrogen fertilization of highbush blueberry. (pp. 547-551). En: VIII: International Symposium on Vaccinium Culture (8^a, 3-8 mayo 2004, Sevilla, España y Oeiras, Portugal). Trabajo presentado como ponencia. Sevilla, España: Leuven, Belgium. 601p.

Jiménez, S.; Y. Gogorcena; C. Hévin; A.D. Rombolà and N. Ollat. 2007, jun. Nitrogen nutrition influences some biochemical responses to iron deficiency in tolerant and sensitive genotypes of Vitis. *Plant Soil*, 290(1-2): 343-355.

Kim, S.A. and M.L. Guerinot. 2007, abr. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *Plant Transporters and Channels*, 581 (12): 2273-228.

Lichtenthaler, H. and A. Wellburn. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extract in different solvents. *Biochemical Society transaction*, 603: 591 – 592.

López-Millán, A.; F. Morales; A. Abadía and J. Abadía. 2001, jun. Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the organic acid metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Physiologia Plantarum*, 112(1): 31-38.

Ma, J.F.; H. Ueno; D. Rombolá and T. Iwashita. 2003, sep. Characterization of phytosiderophores secretion in *Festuca rubra*. *Plant and Soil*, 256 (1): 131-137.

Mancilla, A. y G. Reginato. 2011, sep. Clorosis férrica en arándano. *Antumapu*, 9(1-2): 20-26.

Marschner, P. 2012. Function of nutrients micronutrients: Iron. (cap.7, pp.191-200). En su: *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3^a. The University of Adelaide, Australia: Elsevier. 651p.

Miranda, P. 2013. Optimización de la gestión del recurso humano en labores de poda y cosecha en parrones de uva de mesa. Tesis Ingeniero Agrónomo y Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción Frutícola. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 50h.

Neumann, G. 2006. Root exudates and organic composition of plant roots. En: Luster J., Finlay R (eds.). *Handbook of methods used in rhizosphere research*. Birmensdorf. Swiss Federal Research Institute WSL. 536p.

Norman, J.M. and G.S. Campbell. 1989. Canopy structure. (cap.14, pp.301-323). En: Plant physiological ecology: Field methods and instrumentation. R.E. Pearcy, J.R. Ehleringer, H.A. Mooney, and P.W. Rundel (eds). Chapman and Hall, London, United Kingdom. 441p.

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias). [En línea]. Santiago, Chile.

Recuperado en:

<<http://www.odepa.cl/estadisticas/productivas/>>. Consultado el: 26 de junio 2015.

Ovalle, C.; M.I. González; A. del Pozo y J. Hirzel. 2007, jul-sep. Cubiertas vegetales en producción orgánica de frambuesa: Efectos sobre el contenido de nutrientes del suelo y en el crecimiento y producción de las plantas. *Agricultura Técnica*, 67(3): 271-280.

Palliotti, A.; A. Cartechini; D. Petoumenou; O. Silvestroni; S. Mattioli and J.G. Berrios. 2007, oct. Long-term effects of seeded cover-crop on vegetative characteristics, yield and grape and wine composition of "Grechetto" grapevines in central Italy. *Acta Horticulturae*, 754(1): 515-521.

Peacock, B. and P. Christensen. 1998. Cover crops and vine nutrition. [En línea]. Grape and Wine Research and Development Corporation. Recuperado en:

<http://research.wineaustralia.com/wp-content/uploads/2012/09/2012-03-FS-Cover-Crops-Nutrition1.pdf>. Consultado el: 23 de junio del 2015.

Retamales, J. and J. Hancock. 2012. Blueberries. Blueberries. 1ª. Oxfordshire, UK: CABI.323p.

Rombolà, A.D. and M. Tagliavini. 2006. Iron nutrition of fruit tree crops. (cap.3, pp.61-83). En: J. Abadía; L. Barton (eds.). Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. 1ª. Berlin:Springer. 477p.

Rombolà, A.D.; W. Brüggemann; A.F. López-Millán; M. Tagliavini; J. Abadía; B. Marangoni and P.R. Moog. 2002, ago. Biochemical responses to iron deficiency in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Tree Physiology*, 22 (12): 869-875

Rombolà, A.D.; W. Brüggemann; M. Tagliavini; B. Marangoni and P.R. Moog. 2000, nov. Iron source affects Fe-reduction and re-greening of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) leaves. *Journal Plant Nutrition*, 23(11-12): 1751- 1765.

Römheld, V. 1991, jun. The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. *Plant and Soil*, 130(1): 127-134.

Smith, F. 1974. Malate dehydrogenase. (pp. 163-175). En: Bergmeyer, H.U. (ed.). Methods of enzymatic analysis. 2ª. New York: verlag Chemie/Academic Press. 2302p.

Srere, P.A. 1967. Citrate synthase. (pp.3-11). En: Colowick, SP., NO, Kaplan (eds.). Methods in enzymology. Academic Press, New York.

Syvertsen, J.P. 1987. Nitrogen content and CO₂ assimilation characteristics of Citrus leaves. *HortScience*, 22:289-291.

Tessarín, P.; F. Yunta; E. Ingrosso; A.C. Boliani; J.I. Covarrubias and A.D. Rombolá. 2012. Improvement of grapevine iron nutrition by a bovine blood-derived compound. (pp. 335-338). En: VII: International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops (ISHS) (7^a, 19-25 Mayo 2012, Chanthaburi, Thailand). Chanthaburi, Thailand.

Vance, C.P.; S. Stade and C.A. Maxwell. 1983. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. I. Association with nitrogen fixation and incorporation into amino acids. *Plant Physiology*, 72: 469- 473.

White, P.J. and M.R. Broadley. 2009, ene. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182(1):49-84.

Yunta, F.; F. Di Foggia; V. Bellido; M. Morales; P. Tessarín; S. Lope-Rayó; A. Tinti; K. Kovács; Z. Klencsár; F. Fodor and A. Rombolà. 2013, may. Blood meal-based compound. Good choice as iron fertilizer to be used in organic farming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (17): 3995-4003.

ANEXOS

Anexo I. Concentraciones foliares suficientes o normales de nutrientes para arándanos altos.

Nutrient	Highbush blueberry
Macroelements (%)	
N	1,70-2,10
P	0,08-0,40
K	0,40-0,65
Ca	0,30-0,80
Mg	0,15-0,30
S	0,12-0,20
Microelements (ppm)	
B	25-70
Cu	5-20
Fe	60-200
Mn	50-350
Zn	8-30

Fuente: Elaboración propia en base a Retamales y Hancock, 2012.

Anexo II. Composición mineral del producto a base de Sangre de cerdo.**PRODUCT Hemo Fe 550**

Description Hemo Fe 550 is a veterinary approved protein obtained from pig blood. Hemo Fe 550 has a high protein content and is easy to dissolve in water. Moreover Hemo Fe 550 has a good aminoacid profile and high Iron (Fe) content thus it is suitable as a fertilizer to solve plant iron chlorosis (yellow leaves).

ANALYSIS (1)

Chemical analysis	Protein	>81	%	Fe	5500	ppm
	Moisture	<8	%	Zn	<20	ppm
	Ash	<9	%	Cu	<10	ppm
	Fat	<0,2	%	Mn	<20	ppm
				Heavy metals	<0,1	ppm

Aminoacidic ProfileEssential aminoacid

Arginin	4,1	%
Phenilalanine	5,6	%
Istidine	7,0	%
Isoleucine	0,6	%
Leucine	11,7	%
Lisine	5,8	%
Methionine	0,3	%
Treonine	2,0	%
Triprofane	1,1	%
Valine	7,7	%

Non essential aminoacid

Alanin	5,7	%
Aspartic acid	10,0	%
Glutammic acid	6,3	%
Glicine	3,5	%
Proline	3,2	%
Serine	3,0	%

Emi essential aminoacid

Cisteine	0,8	%
Tirosine	1,4	%

Phisical characteristics

Diestibility %
Specific weight	0,6 Kg/lt
PH (1:10 solution)	7,0 – 9,0

Microbiological Analysis

TBC	< 50.000	CFU/g
Enterobacteriaceae	< 10	CFU/g
Salmonella spp	Neg	25/g