

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE RESPUESTA DEL GENOTIPO DE VID 140
RUGGERI AL DÉFICIT DE HIERRO Y LA PRESENCIA DE BICARBONATO EN
LA SOLUCIÓN NUTRITIVA**

FRANCISCO ANDRÉS GONZÁLEZ VIVALLO

SANTIAGO – CHILE

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE RESPUESTA DEL GENOTIPO DE VID 140
RUGGERI AL DÉFICIT DE HIERRO Y LA PRESENCIA DE BICARBONATO EN
LA SOLUCIÓN NUTRITIVA**

**PHYSIOLOGICAL RESPONSE MECHANISMS OF 140 RUGGERI GRAPEVINE
GENOTYPE TO IRON DEFICIENCY AND THE PRESENCE OF BICARBONATE
IN THE NUTRIENT SOLUTION**

FRANCISCO ANDRÉS GONZÁLEZ VIVALLO

SANTIAGO – CHILE
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE RESPUESTA DEL GENOTIPO DE VID 140
RUGGERI AL DÉFICIT DE HIERRO Y LA PRESENCIA DE BICARBONATO EN
LA SOLUCIÓN NUTRITIVA**

Memoria para optar al título profesional de

Ingeniero Agrónomo

FRANCISCO ANDRÉS GONZÁLEZ VIVALLO

PROFESOR GUÍA	CALIFICACIONES
Sr. José Ignacio Covarrubias P. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc. Dr.	7,0
PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Claudio Pastenes V. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	7,0
Sr. Manuel Casanova P. Ingeniero Agrónomo, M. Sc.	7,0

SANTIAGO – CHILE

2015

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que han formado parte de mi vida, gracias por todo lo que me han enseñado en este bello camino.

Agradecer en particular a mi madre por el apoyo incondicional, fuerza, sacrificio y gran amor. Agradezco a mi papa, hermano, primas y tíos. Familia en general que se han preocupado de mí, me han formado, enseñado a luchar y a levantarme, por su enorme confianza y cariño.

A la gente que hizo más amigable este camino final, a los que me brindaron su ayuda, compañía y trabajo, de antemano MUCHAS GRACIAS: Cote, Aletia, Julio, Tania, Lucía, Meche, Sergy, Cami, Lucho, Dado y Vital.

Mención honrosa a los incondicionales de siempre, Pablo, Marco, Sergi, Seba, Cartagua, Carlos, Perro, Andy, Sousa, Castor, Arikaz, Pato, Maca, Richi, Negro, Lenny y Piero. Por compartir ese sentimiento de vida, gracias amigos.

De todo corazón a la gente que en el camino universitario me ha ayudado. Funcionarios del Campus, gente del casino, las tías del aseo, auxiliares, mayordomos, secretarias y al tío Coné. Gracias por el servicio y los sinceros consejos otorgados a lo largo de este periodo. A los profesores que he tenido que a través de los años desinteresadamente compartieron su sabiduría y experiencia. Gracias Maria L. Tapia y Victor H. Escalona.

Especialmente agradezco a mi profesor guía José Ignacio Covarrubias, por toda la ayuda entregada, motivación, consejos, paciencia y la permanente buena disposición.

Finalmente agradezco al Proyecto de Capital Humano Avanzado en la Academia (CONICYT 7912010003), que hizo posible la realización de esta memoria.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis.....	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Lugar de estudio.....	8
Material vegetal y condiciones del experimento.....	8
Tratamientos y diseño experimental	8
Procedimiento	10
Evaluaciones biométricas.....	10
Actividad enzimática y concentración de proteínas.....	11
Determinación de la concentración de ácidos orgánicos	12
Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS.....	14
Crecimiento.....	14
Peso fresco y peso seco.....	15
Valor SPAD y contenido de clorofilas.....	16
Intercambio gaseoso foliar	18
ph de la solución nutritiva.....	20
Actividad enzimática y concentración de proteínas en raíces.....	20
Concentración de ácidos orgánicos en extractos de raíces y líquido xilemático	21
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28
APÉNDICE.....	35

RESUMEN

La clorosis férrica es uno de los principales problemas nutricionales que afectan a viñedos injertados sobre portainjertos híbridos de *Vitis americana* establecidos en zonas calcáreas, las cuales se caracterizan por la presencia de elevados contenidos de carbonato de calcio y bicarbonatos en los suelos. El presente trabajo evalúa, a nivel fisiológico y bioquímico, las respuestas del portainjerto de vid 140 Ruggeri a la presencia de bicarbonato, en condiciones de déficit de Fe en la solución nutritiva. Plantas del genotipo 140 Ruggeri fueron crecidas en condiciones hidropónicas, con dos niveles de Fe y bicarbonato (-Fe, +Fe; 0, 10 μM de Fe; -BIC, +BIC; 0 y 5mM de KHCO_3 respectivamente). Determinaciones de crecimiento y peso de la planta, índice SPAD y clorofila, fotosíntesis y conductancia estomática, pH de la solución, actividad enzimática de raíces (PEPC, MDH, CS, NADP^+ -IDH) y concentración de proteínas, concentración de ácidos orgánicos en raíces y líquido xilemático fueron realizadas. Los resultados obtenidos indican que el genotipo de vid 140 Ruggeri cuando es sometido a un déficit directo de Fe, responde activamente disminuyendo el crecimiento del brote y la biomasa de la parte aérea, e incrementando la concentración de ácidos orgánicos y sus enzimas de síntesis en raíces. Además, el efecto del déficit de Fe directo se manifiesta mediante una reducción en el contenido de clorofila, la fotosíntesis neta y la conductancia estomática de las hojas. Por su parte, la presencia de bicarbonato en la solución nutritiva induce una reducción en el crecimiento del tallo y las femielas, y un incremento en la biomasa radical. Adicionalmente, la presencia de bicarbonato incrementa la concentración de clorofila foliar, y la concentración de ácido tartárico en el líquido xilemático. Los resultados confirman la probabilidad de que la presencia de bicarbonato en la solución nutritiva contribuye a mitigar el efecto del estrés en las plantas sometidas a déficit de Fe. Lo anterior se fundamenta en que, ante un déficit de Fe, las plantas cultivadas en presencia de bicarbonato muestran una menor actividad de la PEPC y concentración de ácido tartárico en raíces, asimilándose al control. Estos resultados permiten concluir que el genotipo tolerante al déficit de Fe 140 Ruggeri responde con mecanismos correspondientes a una planta de Estrategia I en condiciones limitantes de Fe. Además frente presencia de bicarbonato, presenta respuestas similares a la especie calcícola *Parietaria diffusa* como la reducción del crecimiento, mayor biomasa radical, y aumento de la concentración de ácidos orgánicos, sin embargo más investigaciones son necesarias para determinar con precisión el rol del bicarbonato en el metabolismo del portainjerto 140 Ruggeri.

Palabras claves: Déficit de Fe, bicarbonato, 140Ruggeri, calcícola, solución nutritiva, Estrategia I.

ABSTRACT

Iron (Fe) chlorosis is one of the main nutritional disorders in vineyards grafted on *Vitis americana* hybrids rootstocks established in calcareous zones which are characterized by high levels of calcium carbonates and bicarbonates in the soil. The present work determine, at physiological and biochemical level, the responses of the grapevine rootstock 140 Ruggeri to the presence of bicarbonate under Fe deficiency conditions. The 140 Ruggeri plants were grown in hydroponic conditions, and were submitted to two levels of Fe and bicarbonate (-Fe, +Fe; 0, 10 μ M de Fe; -BIC, +BIC; 0 y 5mM de KHCO_3 , respectively). Determinations regarding the plants biomass and growth, chlorophyll content and SPAD value, photosynthesis and stomatal conductance, nutrient solution pH, enzyme activity (PEPC, MDH, CS, NADP^+ -IDH) and protein concentration in roots and organic acids content in roots and xylem sap were done during the experiment. The results obtained indicate that the grapevine genotype 140 Ruggeri, when it was submitted to a direct Fe depletion in the nutrient solution, reacted reducing the length and biomass of the shoots, and increasing the organic acids concentration and the activity their related enzymes in roots. Moreover, Fe deficiency reduced the chlorophyll content, the net photosynthesis, and the stomatal conductance of the leaf. In addition, the presence of bicarbonate in the nutrient solution induced a reduction in the main and lateral shoots growth, and increased the root biomass. Moreover, the presence of bicarbonate increased the leaf chlorophyll content, and the tartaric acid concentration in the xylem sap. Data obtained confirm the probability that the presence of bicarbonate in the nutrient solution contributes to mitigate the stress in plants submitted to Fe deficiency. This is based on that, under Fe deficiency conditions, the plants grown under the presence of bicarbonate show a PEPC activity and tartaric acid concentration in roots similar to control plants. Such results, allow to conclude that the Fe deficiency tolerant genotype 140 Ruggeri reacts to Fe deficiency activating response mechanisms corresponding to a Strategy I plants. In addition, under the presence of bicarbonate, the genotype shows similar responses to *Parietaria diffusa* species, such as the growth reduction, the higher root biomass, and the root organic acids increase. However, more investigations are necessary to determine the role of bicarbonate in the 140 Ruggeri rootstock metabolism.

Keywords: Fe deficiency, bicarbonate, 140 Ruggeri, calcicole plant, nutrient solution, Strategy I.

INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es el elemento mineral más estudiado en nutrición vegetal debido a que su déficit es una de las alteraciones nutricionales más importantes que afectan a los cultivos localizados en suelos calcáreos (Tagliavini y Rombolà, 2001).

El hierro, es un nutriente esencial para la vida de las plantas, ya que cumple funciones fundamentales para el metabolismo de ellas. Tal micronutriente, es componente de diversas enzimas vitales (catalasas, oxidasas, peroxidasas, deshidrogenasas, aconitasa, Fe-SOD, etc.), participa en reacciones de transferencia de electrones y transformaciones de energía, y también es componente de moléculas que participan en la cadena transportadora de electrones (ej. citocromos y ferredoxina) (Marschner, 1995). En plantas, el Fe es un micronutriente esencial implicado en la síntesis de la clorofila y fundamental para el mantenimiento de la estructura y función de cloroplastos (Abadía, 1992).

Desde un punto de vista agrícola, la carencia de Fe en los cultivos puede provocar una importante reducción del crecimiento, contracciones en la productividad, y mermas en la calidad de la fruta y vida útil de la planta (Álvarez-Fernández et al., 2006; Rombolà y Tagliavini, 2006). Adicionalmente, tal déficit se manifiesta como una clorosis intervenal en hojas jóvenes y reducciones en el crecimiento de la raíz (Schmidt, 2006). El síntoma de carencia de Fe en las plantas se denomina clorosis férrica, y se manifiesta en hojas jóvenes debido a la escasa movilidad del Fe al interior de la planta (Razeto, 1984). La clorosis férrica es un problema a nivel mundial, y predomina en zonas con suelos calcáreos (Marschner, 1995; Mengel et al., 2001). Tales suelos, se caracterizan por contener más de un 20% de carbonatos totales, 3% de cal activa, pH mayor a 6-6,5, y concentraciones superiores a 5 mM de bicarbonatos (Gildersleeve y Ocampo, 1989). Estos suelos cubren aproximadamente un tercio de la superficie terrestre y se localizan predominantemente en regiones que reciben menos de 500 mm de precipitación anual (Chen y Barak, 1982). Las características edáficas descritas presentan condiciones predisponentes para inducir deficiencias de Fe en los cultivos.

A nivel de suelo, el Fe se presenta en dos posibles estados de oxidación: férrico (Fe^{3+}) y ferroso (Fe^{2+}) (Lindsay y Schwab, 1982). En condiciones de pH ácido y no oxidante en el suelo, predomina la forma Fe^{2+} . Tal forma química es altamente soluble y absorbible por las plantas. Sin embargo, en presencia de oxígeno y en medio alcalino, el Fe^{2+} es oxidado rápidamente a Fe^{3+} , el cual precipita en forma de óxidos e hidróxidos de Fe^{3+} y otras formas intermedias, volviéndose menos disponible para las plantas. Existen dos tipos de estrategias de absorción del Fe según el tipo de planta. La Estrategia I de absorción de Fe, corresponde a un mecanismo desarrollado por las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, mientras la estrategia II, la ejecutan principalmente las gramíneas (Römheld y Marschner, 1986; Morrissey y Guerinot, 2009; Abadía et al., 2011). Ante una baja disponibilidad de Fe, las plantas de Estrategia I responden mediante la acidificación de la

rizósfera y del apoplasto de la raíz, a través de la excreción de protones por medio del incremento en la actividad de la enzima intermembrana H^+ -ATPasa presente en la membrana plasmática de los ápices radicales, permitiendo aumentar la solubilidad del Fe^{3+} (Marschner y Römheld, 1994; Rabotti y Zocchi, 1994). Por otra parte, tales plantas también pueden responder exudando a la rizósfera ácidos orgánicos, principalmente citrato y malato (Bedri et al., 1960), los cuales son sintetizados en las células de la raíz mediante el incremento de la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) (Ollat et al., 2003). Estos ácidos orgánicos cumplen funciones como agentes quelantes del Fe en la solución suelo y al interior de la planta. Otro mecanismo fisiológico de respuesta a la carencia de Fe en plantas de Estrategia I, es el incremento de la capacidad de reducción del Fe^{+3} a Fe^{+2} directamente, mediante el aumento en la actividad de la enzima hierro-quelato reductasa (FC-R), localizada en la membrana plasmática de las células de las raíces (Chaney et al., 1972; Schmidt, 1999). Adicionalmente, tales plantas responden mediante la activación del transporte del Fe^{2+} al interior de la célula por medio del incremento en la actividad de la proteína intermembrana transportadora de Fe IRT (Kim y Guerinot, 2007). Además, algunas especies tienen la capacidad de exudar moléculas quelantes como fenoles, flavinas y azúcares por las raíces, que ayudan a la solubilización de compuestos que contienen Fe (López-Millán et al., 2009).

El incremento en la concentración de ácidos orgánicos en las raíces como mecanismo de respuesta al déficit de Fe, se debe al aumento en la actividad de las enzimas que los originan, principalmente de aquellas vinculadas al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (ciclo de Krebs). Lo que se ha evidenciado en especies modelos tolerantes a la deficiencia de Fe, es que tales plantas poseen la habilidad de incrementar la actividad de la enzima PEPC. Esta enzima ejerce un rol fundamental como mecanismo para mitigar la deficiencia de Fe (Rombola, 1998). La PEPC fija carbono desde el bicarbonato para sintetizar oxaloacetato en el citoplasma. El oxaloacetato da origen al ácido málico a través de la enzima malato deshidrogenasa (MDH), el que puede formar parte del ciclo de los ácidos tricarbóxicos al interior de la mitocondria, en donde se estimula la síntesis de distintos ácidos orgánicos, particularmente el málico y el cítrico. El ácido cítrico, adicionalmente, ejerce un importante rol en el transporte del Fe a través de los vasos xilemáticos (Tiffin, 1970).

Uno de los principales iones presentes en los suelos calcáreos es el bicarbonato (HCO_3^-), categorizado según Mengel et al. (1984), como el factor más importante en la inducción de clorosis férrica. El modo de acción del bicarbonato y su interacción con la carencia de Fe en plantas aún no se logra comprender en su totalidad. Los factores que favorecen la formación de bicarbonato, como la alta humedad del suelo, la compactación y el aporte de materia orgánica fresca, también son inductores de clorosis férrica (Chaney, 1984). Múltiples autores han propuesto algunas rutas en donde tal ión podría intervenir. Por un lado podría existir una acción externa, en suelos calizos que presentan elevadas concentraciones del ión, en los cuales el HCO_3^- tampona la solución suelo a elevados valores de pH. En este aspecto Donnini et al. (2009) plantea que el HCO_3^- interviene externamente manteniendo el suelo en un rango de valores entre 7,5-8,5, reduciendo e impidiendo la solubilidad y disponibilidad del Fe que se encuentra en forma de óxidos e hidróxidos (Lindsay, 1979). En concentraciones elevadas (20-30 mM), el HCO_3^- puede

inducir clorosis férrica al inhibir la expresión de los genes que codifican a la FC-R, transportadores de Fe y a la H⁺-ATPasa (Lucena et al., 2007). Adicionalmente, evidencias científicas sugieren que el bicarbonato podría ser cargado al xilema, y al apoplasto de las células foliares. Algunos autores (Covarrubias y Rombolà, 2013) han reportado un aumento en el pH del líquido xilemático presente en plantas crecidas en una solución nutritiva con una concentración de bicarbonato de 5 mM. Por otra parte, Mengel et al. (1994) y Wegner y Zimmermann (2004), observaron una alcalinización del xilema y del apoplasto de la hoja en plantas sometidas a la presencia de bicarbonato en la solución nutritiva, oxidando el Fe absorbido por las células del mesófilo. Recientemente, Covarrubias y Rombolà (2013) reportaron que la presencia de bicarbonato en la solución nutritiva, modificó la actividad de enzimas vinculadas al ciclo de Krebs, tales como la malato deshidrogenasa (MDH), citrato sintasa (CS) e isocitrato deshidrogenasa (NADP⁺-IDH), siendo estas reportadas como enzimas que responden a la deficiencia de Fe en tejidos de *Beta vulgaris* (López-Millán et al., 2000a), *Pisum sativum* (Jelali et al., 2010) y *Lycopersicon esculentus* (López-Millán et al., 2009). De igual forma, se ha evidenciado que en presencia de HCO₃⁻ se produce un cambio en la acumulación y translocación de ácidos orgánicos en raíces de plantas privadas de Fe, como malato y citrato (Ollat et al., 2003; Covarrubias y Rombolà, 2013). Normalmente, en condiciones de déficit de Fe en plantas de estrategia I, ocurre un aumento de la actividad de la enzima PEPC (López-Millán et al., 2000b), sin embargo diversos autores han reportado resultados contrastantes, ante la presencia de bicarbonato. En este sentido, Covarrubias y Rombolà (2013) evidenciaron una disminución de la actividad de esta enzima en presencia de HCO₃⁻ en el portainjerto de vid 140 Ruggeri en comparación a una deficiencia absoluta de Fe, sin presencia de bicarbonato. Similares resultados fueron encontrados en *Pisum sativum* (Jelali et al., 2010) y *Parietaria diffusa* (Donnini et al., 2012). El nivel de tal respuesta fisiológica, depende fundamentalmente del grado de tolerancia a la deficiencia de Fe, ya que las plantas estudiadas presentan características típicas de plantas del tipo calcícola.

Existen dos tipos de plantas en relación a su adaptación al tipo de suelo, las calcífugas y calcícolas. Las calcífugas presentan un mayor grado de adaptación a sustratos ácidos en donde el Fe abunda y no es una limitante. Por otra parte, las especies denominadas calcícolas, logran colonizar hábitats calcáreos sin presentar síntomas de estrés, lo cual indica una mayor adaptación a tales condiciones químicas de suelo. Se ha demostrado que las plantas calcícolas presentan una mayor actividad de la FC-R, como respuesta a la deficiencia de Fe en plantas de estrategia I (Schmidt y Bartles, 1998). A su vez, las plantas calcícolas exudan una mayor proporción de ácidos di- y tri-carboxílicos que las calcífugas, especialmente ácido cítrico y oxálico, los cuales son poderosos quelantes de Fe y ayudan a la solubilización del P, respectivamente (Tyler y Ström, 1995). Por otro lado, las plantas calcícolas pueden generar características morfo-fisiológicas de resistencia ante condiciones desfavorables como suelos calcáreos o baja disponibilidad de nutrientes. Por ejemplo, la especie *Parietaria diffusa*, una enredadera recientemente clasificada como calcícola, incrementa la formación de raíces proteiformes (o en racimo), ante la presencia de suelos calcáreos (Donnini et al., 2012). En este sentido, Donnini et al. (2012) demostraron que en tal especie, la presencia de bicarbonato cambia significativamente la respuesta de la planta a la deficiencia de Fe, evidenciando poca o ninguna presencia de síntomas de clorosis

férrica, menor actividad de la PEPC y una producción exacerbada de ácidos orgánicos y fenoles. De la misma forma Nikolic et al. (2000), concluyeron que la clorosis férrica inducida por bicarbonato, se presenta en bajos niveles en portainjertos de vid tolerantes, debido a una mayor capacidad para acidificar el medio, y para reducir y absorber el Fe.

El portainjerto 140 Ruggeri ha sido clasificado como un patrón altamente tolerante a la carencia de Fe (Covarrubias y Rombolà, 2013; Ksouri et al., 2006; Tagliavini y Rombolà, 2001). Es un portainjerto híbrido interespecífico proveniente de las variedades *Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*. Su alta tolerancia a los suelos calcáreos fue heredada de *Vitis berlandieri*, mientras *Vitis rupestris* le entregó características de tolerancia al estrés hídrico (Eynard y Dalmasso, 1990). Ksouri et al. (2006) encontraron que la alta tolerancia del 140 Ruggeri a la clorosis férrica se debía en parte a la alta actividad de la FC-R presente en la raíz y a su habilidad para liberar compuestos fenólicos, acidificando el medio externo. Ambos parámetros, han sido descritos como marcadores bioquímicos para la detección de plantas tolerantes a la deficiencia de Fe (Ellsworth et al., 1997; Wei et al., 1997). Ksouri et al. (2005) comprobaron que las estacas leñosas del portainjerto 140 Ruggeri sin injertar, pueden tolerar altas concentraciones de bicarbonato en el suelo (10 mM), mostrando sólo moderados descensos en la clorofila de las hojas y la biomasa vegetal. En otros estudios (Lopez-Millán et al., 2000b; Lopez-Millán et al., 2009; Rombolà et al., 2005), se ha usado el bicarbonato o el carbonato de Ca en soluciones nutritivas, de manera de exacerbar los síntomas de deficiencia de Fe y de estimular sus mecanismos de respuesta. En la misma línea, Covarrubias y Rombolà (2013), registraron un mayor contenido de clorofila y de biomasa radical en plantas 140 Ruggeri en el tratamiento de solución con HCO_3^- y ausencia de Fe, sumado a cambios en la respuesta de las enzimas relativas a la síntesis de ácidos orgánicos PEPC, NADP⁺-IDH y MDH. En condiciones similares (presencia de HCO_3^- y Fe; comparados con deficiencia de Fe), se han encontrado resultados análogos, indicando que genotipos altamente tolerantes, son generalmente menos afectados por la deficiencia de hierro cuando se encuentran en ambientes con bicarbonato (Donnini et al., 2009; Jelali et al., 2010; Rombolà, 1998).

A la luz de los antecedentes previamente expuestos, el presente trabajo evalúa, a nivel fisiológico y bioquímico, la respuesta del portainjerto de vid 140 Ruggeri a la presencia de HCO_3^- , en condiciones de deficiencia de Fe. A su vez, el presente estudio busca demostrar si tal genotipo de vid, presenta las características descritas para una planta calcícola.

Hipótesis

El portainjerto de vid, 140 Ruggeri responde a un déficit de Fe en presencia de bicarbonato en la solución nutritiva, mediante mecanismos fisiológicos y bioquímicos correspondientes a una planta calcícola.

Objetivo general

Evaluar respuestas fisiológicas y bioquímicas del portainjerto 140 Ruggeri frente a la deficiencia de Fe y la presencia de bicarbonato en la solución nutritiva.

Objetivos específicos

Evaluar el efecto del bicarbonato y el déficit de Fe sobre el crecimiento de las plantas.

Determinar el efecto del bicarbonato y el déficit de Fe sobre la concentración de clorofila, índice SPAD y fotosíntesis.

Determinar el efecto del bicarbonato y el déficit de Fe sobre el pH de la solución nutritiva.

Determinar la actividad radical de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), citrato sintasa (CS), malato deshidrogenasa (MDH), isocitrato deshidrogenasa (NADP-IDH) en las plantas sometidas a déficit de Fe y presencia de bicarbonato en solución nutritiva.

Determinar el efecto del bicarbonato y el déficit de hierro sobre la concentración de ácidos orgánicos en las raíces y extractos de líquido xilemático de las plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la Av. Santa Rosa 11315, La Pintana. El experimento se llevó cabo en un invernadero climatizado. Los análisis químicos y enzimáticos se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Vegetal, perteneciente al Departamento de Producción Agrícola. Los análisis de ácidos orgánicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Cromatográfico del Departamento Agroindustria y Enología. El ensayo se realizó entre los meses de Enero y Marzo del año 2015.

Material vegetal y condiciones del experimento

En el experimento se utilizaron plantas micropropagadas del genotipo tolerante al déficit de Fe 140 Ruggeri, híbrido interespecífico proveniente de los genotipos *Vitis berlandieri* y *Vitis rupestris*. Las plantas micropropagadas fueron aclimatadas por 8 semanas en un sustrato de turba y perlita a iguales proporciones. Previo al establecimiento del experimento, las plantas fueron podadas dejando un brote principal lignificado de 5 nudos y 15 cm de largo. Posteriormente, se trasplantaron 24 plantas a 4 contenedores provistos de un sistema hidropónico de raíz flotante de 17 L de capacidad cada uno (6 plantas por cada contenedor, Figura 1). Luego de la brotación, se redujo a un brote vegetativo por planta. Los contenedores fueron cubiertos con papel aluminio, y rellenos con solución nutritiva ½ Hoagland continuamente oxigenada. La oxigenación de la solución nutritiva se llevó a cabo mediante bombas de acuario de flujo controlado. En el invernadero se mantuvieron las condiciones de temperatura y humedad relativa entre 20-30°C y 58-75%, respectivamente (Apéndice I).

Tratamientos y diseño experimental

El ensayo fue establecido acorde a un diseño experimental completamente aleatorizado con estructura factorial con dos factores (Fe y BIC), y dos niveles de cada factor (-Fe, +Fe; 0, 10 μ M de Fe; -BIC, +BIC; 0 y 5mM de KHCO_3 respectivamente). Los tratamientos establecidos fueron 1) +Fe -BIC; 2) -Fe -BIC 3) +Fe +BIC; 4) -Fe +BIC. El potasio incluido en los tratamientos con KHCO_3 fue balanceado con K_2SO_4 en los tratamientos sin bicarbonato. El Fe fue aportado en forma de Fe-EDTA. La composición de la solución

nutritiva ½ Hoagland fue 2,5mM KNO₃; 2 mM MgSO₄; 1 mM KH₂PO₄; 2,5 mM Ca(NO₃)₂; 4,6 μMMnCl₂; 23,2 μM H₃BO₃; 0,06 μM Na₂MoO₄; 0,4 μM ZnSO₄; 0,19 μM CuSO₄. La solución fue continuamente aireada y renovada dos veces por semana, ajustando el pH a 5,5 y 7,1 en los tratamientos sin y con bicarbonato, respectivamente. Cada planta correspondió a una repetición.



Figura 1. Esquema del experimento según tratamientos (a); disposición de contenedores según tratamiento (b); y las plantas establecidas en el experimento (c).

Procedimiento

El experimento fue establecido el día 13 de enero de 2015, y las plantas fueron sometidas a los distintos tratamientos por 50 días. Durante el experimento, se registró diariamente el pH de la solución nutritiva en cada contenedor entre las 9:00 y 10:00 am, mediante un medidor de pH portátil (CP-401 pHmeter, Elmetron Co., Polonia). Además, se realizaron determinaciones de variables fisiológicas y vegetativas. Al finalizar el ensayo, cada planta fue seccionada en raíces, tallo principal, feminelas y hojas, y se registró la biomasa fresca y seca de tales órganos. Adicionalmente, se recolectaron muestras de hojas y raíces que fueron congeladas en nitrógeno líquido, y luego almacenadas a -80°C hasta la ejecución de los análisis subsecuentes.

Evaluaciones biométricas

Largo del brote principal

El crecimiento por planta se midió desde el punto de emergencia del brote hasta el ápice, mediante una cinta métrica.

Contenido de clorofila foliar

El contenido de clorofila de las hojas se determinó 2 veces por semana, en cinco áreas diferentes de la última hoja completamente expandida, mediante un medidor de clorofila portátil (Minolta SPAD 502, Osaka, Japón). Con el propósito de determinar la concentración de clorofila foliar mediante el índice SPAD, discos de hojas ($0,56\text{ cm}^2$) previamente evaluados con el medidor portátil, fueron congelados en nitrógeno líquido. Posteriormente, se realizó una extracción de la clorofila en los discos congelados mediante acetona 80%, según el método de Lichtenthaler y Wellbur (1983). La concentración de clorofila total en el extracto se determinó en laboratorio cuantificando la absorbancia de luz de los extractos a 647 y 663 nm, mediante un espectrofotómetro UV-VIS (V-630, Jasco, Japón). Luego, la concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) de clorofila en los discos foliares se determinó mediante las siguientes ecuaciones descritas por Arnon (1949):

$$\begin{aligned}\text{Clorofila total} &= 8,02 A_{663} + 20,21 A_{647} \\ \text{Clorofila } a &= 12,7 A_{663} - 2,69 A_{647} \\ \text{Clorofila } b &= 22,9 A_{647} - 4,68 A_{663}\end{aligned}$$

De esta forma se obtuvo la correlación entre el índice SPAD y la concentración de clorofila.

Intercambio gaseoso foliar

Se determinó la fotosíntesis neta (P_n) y conductancia estomática (gs) en la primera hoja completamente expandida de cada planta mediante un sensor de gases infrarojo, IRGA (LCi, ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, U.K.). Los datos se registraron luego de 40 a 60 segundos, cuando la tasa de asimilación de CO_2 alcanzó un valor constante. Las mediciones se realizaron cada 7 días, en condiciones despejadas, entre las 9:00 am y 12:00 pm.

Peso fresco y peso seco

Se determinó el peso de las plantas separadas en hojas, tallo, raíces y feminelas, mediante una balanza de precisión. Posteriormente se procedió a secar las muestras en una estufa de aire forzado durante 72 horas a 70°C.

Actividad enzimática y concentración de proteínas

Al final del experimento, se colectaron muestras de ápices de raíces (20-30 mm de largo) en cada planta. Estas fueron lavadas en agua desionizada, y luego pesadas y congeladas en nitrógeno líquido (-180 °C). Luego, las muestras fueron almacenadas en un congelador de ultra baja temperatura (-80 °C). En extractos de tales raíces se determinó la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31), malato deshidrogenasa (MDH; EC 1.1.1.37), citrato sintasa (CS; EC 4.1.3.7), e isocitrato deshidrogenasa (NADP⁺-IDH; EC 1.1.1.42). Adicionalmente, se determinó la concentración de proteínas en los extractos. Los análisis se realizaron mediante un espectrofotómetro UV-VIS (V-630, Jasco, Japón). La extracción de las enzimas se llevó a cabo según el protocolo descrito por Jiménez et al. (2007).

Extracción de enzimas

El extracto de enzimas se llevó a cabo moliendo 0,1 g de las muestras de raíces en un mortero con nitrógeno líquido y 50% PVPP (p/p PS). Posteriormente el tejido fue colocado en tubos Eppendorf, a los cuales se adicionó 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 $NaHCO_3$, 2 mM PMSF, 10 mM ascorbato de sodio y 1% (v/v) Triton. Los extractos se centrifugaron a 15.000 rpm mediante la centrífuga refrigerada Sigma (1-14K, Germany) a 4°C por 10 min. Luego, 0,6 mL de los extractos libres de material particulado fueron desalinizados mediante su paso por columnas Sephadex G-25 (PDmidiTrap G-25, GE Healthcare, UK), previamente equilibradas con el buffer de extracción. Los extractos desalinizados se llevaron a un volumen de 1,5 mL según metodología de Jiménez et al. (2007). Posteriormente tales extractos fueron utilizados para los correspondientes análisis enzimáticos.

Fosfoenolpiruvato carboxilasa. La actividad de la enzima PEPC se determinó mediante el acople de su actividad a la malato deshidrogenasa, cuya reacción de oxidación es catalizada por NADH (Vance et al., 1983). Para su determinación, se introdujo 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 CS 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 y 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 proteínas. La concentración de proteínas se determinó en los extractos de raíces mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como proteína de referencia para la conformación de una curva estándar. Las lecturas mediante espectrofotometría se realizaron con una absorbancia de 595 nm. La concentración de proteínas se expresó en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco (PF).

Determinación de la concentración de ácidos orgánicos

Determinación de ácidos orgánicos en raíces

Las concentraciones de ácidos orgánicos fueron determinadas según el protocolo descrito por Neumann (2006). Las muestras congeladas de ápices radicales colectadas al término del experimento, se introdujeron en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido (4 °C). Luego el tejido fue triturado y homogeneizado en el mortero. Para la extracción y la fase móvil, se preparó un buffer con 2 L de agua MiliQ, 4,9 g KH_2PO_4 (18 Mm), ajustado a pH 2,1 con H_3PO_4 . Los ácidos orgánicos fueron cuantificados mediante un HPLC con una

columna LiChrospher 250 × 4 mm 5 µm RP-18 (Supelco 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.

Recolección y análisis de extractos de líquido xilemático

El extracto de líquido xilemático fue colectado de cada planta al finalizar el experimento aplicando una presión de 5 bares hacia el sistema de raíces usando una cámara de presión Schölander, como fue descrito por Rombolà et al. (2002). Fueron recolectados entre 500–1000 µL de extracto xilemático por planta por medio de micro tubos Eppendorf de 2 mL. Las muestras fueron congeladas y almacenadas a -20 °C hasta la determinación de los ácidos orgánicos. Posteriormente fueron cuantificados los ácidos orgánicos por medio de un HPLC mediante la metodología descrita previamente.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron de acuerdo a un diseño experimental aleatorizado con estructura factorial con dos factores (Fe y BIC) y dos niveles cada factor (-Fe, +Fe; 0, 10 µM de Fe; -BIC, +BIC; 0 y 5mM de KHCO₃ respectivamente). Cada tratamiento fue compuesto por 6 plantas, y cada planta constituyó una repetición. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza two-way, y en caso de encontrar interacciones significativas entre los factores por medio de la prueba F, la comparación estadística se realizó entre los 4 tratamientos (2 niveles de Fe x 2 niveles de KHCO₃). En estos casos se procedió a calcular el error estándar de la media de la interacción (SEM), y los tratamientos fueron considerados significativamente diferentes cuando la diferencia entre las medias fuera mayor a 2 * SEM. En caso de no encontrar interacciones significativas entre factores, la comparación estadística se realizó entre los niveles de cada factor en forma independiente para cada factor por medio de la prueba F (P≤0.05). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SAS (SAS Institute, Cary, NC).

RESULTADOS

Crecimiento

El monitoreo del crecimiento (cm) se inició una vez que las plantas emitieron el brote principal, lo cual ocurrió a los 18 días desde el inicio del experimento. Las feminelas y zarcillos fueron excluidas de la medición. Durante el experimento, las plantas sometidas a los distintos tratamientos presentaron diferencias significativas en el largo del brote principal en las distintas fechas (Figura 2).

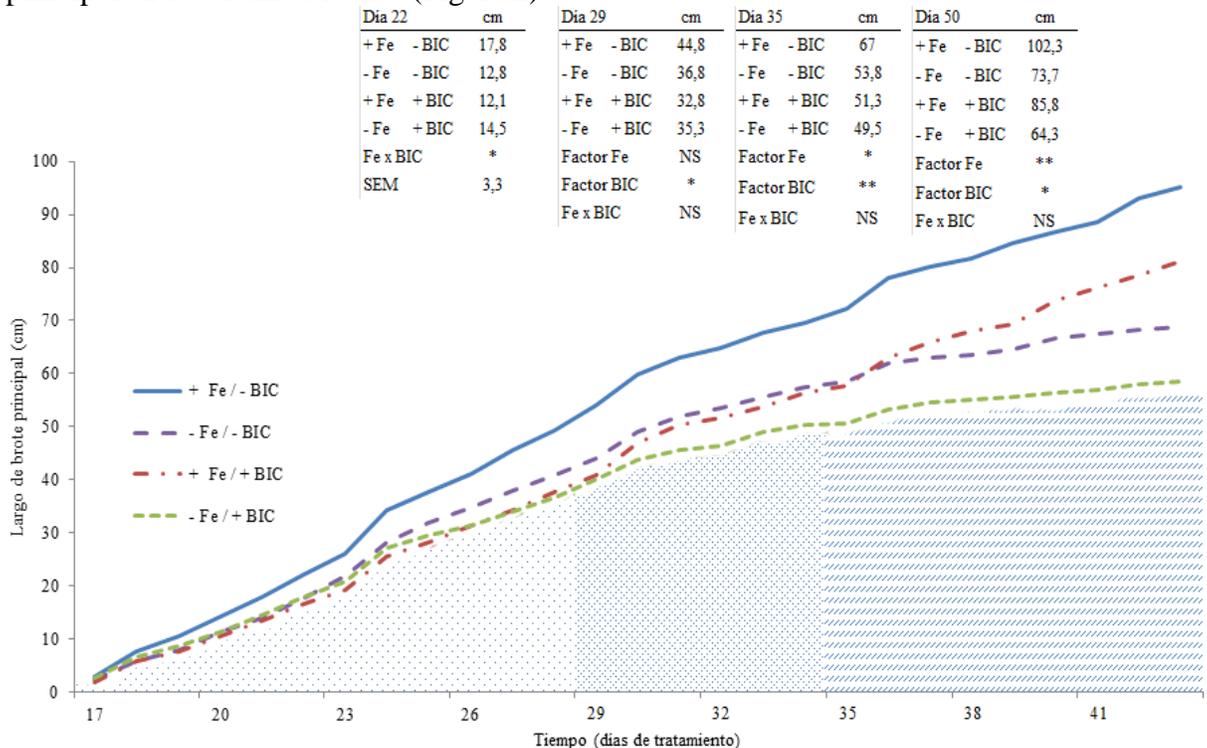


Figura 2. Largo del brote principal (cm) medido durante el experimento (días) en las plantas del portainjerto 140 Ruggeri sometidas a los tratamientos. Los datos son la media de seis repeticiones. NS, * y **. No significativo, significativo a $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente.

A los 22 días del ensayo, se encontró una interacción entre los factores Fe y BIC, en donde las plantas crecidas en presencia de Fe y ausencia de bicarbonato alcanzaron un mayor crecimiento del brote principal en comparación con el resto de los tratamientos.

Sucesivamente, desde los 29 días, el bicarbonato redujo el crecimiento del brote principal, independientemente del nivel de Fe. A partir de los 35 días desde la imposición de los tratamientos, se encontraron diferencias entre los niveles de Fe, en la cual el déficit de Fe redujo el largo de brotes de las plantas. Al finalizar el experimento, la carencia de Fe provocó un decrecimiento significativo de un 26,7% en el largo del brote principal en comparación con las plantas cultivadas en presencia de Fe en la solución nutritiva. A su vez, la presencia de bicarbonato redujo el crecimiento en un 14,7%.

Peso fresco y peso seco

Los resultados obtenidos indican que el nivel de Fe y de bicarbonato modificaron la producción de biomasa de las plantas (cuadros 1 y 2). En tal contexto, la deficiencia de Fe redujo la biomasa en peso fresco del tallo, hojas, feminelas y el total, mientras el bicarbonato redujo el peso de tallo y feminelas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores promedio de peso fresco (g) determinados al finalizar el experimento en las raíces, tallos, hojas, feminelas y peso total de las plantas del portainjerto 140 Ruggeri sometidas a los distintos tratamientos.

Factores		Peso Fresco (g)				
Hierro	Bicarbonato	Raíces	Tallo	Hojas	Feminelas	Total
+ Fe	- BIC	34,0±1,6	14,3±1,7	16,1±1,6	11,8±2,8	76,2±3,7
- Fe	- BIC	33,6±6,8	9,0±3,9	10,4±1,1	4,2±1,5	57,2±7,4
+ Fe	+ BIC	36,0±3,4	10,3±1,1	12,4±1,5	3,6±1,0	62,4±5,8
- Fe	+ BIC	32,2±4,9	7,2±0,8	8,6±0,9	1,5±0,7	49,5±6,8
Estadística						
Factor Fe		NS	**	*	*	*
Factor BIC		NS	*	NS	**	NS
Interacción Fe x BIC		NS	NS	NS	NS	NS

Los datos son las medias de seis repeticiones ± el error estándar.

NS, * y **. No significativo, significativo para $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente.

Respecto de la biomasa seca, el déficit de Fe redujo el peso de los tallos, hojas, feminelas y el total de las plantas (Cuadro 2). El peso de raíces mostró una respuesta significativa ($p < 0,01$) ante el efecto del factor bicarbonato, en el cual la presencia de tal ion incrementó el peso de raíces. Adicionalmente, la presencia de bicarbonato en la solución nutritiva redujo el peso de las feminelas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores promedio de peso seco (g) determinados al finalizar el experimento en las raíces, tallos, hojas, feminelas y peso total de las plantas del portainjerto 140 Ruggeri sometidas a los distintos tratamientos.

Factores		Peso Seco (g)				
Hierro	Bicarbonato	Raíces	Tallo	Hojas	Feminela	Total
+ Fe	- BIC	2,8±0,2	2,9±0,2	2,6±0,3	2,1±0,5	10,5±0,6
- Fe	- BIC	3,1±0,4	1,9±0,2	1,5±0,2	0,7±0,2	7,2±1,1
+ Fe	+ BIC	5,9±0,6	2,5±0,2	2,4±0,3	0,8±0,2	11,5±1,2
- Fe	+ BIC	5,7±0,9	1,8±0,2	1,4±0,2	0,3±0,1	9,1±1,3
Estadística						
Factor Fe		NS	**	**	*	*
Factor BIC		**	NS	NS	*	NS
Interacción Fe x BIC		NS	NS	NS	NS	NS

Los datos son las medias de seis repeticiones ± el error estándar.

NS, * y **. No significativo, significativo a $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente.

Valor SPAD y contenido de clorofilas

El valor SPAD corresponde a una medida no destructiva de la intensidad de verde de la hoja o índice de verdor (Waskom, 1996). Dicha medida, es un indicador relativo de la concentración de clorofilas en las hojas. A partir de los datos obtenidos del valor SPAD en el experimento, se realizó una correlación entre este parámetro y la concentración total de clorofila en las hojas determinada en laboratorio. En la Figura 3 se presenta la correlación entre el valor SPAD y la concentración de clorofila, la cual arrojó un R^2 de 0,96 ($n=20$).

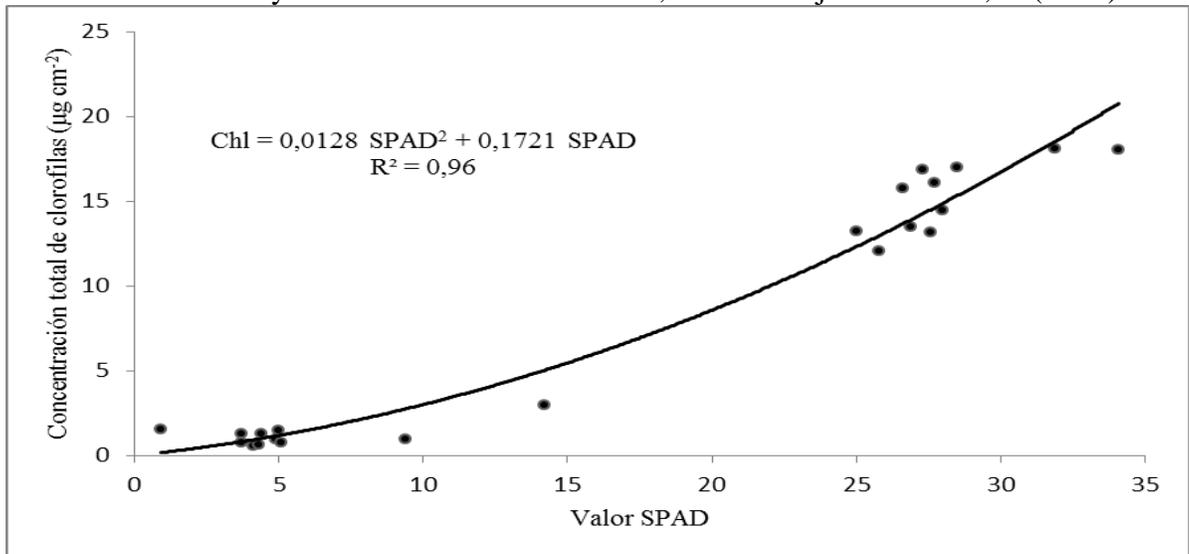


Figura 3. Correlación entre el valor SPAD y la concentración total de clorofila ($\mu\text{g cm}^{-2}$) en 20 hojas del portainjerto 140 Ruggeri.

El valor SPAD medido en la primera hoja completamente expandida del brote principal de las plantas se presenta en la Figura 4. Los resultados indican que desde el día 23 los tratamientos influenciaron la intensidad de verde de las hojas.

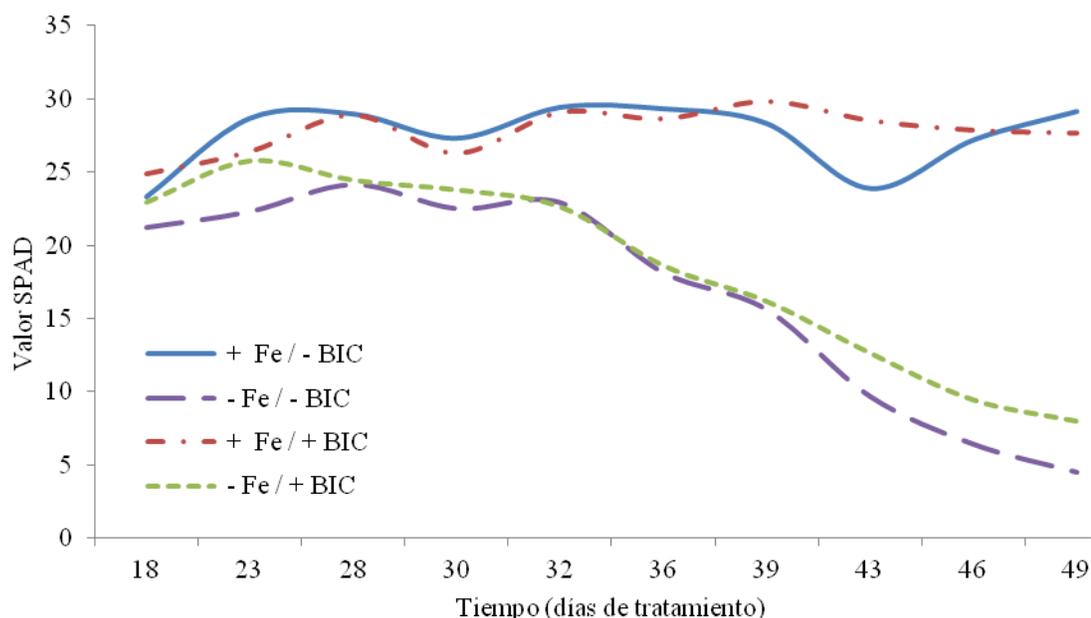


Figura 4. Valor SPAD determinado durante el experimento en la primera hoja completamente expandida del portainjerto 140 Ruggeri sometido a los distintos tratamientos.

Cuadro 3. Concentración de clorofilas ($\mu\text{g}\cdot\text{Chl cm}^{-2}$) estimada a partir del valor SPAD a los 18, 23, 32, 43 y 49 días del experimento.

Factores		Tiempo (días)				
Hierro	Bicarbonato	18	23	32	43	49
Concentración de clorofilas ($\mu\text{g Chl cm}^{-2}$)						
+ Fe	- BIC	7,4±2,3	15,6±1,0	16,2±0,4	11,5±0,7	15,9±0,5
- Fe	- BIC	3,2±2	10,5±1,5	10,8±0,9	3,2±0,9	1,3±0,7
+ Fe	+ BIC	4,1±2,5	13,5±0,7	15,9±0,8	15,4±0,5	14,6±0,8
- Fe	+ BIC	7,2±2,3	13,2±1,5	10,5±0,9	4,6±1,4	2,4±0,8
Estadística						
Factor Fe		NS	*	**	**	**
Factor BIC		NS	NS	NS	*	NS
Interacción Fe x BIC		NS	NS	NS	NS	NS

Los datos son las medias de seis repeticiones \pm el error estándar.

NS, * y **. No significativo, significativo a $p\leq 0,05$ y $p\leq 0,01$, respectivamente.

Respecto de la concentración de clorofilas de las hojas, el déficit de Fe redujo tal variable desde el día 23, y al finalizar el experimento, se registró una reducción del 87,9% en la concentración de clorofila inducida por el déficit de Fe (Cuadro 3). Los resultados evidencian que las plantas sometidas a carencia de Fe mostraron severos síntomas de clorosis férrica. Por otra parte, la presencia de bicarbonato en la solución nutritiva incrementó en un 26,5% la concentración de clorofila en la medición realizada en el día 43 del experimento.

Intercambio gaseoso foliar

En el Cuadro 4 se presenta la actividad fotosintética determinada en la primera hoja completamente expandida durante el experimento. Los resultados evidencian que a los 42 días, la carencia de Fe redujo la fotosíntesis neta en un 46,5% respecto al tratamiento en presencia de este elemento (Cuadro 4). A los 46 días se registró una interacción entre los factores en la cual, el déficit de Fe redujo la fotosíntesis neta en un 70% en las plantas cultivadas en presencia de bicarbonato, y en un 41% en las plantas cultivadas sin la presencia de este ion en la solución nutritiva (Cuadro 4).

La conductancia estomática es la velocidad (cm s^{-1}) a la cual se produce el flujo de agua transpirada desde las hojas hacia la atmósfera a través de los estomas. A los 25 días del experimento se registró una interacción entre los factores Fe y bicarbonato, en la cual, el déficit de Fe redujo la conductancia estomática foliar en las plantas cultivadas en ausencia de bicarbonato, mientras una respuesta contraria se registró en las plantas tratadas con bicarbonato (Cuadro 5). Por otra parte, los resultados indican que el déficit de Fe redujo la conductancia estomática desde los 32 días del experimento, mientras el bicarbonato la redujo solo a los 42 días.

Cuadro 4. Fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) determinada a los 25, 32, 42 y 46 días del experimento en hojas del portainjerto 140 Ruggeri sometido a los distintos tratamientos.

Factores		Tiempo (días)			
Hierro	Bicarbonato	25	32	42	46
		Fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			
+ Fe	- BIC	4,6±0,5	7,9±1,4	8,9±0,3	7,1±0,8
- Fe	- BIC	5,0±0,5	7,0±0,8	4,2±0,5	5,1±1,2
+ Fe	+ BIC	3,5±0,4	7,3±1,3	8,5±0,5	8,6±0,9
- Fe	+ BIC	3,9±0,5	6,0±0,6	5,1±0,6	2,6±0,3
Estadística					
Factor Fe		NS	NS	**	
Factor BIC		NS	NS	NS	
Interacción Fe x BIC		NS	NS	NS	*
SEM					1,01

Los datos son las medias de seis repeticiones \pm el error estándar.

NS, * y **. No significativo, significativo a $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente.

SEM. Error estándar de la media.

Cuadro 5. Conductancia estomática (cm s^{-1}) determinada a los 25, 32, 42 y 46 días del experimento en hojas del portainjerto 140 Ruggeri sometido a los distintos tratamientos.

Factores		Tiempo (días)			
Hierro	Bicarbonato	25	32	42	46
		Conductancia estomática (cm s^{-1})			
+ Fe	- BIC	5,8±0,2	6,4±0,4	7,4±0,2	5,1±0,4
- Fe	- BIC	4,8±0,1	4,6±0,1	4,9±0,4	4,0±0,5
+ Fe	+ BIC	4,3±0,2	6,6±0,3	6,9±0,3	5,1±0,5
- Fe	+ BIC	4,8±0,4	5,3±0,2	3,5±0,3	2,7±0,1
Estadística					
Factor Fe			**	**	**
Factor BIC			NS	*	NS
Interacción Fe x BIC		*	NS	NS	NS
SEM		0,11			

Los datos son la media de seis repeticiones \pm el error estándar.

NS, * y **. No significativo, significativo a $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente.

SEM. Error estándar de la media.

ph de la solución nutritiva

Los datos obtenidos en las mediciones periódicas de pH en la solución nutritiva se presentan en la Figura 5. Durante el experimento, los valores de pH se mantuvieron entre un rango de 7 y 8 para los tratamientos en presencia de bicarbonato, y entre 6,3 y 5,5 en las plantas sin la presencia de este ion. A partir de la tercera semana del experimento, se registró una disminución del pH de la solución nutritiva en los contenedores de las plantas sometidas a déficit de Fe en ausencia de bicarbonato (Figura 5). En el día 45 del experimento, la solución nutritiva de las plantas sometidas a déficit de Fe y ausencia de bicarbonato presentó los valores mínimos, alcanzando un pH de 5,1. Este valor muestra una diferencia mayor a una unidad comparado con el registrado en la solución nutritiva de las plantas cultivadas en presencia de Fe y bicarbonato. En presencia de bicarbonato, el déficit de Fe no indujo una reducción del pH del medio (Figura 5).

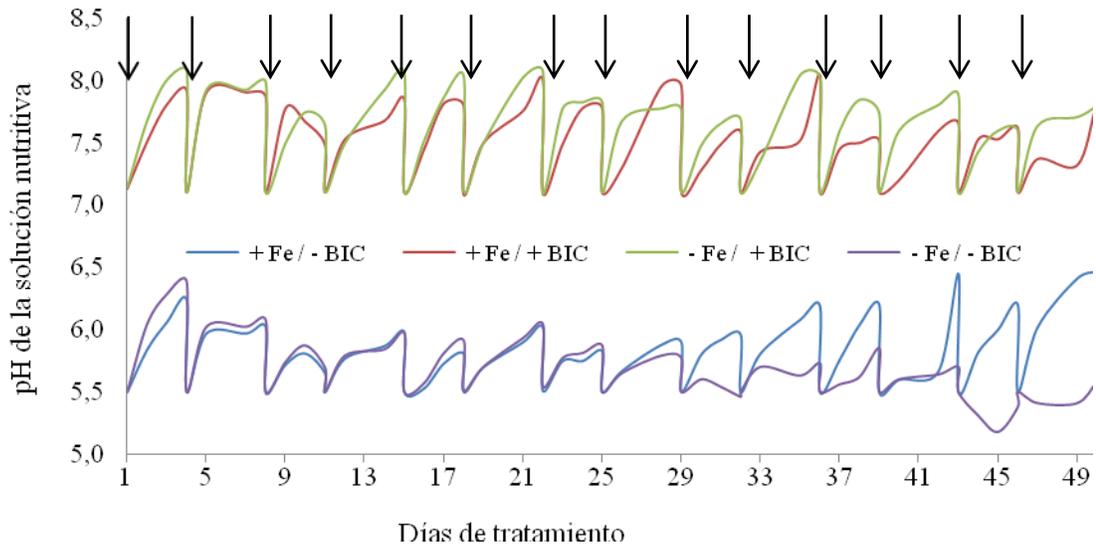


Figura 5. Valores de pH de la solución nutritiva durante el experimento. Las flechas hacia abajo indican la renovación de la solución nutritiva.

Actividad enzimática y concentración de proteínas en raíces

La actividad de las enzimas evaluadas en los extractos de raíces se presenta en el Cuadro 6. El análisis de los datos arrojó una interacción entre los factores para la actividad de la enzima PEPC, en la cual, el déficit de Fe incrementó la actividad de la PEPC en las plantas crecidas en presencia de bicarbonato, mientras en ausencia de bicarbonato no se registró tal efecto (Cuadro 6). Por otra parte, el déficit de Fe incrementó la actividad de las enzimas NADP^+ -IDH y CS, mientras el bicarbonato incrementó la actividad de la NADP^+ -IDH. Los tratamientos no influenciaron la actividad de la enzima MDH (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividad (nmol mg^{-1} proteína min^{-1}) de las enzimas PEPC, MDH, NADP^+ -IDH, CS y concentración de proteínas (mg g^{-1} PF) determinadas en extractos de raíces del portainjerto 140 Ruggeri sometido a los distintos tratamientos.

Factores		Actividad de enzimas (nmol mg^{-1} proteína min^{-1})				Concentración (mg g^{-1} PF)
Hierro	Bicarbonato	PEPC	MDH	NADP^+ -IDH	CS	Proteína
+ Fe	- BIC	12,31±0,4	40,01±2,2	1,37±0,1	0,27±0,02	21,96±2,3
- Fe	- BIC	16,43±1,9	42,06±2,2	1,96±0,08	0,38±0,05	29,38±4,5
+ Fe	+ BIC	18,05±0,8	36,94±2,8	2,17±0,09	0,65±0,03	27,58±3
- Fe	+ BIC	29,82±0,4	36,37±2,3	2,06±0,1	0,57±0,06	28,58±5,5
Estadística						
Factor Fe			NS	**	**	NS
Factor BIC			NS	*	NS	NS
Interacción Fe x BIC		**	NS	NS	NS	NS
SEM		3,27				

Los datos son las medias de seis repeticiones \pm el error estándar.

NS, * y **. No significativo, significativo a $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente.

SEM. Error estándar de la media.

Concentración de ácidos orgánicos en extractos de raíces y líquido xilemático

Luego de finalizar el experimento, se determinó la concentración de los principales ácidos orgánicos presentes en extractos de raíces, y en líquido xilemático de las plantas mediante HPLC. Se determinó la concentración de ácido cítrico, málico, tartárico y ascórbico. Los resultados relativos a la concentración de los ácidos cítrico, málico y tartárico, arrojaron interacción entre los factores Fe y bicarbonato, en la cual, el déficit de Fe incrementó la concentración de tales ácidos orgánicos en las plantas cultivadas en ausencia de bicarbonato (Cuadro 7). En contraste, la carencia de Fe redujo la concentración de ácidos orgánicos en presencia de bicarbonato (Cuadro 7).

En el líquido xilemático la presencia de Fe y bicarbonato en la solución nutritiva incrementaron la concentración de ácido tartárico (Cuadro 8). Los datos relativos a la concentración de ácido ascórbico arrojaron una interacción entre los factores, en la cual, el déficit de Fe redujo la concentración de ascorbato en las plantas cultivadas en ausencia de bicarbonato, mientras el efecto adverso se registró en las plantas sometidas a la presencia de bicarbonato (Cuadro 8). Por otra parte, el déficit de Fe provocó un incremento de 36,5% en el contenido de ácido málico en extractos de líquido xilemático del portainjerto 140 Ruggeri (Cuadro 8).

Cuadro 7. Concentración (mg g^{-1} PF) de ácido cítrico, málico, tartárico y ascórbico, en extractos de raíces del portainjerto 140 Ruggeri sometido a los distintos tratamientos.

Factores		Concentración (mg g^{-1} PF)			
Hierro	Bicarbonato	Cítrico	Málico	Tartárico	Ascórbico
+ Fe	- BIC	0,5±0,09	0,2±0,05	2,0±0,2	0,12±0,06
- Fe	- BIC	1,6±0,07	0,5±0,06	2,4±0,1	0,03±0,01
+ Fe	+ BIC	1,7±0,17	0,6±0,06	3,0±0,3	0,07±0,04
- Fe	+ BIC	1,3±0,1	0,5±0,05	2,0±0,09	0,03±0,01
Estadísticas					
Factor Fe					NS
Factor BIC					NS
Interacción Fe x BIC		**	**	**	NS
SEM		0,02	0,004	0,05	

Los datos son las medias de seis repeticiones \pm el error estándar.

NS, **. No significativo, significativo a $p \leq 0,01$, respectivamente.

SEM. Error estándar de la media.

Cuadro 8. Concentración (μM) de ácido cítrico, málico, tartárico y ascórbico, en extractos de raíces del portainjerto 140 Ruggeri sometido a los distintos tratamientos.

Factores		Concentración (μM)			
Hierro	Bicarbonato	Cítrico	Málico	Tartárico	Ascórbico
+ Fe	- BIC	195±36,4	165±9,6	565±26,4	67±18,1
- Fe	- BIC	212±31,3	265±17,5	486±66,3	54±10,7
+ Fe	+ BIC	197±40,4	200±37,2	771±22,6	12±2,4
- Fe	+ BIC	236±35,4	310±38,7	580±52,3	76±21,2
Estadística					
Factor Fe		NS	**	*	
Factor BIC		NS	NS	*	
Interacción Fe x BIC		NS	NS	NS	*
SEM					8,61

Los datos son la media de seis repeticiones \pm el error estándar.

NS, * y **. No significativo, significativo a $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente.

SEM. Error estándar de la media.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, el portainjerto de vid 140 Ruggeri respondió ante el déficit de Fe mediante una reducción en el crecimiento del brote principal y la biomasa del tallo, hojas, feminelas y total de la planta. Tal respuesta, corresponde a un síntoma de déficit de Fe ampliamente reportado en la literatura en otros genotipos de vid tales como Cabernet Sauvignon (Jimenez et al., 2007), y en otras especies leñosas como el kiwi, duraznero y peral (Rombolà et al., 2002; Álvarez-Fernández et al., 2003; Álvarez-Fernández et al., 2011). Sin embargo, en estudios realizados en los genotipos de vid susceptibles al déficit de Fe 3309-C y *Vitis riparia* Gloire de Montpellier, la carencia de este micronutriente no redujo el crecimiento del brote principal de las plantas, pero si se registró una significativa reducción en la concentración de clorofila foliar (Covarrubias et al., 2014; Covarrubias et al., 2015; Jiménez et al., 2007). Tales evidencias, sugieren que la reducción en la tasa de crecimiento de la parte aérea de la planta, asociada a la mantención de elevados niveles de clorofila foliar podría constituir un mecanismo de respuesta para mantener concentraciones de Fe adecuadas para el funcionamiento metabólico de la planta (Covarrubias y Rombolà, 2015).

Por otra parte, el bicarbonato redujo en un 14,7% el largo del brote principal, sin alterar la biomasa de las plantas. En otros experimentos conducidos en sistemas hidropónicos en el mismo portainjerto de vid se han encontrado resultados contrastantes. Por ejemplo, Ksouri et al. (2005) reportaron que el bicarbonato redujo en un 20% el crecimiento del brote principal y la biomasa total en plantas sometidas a 10 mM de NaHCO_3 . Por otra parte, Covarrubias y Rombolà (2013) no observaron un efecto del bicarbonato en el crecimiento de brotes y biomasa en plantas del genotipo 140 Ruggeri sometidas a 10 mM de KHCO_3 . Es posible que las diferencias en los resultados reportados, se deban a las condiciones experimentales particulares de cada estudio. En una investigación realizada por Donnini et al. (2012), se estudió el comportamiento de la especie calcífuga *Pariataria diffusa* ante la carencia de Fe y la presencia de bicarbonato en el sustrato. En el estudio, tal especie presentó una disminución del 55% en el crecimiento del brote principal en las plantas tratadas con bicarbonato (15 mM HCO_3^-). En el presente ensayo el bicarbonato aumentó el peso seco de las raíces. Dicha estimulación del crecimiento de la biomasa radical en plantas sometidas a la presencia de bicarbonato se ha observado en el portainjerto 140 Ruggeri (Covarrubias y Rombola, 2013), en *Medicago ciliaris* (M'sehli et al., 2009) y en especies leñosas cultivadas en campo como el peral (Tagliavini et al., 1993). Desde un punto de vista morfológico, el incremento en la biomasa radical con la aparición de pelos radicales y abundantes raíces secundarias incrementan la superficie de contacto entre las raíces y el suelo, favoreciendo la búsqueda y adquisición de nutrientes (Landsberg, 1996; Schmidt y Bartels, 1996) en condiciones limitantes. En tal contexto, es posible que el estímulo en el crecimiento de las raíces como respuesta al bicarbonato sea un mecanismo para incrementar la capacidad de absorción de minerales por las raíces.

Los resultados obtenidos arrojaron una alta correlación entre el índice SPAD y la concentración de clorofilas ($r = 0,97$), confirmando la elevada confiabilidad de tal índice como indicador del contenido de clorofilas en las hojas, como ya ha sido descrito por otros autores para la vid (Petrie et al., 2000; Porro et al., 2001; Steele et al., 2008). En la presente investigación, el déficit de Fe disminuyó la concentración de clorofila foliar en un 70,9%. Debido a que el Fe es componente estructural del fotosistema II (PSII) y I (PSI) (Terry y Abadia, 1986) y participa en numerosas reacciones de la ruta de síntesis de la molécula de clorofila, se explica que su deficiencia provoque una disminución en la concentración de clorofilas por unidad de área de hoja (Morales et al., 1990). Adicionalmente, el déficit de Fe redujo la actividad fotosintética y conductancia estomática foliar. Presumiblemente, tales resultados son una consecuencia de la disminución en la concentración de las clorofilas totales en las hojas, lo cual se suma a una condición estresante prolongada. En otros experimentos, Larbi et al. (2006) atribuyó la disminución de la tasa fotosintética y transpiración de tres especies vegetales a una baja concentración de clorofila total debido a la privación de Fe. Según Lerdau y Coley (2002), una limitante nutricional en general afecta de mayor manera al crecimiento de la planta antes que a la fotosíntesis, lo cual permite la asignación de los fotosintetatos a la producción de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos. Por otra parte, en el presente estudio se observó una tendencia al incremento en la concentración de clorofilas en las hojas inducido por la presencia de bicarbonato, la cual fue significativa en la medición realizada a los 43 días del experimento. Los resultados obtenidos son concordantes con lo reportado por Covarrubias y Rombolà (2013), quienes con el mismo portainjerto y bajo similares condiciones experimentales registraron un incremento en el índice SPAD inducido por el bicarbonato (5 mM). Tales autores atribuyeron este resultado al posible efecto del ion bicarbonato en desacelerar la degradación de la clorofila en las hojas (Covarrubias y Rombolà, 2013). En contraste, la especie calcífuga *Parietaria diffusa* mostró una reducción del 20% en la concentración de clorofila inducida por el bicarbonato (Donnini et al., 2012). Sin embargo, en el mismo estudio, las plantas en déficit de Fe tratadas con bicarbonato presentaron un valor SPAD mayor respecto a las plantas sometidas a déficit de Fe absoluto (Donnini et al., 2012), lo cual se condice con lo reportado por Covarrubias y Rombolà (2013) y con los resultados encontrados en el presente estudio. En consecuencia, los datos de crecimiento y concentración de clorofila foliar obtenidos sugieren que el genotipo de vid 140 Ruggeri, cuando se encuentra ante la presencia de bicarbonato, desarrolla una estrategia de adaptación basada en la reducción del crecimiento de la parte aérea para mantener adecuados niveles de Fe y clorofila en la plantas preservando la actividad fotosintética, tal como lo sugirió Donnini et al. (2009), e incrementando la biomasa radical para favorecer la absorción de nutrientes.

En este experimento se registró una disminución del pH en la solución nutritiva de las plantas sometidas a déficit de Fe. La acidificación de la rizósfera, y consecuentemente del medio externo a las raíces es uno de los principales mecanismos de respuesta de este genotipo a la deficiencia de Fe (Covarrubias y Rombolà, 2013; Ksouri et al., 2006). Tal respuesta ha sido ampliamente registrada en especies frutales tolerantes de Estrategia I de absorción del Fe, tales como la vid, el kiwi y el limonero (Brancadoro et al., 1995; Covarrubias y Rombolà, 2013; Covarrubias y Rombolà, 2015; Rombolà et al., 2002). La

disminución del pH de la rizósfera ante deficiencia de Fe se debe en parte a la activación de la enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Dell'Orto et al., 2000), la cual cataliza la exudación de protones hacia el medio externo. Este mecanismo de respuesta permite incrementar la solubilidad y disponibilidad del Fe presente en la solución, y contribuye a establecer un potencial eléctrico transmembrana favorable (negativo al interior) para la mejor captación de otros cationes (Dell'Orto et al., 2000). Los procesos de reducción y aumento de extrusión de protones en las raíces bajo deficiencia de Fe requieren de una mayor producción de NAD(P)H y regeneración de ATP, lo que se consigue a través de la aceleración del metabolismo interno, en particular la glicolisis (Donnini et al., 2012). Por otra parte, las plantas deficientes en Fe no lograron reducir significativamente el pH de la solución nutritiva en presencia de bicarbonato. Este resultado se debe probablemente a la capacidad tampón del HCO_3^- , el cual mantuvo un pH de 7,1 en el medio demostrando su eficacia en neutralizar los protones H^+ excretados por la bomba H^+ -ATPasa (Romera et al., 1992). La especie calcífuga *Parietaria diffusa* sometida a deficiencia de Fe logró disminuir el pH en la solución nutritiva mediante la reorganización de sus compuestos carbonados, administrándolos entre el metabolismo primario y secundario, provocando la acumulación de compuestos orgánicos en sus tejidos (Donnini et al., 2012).

En el presente estudio, la deficiencia de Fe incrementó la concentración de ácidos orgánicos en las raíces y la actividad de sus enzimas de síntesis. Las plantas deficientes en Fe presentaron una actividad PEPC dos veces mayor en comparación al testigo. Similares resultados han sido reportados en el genotipo de vid sometido a estudio (Covarrubias y Rombolà, 2013), en Cabernet Sauvignon, y en Riparia Gloire de Montpellier (Jiménez et al., 2007; Ollat et al., 2003). La enzima PEPC cataliza la incorporación de bicarbonato en el ácido orgánico C3 fosfoenolpiruvato, generando oxaloacetato (OAA), el cual es convertido a malato mediante la actividad de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) (Lance y Rustin, 1984). Tal mecanismo es fundamental para mantener en equilibrio el pH citosólico (Davies, 1986). Adicionalmente, el déficit de Fe incrementó la actividad de la enzima $NADP^+$ -IDH. Esta enzima forma parte del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA), y cataliza la producción de 2-oxoglutarato mediante la oxidación de isocitrato (Foyer et al., 2011). La enzima se encuentra principalmente compartimentada en el citosol y la mitocondria al interior de la célula. Las enzimas $NADP^+$ -IDH y CS han sido documentadas como enzimas que responden incrementando su actividad frente a la deficiencia de Fe en tejidos radicales de *Beta vulgaris* L. (López-Millán et al., 2000b), *Pisum sativum* (Jelali et al., 2010) y *Lycopersicon esculentum* L. (López-Millán et al., 2009). Adicionalmente, la enzima CS respondió positivamente a la deficiencia de Fe, lo cual podría ser atribuido al rol de tal enzima en la acumulación de ácido cítrico en las raíces. Por otra parte, la presencia de bicarbonato incremento la actividad de la $NADP^+$ -IDH, sin modificar la actividad del resto de las enzimas evaluadas. La elevada concentración del ion bicarbonato en suelos calcáreos es uno de los principales factores causantes de clorosis férrica en las especies y/o genotipos susceptibles (Nikolic y Kastori, 2000). Sin embargo, aún no hay absoluta claridad sobre los mecanismos mediante los cuales el bicarbonato provoca déficit de Fe, y en relación a ello, se han propuesto distintas hipótesis. Por una parte, el bicarbonato tampona el suelo a pH 7,5-8,5, reduciendo la biodisponibilidad de Fe. Además, se ha observado que la presencia

de este ion inhibe la actividad de enzimas claves para absorción del Fe, tales como la FC-R, la cual cataliza la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} (Romera et al., 1997; Alcántara et al., 2000), MDH, CS e NADP^+ -IDH (Covarrubias y Rombolà, 2013). En las plantas sometidas a déficit de Fe, el bicarbonato redujo la actividad de la PEPC en comparación las plantas cultivadas en ausencia de este ion. Tal resultado, podría ser atribuido al efecto del bicarbonato como inhibidor de la actividad de la PEPC, o podría ser un indicador de que el bicarbonato logra mitigar parcialmente el estrés causado por el déficit de Fe.

Además, en el presente experimento, el déficit de Fe y la presencia de bicarbonato incrementaron la concentración de ácido cítrico, málico y tartárico en las raíces. El incremento de los ácidos orgánicos generalmente conlleva a su acumulación en tejidos de raíces, hojas y/o exudados (Abadía et al., 2002). La exudación de ácidos desde la raíz hacia la rizósfera mejora la disponibilidad del Fe para ser absorbido (Tyler y Ström, 1995) siendo un recurso para la excreción de H^+ desde la raíz (Landsberg, 1986). Adicionalmente su acumulación en plantas deficientes de Fe mejora el transporte a larga distancia del Fe (López-Millán et al., 2000a), promueve el control del pH citosólico y ayuda a aumentar la actividad de la enzima transmembrana H^+ -ATPasa (Zocchi, 2006). De igual forma, en la especie calcícola *Parietaria diffusa* se encontró un aumento en la acumulación de compuestos orgánicos concentrados y exudados bajo condiciones de deficiencia de Fe, y de mayor manera en presencia de bicarbonato (Donnini et al., 2012). En el líquido xilemático, la presencia de Fe y bicarbonato incrementaron la concentración de ácido tartárico. Aparentemente este ácido juega un rol de mayor importancia para el portainjerto 140 Ruggeri en comparación a otras especies, por ser un ácido característico de la vid (Ruffner, 1982). El incremento en la concentración de los ácidos ascórbico y principalmente málico en el líquido xilemático del portainjerto 140 Ruggeri sometido a déficit de Fe, podría ser debido al rol de los ácidos orgánicos en el transporte del Fe a través de los vasos xilemáticos, y a la necesidad de reducir el Fe en el apoplasto del tejido foliar, a través del efecto de tales ácidos en el pH, y así contribuir a facilitar su paso por la membrana (Kosegarten et al., 2004). En consecuencia, los resultados sugieren que el portainjerto 140 Ruggeri responde al déficit de Fe y al bicarbonato incrementado la síntesis y concentración de ácidos orgánicos en las raíces, y el transporte hacia la parte aérea de algunos de ellos.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible concluir que:

El genotipo de vid 140 Ruggeri cuando es sometido a un déficit directo de Fe, responde activamente disminuyendo el crecimiento del brote y la biomasa de la parte aérea, e incrementando concentración de ácidos orgánicos y sus enzimas de síntesis en raíces. Además, el efecto del déficit de Fe directo se manifiesta mediante una reducción en el contenido de clorofila, la fotosíntesis neta y la conductancia estomática de las hojas.

La presencia de bicarbonato en la solución nutritiva induce una reducción en el crecimiento del tallo y las feminelas, y un incremento en la biomasa radical. Adicionalmente, la presencia de bicarbonato incrementa la concentración de clorofila foliar, y la concentración de ácido tartárico en el líquido xilemático.

Los resultados confirman la probabilidad de que la presencia de bicarbonato en la solución nutritiva contribuye a mitigar el efecto del estrés en las plantas sometidas a déficit de Fe. Lo anterior se fundamenta en que, ante un déficit de Fe, las plantas cultivadas en presencia de bicarbonato muestran una menor actividad de la PEPC y concentración de ácido tartárico en raíces, asimilándose al control.

Las respuestas fisiológicas y bioquímicas del portainjerto 140 Ruggeri al déficit de Fe y la presencia de bicarbonato se asemejan a las reportadas para la especie *Parietaria diffusa*, declarada como calcícola. Lo anterior, indica que el genotipo de vid estudiado manifiesta características propias de una planta calcícola, sin embargo más investigaciones son necesarias para determinar con exactitud el rol del bicarbonato en el metabolismo del portainjerto.

BIBLIOGRAFÍA

Abadía, J. 1992, Nov. Leaf responses to Fe deficiency: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10):1699-1713.

Abadía, J.; A. López-Millán; A. Rombola; A. Abadía. 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil*, 241:75–86.

Abadía, J.; S. Vázquez; R. Rellán-Álvarez; H. El-Jendoubi; A. Abadía; A. Álvarez-Fernández et al. 2011, Jul. Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(5):471–482.

Alvarez-Fernandez, A.; P. Paniagua; J. Abadía; A. Abadía. 2003. Effects of Fe deficiency chlorosis on yield and fruit quality in peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19):5738– 5744.

Álvarez-Fernández, A.; J. Abadía and A. Abadía. 2006. Iron deficiency, fruit yield and fruit quality (pp. 85-101). En: Barton, L y J. Abadía (Eds.). Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms. Ed. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands. 466p.

Álvarez-Fernández, A.; J. Melgar; J. Abadía; A. Abadía. 2011. Effects of moderate and severe iron deficiency chlorosis on fruit yield, appearance and composition in pear (*Pyrus communis* L.) and peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Environmental and Experimental Botany*, 71: 280–286

Alcántara, E.; F. Romera; M. Cañete and M. De la Guardia. 2000, Nov. Effects of bicarbonate and iron supply on Fe(III) reducing capacity of roots and leaf chlorosis of the susceptible peach rootstock “Nemaguard”. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11-12):1607-1617.

Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts-Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24:1–15.

Bedri, A.; A. Wallace and W. Rhoads. 1960, May. Assimilation of bicarbonate by roots of different plant species. *Soil Science*, 89(5):257–263.

Bradford, M. 1976, May. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248–254.

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

Chaney, R.; J. Brown and L. Tiffin. 1972, Aug. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiology*, 50(2):208–213.

Chaney, R. 1984, Nov. Diagnostic practices to identify iron-deficiency in higher plants. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):47-67.

Chen, Y. and P. Barak. 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy*. 35: 217–240.

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

Covarrubias, J.I.; C. Retamales; A.D. Rombolà and C. Pastenes. 2014. Time course of physiological response mechanisms to iron deficiency in Cabernet Sauvignon grapevines grafted on two rootstocks. En: 17th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (ISINIP). Leibniz-Institute of Plant Genetics & Crop Plant Research - Gatersleben, Alemania. 6 - 10 julio 2014. Trabajo presentado como ponencia.

Covarrubias, J.I. and A. Rombolà. 2015. Organic acids metabolism in roots of grapevine rootstocks under severe iron deficiency. *Plant Soil*, 394(1-2):165-175.

Davies D. 1986. The fine control of cytosolic pH. *Physiologia Plantarum*, 67: 702–706.

Dell'Orto, M.; S. Santi; P. De Nisi; S. Cesco; Z. Varanini; G. Zocchi; R. Pinton. 2000. Development of Fe deficiency responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: involvement of plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Journal of Experimental Botany*, 51:695–701.

Donnini, S; A. Castagna; A. Ranieri and G. Zocchi. 2009, Jul. Differential responses in pear and quince genotypes induced by Fe deficiency and bicarbonate. *Journal of Plant Physiology*, 166(11):1181–1193.

Donnini, S.; P. De Nisi; D. Gabotti; L. Tato and G. Zocchi. 2012, Jun. Adaptive strategies of *Parietaria diffusa* (M.&K.) to calcareous habitat with limited iron availability. *Plant, Cell & Environment*, 35(6):1171–1184.

Ellsworth, J.; V. Jolley; D. Nuland and A. Blaylock. 1997, Nov. Screening for resistance to iron deficiency chlorosis in dry bean using reduction capacity. *Journal of Plant Nutrition*, 20:1489-1502.

Eynard, I. e G. Dalmasso. 1990. La scelta del portinnesto. En: *Viticultura moderna, manuale pratico*. 9va ed. Milan, Italia. Editorial Hoepli. pp. 261-289.

Foyer, C.; G. Noctor; M. Hodges. 2011. Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 62:1467–1482.

Gildersleeve, R. and W. Ocampo. 1989, Jul. Greenhouse evaluation of subterranean clover species for susceptibility to iron-deficiency chlorosis. *Crop Science*, 29(4):949-951.

Goldberg, D. and G. Ellis. 1974. Isocitrate dehydrogenase (pp. 183–189). En: Bergmeyer H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*. Segunda Edición. New York: Verlag Chemie/Academic Press. 2302p.

Jelali, N.; M. Wissal; M. Dell'orto; C. Abdelya; M. Gharsallia and G. Zocchi. 2010, May. Changes of metabolic responses to direct and induced Fe deficiency of two *Pisum sativum* cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 68(3):238–246.

Jiménez, S; Y. Gogorcena; C. Hévin; A. Rombolà and N. Ollat. 2007, Jan. 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. and M. Guerinot. 2007, May. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *Plant Transporters and Channels*, 581(12):2273–2280.

Kosegarten, H.; B. Hoffmann; E. Roco; F. Grolig; K. Glüsenkamp and K. Mengel. 2004, Sept. Apoplastic pH and FeIII reduction in young sunflower (*Helianthus annuus*) roots. *Physiologia Plantarum*, 122(1): 95–106.

Ksouri, R.; M. Gharsalli and M. Lachaal. 2005, Mar. Physiological responses of Tunisian grapevine varieties to bicarbonate induced iron deficiency. *Journal of Plant Physiology*, 162(3):335–341.

Ksouri, R.; S. M'rah; M. Gharsalli and M. Lachaâl. 2006, Feb. Biochemical responses to true and bicarbonate-induced iron deficiency in grapevine genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 29:305–315.

Lance, C. and P. Rustin. 1984. The central role of malate in plant metabolism. *Physiologie Vegetale*, 22: 625–641.

Landsberg, E. C. 1986. Function of rhizodermal transfer cells in the Fe stress response mechanism of *Capsicum annuum* L. *Plant Physiology*, 82: 511-517.

Landsberg E. 1996. Hormonal regulation of iron-stress response in sunflower roots: a morphological and cytological investigation. *Protoplasma*, 194:69–80.

- Larbi, A.; A. Abadía; J. Abadía; F. Morales. 2006. Down co-regulation of light absorption, photochemistry, and carboxylation in Fe - deficient plants growing in different environments. *Photosynthesis Research*, 89:113–26.
- Lerdau M. and P. Coley. 2002. Benefits of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Oikos*, 98:534–536.
- Lichtenthaler, H. and A. Wellbur. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extract in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 603:591-592.
- Lindsay, W. L. 1979. Chemical equilibria in soils. John Wiley & Sons, Inc., New York. p. 257.
- Lindsay, W. and A. Schwab. 1982, Nov. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *Journal of Plant Nutrition*, 5(4-7):821-840.
- López-Millán, A.; F. Morales; A. Andaluz; Y. Gogorcena; A. Abadía; J. de las Rivas et al. 2000a, Oct. Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiology*, 124(2), 885–898.
- López-Millán, A.; F. Morales; A. Abadía and J. Abadía. 2000b, Oct. Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiology*, 124(2):873–884.
- López-Millán, A.; F. Morales; Y. Gogorcena; A. Abadia and J. Abadia. 2009, Mar. Metabolic responses in iron deficient tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 166(4):375–384.
- Lucena, C.; F. Romera; C. Rojas; M. García; E. Alcántara and R. Pérez-Vicente. 2007, Nov. Bicarbonate blocks the expression of several genes involved in the physiological responses to Fe deficiency of Strategy I plants. *Functional Plant Biololy*, 34(11):1002–1009.
- Marschner, H. and V. Römheld. 1994, Jun. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil*, 165(2):261–74.
- Marschner, H. 1995. Functions of mineral nutrients: micronutrients. Iron. (cap. 9, pp.313-324). En: Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press. London, England. 889p.
- Mengel, K.; M. Breiningen and W. Bübl. 1984, Oct. Bicarbonate, the most important factor inducing iron chlorosis in vine grapes on calcareous soil. *Plant and Soil*, 81(3):333–344.

- Mengel, K.; R. Planker and B. Hoffmann. 1994, Jan. Relationship between leaf apoplast pH and iron chlorosis of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 17(6):1053-1065.
- Mengel, K.; E. Kirkby; H. Kosegarten and T. Appel. 2001. Iron. pp. 553-571. In: Principles of Plant Nutrition. 5th ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. 849pp.
- Morales F.; A. Abadía; J. Abadía. 1990. Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiology*, 94:607–613.
- Morrissey, J. and M. Guerinot. 2009, Oct. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical Review*, 109(10):4553–4567.
- M'sehli, W.; M. Dell'Orto; P. De Nisi; S. Donnini; C. Abdelly; G. Zocchi; M. Gharsalli. 2009. Responses of two ecotypes of *Medicago ciliaris* to direct and bicarbonate-induced iron deficiency conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31:667–673
- Neumann, G. 2006. Root exudates and organic composition of plant roots. pp. 317-318. In: Luster, J. and Finlay, R. (Eds). Handbook of methods used in rhizosphere research. Birmensdorf. Swiss Federal Research Institute WSL, Switzerland. 536p.
- Nikolic M. and R. Kastori. 2000. Effect of bicarbonate and Fe supply on Fe nutrition of grapevine. *Journal of Plant Nutrition*, 23(11–12):1619–1627.
- Nikolic, M.; V. Römheld; N. Merkt. 2000, Jan. Effect of bicarbonate on uptake and translocation of ⁵⁹Fe in two grapevine rootstocks differing in their resistance to Fe deficiency chlorosis. *Vitis*, 39(4):145–149.
- 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.
- Petrie, P.; M. Trought; G. Howell. 2000. Influence of leaf ageing, leaf area and crop load on photosynthesis, stomatal conductance and senescence of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *Vitis*, 39:31–36.
- Porro, D.; C. Dorigatti; M. Stefanini; A. Ceschini. 2001. Use of SPAD meter in diagnosis of nutritional status in apple and grapevine. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 564: 243–252.
- Rabotti, G. and G. Zocchi. 1994, Apr. Plasma membrane-bound H⁺-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiologia Plantarum*, 90(4):779–785.
- Razeto, B. 1984, Sept-Dic. Deficiencia de hierro en frutales. *Aconex*. 8:36-39.

Rombolà, A.D. 1998. Aspetti fisiologici e biochimici della nutrizione ferrica in actinidia (*A. deliciosa*). Tesis Doctoral. Bologna, Italia: Dipartimento di Colture Arboree, Università degli Studi di Bologna, Italy.

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

Rombolà, A.; Y. Gogorcena; A. Larbi; F. Morales; E. Baldi; B. Marangoni et al. 2005, Apr. Iron deficiency-induced changes in carbon fixation and leaf elemental composition of sugar beet (*Beta vulgaris*) plants. *Plant and Soil*, 271(1-2):39–45.

Rombolà A. and Tagliavini M. 2006. Iron nutrition of fruit tree crops. pp 61–83. In: Abadía J. and Barton L. (eds). Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. Springer, Netherlands. Dordrecht, Netherlands 466p.

Romera, F.; E. Alcántara; M. de la Guardia. 1992. Effects of bicarbonate, phosphate and high pH on the reducing capacity of Fe-deficient sunflower and cucumber plants. *Journal of Plant Nutrition*, 15:1519–1530.

Romera, F.; E. Alcántara and M. de la Guardia. 1997, Sept. Influence of bicarbonate and metal ions on the development of Fe(III) reducing capacity by Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Physiologia Plantarum*, 101(1):143-148.

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

Ruffner, H. 1982. Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review. *Vitis*, 2:247–259.

Schmidt W.; M. Bartels. 1996. Formation of root epidermal transfer cells in *Plantago*. *Plant Physiology*, 110: 217–225.

Schmidt, W. and M. Bartels. 1998, Sept. Orientation of NADH-linked ferric chelate (turbo) reductase in plasma membranes from roots of *Plantago lanceolata*. *Protoplasma*, 203(3-4):186–193.

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

Schmidt, W. 2006. Iron stress responses in roots of strategy I plants. pp. 229-250. In: J. Abadía and L. Barton. (eds.). Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms. Ed. Springer Netherlands. Dordrecht, Netherlands. 466p.

- Smith, F. 1974. Malate dehydrogenase (pp. 163–175). En: Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*. Segunda Edición. New York: Verlag Chemie/Academic Press. 2302p.
- Srere, P. 1967. Citrate synthase. pp. 3–11. In: Colowick, S.P. and N.O. Kaplan, (Eds). *Methods in enzymology*. Academic, New York.
- Steele, M.; A. Gitelson; D. Rundquist. 2008. A comparison of two techniques for non destructive measurement of chlorophyll content in grapevine leaves. *Agronomy Journal*, 100:779–782.
- Tagliavini, M.; D. Bassi; B. Marangoni. 1993. Growth and mineral nutrition of pear rootstocks in lime soils. *Scientia Horticulturae*, 54:13–22
- Tagliavini, M. and A. Rombolà. 2001, Oct. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *European Journal of Agronomy*, 15(2):71–92.
- Terry, N. and J. Abadia, 1986. Function of iron chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition*, 9:609-646.
- Tiffin, L. 1970, Mar. Translocation of iron citrate and phosphorus in xylem exudates of soybean. *Plant Physiology*, 45(3):280-283.
- Tyler, G. and L. Ström. 1995, Jan. Differing organic-acid exudation pattern explains calcifuge and acidifuge behavior of plants. *Annals of Botany*, 75(1):75–78.
- Vance, C.; S. Stade and C. Maxwell. 1983, Jan. Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. I: association with nitrogen fixation and incorporation into amino acids. *Plant Physiology*, 72(2):469–473.
- Waskom, R. 1996. A review of use of chlorophyll meters to assess crop N status in the Great Plains. Proceedings Great Plains Soil Fertility Conference. J. Havlin (ed.). Kansas State University, Manhattan, KS, EEUU. pp. 36 - 43.
- Wegner, L. and U. Zimmermann. 2004, Nov. Bicarbonate-induced alkalinization of the xylem sap in intact maize seedlings as measured in situ with a novel xylem pH probe. *Plant Physiology*, 136(3):3469-3477.
- Wei, L.; R. Loeppert and W. Ocumpaugh. 1997, Feb. Fe-deficiency stress response in Fe-deficiency resistant and susceptible subterranean clover: Importance of induced H⁺ release. *Journal of Experimental Botany*, 48(2):239-246.
- Zocchi, G. 2006. Metabolic changes in iron-stressed dicotyledonous plants. Chapter 18, pp.359–370. In: Barton, L.; J. Abadía (ed.). *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*. Dordrecht, Netherlands. 466p.

APÉNDICE

Apéndice I. Temperatura media y humedad relativa del invernadero durante el transcurso del experimento (13-01-2015/03-03-2015).

Días de tratamiento	Temperatura media	Humedad relativa	Días de tratamiento	Temperatura media	Humedad relativa
(día)	°C	%	(día)	°C	%
1	21,64	62,66	26	22,39	64,60
2	22,36	66,39	27	22,49	73,32
3	22,44	77,53	28	21,38	72,12
4	22,57	60,10	29	20,17	75,71
5	22,12	62,66	30	19,65	76,00
6	20,74	77,65	31	20,97	72,98
7	20,17	78,32	32	22,01	68,08
8	21,39	69,87	33	22,51	76,47
9	21,71	70,18	34	18,94	68,98
10	22,35	76,77	35	21,57	58,80
11	22,76	75,53	36	20,29	69,81
12	22,79	75,76	37	20,68	70,61
13	23,23	74,84	38	20,87	58,02
14	23,54	74,49	39	21,85	60,04
15	23,51	67,68	40	21,70	66,61
16	23,20	78,05	41	22,01	73,58
17	22,89	68,00	42	22,14	70,72
18	22,97	60,11	43	22,08	74,05
19	23,27	65,53	44	22,11	74,26
20	23,33	66,24	45	22,01	71,68
21	23,49	67,74	46	21,08	75,33
22	23,15	60,83	47	21,42	72,82
23	23,85	71,04	48	21,05	61,71
24	22,83	64,34	49	22,01	60,19
25	22,31	68,15	50	21,88	59,36