

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TITULO

**EVOLUCION DE MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE RESPUESTA AL DÉFICIT
DE FE EN DOS PORTAINJERTOS DE VID**

CRISTIAN ANDRES RETAMALES ARMIJO

SANTIAGO - CHILE
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TITULO

**EVOLUCION DE MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE RESPUESTA AL DÉFICIT
DE FE EN DOS PORTAINJERTOS DE VID**

**EVOLUTION OF PHYSIOLOGICAL RESPONSE MECHANISMS TO FE
DEFICIENCY IN TWO GRAPEVINE ROOTSTOCKS**

CRISTIAN ANDRES RETAMALES ARMIJO

SANTIAGO - CHILE

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EVOLUCION DE MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE RESPUESTA AL DÉFICIT
DE FE EN DOS PORTAINJERTOS DE VID**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo

CRISTIAN ANDRES RETAMALES ARMIJO

PROFESOR GUIA	CALIFICACIONES
Sr. Jose Ignacio Covarrubias Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	6,8
PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Claudio Pastenes Villareal Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	7,0
Sr. Danilo Aros Orellana Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	7,0

SANTIAGO - CHILE

2015

AGRADECIMIENTOS

Es difícil mencionar a todas las personas que han estado en este largo proceso, sin embargo hay algunos que por su apoyo incondicional fueron de lo más importante.

Quiero agradecer a mi profesor guía, José Ignacio Covarrubias, por su apoyo, pilar fundamental en el desarrollo de este estudio. Con sus consejos, experiencia y ayuda no solo en el ámbito académico, logre finalizar mis estudios de la mejor manera posible. Simplemente gracias profe.

Agradezco a mis padres, Jorge y Liliana, por ser un pilar fundamental en todo este proceso, apoyándome siempre en cada paso y decisión tomada. Si mi memoria no falla, siempre me preguntaron que quería ser y siempre dije “Agronomo”. Sin ustedes jamás hubiese podido conseguir esto. Gracias por todo, los amo.

A mis hermanas Paola y Carolina, por su ayuda y comprensión en todo este proceso sin duda siempre que necesite un consejo estuvieron ahí para darlo.

A Cristina Riquelme, “Tía Cristina”, por todos estos años, en los cuales siempre estuvo para aconsejarme y ayudarme. Siempre tendré presente todo lo que ud. hizo por mí. De verdad gracias.

Como último, quiero dar las gracias a las dos personas más importantes en mi vida, a mi hijo Javier, que siempre fue la gran motivación para lograr el objetivo. Su energía, ganas de vivir y sonrisa eran mi mayor inspiración en los momentos más difíciles, el motor de mi mundo, la fuerza necesaria para todo, Te amo hijo. Y para ti, amor mío, Natalia, mi amiga, polola, pareja, amante, consejera, la mejor madre, la más linda. Tu mejor que nadie sabe todo lo que tuve que vivir y pasar para lograr esto, haz sido siempre mi gran pilar, siempre con una palabra de aliento y apoyo incondicional. Sin duda te amo y agradezco infinitamente poder compartir toda la vida contigo. Gracias por todo amor. Y gracias por ayudarme a coser las plantas para el herbario (año 2009).

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
INDICE.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCION.....	9
MATERIALES Y METODOS.....	13
Lugar de estudio.....	13
Material Vegetal y condiciones del experimento.....	13
Tratamientos y diseño experimental.....	14
Evaluaciones.....	14
Crecimiento del brote principal.....	14
Biomasa fresca y Seca.....	14
Intensidad de verde de las hojas.....	15
Actividad enzimática.....	15
Concentración de ácidos orgánicos en las raíces.....	16
Análisis estadístico.....	16
RESULTADOS.....	17
Longitud de brote principal.....	17
Biomasa de las plantas.....	18
Valor SPAD en las hojas.....	19
Fotosíntesis neta y conductancia estomática.....	20
pH de la solución Nutritiva.....	21
Actividad Enzimática.....	22
Concentración de ácidos orgánicos en raíces.....	24
DISCUSION.....	26
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	30

RESUMEN

En Chile existe una extensa área agrícola, comprendida entre las regiones de Coquimbo y O'Higgins, caracterizada por la presencia de suelos con pH neutro a alcalino ($>7,0$) y una elevada concentración de carbonatos de calcio y cal activa (10%), en los cuales la carencia de hierro (Fe) representa una de las principales deficiencias nutricionales que afectan a los viñedos injertados. Actualmente, se utilizan distintas estrategias de manejo para hacer frente a tal carencia, tales como el uso de enmiendas acidificantes o aplicaciones de quelatos de Fe al suelo, las cuales están siendo fuertemente cuestionadas debido al elevado costo y los riesgos ambientales asociados a ellas. En tal contexto, el uso de portainjertos de vid tolerantes al déficit de Fe podría representar una estrategia eficaz y sostenible para el control y/o prevención de la clorosis férrica. El objetivo del presente trabajo fue determinar la evolución de respuestas fisiológicas al déficit de Fe en vides cv. Cabernet Sauvignon injertadas sobre los portainjertos 110 Richter (moderadamente tolerante al déficit de Fe) y 3309-C (susceptible al déficit de Fe). El experimento fue establecido en un sistema hidropónico, en el cual las plantas fueron sometidas a una solución nutritiva $\frac{1}{2}$ Hoagland continuamente aireada con $0 \mu\text{M}$ o $50 \mu\text{M}$ de Fe-EDTA, por 18 y 32 días. Los resultados de la investigación indicaron que, durante el primer período del experimento (18 días de tratamiento), el déficit de Fe redujo la fotosíntesis neta foliar en las vides injertadas sobre ambos portainjertos, sin alterar el contenido de clorofila en ellas. Además, el déficit de Fe incrementó la actividad de las enzimas PEPC y NADP⁺-IDH y la concentración de ácido málico y ácidos orgánicos totales en los extractos de raíces de ambos portainjertos. Por otra parte, durante tal período no se registraron diferencias relativas al nivel de Fe en el crecimiento del brote principal y la biomasa de las plantas. Luego de la exposición de las plantas a una carencia de Fe prolongada (32 días), las plantas injertadas sobre 110 Richter respondieron al déficit de Fe mediante una reducción en el largo del brote principal, mientras tal reducción no fue observada en las vides injertadas sobre 3309-C. Adicionalmente, a los 32 días del experimento el déficit de Fe redujo la fotosíntesis neta y el contenido de clorofila en las plantas injertadas sobre 3309-C, sin modificar tales parámetros en las plantas injertadas sobre 110 Richter. En conclusión, los resultados obtenidos revelaron diferencias significativas entre las combinaciones de variedad/portainjerto sometidas a experimentación, en la severidad e intensidad de los síntomas de déficit de Fe y sus respuestas fisiológicas ante tal carencia nutricional.

PALABRAS CLAVES: clorosis férrica, fotosíntesis neta, ácidos orgánicos, actividad enzimática, portainjertos de vid.

ABSTRACT

In Chile, there is an extended area between Coquimbo and O'Higgins regions, characterized by the presence of alkaline soils ($\text{pH} > 7,0$) and high concentrations of active lime (10%), in which iron (Fe) deficiency is one of the main nutritional deficiencies in grafted vineyards. Currently, the most widespread management techniques to face Fe deficiency, are the use of acidifying amendments or the application of Fe-chelates to the soil, which are being strongly questioned due to the and high costs and environmental risks associated to such techniques. In such context, the use of Fe deficiency tolerant rootstocks may be an effective and sustainable strategy to prevent Fe chlorosis. The present work aimed to compare the physiological responses to Fe deficiency in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grafted on two *Vitis* rootstocks with different Fe chlorosis susceptibility: 110 Richter (moderately tolerant) and 3309-C (susceptible). Plants were grown in hydroponic solutions with 50 μM of Fe-EDTA or without Fe. Our data showed that, in a first step (18 days after treatment, DAT), Fe deficiency reduced net photosynthesis in leaves from both variety/rootstock combinations, without modifying leaf chlorophyll concentration. Moreover, Fe deficiency increased the activity of PEPC and NADP^+ -IDH enzymes and the concentration of malic and total organic acids in roots of both rootstocks. During such period, no differences related to Fe level were recorded in the main shoot length and biomass. After a longer exposure to Fe deficiency (32 DAT), the activity of PEPC and organic acid-linked enzymes in roots of both genotypes remained unaltered. However, at 32 DAT, plants grafted on 110 Richter reacted to Fe deficiency by reducing the main shoot length and biomass, whereas such reduction was not observed in plants grafted on 3309-C. In addition, at 32 DAT Fe deficiency reduced the net photosynthesis as well as the chlorophyll concentration in plants grafted on 3309-C, without modifying these parameters in 110 Richter plants. In conclusion, our results revealed significant differences between the two variety/rootstock combinations in severity of Fe deficiency symptoms and physiological responses.

KEYWORDS: Iron chlorosis symptoms, net photosynthesis, organic acids, enzyme activity, grapevine genotypes

INTRODUCCIÓN

En Chile existe una extensa área agrícola, comprendida entre las regiones de Coquimbo y O'Higgins, caracterizada por la presencia de suelos con pH neutro a alcalino ($>7,0$) y una elevada concentración de carbonatos de calcio y cal activa (10%), en los cuales el déficit de Fe representa una de las principales carencias nutricionales en las plantas. Tal problemática afecta significativamente a viñas y huertos frutales, provocando una disminución importante en la vida útil de las plantas y reducciones en la producción y calidad de la fruta (Álvarez-Fernández *et al.*, 2003; Rombolà y Tagliavini, 2006). El Fe es uno de los elementos más estudiados en nutrición mineral, principalmente porque es componente estructural de un importante número de enzimas (oxidasas, catalasas, peroxidadas deshidrogenasas etc.) y participa en reacciones de transformaciones de energía y transferencias de electrones (Marschner *et al.*, 1986; Terry y Zaved, 1995; Menguel y Kirkby, 2001). Una de sus funciones principales, es ser catalizador de enzimas involucradas en la síntesis de la molécula de clorofila y en el sistema redox del proceso fotosintético en los cloroplastos (Marschner, 1995). El déficit de Fe, cuyo síntoma se denomina "clorosis férrica", se manifiesta en la planta mediante un color amarillo en la lámina de las hojas, principalmente nuevas, sin considerar las venas, las cuales mantienen su color verde (Abadía *et al.*, 2002). Cuando la carencia de hierro es severa, ésta puede provocar defoliación, desecamiento de ramillas e incluso la muerte de la planta (Rombolà y Tagliavini, 2006).

Estudios científicos han reportado la existencia de distintas estrategias de absorción de Fe, dependiendo del tipo de planta. Las plantas dicotiledóneas (ej. las especies frutales) desarrollan la Estrategia I de absorción del Fe y, consecuentemente, lo absorben desde el suelo en la forma de Fe^{+2} (estado químico bivalente) (Marschner, 1995). En tal contexto, la disponibilidad del elemento podría disminuir ante condiciones físico-químicas del suelo tales como la presencia de carbonatos de calcio y bicarbonatos, por sus efectos en el incremento del pH, el cual favorece la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} , y esta última forma no puede ser absorbida por las plantas de Estrategia I. Además, por cada unidad de incremento en el pH del suelo, el Fe se torna 1000 veces menos soluble (Kim y Guerinot, 2007). Por otra parte, las plantas monocotiledóneas ejecutan la Estrategia II de absorción, la cual se basa en la exudación de compuestos quelantes llamados fitosideróforos, los que incrementan la solubilidad del Fe formando un complejo Fe^{+3} -fitosideróforo, el cual facilita el transporte de este elemento mineral hacia la membrana celular de las raíces.

El grado de susceptibilidad de las plantas a la clorosis férrica es altamente variable para las distintas especies y variedades. Dentro de las especies frutales más susceptibles a la carencia de Fe, se encuentran el membrillero, peral, duraznero, ciruelo, damasco, limonero, palto y arándano (Razeto, 2009). El manzano, la vid, almendro, naranjo, nogal y el cerezo son relativamente tolerantes a la carencia de Fe (Korčák, 1987). Una de las formas de prevenir la clorosis férrica en las plantas es mediante la fertilización con quelatos de Fe, la cual representa una práctica ampliamente difundida. Sin embargo, los quelatos poseen un

elevado valor (costo), y solo cultivos altamente rentables pueden financiar los tratamientos. Adicionalmente, los tratamientos con quelatos de Fe requieren repetidas aplicaciones y, debido a su elevada estabilidad y solubilidad en los suelos, incrementan los riesgos de lixiviación y contaminación de napas freáticas (Abadía *et al.*, 2004; Rombolà y Tagliavini, 2006). Otra labor ampliamente realizada es la aplicación de enmiendas acidificantes (ej. ácido sulfúrico) para disminuir el pH del suelo, sin embargo, éstas conllevan altos riesgos de contaminación, y su manipulación podría ser peligrosa para el operario (Retamales y Hancock, 2012).

Actualmente, los costos de producción y las tendencias mundiales conducentes al establecimiento de sistemas productivos que garanticen la protección del medio ambiente, evidencian la necesidad de desarrollar alternativas sustentables para el control de la clorosis férrica. En tal contexto, la prevención de la carencia de Fe mediante el uso de portainjertos tolerantes, podría representar una alternativa económica, eficiente y eficaz para el manejo del déficit de Fe.

La vid es la especie frutal con mayor superficie de cultivo en el territorio nacional (190.589 ha, ODEPA, 2013). Tal especie, se caracteriza por un nivel de susceptibilidad a la clorosis férrica altamente variable en función del genotipo (Tagliavini y Rombolà, 2001). Experiencias adquiridas por diversos autores, han reportado que la especie *Vitis vinífera* se caracteriza por ser altamente tolerante al déficit de Fe, mientras que las especies de *Vitis* americana presentan un nivel variable de susceptibilidad. Entre las especies de *Vitis* americanas, *Vitis riparia* ha sido reportada como altamente susceptible a la carencia de Fe, mientras *Vitis berlandieri* se caracteriza por ser tolerante, y *Vitis rupestris* es ligeramente susceptible (Tagliavini y Rombolà, 2001). Tales antecedentes, destacan la importancia de conocer el comportamiento de los portainjertos de vid relativo al grado de tolerancia al déficit de Fe, ya que en los últimos años el establecimiento de parronales y viñas sobre portainjertos híbridos de *Vitis* americanas ha mostrado un importante incremento en zonas proclives a la inducción de tal deficiencia nutricional.

Estudios científicos sobre mecanismos fisiológicos de respuesta al déficit de Fe reportados en portainjertos de vid provenientes de *Vitis vinífera* y *Vitis berlandieri*, evidencian una mayor capacidad respecto de otros portainjertos de vid para reducir el Fe a nivel radicular mediante el incremento en la actividad de la enzima intermembrana hierro quelato reductasa (FCR) y de reducir el pH en la rizósfera liberando protones mediante el incremento en la actividad de la enzima intermembrana ATPasa (Brancadoro *et al.*, 1995; Dell'Orto *et al.*, 2000; Ksouri *et al.*, 2005; Rombolà y Tagliavini, 2006; Jiménez *et al.*, 2007; Covarrubias y Rombolà, 2013; Covarrubias y Rombolà 2015). Adicionalmente, en diversas especies modelo se ha demostrado que los genotipos tolerantes responden al déficit de Fe mediante el incremento en la concentración de ácidos orgánicos en raíces y en el líquido xilemático (particularmente ácido cítrico y ácido málico) e incrementan la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en raíces (Ollat *et al.*, 2003; Rombolà y Tagliavini, 2006; Jiménez *et al.*, 2007; Covarrubias y Rombolà, 2013; Covarrubias y Rombolà 2015). La enzima PEPC, cataliza la conversión del fosfoenolpiruvato a ácido málico en el citoplasma, el cual es un precursor de síntesis de los ácidos tri-carboxílicos que

participan en el ciclo de Krebs al interior de la mitocondria (Landsberg, 1986; Miller *et al.*, 1990). Lo anterior, se debe principalmente al rol de los ácidos orgánicos y las enzimas involucradas en su síntesis, en diversos procesos de la absorción y transporte del Fe al interior de la planta, por lo tanto, tales parámetros han sido utilizados como marcadores bioquímicos para la identificación de genotipos tolerantes a la clorosis férrica (Rombolà y Tagliavini, 2006). Recientemente, Covarrubias y Rombolà (2013) reportaron que el déficit de Fe 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 carencia 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).

En un estudio anterior, se realizó un ensayo con cuatro genotipos de vid en donde se encontró una correlación directa entre el nivel de susceptibilidad de los genotipos al déficit de Fe, el aumento de la acidificación de la rizósfera y la actividad de Fe-reductasa. A su vez, en plantas que son conocidas como susceptibles a la deficiencia de Fe, como *Vitis riparia*, se registró una menor concentración de ácidos orgánicos en extractos de raíz y una menor capacidad para pH en la rizósfera (Brancadoro *et al.*, 1995). Por otra parte, Ksouri *et al.* 2005, estudiaron la deficiencia de Fe directa o inducida por bicarbonato, comparando los genotipos de vid Khamri (tolerante), Balta4 (sensible) y el portainjerto tolerante al déficit de Fe 140 Ruggeri. En tal investigación, los autores reportaron que las plantas de vid (140Ru y Khamri), sometidas a deficiencia directa de Fe presentaron una menor clorosis en hojas y un mayor contenido de clorofila comparado con el genotipo Balta4. Por otra parte, las plantas sometidas a la carencia de Fe inducida por la presencia de bicarbonatos, presentaron efectos similares y más pronunciados en Balta4, mostrando una clorosis intervenal mayor y un menor contenido de clorofila y sin una capacidad acidificante relevante del medio. En cambio ambos genotipos tolerantes mostraron una mayor capacidad acidificante del medio.

Tales evidencias destacan la relevancia de conducir experimentos sobre portainjertos de vid focalizados en el estudio de mecanismos de respuesta al déficit de Fe. Tal información, permitiría identificar *a priori* el nivel de tolerancia y los mecanismos fisiológicos involucrados en la respuesta de los portainjertos de vid a la carencia de Fe, y podría ser utilizada para seleccionar portainjertos que controlen en modo eficiente y sustentable la carencia de Fe en parronales y viñas.

Hipótesis

Plantas de vid Cabernet Sauvignon injertadas sobre portainjertos tolerantes al déficit de Fe tienen una mayor capacidad de reaccionar al déficit de Fe mediante mecanismos fisiológicos de respuesta a nivel radicular y foliar.

Objetivo general

Comparar mecanismos fisiológicos de respuesta a la carencia de Fe en vides Cabernet Sauvignon injertadas sobre dos portainjertos con distinto nivel de tolerancia a la clorosis férrica: el 110 Richter (moderadamente tolerante) y el 3309-C (susceptible).

Objetivos específicos

Determinar el efecto de la carencia de Fe en la concentración de ácidos orgánicos en raíces de las vides Cabernet Sauvignon injertadas sobre dos portainjertos.

Determinar la capacidad de los portainjertos de reducir el pH de la solución nutritiva ante un déficit de Fe.

Determinar la actividad radical de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), citrato sintasa (CS), malato deshidrogenasa (MDH), isocitrato deshidrogenasa (NADP-IDH) en los portainjertos sometidos a un déficit de Fe.

Determinar el efecto de la carencia de Fe en la concentración de clorofila y fotosíntesis neta en vides Cabernet Sauvignon injertadas sobre dos portainjertos.

Evaluar el efecto del déficit de Fe en el crecimiento y producción de biomasa de las vides Cabernet Sauvignon injertadas sobre dos portainjertos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El experimento se realizó en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en Av. Santa Rosa 11315, comuna de La Pintana. Su localización geográfica es de 32° 40' latitud sur y 70° 32' longitud oeste y su altitud es de 625 m.s.n.m. El experimento se estableció en un invernadero climatizado perteneciente a la Facultad. 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 de Agroindustria y Enología.

Material Vegetal y condiciones del experimento

Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron plantas de vid propagadas a través de estacas enraizadas de la variedad Cabernet Sauvignon injertadas sobre los genotipos 3309-C, híbrido proveniente de *Vitis riparia* y *Vitis rupestris*, y 110 Richter, híbrido proveniente de *Vitis berlandieri* y *Vitis rupestris*. Sucesivamente, las plantas fueron llevadas a un invernadero con temperatura controlada y establecidas en 8 contenedores plásticos de 10 litros (5 plantas por cada contenedor). Los contenedores fueron cubiertos con papel aluminio, y rellenos con una solución nutritiva ½ Hoagland, continuamente aireada mediante bombas de acuario. La temperatura del invernadero, fue de 25-30°C con 70-75% de humedad relativa.

Tratamientos y diseño experimental

Previo al inicio del experimento, las plantas fueron homogenizadas dejando un brote principal por planta desprovisto de feminelas. Sucesivamente, las vides fueron sometidas a dos concentraciones de Fe-EDTA (0 y 50 μM). La composición de la solución nutritiva fue de: 2,5 mM KNO_3 ; 1 mM MgSO_4 ; 1 mM KH_2PO_4 ; 2,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 4,6 μM MnCl_2 ; 23,2 μM H_3BO_3 ; 0,06 μM Na_2MoO_4 ; 0,4 μM ZnSO_4 ; 0,19 μM CuSO_4 . La solución nutritiva fue renovada dos veces por semana y el pH fue ajustado a 5,5 después de cada renovación de la solución. El pH de la solución nutritiva fue monitoreado todos los días a las 9:00 am mediante un medidor de pH portátil (CP-401 pH meter, Elmetrón Co., Polonia). A los 18 y 32 días del experimento, 5 plantas de cada tratamiento (un contenedor por tratamiento) fueron seccionadas en raíces, tallo principal y hojas. Adicionalmente se procedió a coleccionar muestras de hojas y raíces, las que fueron congeladas en nitrógeno líquido y luego almacenadas a -80°C para los posteriores análisis.

Evaluaciones

Crecimiento del brote principal

El crecimiento de las plantas se midió dos veces por semana mediante una cinta métrica, desde el inicio del tallo hasta el ápice del brote.

Biomasa fresca y Seca

A los 18 y 32 días del experimento, se determinó el peso fresco de las hojas, tallos y raíces en 5 plantas por tratamiento. Posteriormente, los órganos de las plantas fueron dispuestos en una estufa de secado por 72 horas, y se les determinó la biomasa seca mediante una balanza.

Intensidad de verde de las hojas

La intensidad de verde de las hojas, la cual se asocia al contenido de clorofila de estas, se determinó periódicamente (2 veces por semana) en la primera hoja completamente expandida en cinco áreas mediante un medidor de clorofila portátil (MINOLTA SPAD 502, Osaka, Japón).

Actividad enzimática

A los 18 y 32 días, se colectaron muestras apicales de raíces (20-30 mm de largo) de cada planta, las cuales fueron lavadas en agua desionizada, pesadas y congeladas en nitrógeno líquido (-180 °C). Luego las muestras se almacenaron en un congelador de ultra baja temperatura (-80 °C) para el posterior análisis de actividad de las enzimas. En los extractos de tales raíces se determinó la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), citrato sintasa (CS), e isocitrato deshidrogenasa (NADP⁺-IDH). La extracción de las enzimas se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Jiménez et al. (2007).

El extracto de enzimas se obtuvo moliendo 0,1 g 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 adicionó 1 ml del buffer de extracción que contenía 400 mM de Tricina (pH 7.6); 5 mM MgSO₄; 0,25 mM EDTA; 10% (v/v) glicerol; 0,5% (p/v) BSA; 5 mM NaHCO₃, 2 mM PMSF, 10 mM ascorbato de sodio y 1% (v/v) Triton. Los extractos se centrifugaron a 15.000 rpm mediante una 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 y posteriormente fueron utilizados para las lecturas de actividad enzimática.

La actividad de las enzimas se determinó a través del acoplamiento de reacciones redox, mediante un Espectrofotómetro UV (Jasco V-630, Japón). La actividad de la enzima PEPC se determinó mediante el acople de su actividad al de la enzima MDH, cuya reacción de oxidación es catalizada por NADH. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 340 nm. (Vance *et al.* 1983). La actividad de la enzima MDH se determinó mediante el registro del aumento en la absorbancia a 340 nm, debido a la reducción enzimática de NAD⁺ (Smith, 1974). La actividad de la enzima CS se midió mediante la reducción de Acetil CoA a CoA con DTNB a 412 nm (Srere, 1967). La actividad de NADP⁺-IDH se determinó según el protocolo publicado por Goldberg y Ellis (1974), mediante la reducción de NADP⁺ a 340 nm.

Concentración de ácidos orgánicos en las raíces

Las concentraciones de ácidos orgánicos fueron determinadas según el protocolo de Neumann (2006). Las muestras congeladas de ápices radiculares colectadas al término del experimento, fueron introducidas 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 18 RP de 250 x 4 mm (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.

Análisis estadístico

Los resultados del experimento fueron analizados de acuerdo a un diseño experimental completamente aleatorizado con estructura factorial, con dos factores (Fe y combinación variedad/genotipo) y con dos niveles cada factor: +Fe y -Fe, y las combinaciones Cabernet Sauvignon/110 Richter y Cabernet Sauvignon/3309-C. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza two-way, y en caso de encontrar interacciones significativas entre los factores, la comparación estadística se realizó entre los 4 tratamientos posibles (2 niveles de Fe x 2 niveles de combinación variedad/portainjerto). En estos casos, se procedió a calcular el error estándar de la media de la interacción (SEM), y los tratamientos fueron considerados como significativamente diferentes cuando la diferencia entre ellos fue mayor a dos veces el SEM. A su vez, cuando no se encontraron interacciones significativas entre factores, la comparación estadística se realizó entre los niveles de cada factor en forma independiente para cada factor mediante la prueba de rango múltiple de Tukey ($P \leq 0.05$). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SAS (SAS Institute, Cary).

RESULTADOS

Longitud de brote principal

Durante el experimento, el nivel de Fe en la solución nutritiva y el portainjerto influenciaron el crecimiento del brote principal de las vides (Figura 1). Hasta los 18 días del ensayo, se registraron diferencias significativas atribuibles al portainjerto, en donde las plantas injertadas sobre el genotipo 3309-C presentaron un mayor largo del brote principal en comparación con las plantas injertadas sobre 110 Richter, independientemente del nivel de Fe. Al final del experimento (32 días desde la imposición de los tratamientos), los datos obtenidos arrojaron una interacción entre los factores, en la cual, el déficit de Fe redujo la tasa de crecimiento del brote en las plantas injertadas sobre el portainjerto 110 Richter, mientras que en aquellas injertadas sobre 3309-C no se observaron diferencias atribuibles al nivel de Fe en la solución nutritiva.

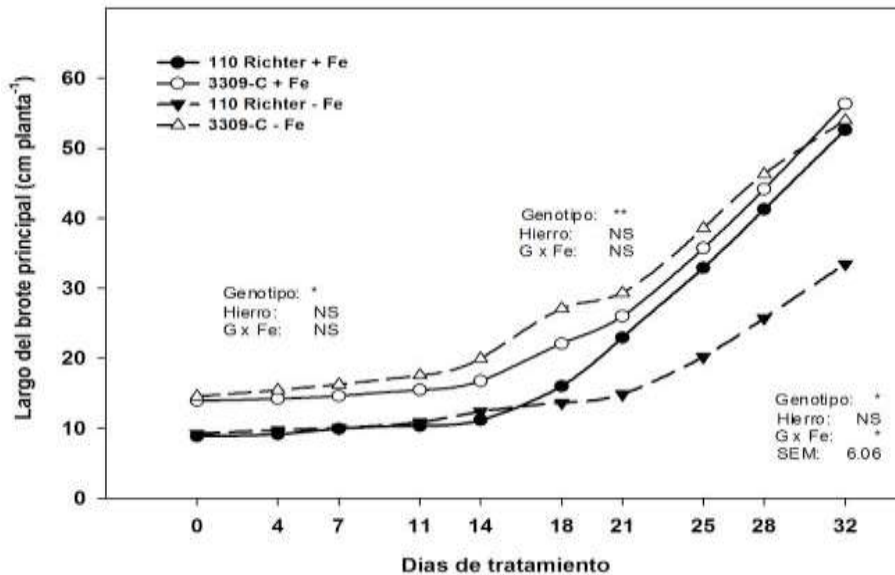


Figura 1. Longitud de brote principal (cm) determinada durante el experimento en las plantas injertadas sobre 110 Richter y 3309-C, sometidas a 0 y 50 μM de Fe-EDTA. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de rango múltiple de Tukey. Símbolos y abreviaciones: NS, *, ** = no significativa y significativa para $p \leq 0,05$ y $p \leq 0,01$, respectivamente. SEM = Error estándar de la interacción de las medias. Los tratamientos se consideran significativamente diferentes cuando las diferencias entre los valores es superior dos veces a SEM.

Biomasa de las plantas

En el Cuadro 1 se presenta la producción de biomasa fresca de las raíces, tallo principal y hojas, determinada a los 18 y 32 días del experimento. A los 18 días, los resultados evidenciaron diferencias significativas en el peso del tallo principal y las hojas atribuibles al portainjerto, en la cual, las plantas injertadas sobre el genotipo 3309-C alcanzaron un mayor peso fresco en tales órganos en comparación con aquellas injertadas sobre 110 Richter. Sin embargo, a los 32 días del experimento, el déficit de Fe redujo la biomasa fresca de las hojas para ambas combinaciones variedad/portainjerto (Cuadro 1). En tal fecha, no se evidenciaron diferencias significativas atribuibles al portainjerto.

Cuadro 1. Biomasa fresca de diferentes órganos de las plantas (g MS planta⁻¹) determinada durante el experimento en las plantas injertadas sobre los genotipos de vid 110 Richter y 3309-C, sometidos a 0 y 50 µM de Fe-EDTA.

Genotipo (G)	Hierro (Fe)	Raíces		Tallo Principal		Hojas	
		18d	32d	18d	32d	18d	32d
g planta ⁻¹							
110 Richter	+Fe	7,2±2,2	16,1±3,2	1,1±0,3	7,5±1,4	2,0±0,4	8,2±1,0
110 Richter	- Fe	12,2±1,3	10,5±2,7	1,8±0,3	4,3±1,1	3,1±0,2	5,1±1,0
3309 C	+Fe	11,6±0,8	10,9±1,4	2,6±0,6	7,4±1,1	4,8±0,7	9,1±0,6
3309 C	- Fe	12,2±2,7	11,6±2,2	3,0±0,8	7,7±1,2	4,0±0,7	7,7±0,8
<i>Estadística</i>							
Factor G		NS	NS	*	NS	**	NS
Factor Fe		NS	NS	NS	NS	NS	*
Interacción		NS	NS	NS	NS	NS	NS
G x Fe							

^a Símbolos y abreviaciones: NS, *, ** = no significativa y significativa para p≤0,05 y p≤0,01, respectivamente.

Respecto del peso seco de los órganos de las vides, a 18 días del experimento los resultados evidenciaron un efecto del portainjerto sobre en el peso del tallo principal y las hojas. Durante tal período, las plantas injertadas sobre el genotipo 3309-C alcanzaron un mayor peso seco del tallo y las hojas respecto de aquellas injertadas sobre 110 Richter (Cuadro 2). A su vez los datos arrojaron una interacción entre los factores en el peso seco de las raíces, en la cual el déficit de Fe incrementó la biomasa en las raíces del portainjerto 110 Richter, mientras que en el genotipo 3309-C se registró un comportamiento contrario (Cuadro 2). Sucesivamente, a los 32 días del experimento, el déficit de Fe redujo la biomasa seca de las hojas, independientemente del portainjerto (Cuadro 2).

Cuadro 2. Biomasa seca de diferentes órganos de las plantas (g MS planta⁻¹) determinada durante el experimento en las plantas injertadas sobre los genotipos de vid 110 Richter y 3309-C, sometidos a 0 y 50 µM de Fe-EDTA.

Genotipo (G)	Hierro (Fe)	Raíces		Tallo principal		Hojas	
		18d	32d	18d	32d	18d	32d
				g planta ⁻¹			
110 Richter	+Fe	1,4±0,4	3,1±0,7	0,12±0,03	1,5±0,4	0,38±0,07	1,8±0,3
110 Richter	- Fe	2,6±0,4	1,7±0,5	0,32±0,06	0,8±0,2	0,74±0,09	1,1±0,2
3309 C	+Fe	2,3±0,2	1,8±0,3	0,54±0,20	1,4±0,3	1,11±0,28	2,0±0,2
3309 C	- Fe	1,7±0,2	2,3±0,2	0,64±0,22	1,4±0,3	0,94±0,19	1,7±0,2

Estadística

Factor G	NS	NS	*	NS	*	NS
Factor Fe	NS	NS	NS	NS	NS	*
Interacción G x Fe	*	NS	NS	NS	NS	NS
SEM ^b	0,31					

^a Símbolos y abreviaciones: NS, * = no significativa y significativa para $p \leq 0,05$. SEM = Error estándar de las medias. En caso de interacción, los tratamientos se consideran significativamente diferentes cuando las diferencias entre los valores es superior dos veces al SEM.

Valor SPAD en las hojas

Durante los primeros 18 días del experimento no se registró un efecto del nivel de Fe y el portainjerto en el valor SPAD de las hojas de las vides (Figura 2). Sin embargo, desde tal período se observa una disminución en el valor SPAD en las plantas injertadas sobre el portainjerto 3309-C sometidas a déficit de Fe respecto del control, la cual se muestra con claridad al término del experimento (32 días). Por otra parte, las vides injertadas sobre 110 Richter no modificaron su intensidad de color verde en las hojas como respuesta a la depleción de Fe en la solución nutritiva.

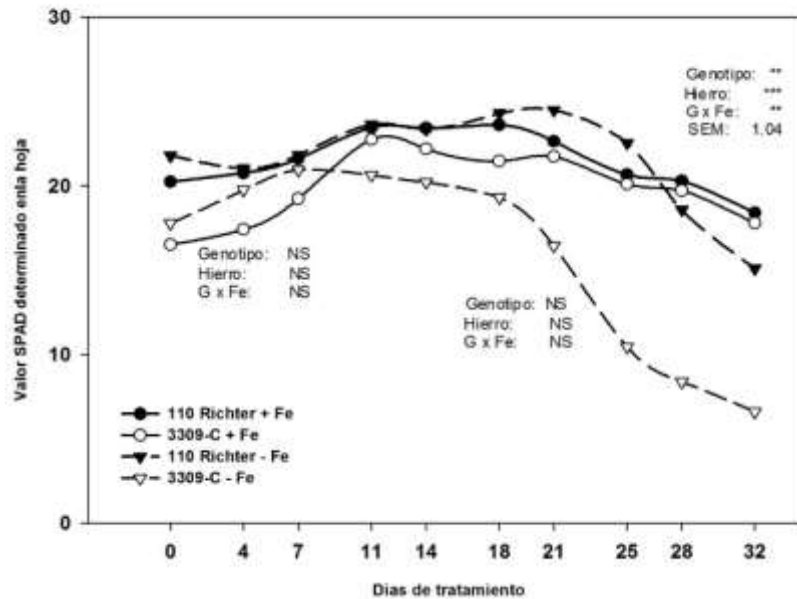


Figura 2. Valor SPAD registrados durante el experimento en las plantas injertadas sobre los genotipos de vid 110 Richter y 3309-C, sometidos a 0 y 50 μ M de Fe-EDTA. Símbolos y abreviaciones: NS, **, *** = no significativa y significativa para $p \leq 0,01$ y $p \leq 0.0001$, respectivamente. SEM = Error estándar de las medias.

Fotosíntesis neta y conductancia estomática

En el Cuadro 3, se presenta la fotosíntesis neta y conductancia estomática registradas a los 18 y 32 días del experimento en la primera hoja completamente expandida de cada planta. A los 18 días, la ausencia de Fe en la solución nutritiva indujo una merma en la fotosíntesis neta de las hojas de ambas combinaciones de variedad/portainjerto (Cuadro 3). Sin embargo, a los 32 días del experimento se observó un comportamiento diferencial entre las combinaciones variedad/portainjerto ante el déficit de Fe, en el cual el déficit de Fe redujo la fotosíntesis neta en las plantas injertadas sobre 3309-C, mientras las plantas injertadas sobre el genotipo 110 Richter no mostraron variaciones en función del nivel de Fe. Por otra parte, la conductancia estomática no presentó diferencias significativas entre los tratamientos para ambas fechas de medición (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fotosíntesis neta, A_n ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y conductancia estomática, g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), en la primera hoja madura del brote principal, determinada durante el experimento en las plantas injertadas sobre los genotipos de vid 110 Richter y 3309-C, sometidos a 0 y 50 μM de Fe-EDTA.

Genotipo (G)	Hierro (Fe)	Datos registrados en 18 días		Datos registrados en 32 días	
		A_n	g_s	A_n	g_s
110 Richter	+Fe	3,5±0,04	0,08±0,009	1,6±0,1	0,07±0,009
110 Richter	- Fe	2,6±0,04	0,07±0,006	1,8±0,3	0,11±0,025
3309 C	+Fe	3,6±0,03	0,07±0,004	1,9±0,2	0,08±0,012
3309 C	- Fe	2,4±0,05	0,06±0,004	0,9±0,2	0,06±0,009

Estadística

Factor G	NS	NS	NS
Factor Fe	*	NS	NS
G x Fe interacción	NS	NS	*
SEM ^b	0,18		

Abreviación y símbolos: NS, * = no significativa y significativa para $p \leq 0,05$, respectivamente.

^b SEM = Error estándar de las medias. En caso de interacción, los tratamientos se consideran significativamente diferentes cuando las diferencias entre los valores es superior dos veces al SEM.

pH de la solución nutritiva

Durante el transcurso del experimento, las plantas sometidas a déficit de Fe redujeron el pH de la solución nutritiva respecto a las plantas de control (Figura 3). Tal efecto resultó ser más marcado en las plantas injertadas sobre el portainjerto 110 Richter. La mayor capacidad acidificante en ambos portainjertos como respuesta al déficit de Fe se observa entre los 5 y los 20 días.

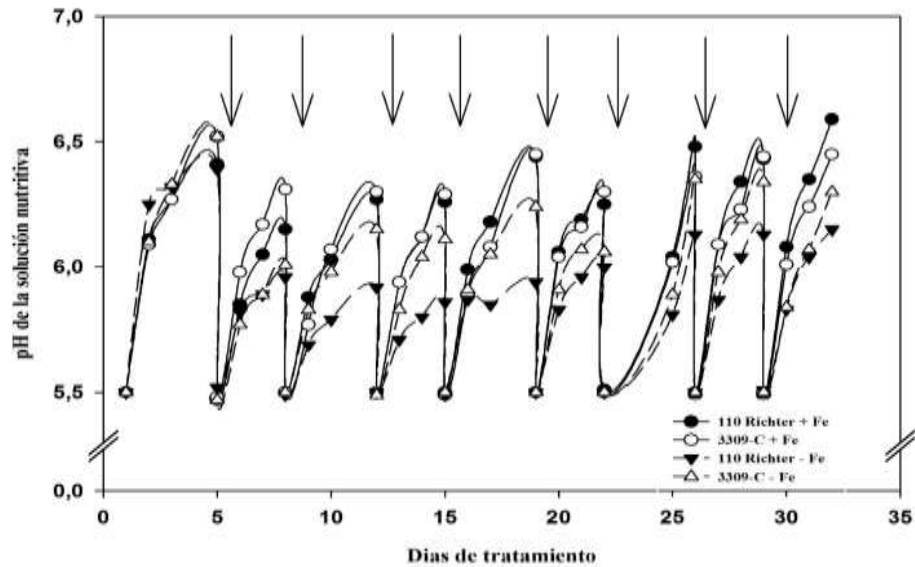


Figura 3. Valores de pH de la solución nutritiva determinados durante el experimento en plantas de vid injertadas sobre los genotipos 110 Richter y 3309-C, sometidos a 0 y 50 μM de Fe-EDTA. La solución nutritiva fue renovada dos veces por semana durante el experimento (flecha abajo).

Actividad Enzimática

A los 18 días de tratamiento, el déficit de Fe incrementó la actividad de las enzimas PEPC y NADP⁺-IDH en las raíces de las plantas, independientemente del portainjerto (Cuadro 4). A su vez, a nivel de genotipo, el 3309-C presentó una mayor actividad radicular de la enzima PEPC en comparación con el portainjerto 110 Richter, independientemente del nivel de Fe en la solución nutritiva (Cuadro 4). Los resultados relativos a la actividad de las enzimas MDH, CS, no evidenciaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Cuadro 4). Al final del experimento no se registraron diferencias significativas en la actividad de las enzimas, atribuibles al nivel de Fe y al portainjerto (Cuadro 5).

Cuadro 4. Actividad ($\text{nmol mg}^{-1} \text{ raíz min}^{-1}$) de PEPC, MDH, CS, NADP^+ -IDH determinada en extractos de raíces a los 18 días del experimento, en plantas de vid injertadas sobre los genotipos 110 Richter y 3309-C, sometidos a 0 y 50 μM de Fe-EDTA. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de rango múltiple de Tukey.

Genotipo (G)	Hierro (Fe)	PEPC	MDH	CS	NADP^+ -IDH
110 Richter	+Fe	2,4±0,52	49,7±9,1	0,42±0,04	2,31±0,17
110 Richter	- Fe	3,6±0,62	49,4±6,1	0,43±0,07	2,96±0,33
3309 C	+Fe	2,9±0,30	43,9±2,7	0,46±0,04	2,55±0,13
3309 C	- Fe	5,8±0,18	59,1±7,8	0,40±0,02	2,71±0,10

Estadística

Factor G	*	NS	NS	NS
Factor Fe	**	NS	NS	*
Interacción G x Fe	NS	NS	NS	NS

^a Abreviación y símbolos: NS, *, ** = no significativa y significativa para $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$, respectivamente.

Cuadro 5. Actividad ($\text{nmol mg}^{-1} \text{ raíz min}^{-1}$) de PEPC, MDH, CS, NADP^+ -IDH determinada en extractos de raíces a los 32 días del experimento, en plantas de vid injertadas sobre los genotipos 110 Richter y 3309-C, sometidos a 0 y 50 μM de Fe-EDTA. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de rango múltiple de Tukey.

Genotipo (G)	Hierro (Fe)	PEPC	MDH	CS	NADP^+ -IDH
110 Richter	+Fe	3,38±0,16	35,9±1,3	0,38±0,03	2,13±0,06
110 Richter	- Fe	3,90±0,54	37,6±8,5	0,32±0,08	2,10±0,24
3309 C	+Fe	3,58±0,52	47,0±6,0	0,42±0,04	2,38±0,20
3309 C	- Fe	3,68±0,46	39,6±2,1	0,38±0,04	1,90±0,19

Estadística

Factor G	NS	NS	NS	NS
Factor Fe	NS	NS	NS	NS
Interacción G x Fe	NS	NS	NS	NS

^a Abreviación y símbolos: NS = no significativa

Concentración de ácidos orgánicos en raíces

A los 18 días desde la imposición de los tratamientos, el déficit de Fe incrementó la concentración de malato y total de ácidos orgánicos en las raíces de ambos genotipos en comparación con el control (Cuadro 6). A su vez, se registró una mayor concentración de malato y ácidos orgánicos totales en las raíces del genotipo 3309-C respecto del 110 Richter, para ambos niveles de Fe (Cuadro 6). Las concentraciones de citrato, tartrato y ascorbato no presentaron diferencias significativas en sus concentraciones como respuesta a los tratamientos (Cuadro 6).

Al final del experimento (32 días), se registraron diferencias significativas en la concentración de tartrato atribuibles al genotipo, en la cual, el portainjerto 3309-C presentó una mayor concentración de tartrato respecto del 110 Richter (Cuadro 7).

Cuadro 6. Concentración de ácidos orgánicos (mg g^{-1} PF) en extractos de ápices radiculares, determinada durante el experimento a los 18 días, en plantas de vid injertadas sobre los genotipos 110 Richter y 3309-C, sometidos a 0 y 50 μM de Fe-EDTA. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de rango múltiple de Tukey.

Genotipo (G)	Hierro (Fe)	Citrato	Tartrato	Malato	Ascorbato	Total
110 Richter	+Fe	0,56±0,05	2,0±0,11	0,32±0,05	0,08±0,020	2,8±0,3
110 Richter	- Fe	0,52±0,13	2,2±0,07	0,53±0,12	0,08±0,003	3,3±0,2
3309 C	+Fe	0,69±0,13	2,3±0,09	0,63±0,14	0,09±0,010	3,4±0,4
3309 C	- Fe	1,07±0,33	2,3±0,11	1,50±0,30	0,09±0,006	4,7±0,2

Estadística

Factor G	NS	NS	**	NS	**
Factor Fe	NS	NS	*	NS	**
Interacción G x Fe	NS	NS	NS	NS	NS

Abreviación y símbolos: NS, *, ** = no significativa y significativa para $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$, respectivamente

Cuadro 7. Concentración de ácidos orgánicos (mg g^{-1} PF) en extractos de ápices radiculares, determinada durante el experimento a los 32 días en plantas de vid injertadas sobre los genotipos 110 Richter y 3309-C, sometidos a 0 y 50 μM de Fe-EDTA. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos según prueba de rango múltiple de Tukey.

Genotype (G)	Hierro (Fe)	Citrato	Tartrato	Malato	Ascorbato	Total
110 Richter	+Fe	0,58±0,15	1,6±0,11	0,24±0,05	0,05±0,007	2,4±0,3
110 Richter	- Fe	0,42±0,07	1,7±0,07	0,30±0,13	0,05±0,007	2,3±0,3
3309 C	+Fe	0,62±0,04	2,1±0,09	0,42±0,08	0,06±0,005	2,9±0,1
3309 C	- Fe	0,77±0,25	1,9±0,15	0,42±0,10	0,05±0,006	2,8±0,6

Estadística

Factor G	NS	**	NS	NS	NS
Factor Fe	NS	NS	NS	NS	NS
Interacción G x Fe	NS	NS	NS	NS	NS

Abreviación y símbolos: NS, ** = no significativa y significativa para $p \leq 0.05$, respectivamente

DISCUSION

Los resultados obtenidos en la presente investigación, indican que la intensidad y duración del déficit de Fe influencia la manifestación de síntomas en las plantas de vid. En tal contexto, durante los primeros 18 días del experimento el déficit de Fe no redujo la concentración de clorofila y el crecimiento de las plantas para ambas combinaciones variedad/portainjerto. Sin embargo, al someter las plantas a un periodo más prolongado de ausencia de Fe en la solución nutritiva (32 días), el déficit de tal elemento indujo síntomas distintos en función de la combinación variedad/portainjerto. En las plantas de la variedad Cabernet Sauvignon injertadas sobre el genotipo 110 Richter, la carencia de Fe redujo el crecimiento de los brotes y la biomasa de la parte aérea, sin alterar el contenido de clorofila de las hojas. En contraste, las plantas injertadas sobre 3309-C sometidas a déficit de Fe mantuvieron la tasa de crecimiento de los brotes, pero manifestaron una reducción significativa en el contenido de clorofila foliar.

Diversos estudios han caracterizado la sintomatología de déficit de Fe en genotipos de vid con diversos niveles de tolerancia tal carencia, reportando diferencias entre ellos en la manifestación de síntomas tales como una clorosis intervenal en hojas jóvenes y reducciones en el largo de los brotes. En el genotipo Cabernet Sauvignon, tolerante a la carencia de Fe, un breve período de depleción de Fe en la solución nutritiva redujo el contenido de clorofila de las hojas y el peso fresco de los brotes, mientras en el genotipo susceptible *Vitis riparia* Gloire de Montpellier, el déficit de Fe redujo el contenido de clorofila foliar sin alterar la biomasa de los brotes (Jiménez *et al.*, 2007). En otros estudios sobre genotipos tolerantes al déficit de Fe (ej. SO₄) conducidos en macetas o en campo, se han registrado reducciones en el crecimiento de los brotes inducidos por el déficit de Fe, previo a la manifestación de mermas en la concentración de clorofila foliar (Römheld 2000, Gruber and Kosegarten 2002). La reducción en el contenido de clorofila de las hojas como respuesta a un déficit de Fe, se genera debido a que el Fe es catalizador de enzimas que están involucradas en la síntesis de la molécula de clorofila, y además en el sistema redox del proceso fotosintético en los cloroplastos (Morales *et al.*, 2000). Tales evidencias, sugieren que probablemente la combinación Cabernet Sauvignon/110 Richter adopta una estrategia conducente a mantener la concentración de clorofila y la tasa fotosintética en las hojas ante un déficit de Fe, en desmedro del crecimiento de los brotes en longitud, y tal estrategia, se mostró ausente en la variedad injertada sobre el genotipo 3309-C, la cual evidenció una fuerte reducción en el contenido de clorofila y la actividad fotosintética foliar a los 32 días del presente estudio.

Los valores de pH registrados en la solución nutritiva indican una mayor capacidad del genotipo 110 Richter de acidificar el medio como respuesta al déficit de Fe, en comparación con el genotipo 3309-C. Tal efecto, fue mayor entre los 15 y los 20 días del experimento. La reducción del pH de la solución nutritiva ha sido ampliamente descrita por diversos autores como un mecanismo fisiológico de respuesta a la carencia de Fe que

ejecutan las plantas tolerantes a la clorosis férrica (Brancadoro *et al.*, 1995; Dell'Orto *et al.*, 2000; Ksouri *et al.*, 2005; Rombolà y Tagliavini, 2006; Jiménez *et al.*, 2007; Covarrubias y Rombolà, 2013; Covarrubias y Rombolà 2015). Al disminuir el pH del medio, el Fe se vuelve más soluble, ya que se favorece la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} , forma química que puede ser absorbida por las plantas de Estrategia I, promoviendo la absorción radicular de Fe (Kim y Guerinot, 2007).

A su vez, esta mayor capacidad de acidificación del medio registrada en las plantas injertadas sobre 110 Richter se asoció a una mayor biomasa de raíces del portainjerto determinada a los 18 días. La reacción al déficit de Fe de incrementar la biomasa radicular, podría ser una estrategia conducente a incrementar la superficie de contacto de las raíces con la solución nutritiva, y con ello incrementar la capacidad de reducir el Fe mediante el incremento de la actividad de la enzima intermembrana hierro quelato reductasa, y a su vez reducir el pH de la rizósfera liberando protones mediante la actividad de la enzima ATPasa. En una investigación conducida en hidroponía con el genotipo tolerante al déficit de Fe 140 Ruggeri, se registró una elevada capacidad del portainjerto de reducir el pH de la solución nutritiva ante un déficit de Fe, y este efecto resultó ser más pronunciado en presencia de bicarbonato (Covarrubias y Rombolà 2013). Estos resultados son coincidentes con los reportados por Ksouri *et al.* (2005) sobre el mismo portainjerto, y demuestran que una parte de la elevada tolerancia de este genotipo a la clorosis férrica, podría ser atribuible a tal mecanismo fisiológico. Por otra parte, Jiménez *et al.* (2007), reportaron que el genotipo tolerante al déficit de Fe Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*) disminuyó el pH de la rizósfera como respuesta a la carencia de Fe con mayor eficacia en comparación con el genotipo susceptible *Vitis riparia* Gloire de Montpellier. En tal contexto, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el portainjerto 110 Richter presenta una mayor capacidad de responder al déficit de Fe mediante una reducción del pH de la rizósfera en comparación con el genotipo 3309-C. Además, los datos sugieren que la estrategia ejecutada por la combinación Cabernet Sauvignon/110 Richter de mantener una elevada tasa fotosintética por unidad de área foliar mediante la reducción del crecimiento de brotes, podría contribuir en parte al incremento en la capacidad acidificante del portainjerto mediante la promoción de la tasa de crecimiento de raíces con el uso de la energía producida en las hojas mediante la fotosíntesis.

Además del efecto de la nutrición férrica en el pH de la solución nutritiva, a los 18 días del experimento ambos portainjertos reaccionaron ante la carencia de Fe incrementando la concentración de ácido málico y ácidos orgánicos totales, y la actividad de las enzimas PEPC y NADP^+ -IDH en los ápices radicales, ambas involucradas en la síntesis de ácidos orgánicos en el Ciclo de Krebs. El aumento en la actividad de la PEPC a nivel radicular como mecanismo de respuesta al déficit de Fe ha sido reportada para varias especies y genotipos tolerantes al déficit de Fe incluida la vid (Covarrubias y Rombolà 2013; Covarrubias *et al.* 2014; Covarrubias y Rombolà 2015), y por ello su actividad ha sido establecida como un marcador bioquímico de tolerancia de las plantas a la carencia de Fe (López - Millán *et al.* 2000; Rombolà *et al.*, 2002, Ollat *et al.*, 2003, Zocchi 2006, Covarrubias y Rombolà 2013). La enzima PEPC cataliza la reacción de fosfoenolpiruvato a oxalato, el cual se convierte posteriormente en malato mediante la acción de la enzima

malato deshidrogenasa (MDH). A su vez, el malato es el ácido orgánico que ingresa a la mitocondria y se incorpora al ciclo de los ácidos tricarbónicos (ciclo de Krebs) para la síntesis de otros ácidos orgánicos (López- Millán *et al.*, 2000). En consecuencia, la actividad de la PEPC cataliza una de las reacciones iniciales de síntesis de ácidos orgánicos, y por ello incrementa su actividad en los genotipos tolerantes al déficit de Fe en condiciones de carencia. En tal contexto, los resultados obtenidos no evidenciaron diferencias significativas entre los genotipos relativas al incremento en la concentración de ácidos orgánicos y la actividad de sus enzimas de síntesis en raíces ante el déficit de Fe, lo que indica que el diferencial de tolerancia al déficit de Fe entre ellos no se debe mayoritariamente a tal mecanismo de respuesta.

Por otra parte, las plantas injertadas sobre el genotipo 3309-C presentaron una mayor actividad radicular de la enzima PEPC y concentración de malato y ácidos orgánicos totales en las raíces respecto del genotipo 110 Richter para ambos niveles de Fe. Sin embargo, el genotipo 110 Richter mostró una mayor capacidad de reducir el pH de la solución nutritiva ante un déficit de Fe. En un experimento conducido en condiciones hidropónicas, Covarrubias y Rombolà (2015) reportaron una importante acumulación de ácido cítrico y málico en las raíces del genotipo 101-14 susceptible a la carencia de Fe sometido a déficit de Fe. En ese estudio, tal genotipo exhibió un comportamiento similar al registrado en el presente experimento sobre el 3309-C en condiciones de carencia de Fe, lo cual indica que tales genotipos sintetizan ácidos orgánicos en la raíz ante un déficit de Fe, y probablemente no cuentan con la habilidad de exudarlos al medio y/o cargarlos al xilema en modo de evitar su acumulación excesiva en el tejido radicular. La escasa capacidad de exudación de ácidos orgánicos en condiciones de carencia de Fe, se muestra como una respuesta común en los genotipos 101-14 y 3309-C, los cuales comparten el mismo origen genético (*Vitis riparia x Vitis rupestris*). En consecuencia, es posible que la menor concentración de ácidos orgánicos registrada en el genotipo 110 Richter, sea producto de una elevada eficacia de este portainjerto en la exudación de ácidos orgánicos hacia la rizósfera y/o su carga a los vasos xilemáticos en comparación con el 3309-C, el cual ha sido descrito como un genotipo susceptible a la deficiencia de Fe (Tagliavini y Rombolà 2001).

En consecuencia, los resultados obtenidos en la presente investigación indican que en una primera etapa (18 días), ambas combinaciones variedad/portainjerto reaccionan al déficit de Fe incrementando la síntesis y acumulación de ácidos orgánicos en las raíces con eficacia análoga. En una etapa sucesiva, ambos genotipos disminuyen la síntesis y/o acumulación de ácidos orgánicos en las raíces, y comienzan a manifestar síntomas de carencia de Fe en las hojas y brotes, en diferente intensidad según el grado de tolerancia de los portainjertos al déficit de Fe. Durante tal período, el portainjerto 110 Richter induce una reducción en la tasa de crecimiento de brotes, manteniendo la concentración de clorofila y la tasa fotosintética en las hojas de la variedad injertada, y en contraste, el genotipo 3309-C induce una reducción en el contenido de clorofila y la actividad fotosintética, sin reducir el crecimiento de los brotes en la variedad injertada. Las respuestas a la carencia de Fe ejecutadas por las plantas injertadas sobre 110 Richter contribuyeron a favorecer la actividad fotosintética, lo que probablemente permitió incrementar la síntesis y exudación de radicales para disminuir el pH de la solución y así hacer frente a la baja disponibilidad

de Fe presente en la solución nutritiva. Por el contrario, las plantas injertadas sobre 3309-C continuaron con su tasa de crecimiento de brotes normal, lo cual indujo síntomas severos de clorosis férrica en las hojas

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las cuales se desarrolló la presente investigación, es posible concluir lo siguiente:

Ante una condición de déficit de Fe leve a moderada (18 días), ambas combinaciones variedad/portainjerto reaccionan a la carencia incrementando la acumulación de ácidos orgánicos y la actividad de sus enzimas de síntesis (PEPC y NADP⁺-IDH) en las raíces con similar eficacia. Cuando el déficit es más severo (32 días), ambos portainjertos disminuyen la síntesis y/o acumulación de ácidos orgánicos en las raíces.

El portainjerto 110 Richter presenta una mayor capacidad de reducir el pH de la solución nutritiva en respuesta al déficit de Fe en comparación con el 3309-C.

A partir de los 18 días de ausencia de Fe en la solución nutritiva, la combinación Cabernet Sauvignon/110 Richter responde mediante una reducción en la tasa de crecimiento de los brotes, manteniendo la concentración de clorofila y la tasa fotosintética en las hojas, mientras que la combinación Cabernet Sauvignon/3309-C reduce el contenido de clorofila y la actividad fotosintética, sin detener el crecimiento de sus brotes.

El portainjerto 110 Richter sometido a un déficit de Fe leve a moderado, responde mediante el incremento en la biomasa radicular.

BIBLIOGRAFIA

Abadía, J.; L. Millán; F. Rombolà y A. Abadía. 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil* 241p.

Álvarez, A.; P. Paniagua; J. Abadía y A. Abadía. 2004. Effects of Fe deficiency chlorosis on yield and fruit quality in Peach (*Prunus persica* L. Batsch). *J. Agric. Food Chem.* 51p.

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

Covarrubias, J. y A. Rombolà. 2013. Response mechanisms of grapevine to sustainable strategies of iron chlorosis prevention. The VII International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops. 19-25 mayo, Chanthaburi, Tailandia.

Dell'Orto, M.; L. Brancadoro; A. Scienza; y G. Zocchi. 2000. Use of biochemical parameters to select grapevine genotypes resistant to iron-chlorosis. *J Plant Nutr* 23.

Goldberg, D. y G. Ellis. 1974. Isocitrate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie/Academic Press, New York, 183p-189p.

Jiménez, S.; Y. Gogorcena; C. Hévin; A. Rombolà y N. Ollat. 2007. Nitrogen nutrition influences some biochemical responses to iron deficiency in tolerant and sensitive genotypes of *Vitis*. *Plant Soil* n° 290, 343p-355p.

Kim, S. y M. Guerinot. 2007. Mining iron: iron uptake and transport in plants.

Ksouri, R.; S. M'rah; M. Gharsalli y M. Lachaâl. 2005. Biochemical responses to true and bicarbonate-induced iron deficiency in grapevine genotypes. *J. Plant Nutr.* 29, 305p-315p.

Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, London.

ODEPA (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias) 2013. Superficie y producción de vides para vinificación, de mesa y pisqueras Catastro frutícola año 2007.

Ollat, N.; B. Laborde; M. Neveux; P. Diakou-Verdin; C. Renaud y A. Moing. 2003. Organic acid metabolism in roots of various grapevine (*Vitis*) rootstocks submitted to iron deficiency and Bicarbonate nutrition. *J. Plant Nutr.* n° 26- 165p–176p.

Razeto, B. 2009. Symptoms of nutrient imbalances in fruit trees. Ed. A. Steven. Santiago, Chile.

Retamales, J. y F. Hancock. 2012. Blueberries, *Crop Production Science in Horticulture* N°21, Ed. J. Retamales and F. Hancock. CABI, Oxfordshire, UK, pp. 323. ISBN 978 1 84593 8260.

Rombolà, A. y M. Tagliavini. 2006. Iron nutrition of fruit tree crops. In *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms* (Eds, J, Abadía and L, Barton), Springer, Berlin, 83p.

Rombolà, A; W. Brüggemann; A. López-Millán; M. Tagliavini; J. Abadía; B. Marangoni; *et. al.* 2002. Biochemical responses to iron deficiency in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Tree Physiol* n°22: 869p–875p.

Smith, F. 1974. Malate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie/Academic Press, New York, 163p–175p.

Srere, P. 1967. Citrate synthase. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods in enzymology*. Academic, New York, 3–11.

Tagliavini, M y A.Rombola. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Eur J Agron* 15, 71–92.