



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA

**Caracterización fisiológica de híbridos de peral, para la obtención  
de nuevos patrones tolerantes a clorosis férrica y de vigor  
reducido**

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**Claudia Paola Mora Córdova**

Directores:

Dr. Ramon Dolcet-SanJuan  
Dra. Roser Tolrà Perez

\_\_\_\_\_  
Dr. Ramon Dolcet-SanJuan

\_\_\_\_\_  
Dra. Roser Tolrà Perez

\_\_\_\_\_  
Claudia Paola Mora Córdova

Barcelona, junio 2017.

## **AGRADECIMIENTOS**

A **Dios**, gracias.

A **CONACYT** por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de doctorado en el extranjero.

A la **Universidad Autónoma de Barcelona**, al **Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)** y al **Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG)** por permitirme realizar mi trabajo de investigación bajo su respaldo institucional.

A mis directores **Dr. Ramón Dolcet-Sanjuan** y **Dra. Roser Tolrà Perez**, y a la coordinadora de posgrado **Dra. Charlotte Poschenrieder** por todo su tiempo, dedicación, apoyo y consejos durante estos cuatro años.

A **Elena** y **Rosa**, por su paciencia y apoyo en todo momento.

A todos **los amigos** que he conocido en esta bella ciudad de **Barcelona** por todos los momentos de alegría y risas que compartimos y sobre todo por su gran amistad.

A mis **papás** y **hermano** por todo el apoyo otorgado durante toda mi vida, pero sobre todo durante esta última etapa.

A **Toby**.

A **mis amigos de toda la vida**, por esa amistad que ni el tiempo ni la distancia han quebrantado, sino que al contrario, se ha hecho más fuerte.

A todos ellos, muchas gracias.

## RESUMEN

La clorosis férrica es una alteración nutricional que afecta a una gran parte de los cultivos de interés económico en la zona del Mediterráneo, limitando su crecimiento y ocasionando grandes pérdidas económicas (Sanz y Montañés, 1997 y Tagliavini y Rombolà, 2001).

La clorosis férrica típica de los suelos mediterráneos no es consecuencia de una deficiencia del hierro en el suelo, sino por un desequilibrio fisiológico que se asocia al carácter calizo y alcalino de los suelos y a las dificultades que presenta la planta para la absorción de este elemento (Pestana *et al.*, 2003 y Asín *et al.*, 2007).

En Europa, los programas de mejoramiento de portainjertos de peral han puesto un gran énfasis en mejorar la resistencia a la clorosis férrica desarrollando nuevos patrones *Pyrus* (Sanz y Montañés, 1997 y Asín *et al.*, 2007) tolerantes a la baja disponibilidad de hierro en suelos calcáreos y con una mayor capacidad de absorción de este elemento (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2004 e Iglesias *et al.*, 2004).

A partir de 1998 se desarrolló un plan de trabajo entre el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) y el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), ubicado en Angers, Francia, para la creación y selección de un patrón de peral resistente a clorosis férrica y de vigor reducido mediante cruzamientos inter específicos entre *Pyrus communis* (Pyriam) y cuatro especies del género *Pyrus* de origen mediterráneo tolerantes a clorosis férrica: *Pyrus communis cordata*, *Pyrus amygdaliformis*, *Pyrus amygdaliformis* subespecie *persica* y *Pyrus elaeagrifolia*.

Las técnicas de propagación y regeneración *in vitro* de plantas permiten la obtención de individuos con las mismas características del progenitor en un menor tiempo y en espacio reducido, lo que resuelve el problema de la variabilidad genética presentada cuando las plantas heterocigóticas son propagadas por medio de semilla. El cultivo *in vitro* se ha desarrollado para una amplia gama de cultivares y genotipos de *Pyrus* spp. (Iglesias *et al.*, 2004 y Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1991).

En este trabajo se describen los experimentos conducidos para la propagación *in vitro* de patrones híbridos de *Pyrus* provenientes de campo, así como el análisis de las respuestas fisiológicas de los individuos durante el ensayo *in vitro* de tolerancia a clorosis férrica y las respuestas presentadas frente a estrés oxidativo.

## ABSTRACT

Iron chlorosis is a nutritional disorder affecting many crops of economic interest in the Mediterranean area, limiting their growth and causing great economic losses (Sanz and Montañés, 1997 and Tagliavini and Rombolà, 2001).

The iron chlorosis typical of Mediterranean soils is not due to low availability of iron in the soil, but due to a physiological disequilibrium associated with the limestone and alkaline character of soils and the difficulties presented by the plant for the absorption of this element (Pestana *et al.*, 2003 and Asín *et al.*, 2007).

In Europe, pear rootstock breeding programs have placed great emphasis on improving resistance to iron chlorosis by developing new *Pyrus* rootstocks (Sanz and Montañés, 1997 and Asín *et al.*, 2007) tolerant to the low iron availability from calcareous soils and with a higher iron absorption capability (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2004 and Iglesias *et al.*, 2004).

Since 1998, a work plan has been developed between the Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) and the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), placed in Angers, France, for the generation and selection of an iron chlorosis tolerant pear rootstock with reduced vigor, by inter-specific crosses between *Pyrus communis* (Pyriam) and four *Pyrus* species of Mediterranean origin tolerant to iron chlorosis: *Pyrus communis cordata*, *Pyrus amygdaliformis*, *Pyrus Amygdaliformis persica* and *Pyrus elaeagrifolia*.

The plant *in vitro* culture propagation and regeneration technics allow to obtain individuals with the same characteristics of the progenitor in a shorter time and space, which solves the problem of the genetic variability presented when heterozygous plants are propagated by means of seed. *In vitro* culture has been developed for a wide range of cultivars and genotypes of *Pyrus* spp. (Iglesias *et al.*, 2004 and Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1991),

The present work describes the experiments conducting to the *in vitro* propagation of hybrid *Pyrus* rootstocks coming from field, as well as the analysis of the physiological responses of individuals during the *in vitro* assay for tolerance to iron chlorosis and the presented responses to oxidative stress.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ABREVIATURAS .....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
Pera ( <i>Pyrus</i> spp.) .....	1
Morfología y filogenia .....	1
Origen y distribución.....	2
Domesticación y cultivo del peral .....	4
Importancia económica del peral .....	5
Producción de pera y utilización de patrones .....	7
Ventajas y desventajas de los patrones utilizados para el cultivo de pera .....	8
El mineral hierro en la corteza terrestre.....	9
Disponibilidad para las plantas del hierro presente en los suelos .....	11
Nutrición y función del hierro en la planta .....	12
Clorosis férrica .....	17
Factores que afectan la incidencia de clorosis férrica en las plantaciones .....	19
Prevención y corrección de la clorosis férrica en cultivos.....	25
OBJETIVOS .....	28
JUSTIFICACIÓN .....	30
CAPÍTULO 1. Selección de patrones de peral resistentes a clorosis férrica en campo. Obtención, multiplicación y selección <i>in vitro</i> .....	31
1.1. INTRODUCCIÓN.....	31
1.1.1. El problema de la clorosis férrica en frutales .....	31
1.1.2. Alternativas en el uso de portainjertos para la producción de pera .....	33
1.1.3. Multiplicación <i>in vitro</i> como herramienta para la propagación de patrones híbridos de peral .....	35
1.1.4. Antecedentes del proyecto.....	36
1.2. METODOLOGÍA .....	39
1.2.1. Selección del material vegetal proveniente de campo.....	39
1.2.2. Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> .....	41
1.2.3. Introducción <i>in vitro</i> de nuevas accesiones a partir de semilla y aclimatación de plántulas para utilizarlas como futuros parentales .....	43
1.2.4. Aclimatación de plantas propagadas <i>in vitro</i> .....	44

1.3.	RESULTADOS .....	44
1.3.1.	Selección del material vegetal proveniente de campo .....	44
1.3.2.	Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> .....	45
1.3.3.	Introducción <i>in vitro</i> de nuevas accesiones a partir de semilla y propagación .....	46
1.3.4.	Aclimatación de plantas propagadas <i>in vitro</i> .....	47
1.4.	DISCUSIÓN .....	48
CAPÍTULO 2. Evaluación de las respuestas fisiológicas de las raíces a la deficiencia de hierro inducida <i>in vitro</i> .....		50
2.1.	INTRODUCCIÓN .....	50
2.1.1.	Absorción de Fe por la planta por la Estrategia I .....	50
2.2.	METODOLOGÍA .....	56
2.2.1.	Test <i>in vitro</i> de tolerancia a clorosis férrica .....	56
2.2.2.	Contenido de clorofila en hojas .....	59
2.2.3.	Acidificación del medio de cultivo <i>in vitro</i> .....	59
2.2.4.	Reducción de Fe <sup>3+</sup> en las raíces <i>in vitro</i> .....	59
2.2.5.	Exudación de fenoles totales <i>in vitro</i> .....	60
2.3.	RESULTADOS .....	61
2.3.1.	Nivel de clorofila en hojas .....	61
2.3.2.	Acidificación del medio de cultivo.....	64
2.3.3.	Actividad FQ-R y reducción de Fe por las raíces.....	66
2.3.4.	Exudación de fenoles totales en el medio de cultivo <i>in vitro</i> .....	68
2.4.	DISCUSIÓN .....	70
CAPÍTULO 3. Nutrición y respuestas fisiológicas, bioquímicas y de estrés oxidativo ante deficiencia de hierro inducida.....		74
3.1.	INTRODUCCIÓN .....	74
3.1.2.	Biosíntesis de ácidos orgánicos.....	76
3.2.	METODOLOGÍA .....	78
3.2.1.	Cultivo hidropónico.....	78
3.2.2.	Contenido de clorofila en hojas.....	79
3.2.3.	Extracción de la fracción enzimática y cuantificación de proteína.....	79
3.2.4.	Actividades enzimáticas .....	80
3.2.5.	Análisis de ácidos orgánicos <i>in vitro</i> en raíces .....	81
3.2.6.	Nutrición .....	82

3.3. RESULTADOS .....	82
3.3.1. Contenido de clorofila en hojas .....	82
3.3.2. Contenido de proteína .....	85
3.3.3. Actividades enzimáticas .....	86
3.3.4. Contenido de ácidos orgánicos en raíces .....	89
3.3.5. Nutrición .....	89
3.4. DISCUSIÓN.....	93
CAPÍTULO 4. Fluorescencia de la clorofila.....	101
4.1 INTRODUCCIÓN.....	101
4.1.1. Fotosíntesis y fluorescencia de la clorofila.....	101
4.1.2. Deficiencia de hierro en fluorescencia .....	103
4.2. METODOLOGÍA .....	103
4.2.1. Fluorescencia de clorofila.....	103
4.3. RESULTADOS .....	104
4.3.1. Estado del aparato fotosintético .....	104
4.4. DISCUSIÓN .....	105
CONCLUSIONES.....	108
BIBLIOGRAFÍA.....	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica del peral ( <i>Pyrus</i> spp.)	1
Figura 2. Producción de pera a nivel mundial en promedio del año 2004 al 2014.	6
Figura 3. Producción anual promedio de peras a nivel mundial en promedio del año 2004 al 2014.	6
Figura 4. Distribución de la producción de pera en España por regiones.	7
Figura 5. Concentración de hierro en rocas, suelos y la corteza terrestre.	10
Figura 6. Ciclo del hierro en el suelo adaptación.	11
Figura 7. Funciones del Fe en la planta.	13
Figura 8. Clasificación de las principales metaloproteínas encontradas en plantas.	15
Figura 9. Individuos afectados por clorosis férrica con hojas amarillentas.	18
Figura 10. Genes involucrados en la respuesta ante la deficiencia de hierro en plantas dicotiledóneas.	25
Figura 11. Árbol de peral afectado por clorosis férrica.	31
Figura 12. Cruces realizados para la obtención de patrones de peral resistentes a clorosis férrica.	34
Figura 13. Plan de trabajo IRTA para la creación y selección de un patrón de peral resistente a clorosis férrica y de vigor reducido mediante cruzamientos inter específicos <i>Pyrus</i> .	38
Figura 14. Híbridos interespecíficos <i>Pyrus</i> en la fase de Preselecciones en campo.	40
Figura 15. Comparación visual en campo para la selección de híbridos interespecíficos para ser introducidos en cultivo <i>in vitro</i> .	40
Figura 16. Códigos de los híbridos interespecíficos <i>Pyrus</i> seleccionados en campo en la fase de preselecciones, empleados en el presente estudio.	41
Figura 17. Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Pyrus</i> .	45
Figura 18. Fase de multiplicación de brotes <i>in vitro</i> .	45
Figura 19. Híbridos interespecíficos <i>Pyrus</i> seleccionados en para realizar el ensayo de tolerancia a clorosis férrica <i>in vitro</i> .	46
Figura 20. Aclimatación de híbridos.	47
Figura 21. Individuos utilizados para el ensayo <i>in vitro</i> de tolerancia a clorosis férrica.	56
Figura 22. Montaje del ensayo de tolerancia a clorosis férrica <i>in vitro</i> . Plántulas transferidas a frascos Magentas® con puentes de papel.	57
Figura 23. Montaje de las plántulas para el análisis de reducción de Fe. Se colocaron 4 plántulas contenidas en viales de color ámbar en un frasco Magenta®.	60
Figura 24. Nivel total de clorofila (SPAD) medido en hojas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	63
Figura 25. Nivel total de clorofila (SPAD) medido en hojas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecífico y <i>P. communis</i> "Williams"s.	64
Figura 26. Acidificación del medio por las raíces de plántulas pertenecientes a cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	65

Figura 27. Acidificación del medio por las raíces de plántulas pertenecientes a cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	66
Figura 28. Capacidad de reducción de hierro por las raíces de las plántulas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	67
Figura 29. Capacidad de reducción de hierro por las raíces de las plántulas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	68
Figura 30. Exudación de fenoles totales al medio por las raíces de las plántulas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	69
Figura 31. Exudación de fenoles totales al medio por las raíces de las plántulas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	70
Figura 32. Contenido de clorofila en hojas de plántulas <i>Pyrus</i> .	83
Figura 33. Cambio de coloración en las hojas de los híbridos en presencia de bicarbonato.	85
Figura 34. Actividad de las enzimas A) catalasa (CAT), B) Peroxidasa (POD), C) Superóxido dismutasa (SOD) y D) Malondialdehído (MDA).	87
Figura 35. Actividad de las enzimas A) catalasa (CAT), B) Peroxidasa (POD), C) Superóxido dismutasa (SOD) y D) Malondialdehído (MDA).	88
Figura 36. Contenido de micronutrientes, Na y macronutrientes.	92
Figura 37. Correlación entre los niveles de clorofila y el contenido de hierro en hojas.	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nuevas accesiones <i>Pyrus</i> importadas del NCGR Oregon en forma de semilla.	43
Tabla 2. Semillas sembradas, plantas obtenidas, porcentaje de germinación y tasa de multiplicación de las nuevas accesiones de los híbridos <i>P. elaeagnifolia</i> , <i>P. amygdaliformis</i> y <i>P. cordata</i> introducidas <i>in vitro</i> a partir de semilla.	47
Tabla 3. Composición de soluciones stock para preparar la solución nutritiva FeDTPA usada para seleccionar plantas tolerantes a clorosis férrica de <i>Pyrus</i> .	58
Tabla 4. Clones seleccionados para medir las respuestas enzimáticas frente al estrés oxidativo.	78
Tabla 6. Contenido de clorofila en hojas de plántulas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	84
Tabla 7. Contenido de proteína total en hojas de plántulas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	86
Tabla 8. Actividad de las enzimas catalasa (CAT), Peroxidasa (POD), Superóxido dismutasa (SOD) y Malondialdehído (MDA).	86
Tabla 9. Actividad de las enzimas catalasa (CAT), Peroxidasa (POD), Superóxido dismutasa (SOD) y Malondialdehído (MDA).	88
Tabla 10. Concentración de Oxalato en las raíces de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	89
Tabla 11. Concentración de macronutrientes y Na en hojas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams"..	90
Tabla 12. Concentración de macronutrientes y Na.	90
Tabla 13. Concentración de micronutrientes en hojas de cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams"..	91
Tabla 14. Concentración de micronutrientes.	91
Tabla 15. Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) y relación entre la fluorescencia variable e inicial (Fv/Fo) medidas en hojas de plantas pertenecientes cuatro híbridos <i>Pyrus</i> interespecíficos y <i>P. communis</i> "Williams".	105

## ABREVIATURAS

ALA	Ácido δ-amino levulínico
ARN	Ácido Ribonucleico
BA	Benciladenina
BA-29	Patrón clonal de membrillero utilizado para peral
BPDS	Ácido batofenantrolinadisulfónico
CAT	Catalasa
CDTA	Ácido ciclohexano diamino tetraacético
CIT	Ácido cítrico
DTPA	Ácido dietilén triamino pentaacético
EDDHA	Ácido etilén diamino di (o.hidroxifenil acético)
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol bis (2-aminoetiléter) traacéticot
Fe(III)-EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético férrico
FQ-R	Quelato férrico reductasa o Hierro quelato reductasa
Fm	Fluorescencia máxima
Fv/Fm	Máxima eficiencia del fotosistema II
Fo	Fluorescencia mínima
Fv	Fluorescencia variable
Fv/Fo	Relación entre fluorescencia variable y fluorescencia inicial
GAE	Equivalentes de ácido gálico
HEDTA	Ácido hidroxietil etilén diamino tetraacético

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
MDA	Malondialdehído
MS0	Medio Murashige y Skoog sin reguladores de crecimiento
MS0GA3	Medio Murashige y Skoog con ácido giberélico
NaClO	Hipoclorito de sodio
NTA	Ácido nitrilo triacético
OX	Ácido oxálico
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión superóxido
Pa	<i>Pyrus amygdaliformis</i>
Pap	<i>Pyrus amygdaliformis persica</i>
PBG	Porfobilinógeno
Pcc	<i>Pyrus communis cordata</i>
Pcw	<i>Pyrus communis</i> "Williams"
Pe	<i>Pyrus elaeagrifolia</i>
PF	Peso fresco
POD	Peroxidasa
ppm	Partes por millón
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II

PyM0BA	Medio <i>Pyrus</i> Multiplicación sin benciladenina
PyM5BA	Medio <i>Pyrus</i> Multiplicación 5 mM benciladenina
PyR0IBA	Medio <i>Pyrus</i> Enraizamiento sin ácido indolbutírico
PyR10IBA	Medio <i>Pyrus</i> Multiplicación 10 mM ácido indolbutírico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
spp	Especies
var	Variedad

# INTRODUCCIÓN

## Pera (*Pyrus spp.*)

### Morfología y filogenia

El nombre pera es derivado del latín *pera* o *pira* y su nombre científico es *Pyrus spp.* El género *Pyrus* pertenece junto con la manzana (*Malus*) y el membrillo (*Cydonia*) a la familia Rosaceae, todos ellos miembros de la subfamilia Amygdaloideae y tribu Pyreae (Figura 1), con los que comparte la misma estructura frutal en forma de poma (Potter *et al.*, 2007; Chagné *et al.*, 2014 y Yamamoto y Terakami, 2016).

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Subfamilia	Amygdaloideae
Tribu	Pyreae
Género	<i>Pyrus spp.</i>

Figura 1. Clasificación taxonómica del peral (*Pyrus spp.*)

El peral es un árbol rústico de follaje caduco. Las hojas son ovales o redondeadas, ligeramente dentadas, oscuras en el haz y más claras en el envés. Las flores son hermafroditas con estambres periginos y de pétalos blancos o rosa que se agrupan en

umbela y se abren en abril y mayo. Su altura puede alcanzar 20 m, varía según la variedad, el injerto y la naturaleza del suelo (Guedj *et al.*, 2009).

Morfológicamente, las peras se clasifican en tres grupos según la cantidad de carpelos y el tamaño de los frutos: frutos pequeños que tienen dos carpelos conocidas como peras asiáticas, frutos grandes con cinco carpelos y frutos con tres a cuatro carpelos que son híbridos de los anteriores (Chevreau y Hammerschlag, 1992).

Se distinguen al menos 24 especies primarias en el género *Pyrus* (Rubstov, 1944) además incluye más de seis híbridos interespecíficos naturales y al menos tres híbridos artificiales (Bell *et al.*, 1996).

Todas las especies de *Pyrus* son diploides, y fértiles (Westwood, 1982) y tienen un número de cromosomas  $2n = 34$  ( $x = 17$ ), a excepción de algunos cultivares *P. communis* poliploides, lo cual es un número alto comparado con otras subfamilias de Rosaceae, las cuales poseen de 7 a 9 cromosomas (Chevreau y Hammerschlag, 1992; Hancock y Lobos, 2008 y Chagné *et al.*, 2014). Estudios genéticos moleculares recientes apoyan el origen autopoliploide de la hibridación entre miembros estrechamente relacionados de la subfamilia Spiraeae (Evans y Campbell, 2002 y Wünsch y Hormaza, 2007). La especiación probablemente involucra una hibridación interespecífica pero no cambios en el número de cromosomas (Chevreau y Hammerschlag, 1992 y Hancock y Lobos, 2008).

### **Origen y distribución**

De acuerdo con algunos fósiles hallados, el origen de *Pyrus* data del periodo Terciario (Rubstov, 1944 y Chevreau y Hammerschlag, 1992) y se sitúa en las regiones montañosas del occidente de China. Se han localizado también centros secundarios de diversidad en Asia Central y el Cercano Oriente, generalmente en zonas bajas y soleadas, desde planicies hasta media montaña (Hancock y Lobos, 2008).

El peral ha tenido su zona de dispersión desde el norte de Italia, Suiza, ex Yugoslavia, Alemania, Grecia, Moldavia y Ucrania hasta países del este como Irán, Uzbekistán, China, Japón, Corea y Bután (Silva *et al.*, 2014). Además este género crece de forma espontánea en los bosques de climas templados desde el mar Caspio hasta el océano Atlántico

(Hancock y Lobos, 2008). Algunos estudios señalan que en el Cáucaso, Ucrania y Armenia podría encontrarse el centro de domesticación de la pera (Volk *et al.*, 2006).

Por otra parte, estudios moleculares (Evans y Campbell, 2002 y Potter *et al.*, 2007) sugieren que el origen de la subfamilia Amygdaloideae, a la cual pertenece el género *Pyrus*, también podría encontrarse en Norte América.

La amplia distribución y la extensa hibridación hacen difícil identificar y distinguir las especies de *Pyrus* por caracteres morfológicos. El número de especies reconocidas en *Pyrus* ha variado entre los taxonomistas, de 60 a 21 (Rubstov, 1944), y se han registrado más de 900 nombres de especies *Pyrus* ([www.ipni.org](http://www.ipni.org)). Sin embargo, el número de especies primarias (es decir, de origen no híbrido) ha sido relativamente consistente y alrededor de 20 especies primarias putativas han sido revisadas (Teng *et al.*, 2002 y Zheng *et al.*, 2014)

Los más de mil cultivares que se encuentran en la especie *Pyrus* se pueden dividir en dos grandes grupos nativos: Perales Occidentales o Europeos y Perales Orientales o Asiáticos dependiendo de su distribución geográfica (Bailey, 1917; Teng *et al.*, 2002 y Bao *et al.*, 2008). Esta especiación puede estar asociada con el aislamiento geográfico de las poblaciones debido a las cadenas montañosas (Rubstov, 1944).

Es probable que la hibridación interespecífica desempeñara un papel importante en la domesticación de las peras. En el caso de la pera europea (*P. communis*) algunas de las especies silvestres implicadas en la hibridación de esta especie son *P. communis* var. *pyraster*, *P. caucásica* y *P. nivalis* (Challice y Westwood, 1973 y Volk *et al.*, 2006). Por otro lado, Rubstov (1944) consideró que los cultivares modernos de *P. communis* tenían características derivadas de al menos tres especies, *P. elaeagnifolia*, *P. salicifolia* y *P. syriaca*.

Los cultivares encontrados en el norte de China pueden pertenecer a un híbrido complejo resultante de la cruce entre *P. ussuriensis* y *P. pyrifolia* (Bell *et al.*, 1996). El origen de *P. bretschnideri* probablemente implicó la hibridación de *P. betulnefolia* y *P. ussuriensis* o *P. pyrifolia* (Bao *et al.*, 2008). Los datos moleculares más recientes sugieren que *P. × bretschnideri* está estrechamente relacionado con *P. pyrifolia* y *P. ussuriensis* y es probablemente una variedad o subespecie de *P. pyrifolia* (Bao *et al.*, 2008 y Yamamoto y Terakami, 2016).

## Domesticación y cultivo del peral

El peral ha sido cultivado al menos durante los últimos 3000 años en áreas de clima templado de Asia y Europa (Hancock y Lobos, 2008). Los cultivos actuales provienen de cultivares seleccionados durante el siglo XIX o finales del siglo XVIII, o bien, algunos son derivados de estas selecciones (Bell *et al.*, 1996 y Brini *et al.*, 2008).

La mejora de la pera se produjo en Europa a partir de dos especies: *Pyrus communis* y *P. nivalis*. La primera, la pera común o europea, es completamente estéril y tiene en su conjunto genético una influencia de otras especies como *P. eleagrifolia*, *P. spinosa*, *P. nivalis* y *P. syriaca* (Rubtsov, 1944 y Silva *et al.*, 2014). La segunda, llamada también pera de nieve, se utiliza para producir sidra de pera (perry) y ha sido de gran importancia en Gran Bretaña y Francia durante más de 400 años (Chevreau y Hammerschlag, 1992 y Hancock y Lobos, 2008). La mayoría de los cultivares liberados en Europa se desarrollaron a través de la polinización abierta y las selección de frutos de acuerdo a su suavidad y aspecto mantecoso (Silva *et al.*, 2014).

En general, en occidente, se cultiva como única especie *Pyrus communis* L., que además de Europa, se distribuye por Norte y Sur América, África y Australia. En Asia, el cultivo comenzó hace más de 2500 años, con las principales especies *Pyrus pyrifolia*, *Pyrus serotina* y *Pyrus ussuriensis* siendo *Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nakai, también llamada pera de arena o Nashi, la especie más cultivada en China central y Japón (Bell *et al.*, 1996; Teng *et al.*, 2002 y Bao *et al.*, 2008). Existen también en Asia algunos híbridos de *P. pyrifolia* y *P. ussuriensis* y la llamada pera blanca (*P. bretschneider* Rehd.) (Chevreau y Hammerschlag, 1992; Volk *et al.*, 2006). Comercialmente, las peras de origen Europeo tienen un cuerpo alargado y una textura jugosa y las de origen asiático tienen una textura arenosa y crujiente con un cuerpo redondeado (Volk *et al.*, 2006 y Silva *et al.*, 2014).

Dentro de Europa, cada país se ha caracterizado por cultivar de forma específica algunas variedades. Por ejemplo, en el caso de Italia la más importante es “Abate Fetel”, en Bélgica y Holanda se produce mayormente “Conference”, mientras que en Francia tienen mayor importancia “Limonera” o “Guyot” y “Williams” (Wünsch y Hormaza, 2007 e Iglesias y Casals, 2013).

En España, a partir de la década de los años 80 la variedad más producida era Blanquilla, debido a su excelente calidad gustativa. A ésta se unían “Limonera”, “Williams” (incluida la “Red Bartlet”), “Devoe”, “Condesa” o “Alejandrina”, y “Ercolini” y “Sta. María Precoz Moretini”, esta última como variedad de recolección estival (Iglesias *et al.*, 2004 e Iglesias y Casals, 2013).

“Conference” fue introducida a finales de los años 70, sin embargo su gran desarrollo inició en el año 2000 convirtiéndose hasta el día de hoy en la primera variedad producida en España, desplazando a “Blanquilla” del primer lugar. Conference es una variedad poco adaptada a las zonas secas y de menor higrimetría de España, sin embargo, su vigor medio hace que su producción no sea dificultosa, presentando además una buena aptitud a la conservación y una buena calidad gustativa (Iglesias *et al.*, 2004 e Iglesias y Casals, 2013).

Por último, y para fines ornamentales se utilizan las especies pequeñas como *P. calleryana* Dcne., *P. fauriei*, *P. betulifolia*, *P. salicifolia* y *P. kawakamii* (Chevreau y Hammerschlag, 1992 y Hancock y Lobos, 2008).

### **Importancia económica del peral**

En términos económicos, la pera es la tercera especie frutal de clima templado más importante producida en el mundo, después de la vid y la manzana (Iglesias *et al.*, 2015). La pera puede ser consumida cruda o cocinada, seca o en conservas (Chevreau y Hammerschlag, 1992 y Guedj *et al.*, 2009).

En Asia se produce la mayor cantidad de peras a nivel mundial con un promedio del 73.2 % de la producción total en los últimos 10 años (Figura 2), siendo China el principal productor con un promedio de 13, 600,000 toneladas anuales (FAO-STAT, 2017).

## Proporción de producción de Peras por región

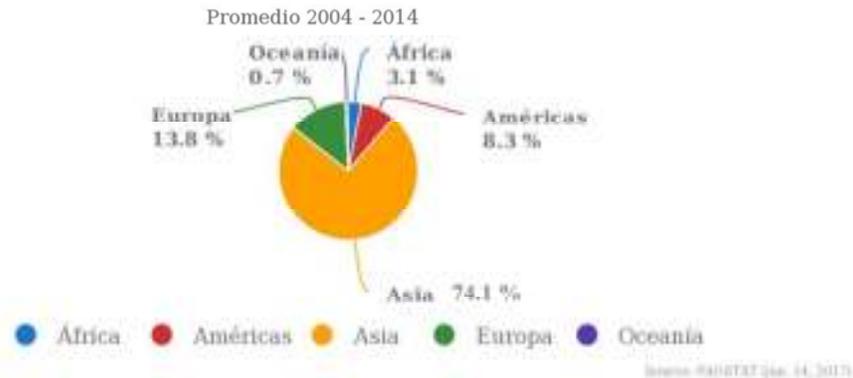


Figura 2. Producción de pera a nivel mundial en promedio del año 2004 a 2014 (FAO-STAT, 2017).

En España, la producción media anual de pera en la última décadas ha sido alrededor de las de 412, 000 toneladas, ocupando así el quinto lugar en producción a nivel mundial y el segundo en Europa después de Italia (Figura 3) (FAO-STAT, 2017 y Prognosfruit, 2016). La principal zona productora es en la actualidad el Valle del Ebro donde se produce cerca del 60% del total nacional. La distribución regional de este cultivo se sitúa mayoritariamente en las zonas de llanura del Valle del Ebro, en particular Cataluña y Aragón, seguidos por La Rioja y Navarra. Castilla y León, Murcia y sobre todo Extremadura son regiones donde el cultivo se ha visto disminuido en las últimas dos décadas (Figura 4) (Iglesias y Casals, 2013; Iglesias *et al.*, 2015).



Figura 3. Producción anual promedio de peras a nivel mundial en promedio del año 2004 a 2014 (FAO-STAT, 2017).



Figura 4. Distribución de la producción de pera en España por regiones (Fuente: elaboración propia con datos de MAPAMA, 2014).

### Producción de pera y utilización de patrones

Las variedades de pera no pueden producirse por medio de semilla debido al alto nivel de heterocigosidad. La producción de pera se realiza mediante el injerto de las variedades sobre patrones, generalmente membrilleros (*Cydonia oblonga* L.) y en menor medida perales (*Pyrus* spp.) (Iglesias *et al.*, 2004 y Asín *et al.*, 2007).

En España ha habido una progresiva intensificación de la tecnología de producción en las plantaciones gracias a la utilización de diferentes selecciones de membrillero como patrones, siendo hasta el momento EM-A (Angers) y el BA-29 (Provence) los más utilizados (Iglesias y Casals, 2013 e Iglesias *et al.*, 2015).

Específicamente, el patrón BA-29, fue uno de los primeros en introducirse y muestra una mayor adaptación a suelos calcáreos, por lo tanto suele ser el más tolerante a la baja disponibilidad de hierro en el suelo, aunque a pesar de dicha tolerancia, resulta obligatorio el empleo anual de quelatos de hierro para combatir la clorosis férrica típica del área del mediterráneo y en algunos casos el uso de intermediarios para remediar la incompatibilidad membrillero-peral (Asín *et al.*, 2007 e Iglesias *et al.*, 2015).

Otros patrones de membrillero comúnmente utilizados son del tipo Angers como el EM-A, Sydo y Adams y del tipo C, como el EM-C, este último es el más importante y utilizado en países del norte de Europa como Bélgica y Holanda (Asín *et al.*, 2007 y Clavería *et al.*, 2012).

Por otro lado, algunas especies *Pyrus* silvestres son utilizadas como porta injertos debido a su resistencia al frío y adaptabilidad a los diferentes ambientes. En Europa, Norte América y el este de Asia se han utilizado para este fin *P. calleryana* Dcne., *P. betulaefolia* Bge., *P. pyrifolia*, *P. ussuriensis* y *P. communis*, mientras que *P. pyraeaster*, *P. amygdaliformis* y *P. elaeagrifolia* han sido utilizados en Asia Menor y Asia Central (Chevreau y Hammerschlag, 1992).

### **Ventajas y desventajas de los patrones utilizados para el cultivo de pera**

En general, el membrillero (*Cydonia oblonga*) ha sido utilizado ampliamente en Europa como patrón para peral y particularmente en huertos de alta densidad debido a su baja vigorosidad y su buena eficiencia productiva (Asín *et al.*, 2007 y Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2008). Reduce el tamaño en un 30-60% en comparación con los patrones estándar de *P. communis*, también reduce el tiempo de fructificación y aumenta el tamaño del fruto. Sin embargo, los patrones de membrillo presentan varios inconvenientes como la susceptibilidad al fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) y la pudrición de la raíz (*Armillaria*) (Volk *et al.*, 2006 y Hancock y Lobos, 2008).

En concreto, los membrilleros del tipo C a pesar de presentar menor vigor que los demás, son más sensibles a clorosis férrica y presentan un anclaje deficiente. Los patrones como EM-H han demostrado tener una buena productividad, sin embargo es necesaria la aplicación de quelatos de hierro para corregir la clorosis férrica). El tipo Provence presenta mayor adaptación a suelos calcáreos y por lo tanto una menor sensibilidad a clorosis férrica que los del tipo de Angers (Asín *et al.*, 2007 e Iglesias *et al.*, 2015).

Otros inconvenientes de los membrilleros son: poca resistencia al invierno, baja tolerancia a los suelos húmedos y sobretodo, la baja compatibilidad del injerto con muchos cultivares de pera común como "Conference" (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2004; Hancock y Lobos, 2008 y Claveria *et al.*, 2012).

La incompatibilidad membrillero-peral se refiere a la presencia de irregularidades anatómicas como cortes o discontinuidades en el punto de injerto, presencia de pigmentos oscuros en las células próximas a la unión y zonas necróticas en la corteza del patrón. A veces se presenta una decoloración y caída prematura de hojas, parada del crecimiento vegetativo e

incluso se puede producir la muerte del árbol por el punto de injerto (Herrero y Tabuenca, 1962 y Asín, *et al.*, 2007).

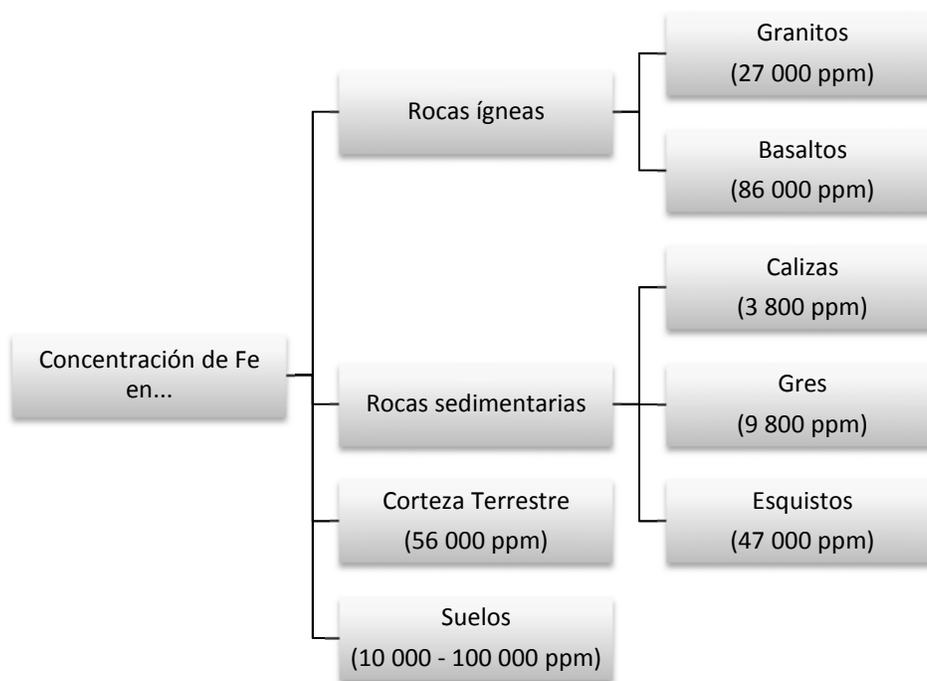
Entre algunas variedades incompatibles con el membrillero se pueden citar Williams, Red Bartlett, Limonera y Mantecosa Bosch. Existen factores que incrementa el grado de incompatibilidad como estado sanitario y altas temperaturas. La variedad Conference presenta incompatibilidad dependiendo la temperatura, ya que en zonas frías no muestra problemas de incompatibilidad, sin embargo en climas con veranos intensos como en España presenta incompatibilidad (Asín *et al.*, 2007 e Iglesias *et al.*, 2015).

La utilización de intermediarios entre el patrón de membrillero y la variedad a injertar ha permitido dar una solución parcial a este problema, sin embargo representa un incremento en los costes que frena su amplia utilización. De acuerdo a la Certificación de Material Vegetal de Cataluña, las plantas de las variedades Conference, Williams y Limonera injertadas sobre intermediarios alcanzan valores próximos al 50 % del total de plantas producidas (Asín *et al.*, 2007 e Iglesias *et al.*, 2015).

### **El mineral hierro en la corteza terrestre**

El hierro (Fe) es el cuarto elemento en peso más abundante de la corteza terrestre (Figura 5) después del oxígeno, silicio y aluminio (Lindsay, 1979 y Chen y Barack, 1982), este elemento representa aproximadamente el 5 % de la misma (Goldschmidt, 1937) y el 3.8 % de la composición del suelo (Krauskopf, 1972 y Fernández López *et al.*, 1994).

El hierro es un metal de transición y se caracteriza por la facilidad con la que puede cambiar su estado de oxidación y por su capacidad de formar complejos octaédricos con distintos ligandos que varían en potencial redox (Loué, 1988).



**Figura 5. Concentración de hierro en rocas, suelos y la corteza terrestre según Krauskopf (1972).**

El hierro se encuentra presente en todo tipo de suelos ya sea como constituyente de algunos minerales o en forma de óxidos o hidróxidos provenientes de la descomposición de los minerales primarios por reacciones de hidrólisis y oxidación con el agua y aire (Figura 6) (Krauskopf, 1972; Loué, 1988 y Fernández López *et al.*, 1994).

Los principales minerales primarios que contienen hierro son los silicatos ferromagnéticos como: olivino, augita, blenda y biotita (Loué, 1988). La meteorización de estos minerales primarios permite la liberación de Fe soluble a la disolución y puede ser transformado a minerales secundarios como sulfuros, carbonatos, silicatos o minerales de arcilla, también puede ser utilizado por los organismos o bien, unirse a distintos ligandos orgánicos (Lindsay, 1979; Murad y Fischer, 1988 y Schwertmann y Taylor, 1989).



Figura 6. Ciclo del hierro en el suelo adaptación de Murad y Fischer (1988).

Los óxidos de  $\text{Fe}^{3+}$  más estables y frecuentes en los suelos son goethita ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ) y hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). La lepidocrocita ( $\gamma\text{-FeOOH}$ ), ferrihidrita ( $\text{Fe}_5\text{O}_7(\text{OH})_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ ) y maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) se presentan con menos frecuencia en algunos tipos de suelos, mientras que feroxyhita ( $\text{FeOOH}$ ) y akagaenita ( $\beta\text{-FeOOH}$ ) son mucho más raros (Schwertmann y Taylor, 1989 y Fernández López *et al.*, 1994).

### Disponibilidad para las plantas del hierro presente en los suelos

La disponibilidad del hierro en el suelo para el consumo de la planta depende de la mineralogía, cristalinidad y contenido de los óxidos de Fe del suelo (Loeppert *et al.*, 1994) de manera que las formas poco cristalinas o amorfas, como la ferrihidrita, son más fácilmente asimilables por la planta (Cañasveras Sánchez, 2014).

La concentración de hierro en suelos oscila entre los 200 y 100,000 ppm. En la capa arable del suelo el contenido de Fe ronda el 2 % (20,000 ppm), lo que supondría una concentración suficiente para la nutrición de las plantas y la mayoría de los cultivos agrícolas, los cuales requieren concentraciones de Fe de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M para su óptimo crecimiento (Lindsay, 1974 y Kim y Guerinot, 2007). En sistemas aireados la concentración de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  es inferior a  $10^{-15}$  M, lo que es insuficiente para cubrir las necesidades de las plantas (Fernández López *et al.*, 1994 y Lindsay, 1995).

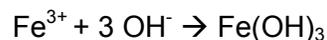
Debido a que el hierro en suelos se presenta en dos estados de oxidación (forma oxidada  $\text{Fe}^{3+}$  (férrica) y forma reducida  $\text{Fe}^{2+}$  (ferrosa), la disponibilidad de iones metálicos es baja ya que el hierro es encontrado principalmente como  $\text{Fe}^{3+}$  (Lindsay, 1979), el cual posee una

baja movilidad en el suelo y por tanto la asimilación de este elemento por parte de la mayoría de las plantas es baja, ya que solo pueden tomarlo como  $\text{Fe}^{2+}$  (a excepción de las gramíneas) (Römheld y Marschner, 1986 y Fernández López *et al.*, 1994).

La oxidación y la reducción de Fe son dos procesos reversibles y el sentido es determinado por la disponibilidad de  $\text{O}_2$  y materia orgánica (Loué, 1988). La forma ferrosa es fácilmente oxidable a férrica, sobre todo en suelos con aireación normal; la forma férrica se caracteriza por ser extremadamente insoluble en agua (Fernández López *et al.*, 1994).

Por tanto, el contenido de Fe soluble en el suelo es escaso, presentándose en forma inorgánica como  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  o  $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ . En suelos aireados la presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  es escasa sobre el total de hierro inorgánico soluble. Si el pH es elevado, la proporción de  $\text{Fe}^{2+}$  sobre el total es mayor (Schwertmann y Taylor, 1989 y Fernández López *et al.*, 1994).

La disponibilidad de Fe en los suelos está prácticamente regulada por la solubilidad de los óxidos hidratados de  $\text{Fe}^{3+}$  (Fernández López *et al.*, 1994):



Este equilibrio tiende a desplazarse hacia la precipitación del  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  y está altamente influenciado por el pH. Los iones férricos por otra parte, en disolución acuosa se hidrolizan rápidamente para dar una serie de especies según el pH del medio, siendo el  $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$  a pH mayores a 8.5 (Lindsay, 1995).

La solubilidad de los óxidos de hierro disminuyen de la siguiente manera:  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (amorfo) >  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  >  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (maghemita) > ( $\gamma\text{-FeOOH}$ ) lepidocrocita > ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) hematitas > ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ) (goethita) (Lindsay, 1979; Schwertmann y Taylor, 1989 y Lindsay, 1995).

### **Nutrición y función del hierro en la planta**

El crecimiento de las plantas puede verse afectado por diversos tipos de estrés bióticos y abióticos. Debido a que el hierro es el micronutriente que las plantas requieren en mayor cantidad, la deficiencia de este elemento se considera el mayor estrés abiótico que limita el desarrollo de las plantas y disminuye de manera drástica el rendimiento productivo de algunos cultivos, (Chen and Barak 1982; Schmidt, 2003 y Chen *et al.*, 2015).

El Fe es un elemento de transición y presenta diversas funciones dentro de la planta formando parte de un gran número de metaloproteínas y metaloenzimas que desempeñan funciones metabólicas y también actúa como cofactor en distintas reacciones enzimáticas (Fernández López *et al.*, 1994). Su capacidad de reacción óxido-reducción lo hacen esencial para la síntesis de clorofila, el transporte electrónico fotosintético, la respiración, la asimilación de nitrógeno y en los sistemas de defensa frente al estrés oxidativo de la planta (Figura 7) (Marschner *et al.*, 1986; Schmidt, 2003 y Briat *et al.*, 2007).

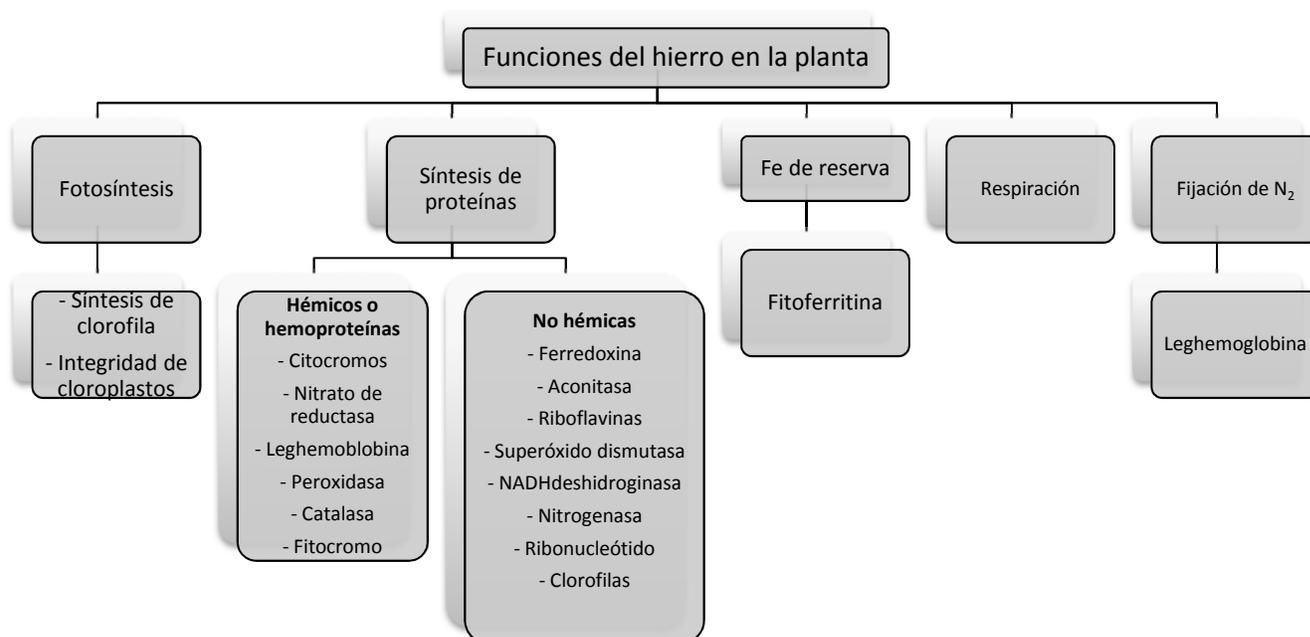


Figura 7. Funciones del Fe en la planta (Fuente: elaboración propia).

En el proceso de la fotosíntesis, el hierro se sitúa en diversos niveles dentro de la cadena de transporte de electrones. La reducción en la capacidad fotosintética en condiciones de deficiencia de Fe provoca una reducción en los niveles de azúcares y almidones, ocasionando una alteración del metabolismo y funcionamiento fisiológico de la planta (Terry y Abadía, 1986; Abadía, 2002 y Martínez Cuenca, 2012).

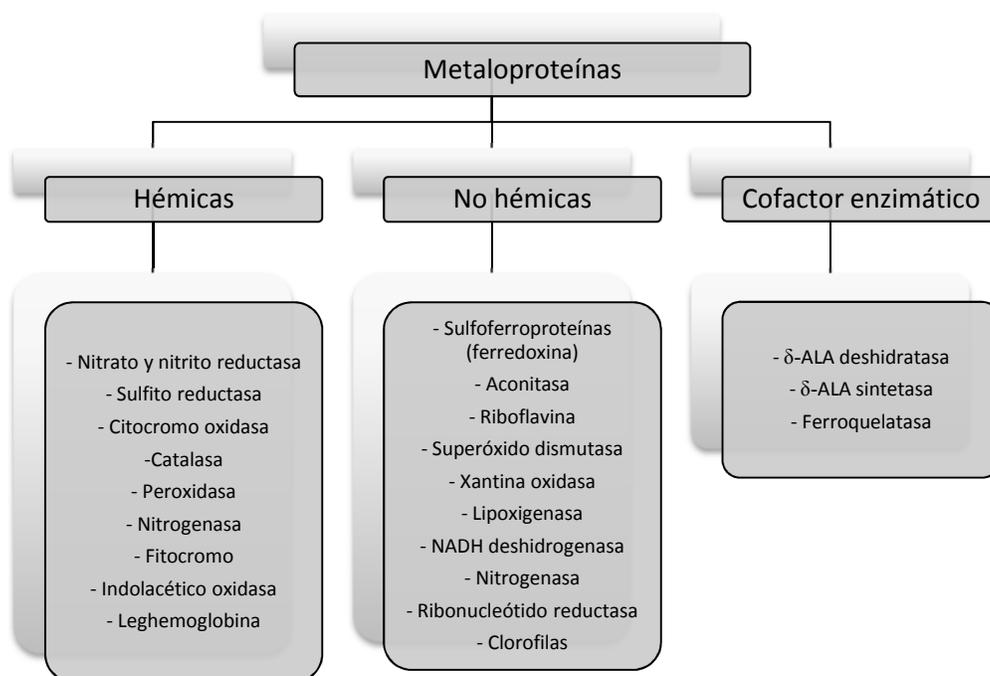
Además, en las plantas, el Fe tiene una influencia en la biosíntesis de clorofila. Existe una correlación positiva entre el nivel de abastecimiento de Fe y el contenido en clorofila (Terry y Low, 1982 y Martínez Cuenca, 2012).

En la primera fase de la biosíntesis de clorofila, el ácido glutámico es convertido a ALA. Seguidamente dos moléculas ALA se asocian en un núcleo pirrol PBG (porfobilinógeno) y cuatro PBG se asocian en círculo formando tetrapirroles llamados coproporfirinógenos (Loué, 1988). Durante la descarboxilación oxidativa del coproporfirinógeno algunas enzimas de los cloroplastos pueden insertar  $Mg^{2+}$  o  $Fe^{2+}$  en los centros de los tetrapirroles, dando como resultado final clorofila o hemoproteínas como la protoporfirina IX, respectivamente.

En la deficiencia del Fe se produce una ralentización en la síntesis del ácido  $\delta$ -amino levulínico (ALA) por lo que se observa una disminución de los productos de los tetrapirroles involucrados en la síntesis de clorofila. El color amarillo característico de las hojas cloróticas en las plantas deficientes de Fe es consecuencia del desequilibrio entre clorofila y carotenoides (Terry y Abadía, 1986; Fernández López *et al.*, 1994 y Abadía *et al.*, 2002).

Por otro lado, la síntesis de proteínas estructurales de la grana y de los tilacoides, así como los cloroplastos, también se ven afectados por la deficiencia de hierro, reduciendo su número, estructura y función. La reducción de la membrana tilacoidal provoca una disminución en todos los pigmentos que recogen luz sobre todo clorofila a y b; los carotenoides también disminuyen aunque en menor medida (Terry y Abadía, 1986 y Abadía *et al.*, 2002). Otros complejos cromoproteicos como la ferredoxina y otros componentes del fotosistema I también se ven afectados (Fernández López *et al.*, 1994).

El hierro participa también en la ruta metabólica de múltiples proteínas importantes para las plantas relacionadas sobre todo en los procesos de óxido-reducción (metaloproteínas). Algunas metaloproteínas como las metaloporfirinas se subdividen en complejos hémicos o no hémicos (Figura 8), dependiendo si el metal que está unido al anillo de la porfirina es un ion Fe o no (Loué, 1988).



**Figura 8. Clasificación de las principales metaloproteínas encontradas en plantas (Fuente: elaboración propia).**

Entre las porfirinas del grupo hemático (hemídicos) se encuentran un cierto número de enzimas muy importantes como las catalasas, peroxidasas, citocromos, citocromo oxidasas, entre otras (Loué, 1988).

Los citocromos constituyen los sistemas redox de los cloroplastos y las mitocondrias y son los responsables del transporte de energía en los procesos de óxido-reducción gracias al cambio de valencia  $Fe^{2+}$  (ferrocitocromo)  $\rightarrow$   $Fe^{3+}$  (ferricitocromo). Los citocromos situados en las mitocondrias intervienen en la cadena respiratoria, mientras que los que están localizados en los cloroplastos intervienen en la fotosíntesis (Marschner *et al.*, 1986). Las plantas con deficiencia de Fe presentan una inhibición de la respiración celular (Loué, 1988).

Las catalasas intervienen en la fotorrespiración y en el Ciclo de Calvin y facilitan la dismutación de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  en los cloroplastos (Römheld y Marschner, 1986). Las peroxidasas al igual que las catalasas favorecen la eliminación de  $H_2O_2$  en cloroplastos y además catalizan la polimerización de fenoles para la biosíntesis de lignina en la rizodermis y endodermis de las raíces (Marschner, 1995; Nikolic y Römheld, 1999 y López-Millán *et al.*, 2000). Tanto en las catalasas como en las peroxidasas el Fe se encuentra en estado férrico

y frente a condiciones de deficiencia de Fe muestran una actividad reducida (Loué, 1988). Por último, la leghemoglobina está implicada en el proceso de fijación de nitrógeno (Marschner, 1995).

Los sistemas enzimáticos no hémicos se caracterizan porque el Fe está unido a un grupo tiol de S cisteína o con S inorgánico formando enlaces Fe-S o con ambos (Röhmeld y Marschner, 1986). Una de las proteínas más importantes de este grupo hemático no porfírico es la ferredoxina, que es una ferroproteína que se encuentra dentro de los cloroplastos y actúa como aceptor final de electrones en un gran número de procesos metabólicos como la fotosíntesis, la reducción de nitrato y sulfato y la fijación del nitrógeno atmosférico (Loué, 1988 y Marschner, 1995).

En hojas con deficiencia de Fe, tanto el contenido de ferredoxina como de clorofila disminuyen en un grado similar, la disminución en el nivel de ferredoxina está asociada con una actividad más baja de nitrato de reductasa (Ortega-Maldonado *et al.*, 2014).

La aconitasa es una enzima no hémica (hemídica) que cataliza la isomerización de citrato a isocitrato en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Marschner, 1995). En plantas con deficiencia de Fe se observa que la actividad de la aconitasa es baja y las reacciones en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos se ven afectadas (Ortega-Maldonado *et al.*, 2014).

La deficiencia de hierro provoca alteraciones en el metabolismo de las purinas, lo que produce una acumulación de riboflavina debido al daño ocasionado a la enzima xantina oxidasa (Schkee *et al.*, 1968). La riboflavina es una vitamina necesaria para el desarrollo de las raíces ya que reduce la cantidad de auxina. La cantidad de riboflavina en plantas deficientes de Fe es 200 veces más elevada que en plantas que crecen en medios con suficiencia de este elemento (Welkie y Miller, 1989)

Existe otras enzimas en las cuales el Fe está implicado como componente metálico, en reacciones redox o como un elemento de unión entre la enzima y al sustrato. Las lipoxigenasas regulan la peroxidación de lípidos (linólico y linolénico), por lo que están implicadas en la senescencia celular y en la resistencia a las enfermedades (Marschner, 1995). En las hojas de plantas con deficiencia de Fe, la actividad lipoxigenasa y contenido de clorofila se encuentran relacionados estrechamente y presentan una correlación positiva, indicando la posibilidad de una asociación de la enzima con membranas tilacoidales (Hille,

2006). El hierro también activa enzimas como el ácido aminolevulínico sintetasa y la coproporfirinógeno oxidasa (Ortega-Maldonado *et al.*, 2014).

El hierro juega un papel importante en el metabolismo de los ácidos nucleicos y en particular en la síntesis de ARN por acción de la ribonucleótido reductasa en los núcleos y sobre todo en el citoplasma y en los ribosomas (Loué, 1988). En condiciones de deficiencia de Fe se observa una drástica disminución del número de ribosomas y un aumento de la concentración de aminoácidos libres tanto en raíces como en las hojas cloróticas, sobre todo arginina, asparagina, glutamina, aspartato y glutamato (Loué, 1988), que dan lugar a un aumento en la síntesis tanto de proteínas como de ARN (Schmidt, 2003).

Por último, el Fe es un constituyente de la nitrato reductasa. Este enzima altamente regulada, que cataliza la reducción de nitrato a nitrito mediante NAD(P)H, consta de un polipéptido de aproximadamente 100 kD, un FAD, una molibdopterina y un Fe-hemo (Campell, 1999).

### **Clorosis férrica**

La clorosis férrica es una alteración nutricional de algunos suelos ocasionada por la baja disponibilidad del hierro en para el consumo de las plantas. Esta deficiencia tiene un efecto negativo en la fotosíntesis, respiración y en la división celular y por lo tanto en el crecimiento de la planta. Además, la baja disponibilidad de hierro provoca la reducción de la fotosíntesis y acumulación de materia orgánica (Chaney, 1984) debido al descenso de la capacidad de redistribución del hierro desde las hojas adultas u otros órganos hasta las zonas de crecimiento dentro de la planta lo que ocasiona un descenso general en la productividad de los cultivos (Donnini *et al.*, 2009).

La falta de hierro afecta el crecimiento y desarrollo de los nuevos órganos de la planta. Los brotes nuevos suelen ser de un tamaño reducido y con menor vigor, se producen también entrenudos más cortos y hojas de menor tamaño (Chaney, 1984). En casos avanzados de clorosis férrica, las hojas pueden presentar zonas necróticas, especialmente en los bordes foliares (Fernández López *et al.*, 1994) lo que conlleva a la defoliación prematura de los brotes y posteriormente la muerte progresiva de los mismos, comenzando por la zona apical. En algunos casos puede llegar a la muerte del árbol (Asín *et al.*, 2007).

En hojas deficientes en Fe se presentan cambios en la estructura interna como en la superficie de las hojas, estos cambios pueden ser típicos de cada especie y afectan principalmente a los cloroplastos y la estructura de los tilacoides que se apilan de manera desordenada y con escaso desarrollo de la grana; además se afecta el grosor de los parénquimas de empalizada y esponjoso por cambios en las dimensiones de las células (Abadía *et al.*, 2002; Donnini *et al.*, 2009 y Ortega-Maldonado *et al.*, 2014).

En términos generales, la deficiencia de hierro se reconoce por hojas cloróticas o amarilleamiento en las zonas intervenosas sobre todo en las hojas jóvenes, extendiéndose al resto de parte aérea conforme la clorosis progresa (Figura 9), esto debido a la disminución de la concentración de pigmentos fotosintéticos como la clorofila (Fernández López *et al.*, 1994; Abadía *et al.*, 2002 y Martínez Cuenca, 2012)



**Figura 9. Individuos afectados por clorosis férrica con hojas amarillentas. A) Los síntomas de la clorosis férrica comienzan a ser evidentes en las hojas más jóvenes con amarilleamiento intervenal. B) Las hojas afectadas presentan una tonalidad amarilla casi por completo.**

Esta condición fisiológica se presenta sobre todo en regiones con tierras calizas, que tienen altas concentraciones de carbonato cálcico, pH básico y con clima árido o semiárido. Esta situación se ve agravada tras largos periodos de lluvia que ocasionan una disminución en los niveles de oxígeno debido al encharcamiento (Römheld y Marschner 1986 y Marschner, 1995).

## **Factores que afectan la incidencia de clorosis férrica en las plantaciones**

A pesar de que el hierro se encuentra en grandes cantidades en la corteza terrestre, la deficiencia de hierro en los cultivos se presenta con frecuencia como consecuencia de una mala asimilación de este elemento agravada por factores externos que influyen en el suministro, absorción, transporte y metabolismo del hierro (Loué, 1988). Estos factores incluyen las propiedades físicas y químicas del suelo (suelos inundados, compactación del suelo), las condiciones ambientales (altas temperaturas), las prácticas culturales (manejo del suelo, carga excesiva de frutos) así como la genética de las plantas entre otros (Chaney, 1984; Abadía *et al.*, 2002 y Donnini *et al.*, 2009).

### ***Propiedades físicas y químicas del suelo involucradas en la incidencia de clorosis férrica***

*Estructura del suelo.* La estructura del suelo juega un papel importante para la penetración de las raíces de las plantas, la recirculación del aire y del agua, y la actividad microbiana del suelo, y puede ser por sí misma causante de la clorosis férrica. Un suelo con estructura deficiente, con pobre aireación y exceso de humedad provoca la acumulación de bicarbonatos (Inskeep y Bloom, 1986) de acuerdo con la siguiente reacción:



En estas condiciones, se reduce la cantidad de iones ferrosos a la mitad, debido a la formación de hidróxidos férricos, mientras que aumenta la cantidad de iones de calcio, manganeso, aluminio y sulfatos (Inskeep y Bloom, 1986). Los óxidos de hierro, tienen poder cementante lo que influye en la estructura de los suelos (Schwertmann y Taylor, 1989).

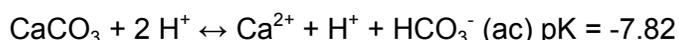
Por el contrario, si la aireación y estructura del suelo son satisfactorias, el CO<sub>2</sub> puede liberarse y entonces se evita la acumulación de bicarbonatos (Fernández López *et al.*, 1994).

*Contenido de arcillas.* El Fe estructural constituye aproximadamente un 2 % del peso de algunas arcillas, por lo que se puede considerar como una fuente adicional de Fe (Cañasveras Sánchez, 2014). Sin embargo, en suelos con contenido alto de arcillas, los iones Fe<sup>3+</sup> no cristalinos que presentan el mismo tamaño que estas, pueden quedar secuestrados en la superficie de las mismas y permanecer fuertemente unidos a ellas o como hidróxidos de Fe intersticiales dentro de ellas, dificultándose así su disponibilidad y absorción (Loeppert 1988 y Cañasveras Sánchez, 2014).

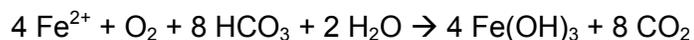
*Encharcamiento de suelos.* El encharcamiento de suelos restringe la difusión de O<sub>2</sub> produciendo condiciones anaeróbicas que disminuyen la rapidez del metabolismo de la raíz y la captación de iones. Además se produce la acumulación de dióxido de carbono y la formación de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> que, en conjunto con otros ácidos orgánicos débiles, comienzan a regular el pH. En consecuencia el intervalo del pH de suelos con drenaje deficiente es más reducido que el de suelos con buen drenaje (Bohn *et al.*, 1993).

En suelos calizos arcillosos se produce la compactación del suelo y la impermeabilización de las capas superficiales a casusa de un exceso de humedad, lo que propicia la acumulación de bicarbonato (Bohn *et al.*, 1993).

*Presencia de carbonatos y bicarbonatos.* Los suelos calizos se caracterizan por el alto contenido de Ca<sup>2+</sup> en la disolución del suelo, altas concentraciones de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y pH elevado. La caliza del suelo está en equilibrio con el Ca<sup>2+</sup> soluble, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y CO<sub>2</sub> de la disolución del suelo (Lindsay, 1979). En muchos estudios se considera la concentración de iones HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> como el parámetro más determinante en la inducción de clorosis férrica (Fernández López, *et al.*, 1994; Nikolic y Römheld, 1999 y Lucena *et al.*, 2009). En suelos calizos y alcalinos, suele presentarse la hidrólisis del carbonato cálcico (Lindsay, 1979; Fernández López *et al.*, 1994 y Loeppert *et al.*, 1994) lo que genera normalmente altas concentraciones de ion bicarbonato controlado por la siguiente reacción:



Esto hace que en la mayoría de los suelos calizos el pH oscile entre 7.5 y 8.5. En suelos con presencia de NaHCO<sub>3</sub> disuelto el pH llega a alcanzar valores superiores a 9 (Lindsay, 1974; Fernández López, *et al.*, 1994 y Loeppert *et al.*, 1994). A estos valores de pH, la concentración de Fe soluble es bastante baja porque en presencia de bicarbonato puede formarse hidróxido férrico (Lindsay, 1979), mediante la reacción:

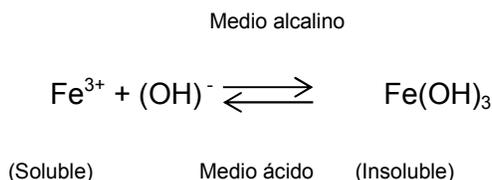


El hidróxido férrico es la forma termodinámicamente más estable del hierro presente en suelos, sin embargo, es la menos soluble e induce la disminución de la capacidad de absorción y transporte del hierro por parte de las plantas, sobre todo aquellas que son sensibles a clorosis férrica (Lindsay, 1979 e Inskeep y Bloom, 1986).

*Influencia del pH.* La disponibilidad de hierro en el suelo depende del pH del medio, bajo condiciones alcalinas, la concentración de Fe libre en el suelo es inferior a  $10^{-20}$  M, mientras que los niveles requeridos por la planta son mayores, entre  $10^{-9}$  y  $10^{-4}$  M (Cañasveras Sánchez, 2014). La solubilidad del Fe en el suelo aumenta 1000 veces por cada unidad que disminuye el pH (Lindsay, 1995 y Kim y Guerinot, 2007), una disminución de pH de 8.0 a 4.0 podrá incrementar la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  de  $10^{-20}$  a  $10^{-8}$  M (Röhmheld y Marschner, 1986).

Dependiendo la especie de hidrólisis del  $\text{Fe}^{3+}$  en el suelo, la actividad de solubilización aumenta o disminuye de acuerdo con el pH (Figura 14). Para valores de pH entre 7.0 y 9.0,  $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , y  $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$  son las especies predominantes y en conjunto la concentración de Fe soluble no excede de  $10^{-10}$  mol/L o 5.6 ppt en este rango de pH (Fernández López *et al.*, 1994 y Lindsay, 1995).

La solubilidad del Fe está relacionada con el pH del suelo, según la siguiente reacción reversible:



Por el contrario, en suelos con pH bajos y con exceso de humedad, disminuye la concentración de óxidos férricos y provoca el exceso de Fe(II). Una absorción excesiva de  $\text{Fe}^{2+}$  puede provocar toxicidad a la planta, presentándose síntomas como ennegrecimiento de los ápices radiculares, inhibición del crecimiento de la raíz y marcas necróticas en las hojas (Schmidt, 2003). Esto debido al estrés oxidativo inducido por la generación de radicales libres por las reacciones de Fenton (Fernández López, *et al.*, 1994).

*Potencial Redox del suelo.* Las altas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en el suelo perjudica la activación de los mecanismos de respuesta de la planta a la deficiencia de hierro. La alcalinización reduce la secreción de compuestos fenólicos y se neutralizan los protones liberados por las raíces, disminuyendo su capacidad reductora (Röhmheld y Marschner, 1986; Nikolic y Röhmheld, 1999 y Lucena *et al.*, 2009) mediante la inhibición de la actividad de la enzima Fe-quelato reductasa (FQ-R) (Alcántara *et al.*, 2012) por lo que también disminuye la

absorción y translocación del Fe desde la raíz hasta la parte aérea de las plantas (Cañasveras Sánchez, 2014).

*Contenido en materia orgánica y formación de complejos orgánicos.* En el suelo existen distintos compuestos orgánicos capaces de combinarse con el hierro para formar complejos orgánicos o quelatos, los cuales son importantes para el consumo y secuestro de hierro por parte de las plantas (Cañasveras Sánchez, 2014).

La presencia de complejos naturales con la materia orgánica aumenta la concentración de hierro en la disolución del suelo, proporcionando una mayor solubilidad, movilidad y disponibilidad del hierro para los vegetales (Lindsay, 1974 y Fernández López *et al.*, 1994). Estos compuestos pueden provenir tanto de la transformación de la materia orgánica presente en los suelos (ácidos húmicos y fúlvicos) como de compuestos exudados por las raíces de las plantas (fitosideróforos) y por los microorganismos del suelo (sideróforos) (Loué, 1988). Sin embargo, la presencia en exceso de estos compuestos puede ocasionar que el hierro quede fijado en compuestos húmicos poco solubles (Sanz y Montañés, 1997).

*Interacción con otros elementos.* La absorción de hierro está influenciada también por la presencia de otros microelementos que compiten con él, sobretodo  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Zn^{2+}$ , los cuales son capaces de desplazar al Fe de los quelatos del suelo favoreciendo así la aparición de clorosis férrica (Römheld y Marschner, 1986 y Lindsay, 1995). La presencia y concentración de estos metales también puede inhibir el funcionamiento de la FQ-R de la raíz (Fernández López *et al.*, 1994).

El  $Na^+$  también compite con el Fe en la formación de agentes quelantes. Además la presencia de altos niveles de  $Na^+$  y  $K^+$  junto con bajos de  $Ca^{2+}$ , degradan la estructura del suelo reduciendo su aireación y alterando las relaciones suelo-agua (Loeppert *et al.*, 1994).

El exceso de Mn en el suelo en relación al Fe induce síntomas de clorosis férrica debido a que Mn compite con el Fe por los sitios de absorción y en algunas actividades enzimáticas sobre todo en localizaciones metabólicas ocupadas normalmente por Fe (Loué, 1988).

La interacción entre el potasio y el hierro no está del todo clara y presenta aspectos contradictorios. Por un lado se ha observado que los órganos cloróticos suelen presentar

elevados contenidos de K. Por otro lado, la deficiencia de K es a veces considerada como susceptible de favorecer o acompañar a la clorosis férrica (Loué, 1988).

En una planta deficiente en K y Fe, la clorosis se incrementa con el aumento de la absorción de potasio (Loué, 1988) Sin embargo, la aplicación de abonos potásicos favorece la excreción de  $H^+$ , acidificando la rizósfera y la absorción de Fe (Barak y Chen, 1984 y Loeppert, 1988).

Otro efecto favorable del potasio sobre el Fe, es el aumento de la movilidad del Fe dentro de la planta debido al aumento de la cantidad de ácido cítrico (Loué, 1988).

La interacción entre el fósforo y el hierro en suelos calizos donde el contenido de fosfatos suele ser alto es uno de los principales factores que favorecen la clorosis férrica. Las principales interacciones fósforo-hierro se observan en la precipitación de fosfato de Fe, la interferencia en la reducción de  $Fe^{3+}$  en los quelatos y la inmovilización de Fe dentro de la planta (Cañasveras Sánchez, 2014).

### ***Factores ambientales y prácticas culturales que favorecen la aparición de clorosis férrica***

Las bajas temperaturas producen la inhibición del crecimiento radicular, lo cual afecta la absorción de Fe (Chaney, 1984). Además, la combinación de las altas temperaturas con el encharcamiento de suelos favorece el aumento de la concentración de  $CO_2$  lo que dificulta la actividad enzimática relacionada con la absorción de Fe por parte de las raíces de las plantas (Inskeep y Bloom, 1986).

En plantas o cultivos bajo condiciones de agricultura de ambiente controlado, la deficiencia de hierro se debe al bajo contenido de hierro en la solución nutritiva como consecuencia de la falta de quelatos de hierro u ocasionalmente al inadecuado control del pH de la solución nutritiva (Prado y Alcántara-Vara, 2011). El exceso de riego y las enmiendas orgánicas también pueden reducir la absorción de Fe (Röhmeld y Marschner, 1986; Lucena *et al.*, 2009 y García-Serrano Jiménez *et al.*, 2009).

Por último, las plantas alimentadas con nitrógeno nítrico absorben mayor cantidad de aniones  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$  que de cationes  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^+$ , lo que provoca una liberación de  $OH^-$  por las raíces para mantener la neutralidad (Loué, 1988 y Fernández López *et al.*, 1994;

Lucena, 2009 y Cañasveras Sánchez, 2014). Estos  $\text{OH}^-$  en presencia de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CO}_2$  forman  $\text{HCO}_3^-$  lo que favorece la aparición de clorosis (Fernández López *et al.*, 1994).

### ***Mecanismos de adaptación y genética***

Otro factor que interviene en la aparición de la clorosis férrica es el genético, debido a la alta sensibilidad que presentan algunas plantas de padecer esta enfermedad en condiciones de baja solubilidad de hierro en el suelo. En una misma especie vegetal, pueden existir variedades, incluso individuos y/o genotipos que pueden desarrollar en mayor o menor medida mecanismos de adaptación para aumentar su capacidad para adquirir Fe de la disolución del suelo (Mengel y Kirkby, 2001).

Las respuestas fisiológicas que intervienen en el proceso de recuperación de las plantas dicotiledóneas ante la deficiencia de hierro están reguladas por ciertos genes (Figura 10). La enzima  $\text{H}^+$ -ATPasa, responsable de la acidificación de la rizósfera en condiciones de deficiencia de Fe, está regulada por una familia de genes denominada HA, entre ellos el AHA1 que se regula en respuesta a esta deficiencia (Gonzalo *et al.*, 2011 y Li *et al.*, 2015).

Recientemente, se han aislado genes que codifican la expresión de la enzima quelato reductasa (FRO1 y FRO2), cuyos transcritos se acumulan en respuesta a la deficiencia de Fe (Wu *et al.*, 2005; Gonzalo *et al.*, 2011 y Martínez Cuenca, 2012). Otro gen implicado en la respuesta ante la deficiencia de hierro es el que codifica la expresión del transportador férrico IRT (Wang *et al.*, 2002; Gonzalo *et al.*, 2011 y Martínez Cuenca, 2012).

En especies frutales como *Prunus* se ha descrito la actividad de estos genes bajo condiciones de deficiencia de hierro (Gonzalo *et al.*, 2011).

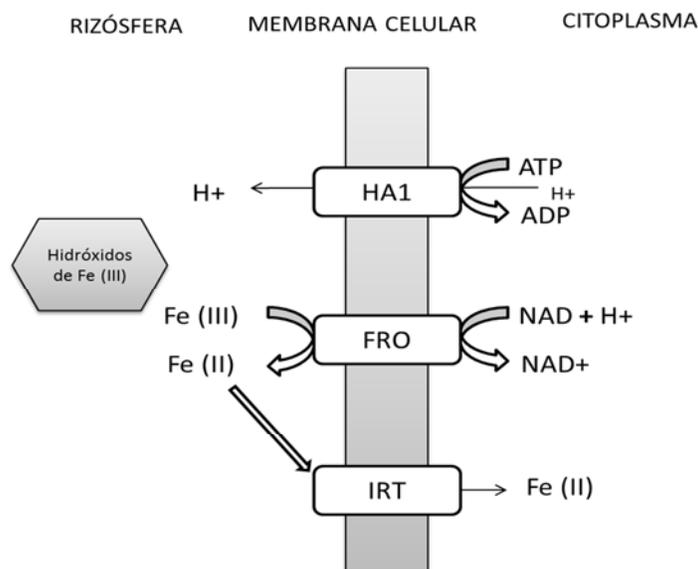


Figura 10. Genes involucrados en la respuesta ante la deficiencia de hierro en plantas dicotiledóneas (Fuente: elaboración propia).

### Prevención y corrección de la clorosis férrica en cultivos

La prevención y corrección de la clorosis férrica en cultivos sobre suelos calcáreos es difícil y costosa. Los métodos más aceptados o utilizados para combatir la deficiencia de hierro en los cultivos es la aplicación de hierro foliar mediante pulverización de sales inorgánicas sobre las hojas y la aplicación de quelatos de hierro directamente al suelo (Orera *et al.*, 2009 y García-Serrano *et al.*, 2009 y Lucena *et al.*, 2009).

La aplicación foliar de compuestos de Fe o acidificantes (ácido ascórbico, ácido cítrico) consiguen resultados más rápidos en la corrección de clorosis con un reverdecimiento local de la parte tratada coincidiendo con los puntos de impacto del producto (Tagliavini *et al.*, 2000; Lucena *et al.*, 2009 y García-Serrano *et al.*, 2009). Esta fertilización foliar es una técnica basada en la capacidad de absorción de productos químicos por la hoja, y concretamente la absorción del Fe ocurre a través de los estomas mientras la hoja se mantiene húmeda (Pestana *et al.*, 2003 y García-Serrano *et al.*, 2009). Con esta técnica se evitan los efectos inhibidores del bicarbonato sobre la absorción y el transporte de Fe en suelos calizos (Pestana *et al.*, 2003), se emplea menor cantidad de fertilizante y se favorece la mayor penetración del Fe aplicado (Fernández López *et al.*, 1994). Estas disoluciones foliares deben contener como único elemento Fe para evitar los efectos antagonistas de la aplicación junto con otros micronutrientes, pero si se aplican grandes cantidades de producto

se pueden producir quemaduras en las hojas (Pestana *et al.*, 2003) y existe el riesgo de toxicidad, además no se logra una distribución homogénea en todas las hojas y tiene un bajo efecto residual ya que no actúa sobre las hojas que nacen después de la aplicación del tratamiento, por lo que hay que repetir el tratamiento durante el ciclo de la planta (Fernández López *et al.*, 1994; García-Serrano *et al.*, 2009 y Prado y Alcántara-Vara, 2011).

En cultivos leñosos o frutales, sobre todo cuando el problema se observa parcialmente en algunas zonas de la plantación, se puede corregir la clorosis férrica mediante la inyección al tronco de compuestos tanto sólidos como disoluciones (sulfato ferroso, nitratos, citratos, quelatos, etc.) (Pestana *et al.*, 2003 y García-Serrano *et al.*, 2009). Con esta técnica la aplicación de hierro se realiza directamente en el xilema de la planta ocasionando el menor daño posible, su efecto es más duradero pero requiere una mano de obra especializada y costosa. Estas aplicaciones en frutales deben realizarse en la época invernal aprovechando el letargo de los árboles (Fernández López *et al.*, 1994).

La aplicación de quelatos de Fe al suelo es la técnica más extendida entre los agricultores para solucionar el problema de la clorosis férrica ya que son una fuente de Fe muy eficaz (Álvarez-Fernández *et al.*, 2005 y García-Serrano *et al.*, 2009). Sin embargo estos productos suelen ser bastante caros y su uso suele estar limitado a campos con alta productividad, ya que representan el 60 % del total del costo de los fertilizantes, son fácilmente lavables (Pestana *et al.*, 2003 y Prado y Alcántara-Vara, 2011) y los resultados son a corto plazo, lo que implica tener que aplicarlos varias veces al año. Además no siempre garantiza la ausencia de síntomas de clorosis férrica y su consecuente reducción de las producciones ya que del 30 al 35 % de los análisis de hojas muestran niveles bajos de hierro (Asín *et al.*, 2007). Por otra parte, los quelatos de Fe pueden producir desordenes nutricionales en la planta ya que pueden quelatar el Mn y reducir así la toma de este elemento por la planta (Pestana *et al.*, 2003).

La lista de productos comerciales existentes para la corrección de clorosis férrica mediante la acción de complejos quelantes es larga. Algunos de ellos contienen como principio activo complejos de Fe formados con EDDHA, DTPA y CDTA que son capaces de mantener grandes cantidades de Fe solubilizado en el rango de pH de 7.0 a 9.0, rango en el cual se presentan los problemas de deficiencia de hierro más importantes, siendo FeEDDHA (etilendiamino-di-o-hidroxifenilacetato férrico) y FeEDDHMA (etilendiamino-di-o-hidroxi-p-

metilfenilacetato férrico) los más efectivo en suelos calcáreos (Fernández López *et al.*, 1994; Pestana *et al.*, 2003; Lucena *et al.*, 2009 y García-Serrano *et al.*, 2009).

Los complejos formados con EDTA y HEDTA son débilmente estables a pH mayores que 6.5, debido a que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en grandes concentraciones puede desplazar al  $\text{Fe}^{3+}$  de los quelatos menos estables, formándose el quelato cálcico correspondiente y precipitando el óxido férrico, lo que indisponibiliza el Fe aportado (Fernández López, *et al.*, 1994). Por último EGTA, NTA, CIT y OX no son efectivos a pH superiores a 7 (Lindsay, 1979; Chen y Barak 1982; Fernández López *et al.*, 1994; Álvarez-Fernández *et al.*, 2005 y Lucena *et al.*, 2009).

## OBJETIVOS

El objetivo general, en el que se enmarca el presente trabajo, es la obtención de un nuevo patrón para peral, adaptado a las condiciones edáficas y climáticas de Catalunya, la cuenca Mediterránea, y las áreas de nuestro planeta con suelos calcáreos, que resuelva conjuntamente los problemas de clorosis férrica, vigor e incompatibilidad.

Los objetivos específicos de los diferentes capítulos de esta investigación se señalan a continuación:

Capítulo 1. Selección de patrones de peral resistentes a clorosis férrica en campo. Obtención, multiplicación y selección *in vitro*:

- Seleccionar y caracterizar selecciones avanzadas propias de patrones híbridos de peral, con base en su comportamiento agronómico en campo y a las respuestas fisiológicas *in vitro* frente a la clorosis férrica.
- Introducir y propagar *in vitro* nuevas accesiones del género *Pyrus* spp., como futuros parentales para generar nuevos híbridos.
- Resolver la propagación *in vitro* de los individuos seleccionados, tanto si son selecciones avanzadas como nuevas accesiones, para asegurar su posterior evaluación agronómica con repeticiones en campo.

Capítulo 2. Evaluación de las respuestas fisiológicas de las raíces a la deficiencia de hierro inducida para la selección de individuos resistentes a clorosis férrica *in vitro*

- Determinar las respuestas fisiológicas *in vitro* que mejor se correlacionan y prevén la tolerancia a clorosis férrica observada en campo.
- Seleccionar clones que muestren las respuestas fisiológicas *in vitro* de mayor interés.

Capítulo 3. Nutrición y respuestas fisiológicas, bioquímicas y de estrés oxidativo ante deficiencia de hierro inducida.

- Analizar las respuestas nutricionales y de estrés oxidativo inducida por la privación de hierro en individuos seleccionados.

- Caracterizar el perfil de los individuos seleccionados a partir de los resultados obtenidos durante los análisis.

#### Capítulo 4. Fluorescencia de la clorofila

- Analizar la actividad del aparato fotosintético de los individuos bajo condiciones de deficiencia de hierro.

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que la mayoría de plantaciones de peral emplean diferentes selecciones de membrillero como patrón (fundamentalmente BA-29 y en menor medida MA), los cuales presentan una alta sensibilidad a la clorosis férrica y un mayor riesgo de incompatibilidad con el peral, y que la única alternativa es el uso de patrones *Pyrus* (clonales o francos) que son resistentes a clorosis y sin problemas de compatibilidad, pero presentan otros problemas más graves como un vigor excesivo y una menor productividad, se busca obtener un patrón adaptado a las condiciones de cultivo de la zona en estudio (la cual presenta altas temperaturas, bajas humedades, y suelos calcáreos) que uniera los beneficios de los membrilleros y perales empleados, pero que a su vez no presente sus inconvenientes.

La obtención de un patrón adaptado a las condiciones de cultivo de la zona en estudio podría suponer una importante reducción de gastos. Teniendo en cuenta que existen aproximadamente más de 23 000 ha de peral en España (Iglesias *et al.*, 2015 y Prognofruit, 2016) y haciendo la proyección de que en un futuro se mantuviese la misma superficie dedicada al peral y se empleasen patrones adaptados a las condiciones de cultivo de la zona en estudio, se podría reducir el empleo de quelatos de hierro (hasta 5.200.000 €/año) y/o de fitohormonas para reducir el vigor y mejorar la productividad (hasta 15.600.000 €/año).

# **CAPÍTULO 1. Selección de patrones de peral resistentes a clorosis férrica en campo. Obtención, multiplicación y selección *in vitro***

## **1.1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1.1. El problema de la clorosis férrica en frutales**

La clorosis férrica es una alteración nutricional que afecta a una gran parte de los cultivos de interés económico en la zona del mediterráneo, tanto hortícolas como frutales, limitando su crecimiento y ocasionando grandes pérdidas económicas (Sanz y Montañés, 1997; Tagliavini, y Rombolà 2001). Esta anomalía fisiológica ocasiona una disminución en el tamaño del fruto y un retraso en su maduración (Tagliavini et al., 1995) ocasionando también la reducción de la adquisición de hierro por parte de los humanos (Sanz y Montañés, 1997 y Prado y Alcántara-Vara, 2011).

Los principales cultivos afectados por este desorden nutricional son el melocotón (Gonzalo *et al.*, 2011), el peral (Asín *et al.*, 2007; Iglesias *et al.*, 2004 y Dolcet e al., 2004) (Figura 11), el membrillero (Bunnang *et al.*, 1996) y el kiwi (Tagliavini et al., 1995). En menor medida, este problema también se presenta en frutales como olivo (Alcántara *et al.*, 2003), limón (Hellín *et al.*, 1995) y otros cítricos (Kobayashi *et al.*, 2005 y Martínez Cuenca, 2012).



**Figura 11. Árbol de peral afectado por clorosis férrica.**

La incidencia de clorosis férrica en frutales en el área del mediterráneo de la Unión Europea es un problema considerable debido a que presenta una gran superficie de suelos calcáreos. De hecho, un 39 % de los suelos cultivados en el mundo son calcáreos (FAO-STAT, 2017) y se consideran por lo tanto deficientes en Fe (Kim y Guerinot, 2007) En España, la presencia de suelos calcáreos se ha reportado principalmente en el Valle del Ebro, Andalucía y la Comunidad Valenciana (Fernández López *et al.*, 1994; Sanz y Montañés, 1997 y Asín *et al.*, 2007).

Los niveles altos de caliza activa producen un efecto tampón sobre el pH alto del suelo, neutralizando la respuesta acidificante que muestran las plantas en sus raíces y agravando más la baja disponibilidad de hierro en el suelo ocasionada por la precipitación de óxidos férricos insolubles. Así que la clorosis férrica típica de los suelos Mediterráneos no es consecuencia de una deficiencia del hierro en el suelo, sino por un desequilibrio fisiológico (Pestana *et al.*, 2003 y Asín *et al.*, 2007) que se asocia al carácter calizo y alcalino de los suelos y a las dificultades para reducir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ .

Los árboles bajo déficit de Fe ven afectada su producción de forma significativa ya que disminuye el cuajado de los frutos y la cantidad y calidad de los mismos (Tagliavini y Rombolà, 2001 y Pestana *et al.*, 2003).

Las especies leñosas difieren en su sensibilidad a la clorosis férrica, a través de diversos estudios se han reportado que algunos genotipos son capaces de mejorar la adquisición de este metal a través de la reducción enzimática de  $Fe^{3+}$  y la acidificación del apoplasto de la raíz, asociados con el incremento de la  $Fe^{3+}$  quelato reductasa (FQ-R) y la actividad de la  $H^+$ -ATPasa, respectivamente (Donnini *et al.*, 2009).

Una de las alternativas que se han utilizado para ofrecer una solución permanente al problema de la clorosis férrica es el desarrollo y uso de genotipos tolerantes a la baja disponibilidad de hierro en el suelo y con una mayor capacidad de absorción (Tagliavini y Rombolà, 2001; Gogorcena *et al.*, 2004 y Jiménez *et al.*, 2008).

En el caso de especies frutales la selección de estos genotipos tolerantes se realiza para la obtención de porta injertos, los cuales aportan suficiente Fe a la variedad injertada, reduciendo su nivel de clorosis. Sin embargo, los genotipos disponibles en la actualidad para algunas especies de frutales son poco atractivos desde el punto de vista agronómico ya que

suelen conferir un exceso de vigor, como es el caso de la uva (Tagliavini y Rombolà, 2001) y peral (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1992 y Asín *et al.*, 2007).

El peral es muy sensible a la clorosis férrica, sin embargo, existen diferencias en la susceptibilidad a la clorosis entre variedades de esta misma especie, por ejemplo, las variedades Abbé Fétel y Bartlett son más susceptibles que “Conference” y “Hardy” (Iglesias *et al.*, 2015).

Una característica evolutiva de los géneros pertenecientes a la subfamilia Maloideae, es el bajo nivel de divergencia entre géneros, lo que permite realizar injertos del tipo intergenérico entre ellos (Evans y Campbell, 2002). En el caso de los perales injertados, la susceptibilidad a clorosis férrica es mayor cuando el patrón es membrillero (Asín *et al.*, 2007 e Iglesias *et al.*, 2015).

### **1.1.2. Alternativas en el uso de portainjertos para la producción de pera**

En Europa, los programas de mejoramiento de portainjertos de peral han puesto un gran énfasis en mejorar la resistencia al frío y a la clorosis férrica (Asín, *et al.*, 2007). Anteriormente se dedicó mucho esfuerzo a mejorar los portainjertos de membrillo (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1991; Bunnang *et al.*, 1996 y Alcántara *et al.*, 2012), pero ahora se está enfocando al desarrollo de nuevos patrones *Pyrus*, ya que existe menos riesgo de incompatibilidad entre los injertos intragenéricos que entre los injertos intergenéricos, además algunas de las especies de *Pyrus* son más resistentes al frío, a las enfermedades, a la sequía y tienen mejor anclaje que los portainjertos de membrillo (Sanz y Montañés, 1997 y Asín, *et al.*, 2007).

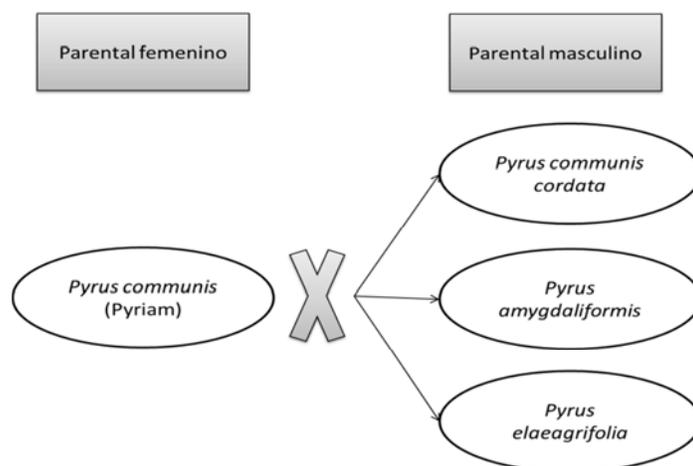
Los patrones *Pyrus* pueden ser francos, es decir, provenientes de semillas o bien, selecciones clonales. Algunos de ellos como *Pyrus communis* presentan resistencia al fuego bacteriano y compatibilidad con las variedades injertadas, además crecen bien en suelos calcáreos, sin embargo algunos de los inconvenientes que presentan estos patrones son un vigor excesivo y una lenta entrada en producción (Dalmau e Iglesias, 1999; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2004 e Iglesias *et al.*, 2004).

En España se están empleando fuentes genéticas de resistencia a clorosis férrica y de vigor reducido utilizando híbridos provenientes de cruzamientos inter específicos desarrollados en programas de mejoramiento del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de

Angers, en colaboración con el IRTA<sup>1</sup>, con características deseables para ambientes mediterráneos (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1992; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2004; Iglesias *et al.*, 2004 y Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2011).

El patrón Pyriam (una nueva selección de patrón *Pyrus communis*), seleccionado en el INRA, proveniente de una fecundación libre de la variedad Old Home se ha empleado como parental femenino. Pyriam se caracteriza por conferir a la variedad un vigor 10 % superior del patrón membrillero BA-29 pero menor que otros perales clonales (Asín *et al.*, 2007), es tolerante al fuego bacteriano, tiene buena aptitud para la multiplicación clonal, un porte recto y sin ramificación en vivero y no presenta problemas de incompatibilidad, además permite una entrada en producción rápida y caracterizada por un buen calibre del fruto (Simard y Michelesi, 2002; Asín *et al.*, 2007 e Iglesias *et al.*, 2015).

Los híbridos evaluados en este programa de mejora han sido obtenidos mediante la polinización de Pyriam con cuatro especies de origen mediterráneo: *Pyrus communis cordata*, *Pyrus amygdaliformis*, *Pyrus amygdaliformis* subespecie *persica* y *Pyrus elaeagrifolia* (Figura 12) (Lombard y Westwood, 1987 y Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2004). Estas especies se encuentran de manera natural en la zona mediterránea y se caracterizan por presentar tolerancia a clorosis férrica, sequía, veranos calurosos y suelos arenosos (Lombard y Westwood, 1987; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2008 y Asín *et al.*, 2011)



**Figura 12. Cruces realizados para la obtención de patrones de peral resistentes a clorosis férrica.**

<sup>1</sup> Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries

### **1.1.3. Multiplicación *in vitro* como herramienta para la propagación de patrones híbridos de peral**

En una plantación frutícola, el patrón influye en la variedad como en el tamaño del árbol, la productividad, el vigor y desarrollo del árbol, la rapidez en la entrada de producción, el tamaño, calidad y coloración de los frutos, precocidad en la maduración y la resistencia a agentes externos como factores limitantes del suelo (Asín, et al., 2007)

Los patrones utilizados en las plantaciones comerciales de pera se propagan sexual y asexualmente. Debido a que los portainjertos obtenidos por semillas se derivan de cultivares parentales que son altamente heterocigóticos (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1991), los patrones individuos genéticamente distintos, aunque son usualmente uniformes en muchas características importantes (Hancock y Lobos, 2008).

Debido al escaso éxito en el enraizamiento de esquejes de peral, este método de propagación asexual queda descartado. Una alternativa a esta limitación es el desarrollo de la micropropagación *in vitro* de estos patrones (Iglesias *et al.*, 2004 ).

Las técnicas de propagación y de regeneración *in vitro* se han desarrollado para una amplia gama de cultivares y genotipos de pera de élite, incluidos los de *P. communis* (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1991 e Iglesias *et al.*, 2004), *P. elaeagrifolia* Pallas (Aygün y Dumanoglu, 2015), *P. betulaeifolia* (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1991), *P. pyrifolia* (Lane et al. 1998) *P. syriaca* (Shibli *et al.*, 1997) y *C. oblonga* (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1991; Bunnang *et al.*, 1996 y Alcántara *et al.*, 2012).

Los explantes empleados en la mayoría de los trabajos de propagación *in vitro* son meristemas axilares o apicales de brotes procedentes de las plantas seleccionadas (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1992 y Claveria *et al.*, 2012). Los tejidos utilizados como explantes en la mayoría de los trabajos de regeneración *in vitro* han sido hojas, de las cuales la regeneración del brote se desarrolla a partir del callo producido en el sitio de la herida en aproximadamente 3-6 semanas. Los explantes se exponen generalmente a períodos luz/oscuridad de 2 a 4 semanas (Hancock y Lobos, 2008).

Las hormonas más comunes empleadas han sido thidiazuron (TDZ) y ácido naftalenoacético (NAA). Las tasas máximas de regeneración varían de < 20% en *P. pyrifolia* (Lane et al., 1998) a > 80% en *P. communis* (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1991; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2004 y

Claveria et al., 2012) y *C. oblonga* (Dolcet-Sanjuan et al., 1991; Bunnang et al., 1996 y Alcántara et al., 2012). Palombi et al. (2007) han utilizado la regeneración *in vitro* de la pera silvestre (*P. pyraeaster*) para generar variantes somaclonales con una mayor adaptabilidad a los suelos calcáreos.

Los tratamientos selectivos implican la utilización de medio Murashige y Skoog (MS) con Fe-EDTA sustituido por cantidades equimolares de FeSO<sub>4</sub> con KHCO<sub>3</sub> o NaHCO<sub>3</sub>. A partir de este trabajo, se obtuvieron once líneas tolerantes a partir de los ápices vegetativos (Hancock y Lobos, 2008), como en el caso del membrillero (Dolcet-Sanjuan et al., 1992). Sin embargo el nivel de tolerancia a clorosis férrica seleccionado *in vitro* en algunos variantes somaclonales, no es suficiente para que los mutantes sean utilizados comercialmente en las producciones comerciales de pera (Dolcet-Sanjuan et al., 1992 y Bunnang et al., 1996).

Por último, la modificación genética utilizando técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos pueden complementar los esquemas tradicionales de hibridación y selección. Tales manipulaciones pueden ser particularmente ventajosas para el mejoramiento de árboles frutales debido a su larga fase juvenil y su alta heterocigosidad las cuales complican los programas de mejora convencionales. Por otra parte, en la medida que los principales árboles frutales y patrones sean propagados clonalmente, el germoplasma puede ser rápidamente multiplicado, evaluado en plantaciones y comercializado (Dolcet-Sanjuan et al., 1992 y Bunnang et al., 1996).

#### **1.1.4. Antecedentes del proyecto**

A partir de 1998 se desarrolló un plan de trabajo entre el IRTA y el INRA para la creación y selección de un patrón de peral resistente a clorosis férrica y de vigor reducido mediante cruzamientos inter específicos entre *Pyrus communis* (Pyriam) y cuatro especies del género *Pyrus* de origen mediterráneo tolerantes a clorosis férrica (Figura 13).

El programa consiste de tres fases diferenciadas: 1) Fase de introducción, 2) fase de preselecciones y 3) fase de selecciones.

**Fase de introducción.** El objetivo es seleccionar individuos que no presenten síntomas de clorosis férrica y un vigor inferior al 75 % del membrillero BA-29.

Los individuos introducidos provienen de las semillas generadas por los cruzamientos inter específicos y por tanto son híbridos entres dos especies. La plantación se realiza colocando un membrillero BA-29 a lado de cada individuo obtenido con la finalidad de realizar la comparativa sobre su comportamiento. Los individuos son injertados con Conference y se realizan tres evaluaciones, dos de clorosis mediante lectura de SPAD-502® y evaluación visual y una de vigor por comparación con el BA-29 (Asín *et al.*, 2007) para seleccionar aproximadamente 10-15 % de individuos que cumplan con los criterios de selección.

La evaluación visual considera ausencia de síntomas de clorosis férrica, con valores 0 o 1 según la escala Sanz y Montañés (1997) (Asín *et al.*, 2007).

Una vez seleccionados los híbridos se realiza un corte por debajo del punto de injerto donde se desarrollan los nuevos brotes a lo largo de la primavera, los cuales son introducidos *in vitro* para su multiplicación y para realizar el test *in vitro* de tolerancia a clorosis férrica.

**Fase de preselecciones.** El objetivo es seleccionar individuos que no presenten síntomas de clorosis férrica, un vigor inferior al 75 % del membrillero BA-29 y una aceptable entrada en producción.

Esta fase se realiza en una parcela del IRTA-Estació Experimental de Lleida, en Gimennells (Lleida), y en otra del IRTA- Estació Experimental Mas Badia, en (Girona) para poder observar el comportamiento de los individuos preseleccionados y obtenidos *in vitro* en condiciones edafoclimáticas y de cultivo diferentes. En este caso, en la plantación se introducen membrilleros BA-29 y EM-A como referentes para realizar la comparativa sobre el comportamiento de los individuos preseleccionados. Los individuos (4-8 árboles por individuo) son injertados con Conference. Se realizan las determinaciones de clorosis, vigor y entrada de producción, seleccionando los individuos que muestran mejor comportamiento en ambas localidades.

Los individuos seleccionados durante esta fase son también propagados *in vitro* para su multiplicación y para realizar el test *in vitro* de tolerancia a clorosis férrica. Los híbridos utilizados en el presente trabajo, son híbridos seleccionados en esta fase de preselecciones.

**Fase de selecciones finales.** El objetivo es la selección de individuos que presenten un comportamiento productivo y agronómico superior a membrilleros.

La selección final se realizará de manera similar a la fase de preselecciones, con la diferencia que en esta fase los árboles son injertados en vivero antes de ser plantados en campo, es decir, se plantarán árboles injertados de 1 año. En esta fase los árboles se conducirán de manera idéntica a una plantación frutal estándar y se realizarán medidas anuales del comportamiento productivo y calidad del fruto.

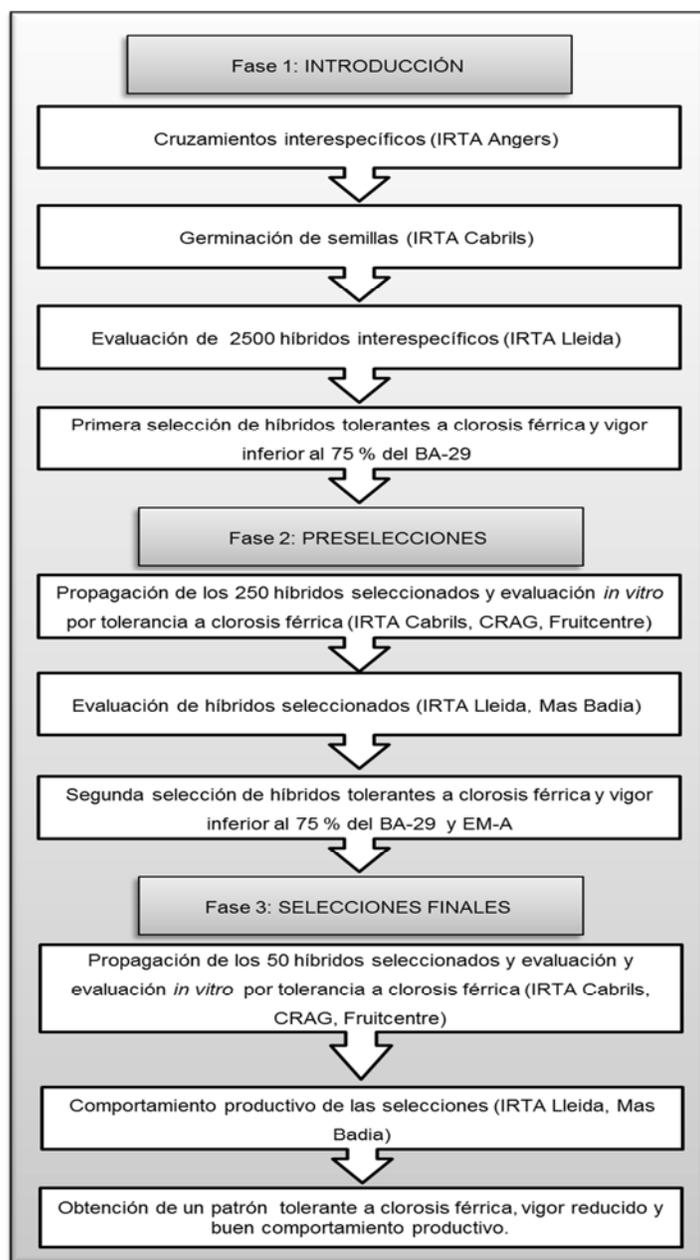


Figura 13. Plan de trabajo IRTA para la creación y selección de un patrón de peral resistente a clorosis férrica y de vigor reducido mediante cruzamientos inter específicos *Pyrus*.

En este trabajo se describen los experimentos conducidos para la propagación *in vitro* de algunos patrones híbridos de *Pyrus* provenientes de campo, en la fase de Preselecciones, así como el análisis de las respuestas fisiológicas de los individuos durante el ensayo *in vitro* de tolerancia a clorosis férrica y las respuestas presentadas frente a estrés oxidativo.

## **1.2. METODOLOGÍA**

### **1.2.1. Selección del material vegetal proveniente de campo**

El material vegetal utilizado en este trabajo proviene de individuos seleccionados en campo de la “Fase de Preselecciones”, los cuales mostraron resistencia a clorosis férrica en campo así como un vigor reducido (Figura 14). Estos individuos se encontraban en parcelas ubicadas en las fincas de la Estación Experimental Gimennells (Lleida) y Mas Badia (Girona).

Los individuos provenientes de campo se seleccionaron por la ausencia de síntomas de clorosis férrica mediante criterio visual con valores 0 o 1 según la escala Sanz y Montañés (1997) (Figura 15) así como por el nivel de clorofila en las hojas de la variedad Conference injertada sobre los patrones *Pyrus* obtenido mediante el uso del dispositivo de mano para la medición de clorofila Minolta SPAD-502®. Así mismo se consideró el vigor alcanzado por los árboles en comparación con los controles de membrillero BA-29 (Asín *et al.*, 2007). Las mediciones en campo para la selección de estos individuos se realizaron entre los años 2008 y 2009.

Los clones evaluados en este trabajo fueron introducidos *in vitro* anualmente desde el año 2012 hasta el año 2014 (Figura 16). Las cruas interespecíficas utilizadas en este experimento fueron las generadas en el INRA entre Pyriam (P2395) y cuatro especies *Pyrus*: *Pyrus communis cordata* (P256), *P. amygdaliformis* (P257), *P. amygdaliformis pérsica* (P264) y *P. elaeagrifolia* (P1588) y *P. communis* “Williams” (P415), este último como control ya que esta especie ha demostrado resistencia a clorosis férrica en campo.



Figura 14. Híbridos interespecíficos *Pyrus* en la fase de Preselecciones en campo. A) Híbridos seleccionados por su resistencia a clorosis férrica y vigor reducido, B) Híbridos descartados por presentar síntomas de clorosis férrica.



Figura 15. Comparación visual en campo para la selección de híbridos interespecíficos para ser introducidos en cultivo *in vitro*. A) la izquierda un patrón de *Cydonia* BA-29 con síntomas de clorosis férrica y a la derecha un patrón *Pyrus* sin síntomas visibles de clorosis férrica.

	2012	2013	2014
Cruzamiento	Códigos	Códigos	Códigos
P2395xP1588	111	55, 58, 110	135, 136, 137
P2395xP264	66, 99, 101, 103, 123, 129, 121, 150	102, 104, 105, 109, 114, 115	159, 161, 162, 165, 167
P2395xP256	32, 36, 38, 45, 83, 87	25, 88, 29	144
P2395xP257	250	74	170, 171, 172, 174, 175, 176, 179, 181
P415	12	11	

Figura 16. Códigos de los híbridos interespecíficos *Pyrus* seleccionados en campo en la fase de preselecciones, empleados en el presente estudio.

### 1.2.2. Establecimiento de cultivos *in vitro*

La multiplicación y enraizamiento *in vitro* se realizó siguiendo el método descrito por Dolcet-Sanjuan *et al.*, (1990).

**Fase de multiplicación.** El medio basal utilizado para la fase de multiplicación (PyM5BA) es el descrito por Murashige y Skoog en 1962, con la adición de sacarosa ( $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), tiamina-HCl ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), piridoxina-HCl ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Difco Bacto-Agar ( $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), se utilizó benciladenina (BA)  $5 \mu\text{M}$  como regulador de crecimiento para inducir el desarrollo vegetativo. El pH se ajustó a 5.7 antes de esterilizar el medio. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura de  $24\text{-}26^\circ \text{C}$  y con un fotoperiodo 16 h día/ 8 h noche ( $35 \text{ a } 75 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Los individuos seleccionados en campo fueron utilizados como fuente de material vegetal. De cada árbol seleccionado se tomaron brotes nuevos con yemas vegetativas activas, los cuales fueron utilizados como explantes para establecer el cultivo *in vitro*.

Los brotes fueron esterilizados sumergiéndolos en una solución de NaClO al 0.6 % (p/v) con Tween-20 0.1 % (v/v) por 10 min con tres lavados posteriores con agua destilada estéril. Los explantes fueron segmentados de 1 a 2 cm con 2 o 3 yemas axilares y se colocaron en tubos con 15 ml de medio de cultivo nutritivo PyM5BA.

Durante las primeras 12 semanas, los explantes fueron subcultivados semanalmente a medio fresco PyM5BA. Los brotes que presentaban contaminación fueron descartados, continuando así los subcultivos con los brotes sanos.

La multiplicación y ramificación de los brotes comenzó a las 16 semanas después de iniciado el cultivo. Para continuar la multiplicación de las plantas, los segmentos o brotes de 1 a 2 cm de longitud fueron transferidos cada 4 semanas a frascos con 100 ml de medio nutritivo fresco PyM5BA. Se transfirieron 10 segmentos a cada frasco posicionados horizontalmente sobre el medio.

Después de 5 o 6 subcultivos (36 a 40 semanas) la cantidad de plantas multiplicadas fue suficiente para continuar con el proceso de enraizamiento.

Para permitir la elongación de las plántulas antes de ser enraizadas se utilizó el método de doble fase para cultivo *in vitro* descrito en Iglesias et al., (2004), el cual consistió en añadir 50 ml de medio líquido PyM5BA a los frascos con las plántulas multiplicadas después de realizado el último subcultivo. Pasados 10 días se procedió a añadir 25 ml de medio líquido PyM0BA, el cual presenta las mismas características que el medio PyM5BA pero sin presencia de BA. Los cultivos fueron mantenidos a 24-26 ° C y con un fotoperiodo 16 h día/ 8 h noche (35 a 75  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

**Fase de enraizamiento.** Para inducir la formación de raíces se utilizó medio de cultivo PyR10IBA, medio con características similares al medio PyM0BA utilizado en la fase multiplicación, pero reduciendo la concentración de las sales MS y macronutrientes al 50 % y adicionando Fe-EDTA 10 mM y ácido indolbutírico (IBA) 10  $\mu\text{M}$  como regulador de crecimiento.

Los brotes nuevos que presentaron un tamaño de 3 a 4 cm y con hojas bien desarrolladas fueron separados y colocados en medio PyR10IBA por un periodo de 7 a 10 días. Posteriormente, las plántulas que habían desarrollado callo en la base del tallo fueron trasladadas a un medio de cultivo fresco PyR0IBA, medio con las mismas características que Py10IBA pero sin presencia de IBA (Iglesias *et al.*, 2004).

Para los híbridos que presentaron una baja tasa de enraizamiento se utilizó otra técnica basada en el uso de vermiculita para lograr el enraizamiento. En este caso se adicionó 50 ml

de vermiculita a medio a 100 ml PyR0IBA, la concentración de agar para este medio fue de  $3.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 1.2.3. Introducción *in vitro* de nuevas accesiones a partir de semilla y aclimatación de plántulas para utilizarlas como futuros parentales

En 2013 se introdujeron como fuente de nueva variabilidad genética semillas de 7 nuevas accesiones de las especies *Pyrus* (Tabla 1), provenientes del NCGR<sup>2</sup> Corvallis, Oregón, las cuales fueron propagadas con el objetivo de evaluar y seleccionar *in vitro* las más tolerantes a clorosis férrica.

Tabla 1. Nuevas accesiones *Pyrus* importadas del NCGR Oregon en forma de semilla.

Accesión	Código
<i>P. amygdaliformis</i> (PI 349022)	PA22
<i>P. amygdaliformis</i> (PI 349036)	PA36
<i>P. elaeagrifolia</i> (PI 541618)	PE18
<i>P. elaeagrifolia</i> (PI 541620)	PE20
<i>P. elaeagrifolia</i> (PI 541621)	PE21
<i>P. cordata</i> (PI 541586)	PC86
<i>P. cordata</i> (PI 541587)	PC87

El medio basal utilizado para iniciar el cultivo de las semillas es el descrito por Murashige y Skoog en 1962 con la adición de sacarosa ( $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), tiamina-HCl ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), piridoxina-HCl ( $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), Difco Bacto-Agar ( $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). El pH se ajustó a 5.7 antes de esterilizar el medio.

Las semillas fueron esterilizadas sumergiéndolas en etanol al 70 % por 2 minutos, seguido por una inmersión en una solución de NaClO al 70 % (v/v) con Tween-20 0.1 % (v/v) por 20 minutos con tres lavados posteriores con agua destilada estéril. Las semillas fueron

<sup>2</sup> National Clonal Germplasm Repository

diseccionadas para extraer el embrión, el cual fue colocado en tubos con 15 ml de medio de cultivo. Se colocaron 5 semillas de cada accesión por cada tratamiento.

Los cultivos fueron colocados en cámara fría a 4 °C en total oscuridad, para estimular la germinación de las semillas.

Una vez germinadas las semillas, se transfirieron a cámara de cultivo con temperatura de 24-26 °C y con un fotoperiodo 16 h día/ 8 h noche (35 a 75  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Los cultivos que presentaron contaminación fueron descartados.

Para continuar la multiplicación de las plántulas, una vez formadas las raíces y hojas verdaderas, cada plántula fue segmentada en dos, colocando la parte aérea en medio fresco PyM5BA y desechando la parte de la raíz. Los nuevos explantes obtenidos tras las resiembras fueron transferidos cada 4 semanas a frascos con 100 ml con medio nutritivo fresco PyM5BA posicionándolos horizontalmente sobre el medio.

Después de 5 o 6 subcultivos se obtuvieron suficientes plantas para ser almacenadas como material de reserva. El material obtenido de estas resiembras será enraizado y aclimatado, para su utilización en el programa de mejora de portainjertos, como parentales en futuros cruzamientos dentro del programa de mejora para la tolerancia a clorosis férrica.

#### **1.2.4. Aclimatación de plantas propagadas *in vitro***

Las plantas enraizadas *in vitro* y que no fueron utilizadas para el test de tolerancia a clorosis férrica, fueron aclimatadas en invernadero con turba y vermiculita (2:1), y posteriormente, cuando la planta alcanzó 20 cm aproximadamente, fueron trasplantadas a contenedores de 2 litros, con turba y arena (2:1), y se mantuvieron en el invernadero hasta su trasplante a campo.

### **1.3. RESULTADOS**

#### **1.3.1. Selección del material vegetal proveniente de campo**

Se introdujeron en total 48 individuos provenientes de las parcelas de la finca de la Estación Experimental Gimenezs (Lleida) y Mas Badia (Girona). De los cuales 17 fueron introducidos en el año 2012, 14 en el año 2013 y 17 en el año 2014.

En total se introdujeron 7 individuos pertenecientes a *P. elaeagrifolia* (P2395xP1588), 19 de *P. amygdaliformis persica* (P2395xP264), 10 de *P. communis cordata* (P2395xP256), 10 de *P. amygdaliformis* (P2395xP257) y 2 de *P. communis* "Williams".

### 1.3.2. Establecimiento de cultivos *in vitro*

Cada año se realizó la introducción y establecimiento de cultivos *in vitro* de los híbridos seleccionados en campo (Figura 17). Se realizaron de 6 a 8 subcultivos de cada individuo mensualmente para obtener la cantidad de plantas necesarias para realizar los ensayos de tolerancia a clorosis férrica *in vitro*.



Figura 17. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Pyrus*.

Los individuos introducidos de campo pudieron ser regenerados y multiplicados bajo condiciones *in vitro* (Figura 18), sin embargo, no todos ellos presentaron la misma tasa de multiplicación. Los individuos con baja tasa de multiplicación fueron descartados para la realización del test de tolerancia a clorosis férrica.



Figura 18. Fase de multiplicación de brotes *in vitro*.

Algunos cultivos fueron descartados por presencia de contaminación. En el año 2014 solo se obtuvieron 2 clones debido a problemas de contaminación.

En total se seleccionaron 24 individuos (Figura 19) para ser sometidos al ensayo de tolerancia a clorosis férrica debido a su alta capacidad de multiplicación y enraizamiento bajo condiciones *in vitro*.

De los individuos seleccionados 3 de ellos pertenecían al híbrido *P. elaeagrifolia* (P2395xP1588), 10 a *P. amygdaliformis persica* (P2395xP264), 8 a *P. communis cordata* (P2395xP256), 2 a *P. amygdaliformis* (P2395xP257) y 1 a *P. communis* "Williams".

Por otra parte, tomando en cuenta las introducciones de los años 2012 y 2013 (descartando la del 2014 por motivos de contaminación) el porcentaje de regeneración y multiplicación de cada uno de los híbridos y la variedad de libre polinización "Williams" queda de la siguiente manera: *P. communis cordata* 88%, *P. elaeagrifolia* 75 %, *P. amygdaliformis persica* 64 %, *P. amygdaliformis* y *P. communis* "Williams" 50 %.

	2012	2013	2014
Cruzamiento	Códigos	Códigos	Códigos
P2395xP1588	111	55, 58	
P2395xP264	66, 101, 103, 123, 129, 121	105, 109, 114*	162
P2395xP256	32, 36, 38, 45, 83, 87	25*, 88	
P2395xP257		74	170
P415	12		

\* Estos clones se analizaron en el ensayo de tolerancia a clorosis férrica *in vitro* junto con los individuos introducidos en el año 2014.

Figura 19. Híbridos interespecíficos *Pyrus* seleccionados en para realizar el ensayo de tolerancia a clorosis férrica *in vitro*.

### 1.3.3. Introducción *in vitro* de nuevas accesiones a partir de semilla y propagación

El porcentaje de germinación de las semillas fue de 25 a 50 %. *P. cordata* (PI 541586) y (PI 541587) presentaron mayor porcentaje de germinación 50 y 40 % respectivamente. *P. elaeagrifolia* (PI 541620), *P. elaeagrifolia* (PI 541621) y *P. amygdaliformis* (PI 349022) presentaron germinación aunque en menor medida, con porcentajes de germinación entre

25-30 %. *P. amygdaliformis* (PI 358436) y *P. elaeagrifolia* (PI 541618) no presentaron germinación, esta última ocasionada por contaminación (dato no presentado). No hubo diferencias significativas entre tratamientos ( $P = 0.792$ ).

Tabla 2. Semillas sembradas, plantas obtenidas, porcentaje de germinación y tasa de multiplicación de las nuevas accesiones de los híbridos *P. elaeagrifolia*, *P. amygdaliformis* y *P. cordata* introducidas *in vitro* a partir de semilla.

Accesión	Código	Semillas sembradas	Plantas obtenidas	Germinación (%)	Tasa media de multiplicación*
<i>P. elaeagrifolia</i> (PI 541618)	PE18	10	0	0	0
<i>P. elaeagrifolia</i> (PI 541620)	PE20	10	2	25	23
<i>P. elaeagrifolia</i> (PI 541621)	PE21	10	3	30	6.4
<i>P. amygdaliformis</i> (PI 349022)	PA22	10	3	30	3.6
<i>P. amygdaliformis</i> (PI 358436)	PA36	10	0	0	0
<i>P. cordata</i> (PI 541586)	PC86	10	4	50	5.9
<i>P. cordata</i> (PI 541587)	PC87	10	5	40	4.4

\* Tasa media de multiplicación del subcultivo 0 al 4.

#### 1.3.4. Aclimatación de plantas propagadas *in vitro*

Las plantas que se obtuvieron *in vitro* fueron aclimatadas en invernadero y posteriormente trasplantadas a campo (Figura 20).



Figura 20. Aclimatación de híbridos. A) Aclimatación en bandeja; B) Plantas en contenedor de 2 litros y C) Plantas listas para trasplante a campo.

## 1.4. DISCUSIÓN

Los estudios que demuestran la mayor sensibilidad de los membrilleros a la clorosis férrica en comparación con los patrones *Pyrus* son muy numerosos (Dolcet-Sanjuan, et al., 1991; Dolcet-Sanjuan, et al., 1992; Simard y Michelesi, 2002; Dolcet-Sanjuan, et al., 2004; Donini et al., 2009; Prado y Alcántara-Vara, 2011 y Asín et al., 2011).

Prado y Alcántara-Vara (2011) midieron la tolerancia a clorosis férrica en membrilleros (*Cydonia oblonga*) sin injertar y membrilleros injertados con peral (*Pyrus communis* L.) y encontraron que los membrilleros sin injertar eran más susceptibles a la clorosis férrica que los membrilleros injertados con la variedad. Estos resultados les sugirieron que la resistencia a la clorosis férrica puede estar relacionada con los procesos bioquímicos y fisiológicos posteriores a la absorción del nutriente como es el transporte del hierro dentro de la planta, esto debido a una distribución más extensa o bien, a la eficiencia en el uso del nutriente por la parte aérea de la planta (Prado y Alcántara-Vara, 2011).

Por otro lado, Dolcet-Sanjuan et al., (2004) encontraron que los patrones híbridos interespecíficos *Pyrus* conferían mayor resistencia a la clorosis férrica a la variedad “Conference” injertada sobre ellos que cuando esta era injertada sobre *Cydonia oblonga* BA29, lo que podría explicarse por la incompatibilidad interespecífica de las especies. Otros autores señalan que el peral injertado sobre membrillero presenta clorosis cuando el contenido del suelo en caliza activa es superior a 9 % (Loué, 1988).

En condiciones de campo suele darse una pobre relación entre los contenidos de Fe y clorofila, debido fundamentalmente a que los experimentos comprenden mínimo entre 4 a 6 meses durante los cuales las velocidades de crecimiento y de absorción de nutrientes sufren numerosos oscilaciones (Fernández López et al., 1994).

Por otro lado, debido a que la clorosis férrica es un problema ampliamente extendido en áreas con suelo calcáreo, el mejoramiento genético en adquisición de Fe por la selección *in vitro* de plantas podría beneficiar un número importante de especies vegetales.

En estudios anteriores la micropropagación de híbridos interespecíficos de *Pyrus* previamente seleccionados ha dado como resultado tasas de multiplicación de 6 a 9 y porcentajes de enraizamiento del 50 al 90 % (Dolcet-Sanjuan et al., 2004; Iglesias et al., 2004 y Claveria, et al., 2012).

El problema de la contaminación en el establecimiento de los cultivos *in vitro* es un problema que se incrementa con la edad de la planta o árbol de donde se ha tomado el explante. Iglesias *et al.*, (2004) enfrentaron problemas de contaminación al propagar plantas de *Pyrus communis* L. "IGE2002" provenientes de una plantación de 40 años de edad, donde el 95 % de los explantes introducidos *in vitro* presentaron contaminación del tipo sistémica.

Otro factor que puede incrementar la incidencia de contaminación en los cultivos establecidos *in vitro* es el estado del ciclo vegetativo en el que se encuentre la planta. En nuestro caso, el incremento de contaminación en los cultivos de los individuos seleccionados e introducidos *in vitro* en el año 2014 se puede deber a este último factor.

El uso de reguladores de crecimiento, en específico BA con una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , está ampliamente documentado en muchos estudios de multiplicación *in vitro* de *Pyrus* spp. (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1990; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1991; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 2004; Iglesias *et al.*, 2004 y Claveria *et al.*, 2012), así como también el uso de IBA 10  $\mu\text{M}$  como regulador de crecimiento (Iglesias, *et al.*, 2004 y Aygun y Dumanoglu, 2015) y el uso de vermiculita para favorecer el desarrollo de raíces (Iglesias, *et al.*, 2004).

Dentro del programa de mejora hemos encontrado que existe un número mayor de individuos pertenecientes a *P. amygdaliformis persica* seleccionados en campo e introducidos en condiciones *in vitro*; sin embargo, no todos los individuos pertenecientes a este híbrido han tenido una tasa de multiplicación adecuada para realizar el test de tolerancia a clorosis férrica. Los individuos utilizados para realizar los análisis *in vitro* tuvieron una tasa de multiplicación y enraizamiento satisfactoria, lo cual nos garantiza la reproducción de los híbridos seleccionados a gran escala para futuros análisis.

## **CAPÍTULO 2. Evaluación de las respuestas fisiológicas de las raíces a la deficiencia de hierro inducida *in vitro***

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Las raíces de las plantas dicotiledóneas solo pueden tomar el ion ferroso, sin embargo, en el suelo está presente generalmente el ion férrico, por lo tanto el hierro debe ser reducido para poder entrar en la planta (Chen y Barack, 1982; Landsberg, 1986; Römheld y Marschner, 1986; Schmidt, 2003; Zocchi, 2006 y Briat *et al.*, 2007).

Las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas han evolucionado y desarrollado mecanismos de respuesta o estrategias (Estrategia I y Estrategia II) ante la deficiencia de hierro para incrementar su capacidad de reducir  $\text{Fe}^{3+}$ , movilizar y absorber hierro por parte de las raíces (Chen y Barack, 1982; Römheld y Marschner, 1986; Schmidt, 2003 y Zocchi, 2006).

Estos mecanismos de adaptación en respuesta al estrés producido por la deficiencia de hierro tienen carácter rítmico, es decir, se ponen en marcha o cesan en función del nivel de hierro presente en la planta (Landsberg 1986; Römheld y Marschner 1986; Fernández López *et al.*, 1994 y García Del Rosal, 2013).

#### **2.1.1. Absorción de Fe por la planta por la Estrategia I**

Las plantas clasificadas como estrategia I, en las que se incluyen los frutales, bajo condiciones de deficiencia de hierro desarrollan cambios morfológicos y bioquímicos como respuesta a este estrés que tienen como finalidad potenciar la adquisición de este elemento del suelo (Römheld y Marschner, 1986; Schmidt, 2003; Zocchi, 2006 y García Del Rosal, 2013).

En esta estrategia, la movilización del  $\text{Fe}^{3+}$  en el suelo hacia el interior de la planta se debe al aumento del potencial reductor de las raíces y la producción de exudados ricos en ácidos orgánicos y fenoles que ayudan a quelatar el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en el suelo y reducirlo a  $\text{Fe}^{2+}$ , así como la liberación de protones ( $\text{H}^+$ ) que, junto con los compuestos exudados, disminuye el pH del suelo (Chen y Barack, 1982; Römheld y Marschner, 1986; Schmidt, 2003; Zocchi, 2006; Gonzalo *et al.*, 2011 y Li *et al.*, 2015).

Las respuestas ante la deficiencia de hierro se llevan a cabo, principalmente por la acción de dos enzimas unidas a la membrana plasmática de las células de la rizodermis, H<sup>+</sup>ATPasa y Fe-quelato reductasa (FQ-R), ubicadas principalmente en las zonas subapicales de raíces jóvenes y en los pelos radicales (Chen y Barack, 1982; de Vos, et al., 1986; Römheld y Marschner, 1986; Schmidt, 2003; Zocchi, 2006 y Li *et al.*, 2015).

La estrategia II es típica de las especies gramíneas (Poaceae), la cual es más eficiente que la estrategia I en suelos calcáreos e incluye la producción de compuestos quelantes llamados fitosideróforos (FS) sintetizados en las raíces, los cuales son liberados a la rizósfera para formar complejos o quelatar el Fe<sup>3+</sup> (Römheld y Marschner, 1986; Asín *et al.*, 2007 y Chen *et al.*, 2015).

#### **2.1.1.1. Cambios morfológicos**

Bajo condiciones de deficiencia de Fe, se presenta la inhibición de la extensión de la raíz principal acompañada por el desarrollo de raíces laterales. Las raíces jóvenes presentan un aumento en el diámetro de la zona apical radicular y desarrollo de pelos radicales (Römheld y Marschner 1986). Los engrosamientos presentados en los ápices de las raíces muestran una tonalidad amarillenta, debido a la acumulación de riboflavina en los tejidos (Zocchi, 2006 y García Del Rosal, 2013).

Estos cambios están asociados con la formación de células de transferencia con membranas plasmáticas complejas. Estas células se desarrollan a partir de células de la rizodermis (Schmidt, 2003 y Zocchi, 2006) y se caracterizan por poseer invaginaciones en su membrana citoplasmática, lo cual permite incrementar el área de superficie de contacto de las raíces con el medio y con otras células (Landsberg, 1981; Römheld y Marschner 1986; López-Millán *et al.*, 2001). El desarrollo de estas células de transferencia está asociado al incremento de la capacidad reductora, la síntesis de ácidos orgánicos y la acidificación de la rizósfera (Landsberg 1981 y García Del Rosal, 2013)

Las células de transferencia en la rizodermis son probablemente centros de flujo de H<sup>+</sup> en las raíces con deficiencia de hierro. Cuando se restablece el suministro de hierro, el número de estas células disminuye en uno o dos días, reduciendo la liberación de H<sup>+</sup> (Römheld y Marschner 1986).

### **2.1.1.2 Acidificación de la rizósfera**

Bajo condiciones de deficiencia de hierro, la acidificación de la rizósfera y del apoplasto de la raíz se produce por la liberación de protones mediante el incremento de la actividad de la enzima H<sup>+</sup>ATPasa (Römheld y Marschner, 1986; Schmidt, 2003; Zocchi, 2006; Gonzalo *et al.*, 2011 y Li *et al.*, 2015).

La H<sup>+</sup>ATPasa bombea protones desde el citoplasma al exterior de la célula usando ATP como fuente de energía, con lo que disminuye el pH de la rizósfera mejorando así la disponibilidad y movilización de los compuestos de hierro, haciendo posible la reducción de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> (Landsberg, 1981; de Vos, *et al.*, 1986; Römheld y Marschner, 1986; Schmidt, 2003; Zocchi, 2006 y Li *et al.*, 2015).

La acidificación de la rizósfera alcanza aproximadamente 2 mm de distancia de la raíz, incluso en suelos calcáreos (de Vos, *et al.*, 1986). Por otra parte también se acidifica el apoplasto radicular a nivel intracelular (de Vos, *et al.*, 1986; Schmidt, 2003 y Zocchi, 2006).

El incremento de la actividad de H<sup>+</sup>ATPasa genera también un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática, el cual dirige la toma de nutrientes como el Fe<sup>2+</sup>. La enzima H<sup>+</sup>ATPasa presenta un óptimo funcionamiento a pH de 6.6 (de Vos, *et al.*, 1986; Schmidt, 2003 y Zocchi, 2006).

La acidificación de la rizósfera también favorece la liberación de fenoles Römheld y Marschner, 1986; Briat y Lobréaux, 1997; Schmidt, 2003 y Zocchi, 2006).

### **2.1.1.3. Incremento de la capacidad reductora de Fe<sup>3+</sup> en las raíces de las plantas**

La disociación de los quelatos es el principal mecanismo de la Estrategia I. Las células radiculares de las plantas Estrategia I poseen dos sistemas de reducción de Fe<sup>3+</sup>, un sistema llamado estándar y otro turbo, este último se activa en plantas Fe-deficientes (Gonzalo *et al.*, 2011 y Li *et al.*, 2015).

El primer sistema puede reducir solamente ferrocianuro u otros oxidantes con un potencial redox mayor que 0 mV, mientras que el segundo tiene una capacidad reductora 20 veces mayor que el sistema estándar y tiene una especificidad mucho más amplia. Ambos sistemas se encuentran ubicados en la membrana plasmática de las raíces apicales (Susín *et al.*, 1996)

La reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  se realiza mediante la acción de la enzima Fe-quelato reductasa (FQ-R), que aumenta la velocidad de descomposición de los quelatos de  $\text{Fe}^{3+}$ . Esta enzima presenta un pH óptimo de funcionamiento entre 4 y 5 y máximo 6.5. La disminución del pH también afecta a la especificidad de esta enzima, favoreciendo así la afinidad de la enzima FQ-R por el sustrato (Römheld y Marschner 1986; Chaney *et al.* 1992; Susín *et al.*, 1996; Schmidt, 2003 y Zocchi, 2006).

Las temperaturas extremas (muy por encima o por debajo de 25 °C), pH alcalinos (mayores que 7.5) y la presencia de metales pesados influyen en la inactivación de esta enzima (Susín *et al.*, 1996; Lucena, 2009).

#### **2.1.1.5. Excreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular**

Las raíces de las plantas excretan gran variedad de compuestos orgánicos como azúcares reductores, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y flavinas, que pueden constituir hasta un 20% del carbono asimilado (Martínez Cuenca, 2012). Los factores ambientales como el pH, la temperatura, el tipo de suelo, la intensidad de la luz, la edad, el estado nutricional de la planta y la presencia de microorganismos pueden alterar su composición (Martínez Cuenca, 2012).

El deterioro en la pared de las células de la rizodermis, provocada por las condiciones de déficit de hierro, produce una acumulación de compuestos fenólicos lo cual afecta la lignificación celular (Römheld y Marschner 1986 y Shmidt, 2003).

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de compuestos aromáticos hidroxilados que se encuentran sólo en microorganismos y plantas. Estos compuestos desempeñan múltiples funciones químicas y biológicas en las plantas relacionadas principalmente con la adaptación a los cambios ambientales y son un claro ejemplo de plasticidad metabólica, ya que las plantas son capaces de responder a tensiones externas que inducen rápidamente su biosíntesis de manera reversible (Tato *et al.*, 2013).

Las plantas deficientes en Fe producen y excretan diferentes compuestos de naturaleza fenólica (Römheld y Marschner, 1986) como el ácido cafeico (Olsen *et al.*, 1981), ácido fenólico, ácido clorogénico (Hether *et al.*, 1984) y ácido cumárico. Se ha sugerido que los compuestos fenólicos podrían operar como mediadores en la adquisición de Fe de tres maneras: a) mejorando directamente la solubilidad del Fe, principalmente debido a su

propiedad reductora y quelante; b) mediante la reutilización del Fe apoplástico de la raíz y c) por su actividad alelopática que influye en las comunidades microbianas de la rizósfera para producir sideróforos y auxinas (Tato *et al.*, 2013).

Por otra parte, las flavinas son acumuladas y excretadas por algunas especies en condiciones de deficiencia de Fe como la riboflavina o los sulfatos de riboflavina (Susín *et al.*, 1996). Esta acumulación puede deberse a un desequilibrio en el metabolismo de las purinas, evidenciando el requerimiento de hierro de la enzima xantina-oxidasa (Belitz y Grosch, 1985 y Fernández López *et al.*, 1994).

Estas sustancias son capaces de reducir directamente los compuestos de Fe<sup>3+</sup> en presencia de donadores electrónicos como el NADH o NADPH (González-Vallejo *et al.*, 1998). Además, los sulfatos de riboflavina ejercen una acción antimicrobiana, disminuyendo la posibilidad de que microorganismos del medio compitan con la planta en la absorción de Fe (Anon., 1996 y Susín *et al.*, 1996).

Los ácidos orgánicos son los compuestos más abundantes en los exudados excretados por las raíces de las plantas ante la deficiencia de Fe. Dependiendo de sus propiedades de disociación y del número de grupos carboxílicos, los ácidos orgánicos pueden formar complejos con distintos metales de la solución del suelo gracias a su capacidad de variar su carga negativa. La expulsión de estas sustancias aumenta al disminuir el pH. Cuando el pH del suelo es bajo forman complejos estables con el Fe<sup>3+</sup> favoreciendo su disolución en la solución del suelo (Shmidt, 2003). En suelos calizos la movilización del Fe por el malato y citrato es lenta ya que los complejos formados son inestables en pH altos (Fernández López *et al.*, 1994 y López-Millán *et al.*, 2002).

Cuando el aporte de hierro se reestablece, los niveles de estos compuestos disminuye hasta los niveles normales en aproximadamente dos días (Fernández López *et al.*, 1994).

#### **2.1.1.6. Transporte de Fe<sup>2+</sup> al interior de la planta**

En el interior de las células de la raíz, el hierro reducido es transportado a través del córtex radicular vía simplasto por medio de los plasmodesmos en forma de Fe<sup>2+</sup> mediante transportadores férricos específicos (Iron-Regulated Transporter o IRT) (Chen *et al.*, 2015).

IRT se trata de una proteína que se localiza en la membrana plasmática y funciona principalmente como un transportador de alta afinidad que regula la absorción de Fe<sup>2+</sup> desde

el suelo al interior de las plantas Fe (Gonzalo *et al.*, 2011; Maurer *et al.*, 2011 y Li *et al.*, 2015).

IRT pertenece a la familia de transportadores metálicos ZIP, y también es responsable de la absorción de otros metales divalentes, como  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  pero presenta mayor afinidad por el Fe (Gonzalo *et al.*, 2011 y Li *et al.*, 2015).

Debido a que la reactividad del hierro con ligandos orgánicos es muy alta, entender cómo circula el hierro dentro de la planta requiere de la identificación de su especiación en cada compartimiento. La distribución del hierro depende por tanto del quelato específico formado (Briat *et al.*, 2007).

En el interior de las células (simplasto) del sistema radicular el hierro es oxidado nuevamente a  $Fe^{3+}$  para posteriormente ser translocado hacia la parte aérea de la planta a través del xilema, en donde el hierro se compone principalmente de citrato, pero el transportador o transportadores responsables de la circulación del complejo Fe-citrato aún no ha sido identificado (Briat *et al.*, 2007 y Larbi *et al.*, 2010). López-Millán *et al.* (2000) encontraron que la principal especie de Fe que se cree forma parte del sistema de transporte de hierro en la savia del xilema y el fluido apoplásmico en hojas de peral provenientes de campo es el complejo  $FeCitOH^-$  tanto en plantas tolerantes y susceptibles a la deficiencia de hierro. En otras especies como la remolacha azucarera, las principales especies de Fe que presumiblemente se encuentren en la savia del xilema y fluido apoplásmico fueron  $FeCitOH^-$  y  $FeCit^{-3}$  (López-Millán *et al.*, 2000 y Larbi *et al.*, 2010).

Desde las hojas el hierro debe atravesar de nuevo la membrana plasmática de las células foliares, donde se redistribuye a través del floema hacia otros lugares de la planta. Este paso requiere nuevamente la reducción de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , proceso que se lleva a cabo por una enzima reductasa similar a la encontrada en la raíz (Schmidt, 2003 y Zocchi, 2006). En el floema, el hierro está probablemente quelato a nicotianamina (NA) (Briat *et al.*, 2007 y Chen *et al.*, 2015).

Recientemente, se ha demostrado que existen dos tipos de transportadores que mueven el hierro hacia y desde la vacuola en la semilla, lo que ilustra el papel de la vacuola como compartimiento de almacenamiento de hierro (Briat *et al.*, 2007).

La capacidad de transportar el hierro dentro de la planta está relacionada con las respuestas de las plantas ante este tipo de carencias, es por ello que los primeros síntomas de la deficiencia de hierro aparecen en las hojas más jóvenes debido a que el hierro es relativamente inmóvil en el floema (Marschner, 1995).

## 2.2. METODOLOGÍA

En este experimento se evaluaron las respuestas fisiológicas de las raíces de las plantas sometidas a condiciones de clorosis férrica.

### 2.2.1. Test *in vitro* de tolerancia a clorosis férrica

El ensayo de tolerancia a clorosis férrica se realizó en cuatro bloques durante los años 2013 a 2015 (Figura 21). Cada uno de los bloques integrado por individuos pertenecientes a los diferentes híbridos evaluados. Los bloques fueron ensayados por separado, con una diferencia temporal de entre 6 y 12 meses entre bloque y bloque.



Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4
Pcw12	Pcc36	Pe55	Pcc25
Pcc32	Pcc45	Pe58	Pap114
Pcc38	Pap66	Pa74	Pap162
Pap101	Pcc87	Pcc88	Pa170
Pap103	Pe111	Pap105	
Pap129	Pap123	Pap109	

Figura 21. Individuos utilizados para el ensayo *in vitro* de tolerancia a clorosis férrica. Los códigos identificadores de cada individuo representan el híbrido al que pertenecen, *P. communis* "Williams" (Pcw), *P. communis cordata* (Pcc), *P. amygdaliformis persica* (Pap), *P. amygdaliformis* (Pa) y *P. elaeagnifolia* (Pe) y el número asignado en campo al árbol del que provienen.

Las plántulas que desarrollaron un buen sistema radicular durante la fase de enraizamiento fueron seleccionadas para realizar el ensayo *in vitro* de tolerancia a clorosis férrica. Este test está basado en estudios previos descritos por Chaney *et al.* (1992) y Dolcet-Sanjuan *et al.* (1992).

Las condiciones de privación de hierro fueron alcanzadas transfiriendo las plantas a frascos Magentas® con puentes de papel (Schleicher & Schuell) para dar estabilidad a la planta (Figura 22) tal como se describe en Dolcet-Sanjuán et al., (2004).



**Figura 22. Montaje del ensayo de tolerancia a clorosis férrica *in vitro*. Plántulas transferidas a frascos Magentas® con puentes de papel (Schleicher & Schuell).**

La composición del medio para valorar la susceptibilidad o tolerancia a la deficiencia de hierro en las plantas fue descrita por Chaney *et al.* (1992) con  $2 \mu\text{M Fe}^{3+}\text{DTPA}$  (Tabla 3) y se probaron dos concentraciones de bicarbonato 10 mM y 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ . El medio líquido fue cambiado dos veces por semana. El pH de la solución varió en cada cambio de solución entre 8.0 a 8.5.

Las plántulas de los ensayos fueron mantenidas bajo las siguientes condiciones: temperatura de 24-26 °C, fotoperiodo 16 h luz/ 8 h oscuridad ( $35 \text{ a } 75 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) durante 4 semanas

Se utilizaron 4 plantas de cada genotipo para cada tratamiento de bicarbonato. Los análisis fueron destructivos, por lo tanto se utilizaron plantas nuevas para cada día de muestreo, es decir se utilizaron 24 plantas por genotipo y tratamiento.

Las muestras fueron tomadas a las 24 h y a los días 3, 7, 14, 21 y 28 para los análisis de pH y contenido de clorofila en hojas. Para la cuantificación de fenoles totales y la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$ , las muestras se tomaron a las 24 h y a los días 3, 7 y 28 días.

**Tabla 3. Composición de soluciones stock para preparar la solución nutritiva FeDTPA usada para seleccionar plantas tolerantes a clorosis férrica de *Pyrus* (Chaney et al., 1992).**

Solución Stock		Concentración final en la solución nutritiva
Macronutrientes <b>A</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.0 mM
	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.0 mM
	KNO <sub>3</sub>	2.5 mM
Macronutrientes <b>B</b>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.0 mM
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4.0 mM
Macronutrientes <b>C</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.020 mM
Micronutrientes <b>D</b>	KOH	426 µM
	DTPA	142 µM
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 µM
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20 µM
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10 µM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 µM
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 µM
	NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 µM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 µM
Fe <sup>3+</sup> DTPA	KOH	6 µM
	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	2 µM
	DTPA	2.04 µM
NaHCO <sub>3</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	10 mM/20 mM

Durante cada día de muestreo el medio líquido de las plántulas seleccionadas fue transferido a un tubo Falcón® y guardado para el posterior análisis de pH y fenoles totales. Para los fenoles totales se tomaron alícuotas de 5 ml, los cuales fueron posteriormente liofilizados.

Las plántulas seleccionadas fueron destinadas para la medición del contenido de clorofila en hojas y para realizar el ensayo de reducción de hierro, los cuales se describen a continuación.

### **2.2.2. Contenido de clorofila en hojas**

Para la cuantificación del contenido total de clorofila en las hojas de las plántulas analizadas se utilizó el dispositivo de mano para la medición de clorofila Minolta SPAD-502®, el cual realiza mediciones mediante fluorescencia electrónica de la clorofila.

Se realizaron 3 lecturas por plántula en cada una de las primeras 3 hojas extendidas de cada plántula.

### **2.2.3. Acidificación del medio de cultivo *in vitro***

Para la determinación y cuantificación de la extrusión de protones excretados al medio de cultivo bajo condiciones de deficiencia de Fe, la acidificación del medio se determinó midiendo los cambios del pH en la solución nutritiva con un pHmetro, lo que permitió determinar la extrusión de H<sup>+</sup> durante este periodo.

Las soluciones 10 y 20 mM de bicarbonato se consideraron el blanco para la medición del pH al día 0.

Para los días 3, 7, 14, 21 y 28 se tomó el medio de cultivo de 3 plantas de cada clon y se midió el pH del medio líquido.

### **2.2.4. Reducción de Fe<sup>3+</sup> en las raíces *in vitro***

La reducción de Fe<sup>3+</sup> dada por la activación de la quelato férrico reductasa (FQ-R) se determinó espectrofotométricamente midiendo la formación del complejo Fe(II)-BPDS (ácido batofenantrolinadisulfónico) a partir de Fe(III)-EDTA. El BPDS forma un complejo de color rojo con el Fe<sup>2+</sup>, pero no con Fe<sup>3+</sup> (Chaney *et al.*, 1992).

Esta determinación se realizó a los días 3, 7, 14, 21 y 28. En cada día se utilizaron 3 plantas de cada genotipo, las cuales después de medir la clorofila se incubaron en viales color ámbar que contenían 11 ml de solución nutritiva fresca sin Fe suplementada con 0.3 mM de BPDS y 100 µM de Fe(III)-EDTA con un pH de la solución de 6.0 (Figura 23). Las plantas se dejaron en condiciones de incubación con temperatura de 24-26 °C, un fotoperíodo 16 h luz/ 8 h oscuridad (35 a 75 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) por 24 h.



**Figura 23. Montaje de las plántulas para el análisis de reducción de Fe. Se colocaron 4 plántulas contenidas en viales de color ámbar en un frasco Magenta®.**

Al cabo de estas 24 h, se tomaron alícuotas de 4 ml de cada vial y se midió la absorbancia a 535 nm con un espectrofotómetro. La cantidad de hierro reducido se calculó por la concentración del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -(BPDS) utilizando un coeficiente de extinción de  $22.14 \text{ mM cm}^{-1}$ , y se expresó en  $\text{nmol Fe}^{2+}$  reducido  $\text{g}^{-1}$  peso fresco (PF) de raíz  $\text{h}^{-1}$  o  $\mu\text{moles Fe}^{2+}$  producidos durante 24 horas/peso fresco de las raíces (Asín *et al.*, 2007 y Dolcet *et al.*, 2008,). Las plantas fueron diseccionadas en dos partes (parte aérea y raíz) y se pesó cada una de ellas.

### **2.2.5. Exudación de fenoles totales *in vitro***

La extracción de fenoles en las muestras de medio de cultivo se realizó mediante homogenización o hidrólisis ácida y una posterior extracción con solución acuosa. El análisis de fenoles libres totales en las muestras se realizó según el método para la determinación de fenoles totales de Folin-Ciocalteu mediante espectrofotometría (Singleton *et al.*, 1999 y Cicco *et al.*, 2009).

Este método se basa en la oxidación de una solución alcalina de fenoles con el reactivo amarillo ácido molibdotungstosfórico heteropolianión y mediante una medición colorimétrica del molibdotungstosfato formado de color azul. Estos pigmentos azules tienen una absorción máxima dependiendo de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas

fenólicas, además del pH de la solución, usualmente obtenido por la adición de carbonato de sodio (Singleton *et al.*, 1999 y Cicco *et al.*, 2009).

Para la hidrólisis ácida, las muestras de los exudados liofilizados se redisolviéron en 500 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q®. Posteriormente se realizaron dos lavados con 1 ml de éter etílico. La fase superior que representa la parte orgánica de la muestra fue desechada, mientras que la fase acuosa inferior de la muestra se utilizó para realizar la hidrólisis ácida ajustando el pH a 3 con HCl 2 M. Posteriormente se realizaron nuevamente dos lavados con 1 ml de acetato de etilo, el sobrenadante obtenido fue liofilizado.

Para la determinación de fenoles totales, las muestras liofilizadas se redisolviéron en 250 µl de metanol. Para realizar el análisis de Folin-Ciocalteu, se colocaron 100 µl de cada muestra, 1500 µl de agua Milli-Q® y 10 µl del reactivo Folin en cubetas para espectrofotómetro. Se mezcló por 5 min y posteriormente se agregó 300 µl de carbonato sódico para iniciar la reacción y se incubó a 40 °C por 30 minutos. La determinación de la absorbancia para las muestras y la curva de calibración se realizó a 765 nm frente a un blanco 0 mg/l de ácido gálico.

Para realizar una recta de calibración se preparó una solución stock de ácido gálico de 5000 ppm. A partir de esta solución se hicieron diluciones con concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 ppm que marcaron los distintos puntos de la recta.

## **2.3. RESULTADOS**

Este experimento permitió caracterizar el sistema de absorción de Fe en plantas de *Pyrus* spp. cultivadas bajo condiciones de deficiencia de hierro en un sistema de cultivo *in vitro*, mediante el análisis de parámetros relacionados con las respuestas fisiológicas que presentan las plantas ante este tipo de estrés

### **2.3.1. Nivel de clorofila en hojas**

En primer lugar se evaluó el estado del aparato fotosintético mediante la cuantificación del contenido de clorofila en las hojas de las plantas. Para este primer parámetro, se observaron diferencias genotípicas en el nivel de clorofila foliar bajo la privación de hierro, lo que indica una diversa susceptibilidad y respuestas fisiológicas a la clorosis inducida por la ausencia de hierro.

Una concentración mayor de bicarbonato, provoca un tamponamiento del pH, lo que disminuyó el contenido de clorofila en todos los genotipos. Para ambos tratamientos, los híbridos o genotipos se clasificaron en grupos partiendo de su comportamiento durante la privación de hierro durante 28 días.

Para el tratamiento  $\text{NaHCO}_3$  10 mM, las plántulas correspondientes a los híbridos *P. amygdaliformis persica*, *P. communis cordata*, *P. elaeagrifolia* y *P. amygdaliformis* presentaron un comportamiento similar durante el estudio (Figura 24 A), en el cual, el nivel de clorofila en las hojas disminuyó en los primeros días recuperándose a partir del día 7 del experimento. *P. communis* “Williams” presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) del resto de los híbridos, presentando una decaída en el nivel de clorofila desde el inicio del experimento, observándose poca recuperación al final del experimento.

Para el tratamiento  $\text{NaHCO}_3$  20 mM (Figura 24 B), los híbridos que se agruparon en una misma tendencia fueron híbridos *P. communis* “Williams”, *P. amygdaliformis persica* y *P. elaeagrifolia*, en donde los individuos pertenecientes a estas selecciones presentaron un comportamiento similar al que mostraron los individuos de la primera clasificación en el tratamiento 10 mM, sin embargo la recuperación bajo condiciones más alcalinas y pH tamponado con más  $\text{NaHCO}_3$  fue más lenta, considerando que al día 7 ya se presentó disminución en el nivel de clorofila.

*P. communis cordata* demostró ser significativamente diferente al resto de los individuos presentando una recuperación mucho mayor en el nivel de clorofila al día 28. *P. communis* “Williams” fue el más sensible a la clorosis férrica inducida por la ausencia de hierro *in vitro* que las otras cuatro especies, ya que los síntomas de clorosis incrementaron a lo largo del ensayo y nunca se vio una respuesta de mejoría en las plantas.

Podemos observar también que los valores iniciales y finales en los niveles de clorofila de *P. communis cordata* bajo el tratamiento 20 mM  $\text{NaHCO}_3$  son mayores que los presentados bajo el tratamiento de 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , en el resto de los híbridos y en *P. communis* “Williams” estos valores ya se ven afectados por la concentración menor de bicarbonato.

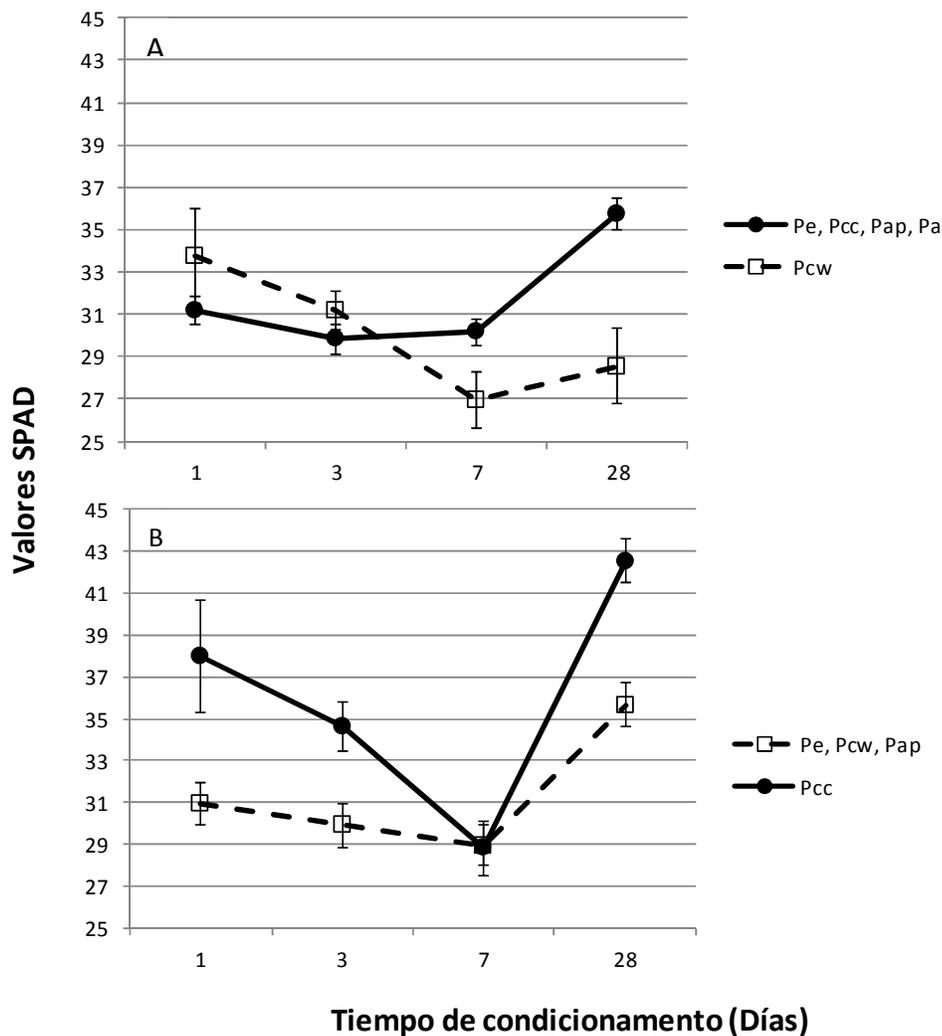


Figura 24. Nivel total de clorofila (SPAD) medido en hojas de cuatro híbridos *Pyrus* interespecíficos (Pa, Pap, Pcc, Pe) y *P. communis* Williams (Pcw) de libre polinización bajo condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* (durante 1, 3, 7 y 28 Días) en medio líquido con NaHCO<sub>3</sub> 10 mM (A) y 20 mM (B). Los valores medios provienen de las medidas de las tres primeras hojas de cada plántula, con cuatro repeticiones por genotipo. Las barras representan el error estándar.

No se encontraron diferencias significativas en la interacción especie y tratamientos ( $P = 0.452$ ). Lo que nos sugiere que las concentraciones de bicarbonato ensayada aquí no son un factor determinante para la selección de híbridos resistentes a clorosis férrica *in vitro* tomando en cuenta el nivel de clorofila de las hojas. De acuerdo con los gráficos, *P. communis cordata* presentó mayor nivel de clorofila en hojas que el resto de los genotipos, siendo Pe el que presentó los niveles más bajos de clorofila en hojas (Figura 25).

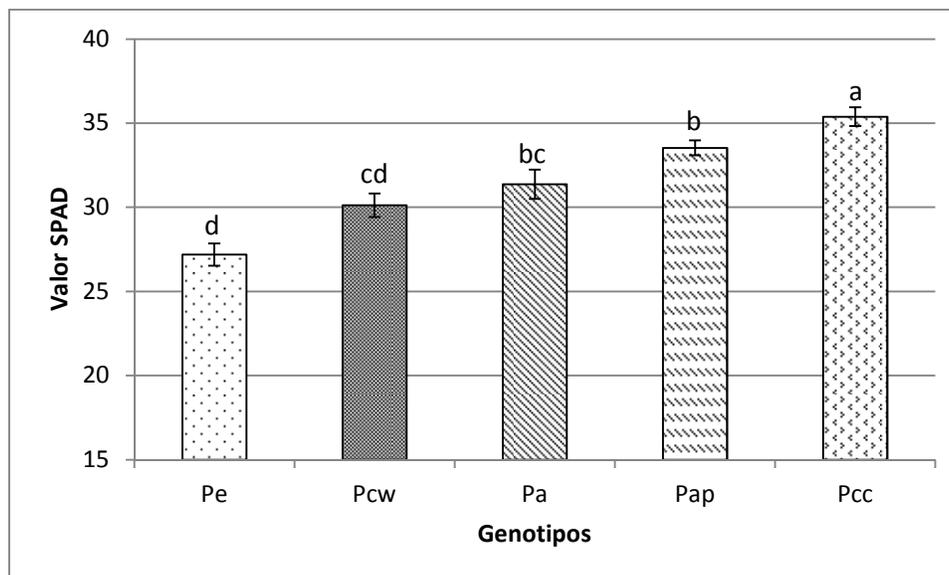


Figura 25. Nivel total de clorofila (SPAD) medido en hojas de cuatro híbridos híbridos *Pyrus* interespecíficos (Pa, Pap, Pcc, Pe) y *P. communis* "Williams" (Pcw) de libre polinización, bajo condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* en medio líquido con  $\text{NaHCO}_3$  durante el experimento.

### 2.3.2. Acidificación del medio de cultivo

Para medir la cantidad de protones liberados y la acidificación del medio al medio se utilizó un pH-metro. El pH de la solución nutritiva fue monitoreado durante el experimento.

Al día 3 del experimento para ambos tratamientos se observaron diferencias significativas en la respuesta de los genotipos, de esta manera se clasificaron a los híbridos de acuerdo a su comportamiento.

Para el tratamiento 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , *P. amygdaliformis persica* mostró una tendencia diferente del resto de los híbridos, (*P. communis cordata*, *P. communis* "Williams", *P. elaeagrifolia* y *P. amygdaliformis*) siendo el que presentó menor capacidad para acidificar el medio (Figura 26 A). Para el tratamiento con 20 mM  $\text{NaHCO}_3$  se muestra una clara dificultad en acidificar el medio de cultivo para todos los híbridos, sin embargo *P. communis cordata* muestra diferencias significativas con respecto a los otros híbridos, lo que muestra una mayor respuesta de acidificación incluso en medios más alcalinos (Figura 26 B).

En ambos tratamientos *P. communis cordata* fue capaz de reducir el pH del medio, sin embargo, una mayor concentración de carbonato redujo su capacidad a partir del tercer día.

Esto nos sugiere que el tamponamiento del medio producida por concentraciones demasiado altas de carbonatos inhibe la respuesta acidificante de las raíces incluso de los genotipos con una eficiente capacidad de acidificación del medio.

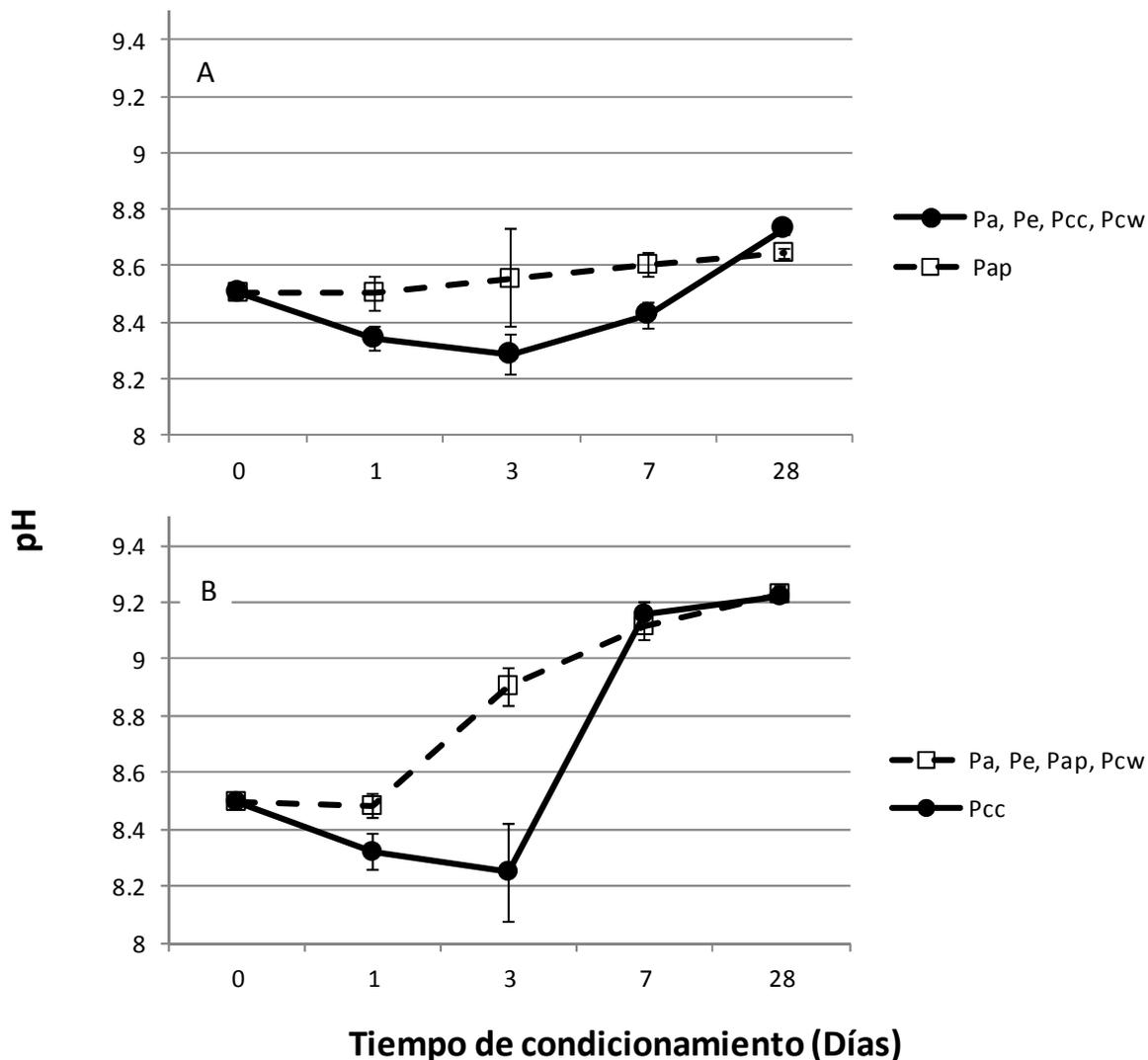


Figura 26. Acidificación del medio por las raíces de plántulas pertenecientes a cuatro híbridos *Pyrus* interespecíficos (Pa, Pap, Pcc, Pe) y *P. communis* "Williams" (Pcw) de libre polinización, bajo condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* (durante 0, 1, 3, 7 y 28 días) en medio líquido con NaHCO<sub>3</sub> 10 mM (A) y 20 mM (B). Los valores medios provienen de las medidas tomadas en el medio de cultivo de cuatro repeticiones, una plántula cada una por genotipo. Las barras representan el error estándar.

Pese a que la concentración de carbonato fue un factor que permitió observar respuestas significativas en el comportamiento de los híbridos y la variedad Williams, no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.676$ ) en la interacción tratamiento e híbrido. Los híbridos que

presentaron la mejor respuesta acidificante del medio fueron *P. communis cordata* y *P. amygdaliformis*, mientras que el que presentó la menor capacidad de acidificar el medio de cultivo más baja fue *P. communis* "Williams" (Figura 27).

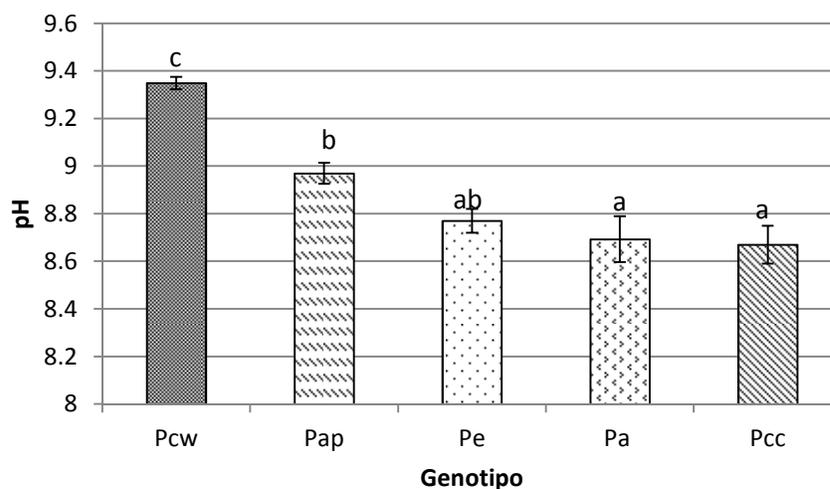


Figura 27. Acidificación del medio por las raíces de plántulas pertenecientes a cuatro híbridos *Pyrus* interespecíficos (Pa, Pap, Pcc, Pe) y *P. communis* "Williams" (Pcw) de libre polinización, bajo condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* en medio líquido con NaHCO<sub>3</sub> durante el experimento.

### 2.3.3. Actividad FQ-R y reducción de Fe por las raíces

La actividad de FQ-R se midió en raíces de plantas intactas sometidas a ambos tratamientos NaHCO<sub>3</sub> 10 mM y 20 mM.

*P. elaeagnifolia* mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en cuanto a la capacidad de reducción de hierro bajo el tratamiento NaHCO<sub>3</sub> 10 mM (Figura 28 A), mientras que con mayor concentración de bicarbonato no se encontraron diferencias entre genotipos ( $P=0.229$ ) (Figura 28 B).

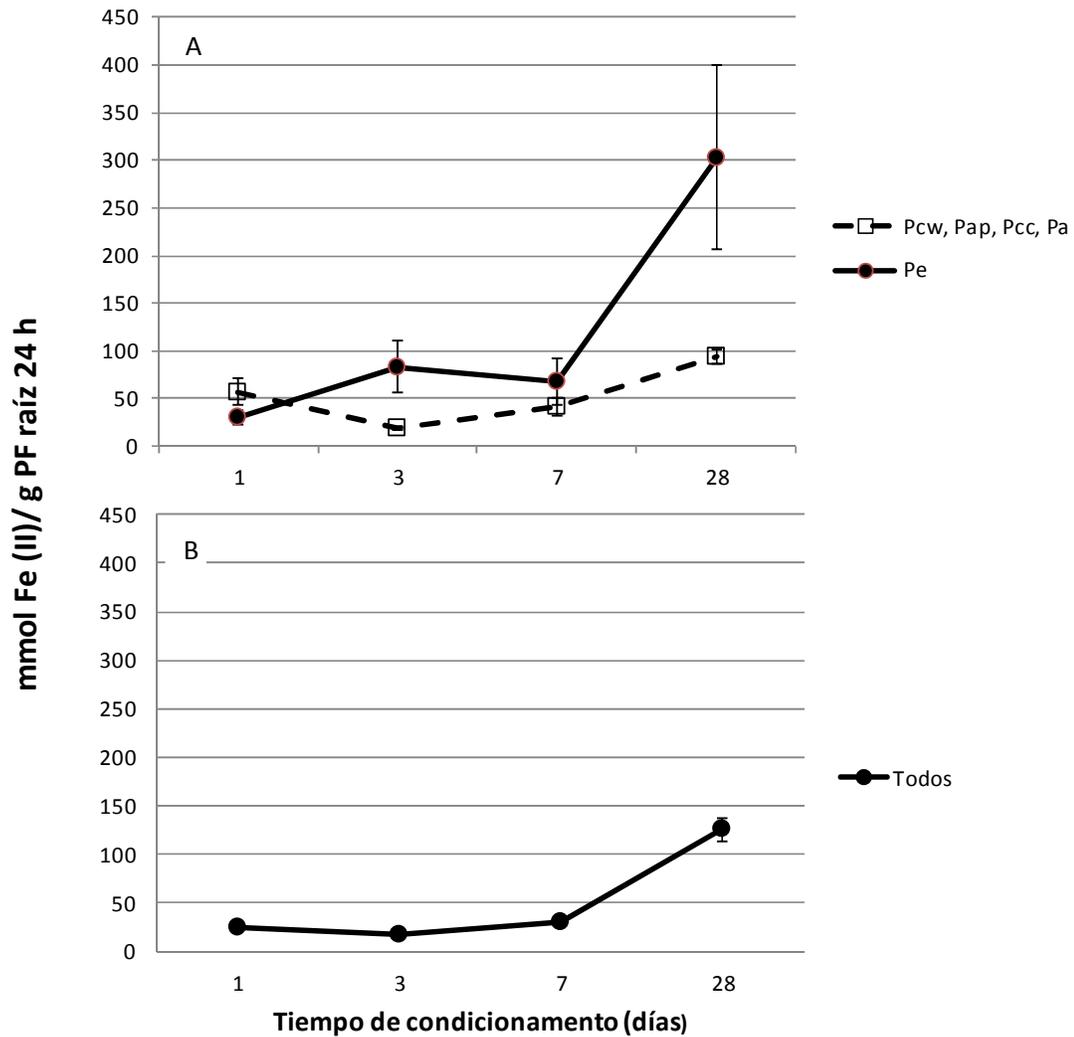


Figura 28. Capacidad de reducción de hierro por las raíces de las plántulas de cuatro híbridos *Pyrus* interespecíficos (Pa, Pap, Pcc, Pe) y *P. communis* "Williams" (Pcw) de libre polinización, bajo condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* (durante 1, 3, 7 y 28 días) en medio líquido con NaHCO<sub>3</sub> 10 mM (A) y 20 mM (B). Los valores medios provienen de las medidas tomadas sobre las raíces de cuatro repeticiones, una plántula cada una por genotipo. Las barras representan el error estándar.

Para la reducción no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.361$ ) en la interacción tratamiento e híbrido. El híbrido que presentó la mayor capacidad de reducción de hierro fue *P. elaeagrifolia*, mientras que el que presentó la menor capacidad de reducción fue *P. communis* "Williams" (Figura 29).

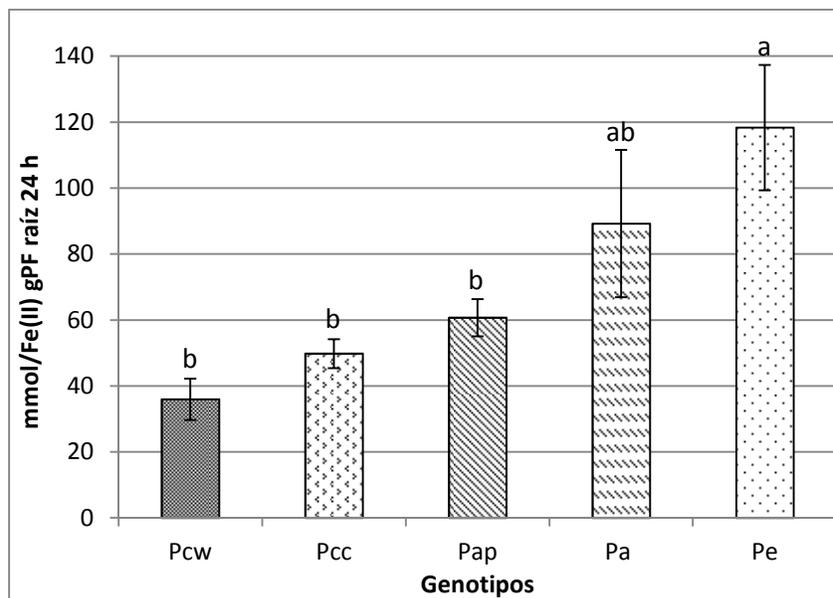


Figura 29. Capacidad de reducción de hierro por las raíces de las plántulas de cuatro híbridos *Pyrus* interespecíficos (Pa, Pap, Pcc, Pe) y *P. communis* "Williams" (Pcw) de libre polinización, bajo condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* en medio líquido con  $\text{NaHCO}_3$  durante el experimento.

#### 2.3.4. Exudación de fenoles totales en el medio de cultivo *in vitro*

La cuantificación de fenoles que se realizó a partir de los exudados de las raíces. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P = 0.713$ ) por lo que los valores obtenidos a lo largo del experimento se presentan en un solo gráfico donde se muestra el comportamiento de los híbridos interespecíficos y la variedad de polinización libre Williams sometidos a condiciones de deficiencia de hierro con ambos tratamientos (10 y 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ ). *P. communis* "Williams" mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) con los otros híbridos en la respuesta de exudación de fenoles totales al medio, presentando una producción considerable de estos compuestos en los días 3 y 28, pero con un descenso en el día 7. La disminución de fenoles totales exudados al medio en el día 7, también se presentó, aunque en menor medida, en el resto de los genotipos, por lo cual se agrupan en una misma tendencia de comportamiento.

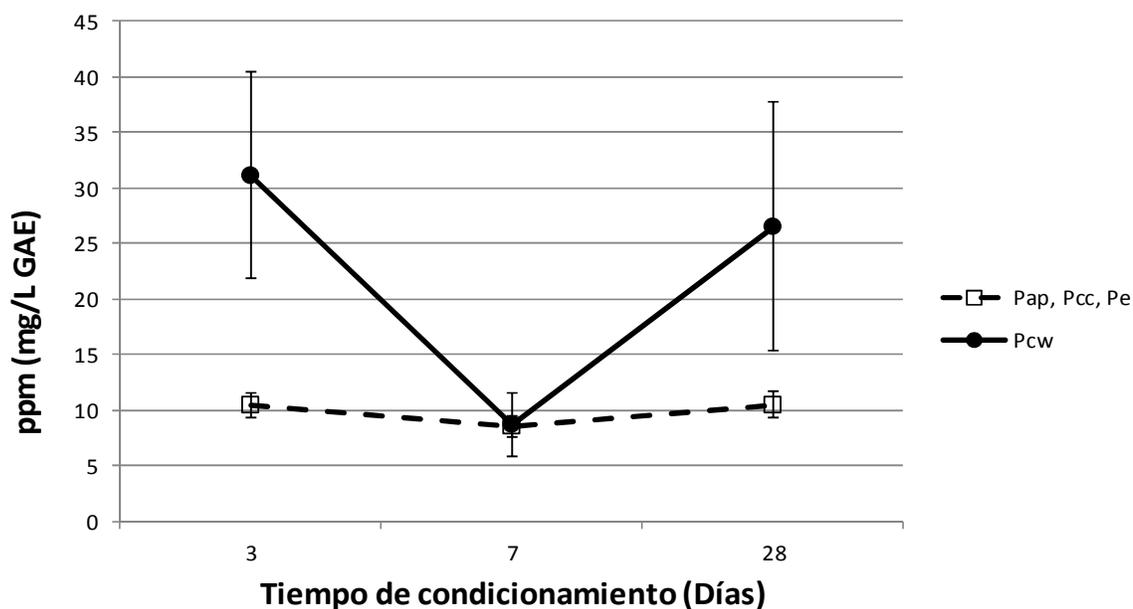


Figura 30. Exudación de fenoles totales al medio por las raíces de las plántulas de cuatro híbridos *Pyrus* interespecíficos (Pa, Pap, Pcc, Pe) y *P. communis* "Williams" (Pcw) de libre polinización, bajo condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* (durante 3, 7 y 28 días) en medio líquido con  $\text{NaHCO}_3$ .

La exudación de fenoles totales al medio tampoco mostró diferencias significativas ( $P = 0.164$ ) en cuanto a la interacción tratamiento e híbrido. En términos generales, *P. communis* "Williams" presentó una mayor exudación de fenoles totales al medio que el resto de los híbridos *P. communis cordata*, *P. elaeagnifolia* y *P. amygdaliformis persica* (Figura 31).

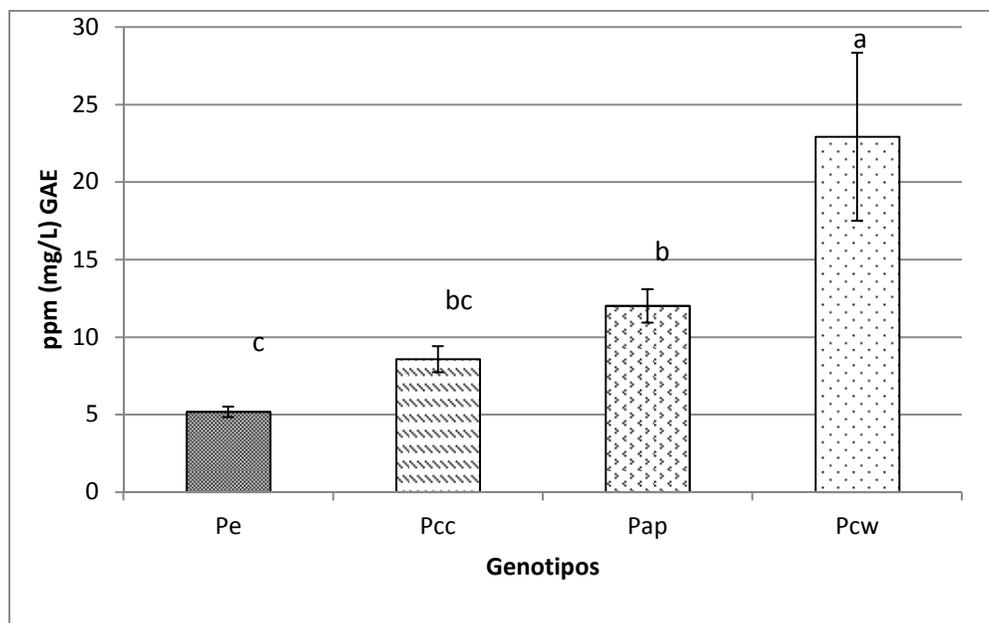


Figura 31. Exudación de fenoles totales al medio por las raíces de las plántulas de cuatro híbridos *Pyrus* interespecíficos (Pa, Pap, Pcc, Pe) y *P. communis* "Williams" (Pcw) de libre polinización, bajo condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* en medio líquido con NaHCO<sub>3</sub> durante el experimento.

## 2.4. DISCUSIÓN

Las plantas dicotiledóneas, entre las que se incluye la especie *Pyrus*, están clasificadas como estrategia I, las cuales están adaptadas a baja disponibilidad de Fe gracias a respuestas fisiológicas que incluyen el incremento en la excreción de protones, la elevada reducción de Fe<sup>3+</sup> y la exudación de ácidos orgánicos y fenoles (Römheld, 1986). La diferencia más significativa entre los híbridos examinados reside en la habilidad de reducir Fe, acidificar el medio y la capacidad de mantener o incrementar los niveles de clorofila total en hojas.

El mayor contenido de clorofila en hojas se encontró en *P. communis cordata*, lo que sugiere que este híbrido es el más tolerante a clorosis férrica, mientras que *P. elaeagnifolia* presentó el menor contenido de clorofila en hojas, lo que sugiere una mayor susceptibilidad a este desequilibrio fisiológico.

En general, en el tratamiento 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, los genotipos muestran una recuperación en los niveles de clorofila a lo largo del experimento, a excepción de *P. communis* "Williams", lo que nos sugeriría que este genotipo, un *Pyrus* de libre polinización seleccionado por su resistencia a clorosis férrica en campo, es más susceptible a la clorosis férrica que el resto de los híbridos interespecíficos analizados. En otras palabras, los híbridos seleccionados por su resistencia a clorosis férrica en campo muestran una respuesta favorable ante las condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* y por tanto se consideran más resistentes a la clorosis férrica que *P. communis* "Williams", sobre todo *P. communis cordata* y *P. amygdaliformis persica*.

El estudio previo realizado por Dolcet-Sanjuan *et al.*, (2004), quienes utilizaron un mayor número de híbridos interespecíficos clonados derivados de los mismos cruzamientos que los analizados en el presente trabajo, demostró que las plántulas más tolerantes a la clorosis férrica se originaron de los cruzamientos interespecíficos entre el Pyriam y *P. amygdaliformis* (P257), seguidos por *Pyrus communis cordata* (P256) y *P. amygdaliformis persica* (P264). Sus resultados confirmaron una buena correlación entre la evaluación de la tolerancia a las condiciones de deficiencia de hierro *in vitro* y en campo de las plantas injertadas provenientes de esos cruces interespecíficos. Nuestro estudio demostró que *P. communis*

*cordata* presenta mayor contenido en clorofila y capacidad de acidificar el medio que el resto de los híbridos analizados. *P. amygdaliformis* también presentó un buen comportamiento ante condiciones de deficiencia de hierro *in vitro*, sobre todo en la capacidad reductora de hierro y la acidificación del medio. Sin embargo, el menor número de réplicas utilizadas en nuestro ensayo puede ser un factor determinante para no encontrar los mismos resultados para los híbridos con *P. amygdaliformis*. Por lo cual sería recomendable analizar más individuos de este híbrido.

Por otro lado, se observó que una concentración mayor de  $\text{NaHCO}_3$  retrasó la recuperación de los híbridos. El aumento de los niveles de clorofila de todos los genotipos se produjo al final del experimento, superando los niveles iniciales de clorofila, este comportamiento fue más evidente en plántulas en medio con  $\text{NaHCO}_3$  20 mM.

La susceptibilidad y resistencia a la clorosis férrica difiere entre especies frutales y leñosas. Algunos autores han reportado que la resistencia a clorosis férrica de los genotipos se relaciona con una mayor reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  debido a la activación de la Fe-quelato reductasa y la acidificación del apoplasto de la raíz por acción de la  $\text{H}^+$ ATPasa similar al comportamiento de las especies herbáceas (Cinelli, 2011 y Jiménez *et al.*, 2008).

Esta relación entre la capacidad de reducción de hierro en las raíces y la tolerancia a clorosis férrica se ha reportado en especies como el manzano (Ao *et al.*, 1985), patrones y cultivares de melocotón (Jiménez *et al.*, 2008 y Cinelli, 2011), uva (Covarrubias y Rombolà, 2015), kiwi (Vizzotto *et al.*, 1999), cítricos (Martínez Cuenca, 2012) donde la deficiencia de Fe aumentó la actividad FQ-R en las especies tolerantes. Sin embargo en especies como el mango (Shenker *et al.*, 1995) y en varios patrones de membrillero y peral (Iglesias *et al.*, 2004; Asín *et al.*, 2007 y Donnini *et al.*, 2009) no han encontrado relación alguna entre el incremento de la actividad Fe-quelato reductasa y la resistencia a la baja disponibilidad de hierro.

*P. elaeagrifolia*, a pesar de la evidente aparición de los síntomas de clorosis férrica en las hojas, mostró una mayor capacidad de reducción de hierro. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Asín *et al.* (2007) quienes demostraron que en condiciones *in vitro* el híbrido con la mayor capacidad reductora era *P. elaeagrifolia* (seguido por *P. amygdaliformis* y *P. amygdaliformis persica*), el cual presentaba los niveles más bajos de clorofila. *P. communis cordata* tuvo una actividad reductora baja, sin embargo como se mencionó anteriormente, presentó mayor resistencia a la deficiencia de hierro evidenciado por la

recuperación de la clorofila en las hojas al ser sometido a medio con bicarbonato. Por lo tanto, nuestros resultados señalan que el peral es una especie en la cual la capacidad de reducir hierro en el sistema radical no está relacionada con la tolerancia a clorosis férrica.

En cuanto a la acidificación del medio se ha reportado mayor extrusión de  $H^+$  en genotipos resistentes a la deficiencia de Fe en frutales como uva (Jiménez et al., 2008 y Covarrubias y Rombolà, 2015) y kiwi (Vizzotto et al., 1999). En un estudio comparativo entre patrones de *P. communis* y *C. oblonga* bajo condiciones de deficiencia de Fe, Tagliavini et al., (1995) encontraron que había mayor acidificación del medio en los genotipos más resistentes de peral que en los de membrillero.

*P. communis cordata* mostró la mayor capacidad de acidificación del medio por lo que la acidificación del medio sí podría considerarse como un parámetro relacionado con la tolerancia a clorosis férrica en las especies *Pyrus*.

Es así que, aunque la activación de las enzimas  $H^+$  ATPasa y FQ-R en las raíces de las plantas sometidas a baja disponibilidad de Fe es considerada por algunos autores una acción sinérgica de ambas enzimas para mejorar la adquisición de este elemento, en el caso de *Pyrus* spp. no se observa relación entre estos dos parámetros. Sería necesario estudiar en la membrana celular de las hojas si el nivel de reducción de hierro está o no relacionada con la clorosis foliar, tal como sugieren los resultados con suspensiones celulares (Dolcet-Sanjuan et al., 1992).

Nuestros resultados señalan que *P. communis cordata* es el híbrido interespecífico que muestra mayor resistencia a la clorosis férrica en los ensayos de tolerancia a clorosis férrica *in vitro* dada su capacidad de acidificar el medio de cultivo en condiciones alcalinas y su recuperación en los niveles de clorofila en hojas bajo condiciones de déficit de hierro.

Por último, Dolcet-Sanjuan et al., (2004) observaron que la tolerancia a clorosis férrica de las plántulas de los híbridos interespecíficos *Pyrus* obtenidos *in vitro* se mantuvo después de ser injertados en el campo con la variedad Conference, incluso las lecturas SPAD fueron superiores en los árboles injertados. Sin embargo, en este mismo estudio, no se encontró correlación a nivel individuo, pero sí a nivel de población derivada del mismo cruzamiento, entre los valores SPAD obtenidos en las plántulas *in vitro* durante el ensayo de tolerancia a

deficiencia de hierro y los valores obtenidos en campo después de que se midiera el nivel de clorofila en estos patrones injertados con la variedad Conference y sin injertar.

Debido a la variabilidad entre las respuestas presentadas en condiciones *in vitro*, por los híbridos interespecíficos *Pyrus* seleccionados, y su relación con la deficiencia de hierro, es conveniente realizar más ensayos y determinar nuevos parámetros que permitan identificar las mejores respuestas ante el déficit de hierro y así obtener un método para la selección de clones resistentes a clorosis férrica con base en estas respuestas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este capítulo nos condujeron a la selección de los clones más y menos eficientes en los parámetros analizados (nivel de clorofila en hojas, acidificación del medio de cultivo, reducción de hierro y exudación de fenoles totales) con el fin de estudiar las respuestas fisiológicas, bioquímicas y de estrés oxidativo, así como el estado nutrimental y el estado del aparato fotosintético de cada uno de los individuos.

La identificación de las respuestas fisiológicas para las que los distintos híbridos son más eficientes, permitirá centrar los esfuerzos de selección de otros híbridos producidos y evaluados, en las respuestas más adecuadas. Por ejemplo, sería más adecuado centrar la selección de híbridos que provienen de *P. communis cordata* y *P. amygdaliformis* por la respuesta de acidificación del medio, y los híbridos que provienen de *P. elaeagnifolia* y *P. amygdaliformis* por su capacidad de reducir hierro.

## **CAPÍTULO 3. Nutrición y respuestas fisiológicas, bioquímicas y de estrés oxidativo ante deficiencia de hierro inducida**

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

La exposición de plantas a diferentes tipos de estrés como la privación de nutrientes puede dar lugar a una acumulación excesiva de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) a nivel celular. En las células vegetales los ROS como el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) son producidos principalmente en los cloroplastos, la mitocondria y los peroxisomas, así como por las NADPH oxidasa unidas a la membrana y las NAD(P)H oxidasas unidas a la pared celular (Agnolon *et al.*, 2001; Demiral y Türkan, 2005; Latowski *et al.*, 2010 y Weydert y Cullen, 2010).

El estrés oxidativo ocurre debido al desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad del organismo de mantener las ROS en niveles no tóxicos. Estas moléculas reaccionan con los lípidos de las membranas a través de un proceso conocido como peroxidación lipídica, en el cual se da una degradación oxidativa de los lípidos tras sucesivas reacciones en cadena, ocasionadas por los radicales libres generados ante situaciones de estrés y tiene como producto final malondialdehído (MDA). El grado de avance de esta reacción puede determinarse a partir de la cuantificación este compuesto (Agnolon *et al.*, 2001; Demiral y Türkan, 2005 y Azooz *et al.*, 2012).

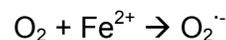
La activación de ROS puede presentar una amenaza para las plantas, sin embargo también sirve como un indicador de estrés y como un mensajero secundario activando una señal de respuesta al estrés, de esta manera los niveles de estos compuestos deben ser controlados por la activación de sustancias antioxidantes de origen enzimático y no enzimático (Latowski *et al.*, 2010; Weydert y Cullen, 2010 y Azooz *et al.*, 2012).

El sistema de defensa antioxidante de las plantas incluye compuestos de naturaleza proteínica como las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y catalasa (CAT) y compuestos no proteínicos como la vitamina E, los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, y terpenoides, pertenecientes a la ruta de los fenilpropanoides, además del ácido ascórbico, el glutatión y los pigmentos carotenoides (Agnolon *et al.*, 2001; López-Blancas *et al.*, 2014 y Ortega-Maldonado *et al.*, 2014).

La primer enzima en la línea de defensa es la superóxido dismutasa, la cual cataliza la dismutación del anión superóxido  $O_2^{\cdot-}$  (producido bajo condiciones de estrés) a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Latowski *et al.*, 2010 y Ortega-Maldonado *et al.*, 2014). Posteriormente  $H_2O_2$  es degradado por la catalasa y varias peroxidadas y el ascorbato glutatión, también conocido como el ciclo Halliwell-Asada (Latowski *et al.*, 2010).

La superóxido dismutasa puede contener cobre (Cu), Zinc (Zn), Manganeso (Mn) o hierro (Fe) como componentes metálicos. En cloroplastos FeSOD es la típica isoenzima de SOD, pero también se puede encontrar en la mitocondria y en los peroxisomas en el citoplasma (Azooz *et al.*, 2012 y Ortega-Maldonado *et al.*, 2014).

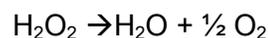
En sistemas aerobios, muchos quelatos de hierro de bajo peso molecular y el hierro libre tanto en forma  $Fe^{3+}$  como  $Fe^{2+}$ , están involucrados en la formación de estas especies reactivas del oxígeno y en la reacción Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1986):



Los radicales libres son responsables de la oxidación de los ácidos orgánicos poliinsaturados de las membranas lipídicas. Para prevenir los daños oxidativos por hierro, este ha de estar fuertemente unido a estructuras orgánicas como las proteínas hemo y no hemo, que permiten controlar la racción reversible de oxidación reducción (Fernández López *et al.*, 1994 y Weydert y Cullen, 2010).

El hierro es un constituyente del heme de la catalasa, de la citocromo oxidasa y de la peroxidasa, las cuales reducen su actividad drásticamente bajo condiciones de deficiencia de hierro, sobre todo la catalasa, por lo que es un indicador bioquímico confiable de clorosis férrica (Fernández López *et al.*, 1994).

La enzima catalasa se encarga de la dismutación del peróxido de hidrógeno según:



Esta enzima juega un papel muy importante, junto a superóxido dismutasa (SOD), tanto en la fotorrespiración como en la ruta glucolítica.

El superóxido y peróxido de hidrógeno, que se producen en las células durante la reducción del oxígeno molecular, son catalizados por  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  para formar radicales hidroxilos altamente reactivos. El radical hidroxilo puede dañar la mayoría de los componentes como el ADN, proteínas, lípidos y azúcares. Así, la absorción de Fe en las plantas está altamente regulada para evitar el exceso de acumulación (Kim y Guerinot, 2007 y Weydert y Cullen, 2010).

Tanto las catalasas como las peroxidasas catalizan la polimerización de fenoles a lignina en la rizodermis y endodermis de las raíces. En condiciones de deficiencia de hierro, la actividad de ambas enzimas se ve reducida, consecuentemente, la producción de lignina en las raíces se ve disminuida (Marschner, 1995 y Trejo y Pascual, 2010).

La reducción de hierro se ve favorecida debido a la deficiente síntesis de lignina en las raíces. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  requerido en esta síntesis es producido por una peroxidasa que cataliza la oxidación del NADH en la membrana plasmática de la raíz (Fernández López *et al.*, 1994). Al disminuir la actividad peroxidasa por falta de Fe, la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  disminuye, con lo que disminuye la velocidad de oxidación del NADH, de esta manera aumenta la posibilidad de reducir los quelatos de hierro (Briat *et al.*, 2007).

### **3.1.2. Biosíntesis de ácidos orgánicos**

La síntesis de ácidos orgánicos se lleva a cabo en el interior de la mitocondria durante el ciclo de Krebs. El piruvato es el sustrato previo a la síntesis de ácidos orgánicos, se sintetiza en el citoplasma de la célula a partir de dos rutas metabólicas, ya sea directamente mediante la fosforilación del fosfoenolpiruvato catalizada por la enzima piruvato quinasa; o bien por la acción de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) (Echevarría *et al.*, 2010 y Martínez Cuenca, 2012).

PEPC cataliza la carboxilación del fosfoenolpiruvato a oxalacetato, el cual puede ser reducido posteriormente a malato por la enzima malato deshidrogenasa citosólica (cMDH) (Echevarría *et al.*, 2010). Finalmente, el malato citosólico se convierte en piruvato por la enzima málico ya sea en el citosol o bien en el interior de la mitocondria, activando la síntesis del resto de ácidos del ciclo (Martínez Cuenca, 2012).

En la mayoría de las especies dicotiledóneas, la deficiencia de hierro provoca un incremento en la concentración de ácidos orgánicos (ciclo de Krebs), principalmente citrato y malato, en

las zonas subapicales de la raíz, hojas y xilema (Fernández López *et al.*, 1994; Abadía *et al.*, 2002; Rabotti *et al.*, 1995; Nikolic y Römheld, 1999 y López-Millán *et al.*, 2000).

Existen varias teorías que explican la acumulación de ácidos orgánicos bajo deficiencia de Fe. Algunos autores mencionan que esta aculación puede estar relacionada con una disminución de la actividad de aconitasa (Bacon *et al.*, 1959, De Kock, 1981). Sin embargo, se ha encontrado que la actividad de la aconitasa no disminuye de forma consistente con la deficiencia de Fe en las raíces (de Vos *et al.*, 1986; Pich y Scholz, 1993 y López-Millán *et al.*, 2001).

Por otro lado Landsberg (1981, 1986) informó que el incremento de ácidos orgánicos en las raíces deficientes de hierro está relacionado con un aumento en la extrusión de protones por lo que la alcalinización del citoplasma asociada con el flujo de protones podría ser responsable de la activación de PEPC en el mecanismo celular pH-stat (Davies, 1973) (Abadía *et al.*, 2002 y Zocchi, 2006), con lo cual se aumenta la fijación de CO<sub>2</sub> a partir del bicarbonato e incrementa la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Landsberg, 1986; Rabotti, *et al.*, 1995; Agnolon *et al.*, 2001; Abadía *et al.*, 2002 y Zocchi, 2006).

La deficiencia de Fe también estimula la activación de otras enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs y la ruta glicolítica como malato deshidrogenasa (MDH), fumarasa, citrato sintetasa e isocitrato deshidrogenasa (López-Millán *et al.*, 2001; Zocchi, 2006 y Covarrubias y Rombolà, 2015).

Además, en condiciones de deficiencia de Fe, la enzima PEPC está encargada de mantener el estado del pH y satisface las demandas de ATP y NAD(P)H mejorando el flujo catabólico de los carbohidratos (Agnolon *et al.*, 2001; Donnini *et al.*, 2009 Covarrubias y Rombolà, 2015).

Los ácidos orgánicos son los responsables de mantener al hierro solubilizado en el interior de las plantas. El citrato y la nicotinamina (NA) se unen a Fe<sup>3+</sup> formando complejos estables con Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>, estos complejos desempeñan un papel importante en el transporte de Fe a corto y o largo recorrido (Fernández López *et al.* 1994 y Kim y Guerinot, 2007).

## 3.2. METODOLOGÍA

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de la evaluación de tolerancia a la clorosis férrica, se seleccionaron los individuos que presentaron mayor y menor rendimiento en los diferentes parámetros fisiológicos medidos bajo déficit de hierro para realizar los análisis de estrés oxidativo (Tabla 4).

Se tomaron en cuenta las respuestas obtenidas al día 3, con el tratamiento de 10 mM NaHCO<sub>3</sub> ya que se consideró que en ese día y bajo ese tratamiento se presentaban las respuestas más significativas e interesantes. Se seleccionaron dos individuos *P. communis cordata* (Pcc38 y Pcc45), dos de *P. amygdaliformis persica* (Pap 101 y Pap 103), dos de *P. elaeagrifolia* (Pe55 y Pe111) y nuevamente como control *P. communis* “Williams (Pcw 12).

**Tabla 4. Clones seleccionados para medir las respuestas enzimáticas frente al estrés oxidativo. Se indican los valores obtenidos para cada uno de ellos en los parámetros analizados en el experimento anterior de tolerancia a clorosis férrica *in vitro*.**

Genotipo	Clorofila total, Valor SPAD	Fenoles totales, ppm (mg/L) GAE	Reducción Fe, mmol Fe(II) / g FWRroot 24h	pH del medio
Pap101	29.02 ab	19.25 a	8.46 a	8.94 cd
Pap103	30.42 a	10.19 a	11.33 a	9.12 d
Pcc38	31.33 a	15.45 a	6.72 a	8.98 cd
Pcc45	31.91 a	6.9 a	12.2 a	7.41 a
Pe111	20.49 b	4.95 a	78.36 a	7.9 ab
Pe55	20.55 b	6.75	75.61 a	8.4 bc
Pcw12	31.16 a	30.5 a	5.6 a	8.88 cd

El material vegetal fue obtenido a partir de los cultivos *in vitro* establecidos en el primer experimento. El material fue multiplicado y enraizado de la misma forma que en el experimento anterior. Se utilizaron 10 plantas por cada genotipo.

### 3.2.1. Cultivo hidropónico

Las plantas obtenidas *in vitro* que presentaron un sistema radical bien desarrollado y con 3 o 4 hojas desarrolladas fueron transferidas a medio hidropónico tres días antes de iniciar el ensayo para su aclimatación en cubetas de cultivo de 7 L.

Se colocaron 10 plantas de cada genotipo en bases o soportes de polietileno con agujeros de aproximadamente 3 cm de diámetro donde fueron colocadas las plantas siendo sumergiendo completamente las raíces en el líquido. Se utilizaron trozos de esponja de poliuretano de 2 a 3 cm para sujetar el tallo en el soporte de polietileno y dar estabilidad a la planta.

Se utilizó un sistema de aireación mediante gomas, en un rango de aireación de 200 a 300 ml/min para obtener una buena aireación y recirculación de la solución nutritiva en la cubeta.

El medio utilizado fue el mismo descrito por Chaney *et al.*, 1992 con algunas modificaciones. Al igual que para el cultivo *in vitro* se utilizó una concentración de 2  $\mu\text{M}$  FeDTPA. Para este ensayo solo se utilizó la concentración de 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  para inducir la deficiencia de hierro. El pH de la solución final fue de 8.06.

Para los análisis estadísticos se consideraron todas las cubetas dentro de un bloque para ser consideradas como una réplica y para seleccionar a los genotipos. Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias lo que permitió la identificación de los genotipos más resistentes contra los genotipos más susceptibles.

### **3.2.2. Contenido de clorofila en hojas**

Para la cuantificación del contenido total de clorofila en las hojas de las plántulas analizadas se utilizó el dispositivo de mano medidor de clorofila Minolta SPAD-502, el cual realiza mediciones mediante fluorescencia electrónica de la clorofila.

Se realizaron 3 lecturas por plántula en cada una de las primeras 3 hojas extendidas de cada plántula.

### **3.2.3. Extracción de la fracción enzimática y cuantificación de proteína**

Para la cuantificación de proteína y la medición de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) se realizó la extracción de la fracción enzimática. Se homogenizaron de 0.1-0.2 g de material vegetal proveniente de raíz en tubos Eppendorf® con 1 ml de solución tampón de fosfato pH 8. Se centrifugó a 10000 rpm, 30 minutos a 4 °C. Se hicieron alícuotas de 300  $\mu\text{l}$  y se almacenaron a -80 °C para su posterior uso para los análisis correspondientes.

La cuantificación de proteína se realizó con un espectrofotómetro de espectro total (220-750nm) NanoDrop® ND-1000 a una absorbancia de 280 nm.

### **3.2.4. Actividades enzimáticas**

#### ***Catalasa (CAT)***

La actividad de la catalasa (EC 1. 11. 1. 6) se evaluó con el método descrito por (Aebi, 1984) con modificaciones, donde se cuantificó mediante la reacción que utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato de la enzima a bajas concentraciones.

Para medir la absorbancia de cada muestra se adicionaron 40 µl de la extracción enzimática con 1.8 ml de solución tampón de fosfato pH 7.2 en cubetas de cuarzo. La reacción se inició añadiendo 200 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se midió el cambio de absorbancia a 240 nm ( $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) durante 5 minutos mediante espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzo UV-2450).

La actividad catalasa es expresada como unidades internacionales de actividad enzimática por miligramo de proteína (U/mg<sup>-1</sup>), cada unidad se define como la cantidad de enzima que descompone 1 mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 25 °C y pH 7.0.

#### ***Peroxidasa (POD)***

La actividad peroxidasa (EC 1. 11. 1. 7) fue determinada a través la oxidación de guaiacol en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chance y Maehly, 1954). Se adicionaron 100 µl del extracto enzimático en 600 µl agua Milli-Q® y 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % en una cubeta de cuarzo y se inició la reacción adicionando 100 µl guaiacol al 1 % diluido en etanol. El incremento de la absorbancia, debido a la formación de tetraguaiacol, fue medido a una longitud de onda de 470 nm ( $\epsilon_{470} = 26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) durante 3 min.

La actividad peroxidasa es expresada como unidades internacionales de actividad enzimática por miligramo de proteína (U/mg<sup>-1</sup>).

#### ***Superóxido dismutasa (SOD)***

La superóxido dismutasa cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular

La actividad SOD (EC 1. 15. 1. 1) fue medida mediante el kit de ensayo SOD Kit-WST de Sigma Aldrich® a partir de la extracción enzimática. En la cual la velocidad de reducción con O<sub>2</sub> está directamente relacionada con la actividad xantina oxidasa y es inhibido por SOD por

lo tanto el IC50 (50 % de inhibición de la actividad SOD) puede ser determinada por un método colorimétrico. La actividad SOD como una inhibición de la actividad puede ser cuantificada midiendo la disminución en la formación del color a 440 nm.

### **Malondialdehído (MDA)**

Malondialdehído es un producto de la peroxidación de lípidos de membrana y se determinó mediante el método descrito por Hodges *et al.*, 1999 en donde el MDA presente en las muestras se une al ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un compuesto con un máximo de absorción a 532 nm, longitud de onda la cual es proporcional a la concentración de MDA presente en la muestra.

Se trituraron 0.1 g de raíz en 4 ml de ácido tricloroacético 5 % (P/V) por 2 min. Se centrifugó la muestra a 5500 g por 5 min. Se tomaron alícuotas de 1 ml del sobrenadante y se añadió 4 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico 0.5 % (P/V) disuelto en ácido tricloroacético 20 % (P/V). Se incubó a 95 °C por 30 min, transcurrido este tiempo se enfrió inmediatamente en hielo. Se centrifugó nuevamente a 3000 g por 10 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm y 600 nm. El valor para la absorción no específica a 600 nm se sustrae.

La peroxidación lipídica fue estimada como el contenido de Sustancias Reactivas con Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) y expresadas como equivalentes de MDA y se calculó con el coeficiente de absorción  $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  como contenido de MDA (nmol/g) =  $(A_{532} - A_{600})/155 (\text{K}, \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 5 (\text{volumen}) \times 4 (\text{factor de dilución } 1000/\text{PF}(\text{g}))$ .

### **3.2.5. Análisis de ácidos orgánicos *in vitro* en raíces**

La determinación de ácidos orgánicos en raíces se realizó mediante HPLC. Se pesó 1 g PF de raíz y se homogenizó en 5 ml de HCl 0.025 N. El homogenizado se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C por 20 minutos.

Para filtrar las muestras se utilizaron Sep-Pak C18®, los cuales se activaron agregando 1.4 ml de metanol, 0.7 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q® y 1.4 ml de HCl 0.025 N.

Una vez activados los Sep-Pack, se agregaron 0.7 ml de la muestra, los cuales se desecharon para volver a adicionar otra vez 0.7 ml de la muestra y esta vez se recogieron en crioviales.

Los extractos se filtraron con un filtro Phenex® de 0.22 µm y se analizaron por HPLC (LC-10 AT, Shimadzu Corporation). La fase móvil fue acoplada con una columna YHC-Pack ODS-A. Las condiciones analíticas fueron las siguientes: volumen de inyección de 10 µL, velocidad de flujo de 0.5 ml min<sup>-1</sup>, columna T de 25-27 °C, fase móvil NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.7), tiempo de funcionamiento de 20 minutos, longitud de onda de detección a 210 nm (Tolrà et al 2005). La identificación de ácidos orgánicos pequeños se llevó a cabo mediante la comparación del tiempo de retención del componente en soluciones estándar. Para la cuantificación de los ácidos orgánicos en los extractos, se utilizó el área de pico de integración de las concentraciones conocidas de los estándares para construir una estructura curva de calibración.

### **3.2.6. Nutrición**

La determinación de los elementos presentes en las hojas de las plantas sometidas al tratamiento de deficiencia de hierro se realizó mediante espectroscopía atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP).

Para realizar el análisis, se trituró 0.1 g de vegetal seco en 5 ml ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 69 % y 2 ml agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30 % dejando la mezcla en predigestión durante toda la noche para romper los enlaces de los nutrientes.

Las muestras preparadas se introdujeron en un digestor Hot Block Environmental Express® por 4 h a 110 °C. Posteriormente las muestras se enrazaron a 25 ml con agua MilliQ® y se filtraron con una Jeringa y filtro de 0.45 µm.

Una vez digeridas las muestras preparadas, se llevaron al Servicio Científico-técnico de la UAB donde fueron analizadas mediante espectrometría atómica de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Perquin Elmer®, modelo Elan 6000).

## **3.3. RESULTADOS**

### **3.3.1. Contenido de clorofila en hojas**

Se midió la cantidad de clorofila en las hojas al inicio y al final del tratamiento. En todos los híbridos, a excepción de *P. communis* "Williams", el contenido de clorofila en hojas disminuyó al someter a las plantas a un medio con supresión de hierro durante 3 días (Figura 32 A). Sin embargo para *P. elaeagrifolia* la diferencia en el contenido de clorofila fue mínimo.

Se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) dentro de las especies y los clones (Tabla 6).

En específico, el clon Pe55, al igual que el clon Pcw12, presentó un aumento en el contenido de clorofila después de los 3 días de tratamiento (Figura 32 B).

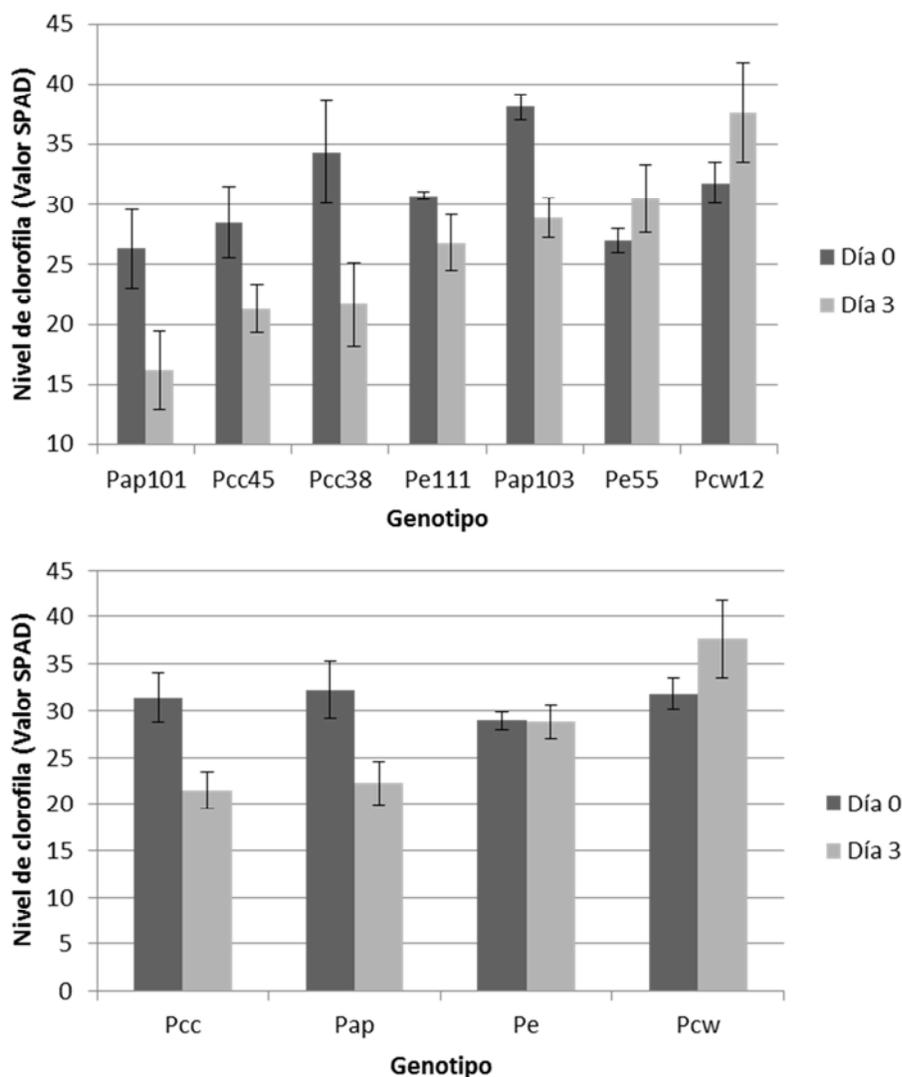


Figura 32. Contenido de clorofila en hojas de plántulas de A) *P. amygdaliformis persica* (Pap), *P. communis* “Williams” (Pcw), *P. communis cordata* (Pcc) y *P. elaeagrifolia* (Pe) y B) Clones de las especies *P. amygdaliformis persica* (Pap 101, Pap103), *P. communis* “Williams” (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38, Pcc45) y *P. elaeagrifolia* (Pe55, Pe111) medido al inicio del tratamiento y después de los 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu\text{M}$  FeEDDHA y 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ .

Tabla 5. Contenido de clorofila en hojas de plántulas de *P. amygdaliformis persica* (Pap), *P. communis* “Williams” (Pcw), *P. communis cordata* (Pcc) y *P. elaeagrifolia* (Pe) y B) Clones de las especies *P. amygdaliformis persica* (Pap 101, Pap103), *P. communis* “Williams” (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38, Pcc45) y *P. elaeagrifolia* (Pe55, Pe111) cultivadas durante 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu$ M FeEDDHA y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>.

Híbrido	Valores SPAD	Clon	Valores SPAD
<i>P. amygdaliformis persica</i>	24.612 b	Pap101	18.513 c
		Pap103	31.219 ab
<i>P. communis</i> “Williams”	<b>36.299 a</b>	Pcw12	<b>36.299 a</b>
<i>P. communis cordata</i>	23.805 b	Pcc38	24.610 bc
		Pcc45	23.000 bc
<i>P. elaeagrifolia</i>	28.801 ab	Pe55	29.705 ab
		Pe111	27.821 ac

Los valores son medias de repeticiones por tratamiento. Los valores con diferente letra indican diferencias significativas a  $P \leq 0.001$  con la prueba de contrastes Tukey.

Visualmente, los híbridos presentaron un cambio en la coloración de las hojas, de verde a rojo carmín. Este cambio de coloración fue más evidente en los híbridos pertenecientes a *P. communis cordata* (Pcc38 y Pcc45) (Figura 33 A). Los individuos pertenecientes a *P. elaeagrifolia* presentaron daño evidente al crecer en presencia de bicarbonato, mostrando síntomas evidentes de clorosis férrica, Pe55 presentó amarilleamiento en las hojas (Figura 33 B) y por otro lado, Pe111 presentó defoliación y aparición de zonas necróticas en las hojas (Figura 33 C). Por último, para *P. communis* “Williams” solo un 60 % de los individuos presentaron crecimiento y desarrollo de hojas nuevas; en el caso de los demás híbridos, el desarrollo de hojas nuevas de los individuos fue del 90-100 %.

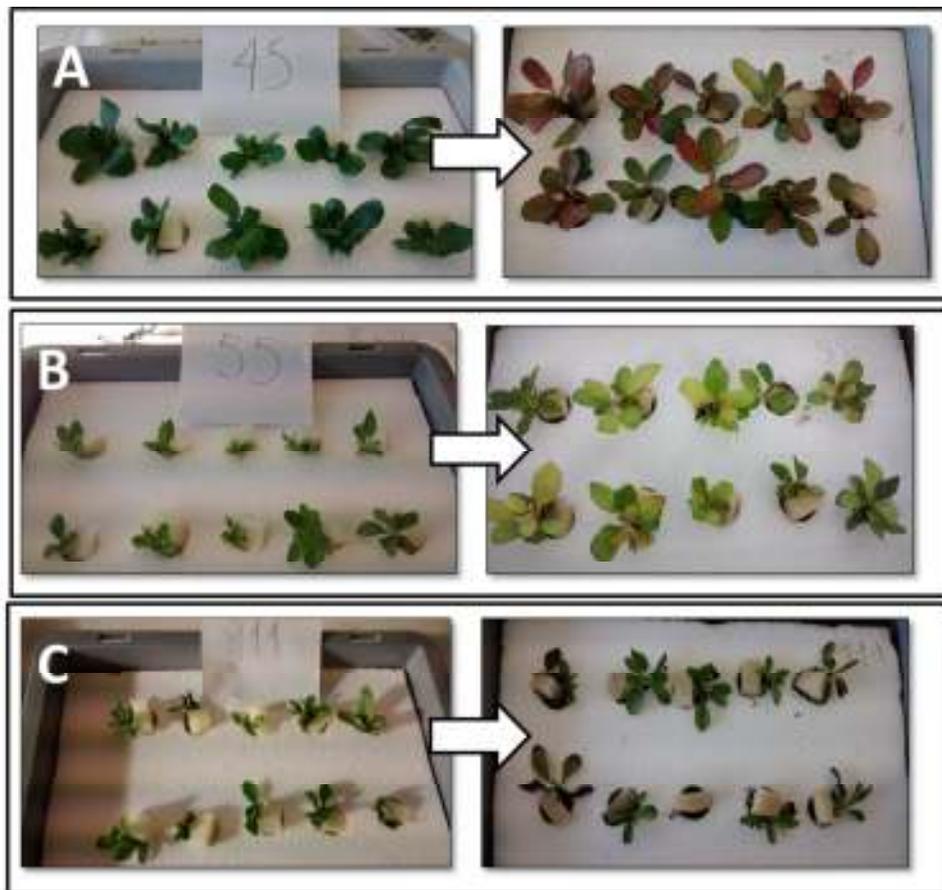


Figura 33. Cambio de coloración en las hojas de los híbridos en presencia de bicarbonato. A) Pcc45: cambio de color de verde a rojo carmín, B) Pe55: amarilleamiento de hojas y C) Pe111: zonas necróticas en hojas y defoliación.

### 3.3.2. Contenido de proteína

Para la determinación de las actividades enzimáticas se cuantificó la cantidad de proteína presente en las raíces de los individuos sometidos al tratamiento con bicarbonato. Todos los individuos presentaron cantidades suficiente de proteína total para realizar los ensayos correspondientes, siendo Pcw quien presentó el mayor contenido de proteína en las raíces (Tabla 7).

Tabla 6. Contenido de proteína total en hojas de plántulas de las especies *P. amygdaliformis persica* (Pap 101, Pap103), *P. communis* “Williams” (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38, Pcc45) y *P. elaeagrifolia* (Pe55, Pe111) cultivadas durante 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu\text{M}$  FeEDDHA y 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ .

Genotipo	Proteína total (mg/ml)
Pcw12	3.834
Pcc38	2.793
Pcc45	2.255
Pe55	1.875
Pap101	1.748
Pap103	1.087
Pe111	3.087

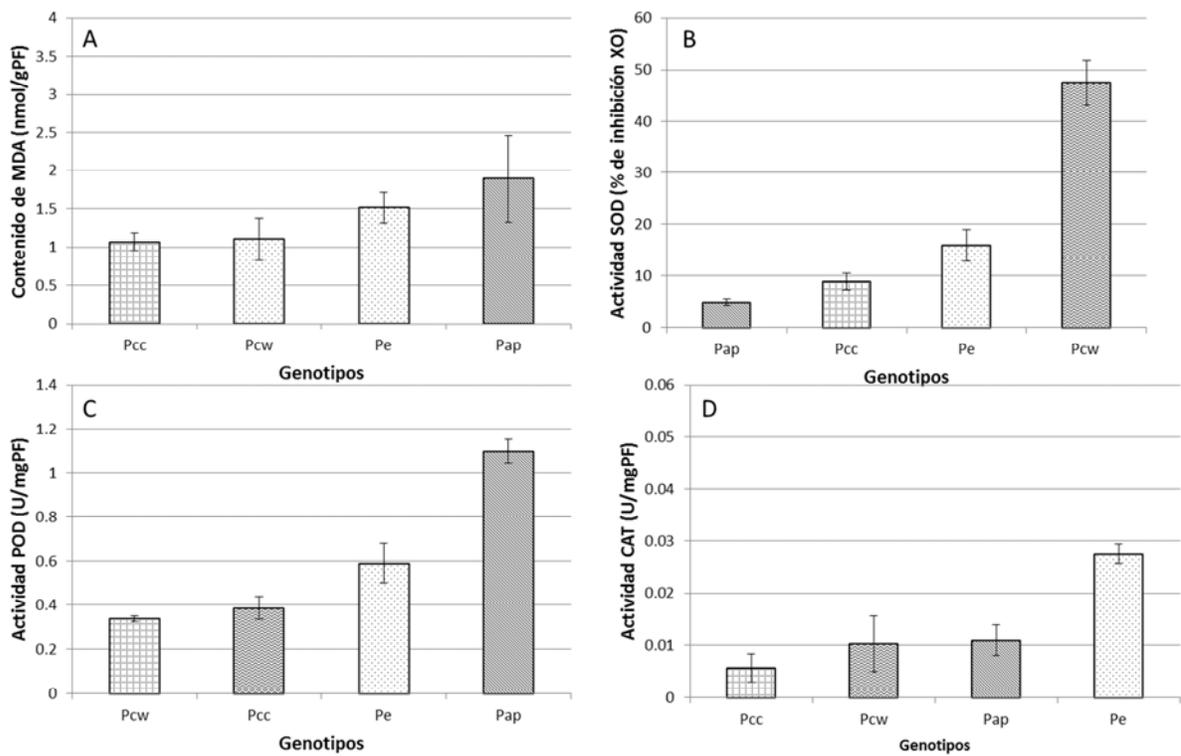
### 3.3.3. Actividades enzimáticas

*P. elaeagrifolia* y *P. amygdaliformis persica* presentaron mayor actividad enzimática CAT, POD y MDA (Figura 34). Sin embargo, para SOD quien presentó mayor actividad fue *P. communis* “Williams”, seguida de *P. elaeagrifolia* y siendo *P. amygdaliformis persica* quien mostró menor actividad. Estadísticamente, solo se observaron diferencias significativas en la actividad SOD ( $P \leq 0.001$ ) (Tabla 8).

Tabla 7. Actividad de las enzimas catalasa (CAT), Peroxidasa (POD), Superóxido dismutasa (SOD) y Malondialdehído (MDA) medida en raíces de plántulas de *P. amygdaliformis persica*, *P. communis* “Williams”, *P. communis cordata* y *P. elaeagrifolia* cultivadas durante 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu\text{M}$  FeEDDHA y 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ .

	CAT (U/mg)	POD (U/mg)	SOD (% inh. XO)	MDA (nmol/g)	Fenoles (ppm (mg/L) GAE)
<i>P. amygdaliformis persica</i>	0.016 a	0.004 a	4.857 c	1.892 a	5.812 a
<i>P. communis</i> “Williams”	0.014 a	0.001 a	<b>47.477 a</b>	1.101 a	13.805 a
<i>P. communis cordata</i>	0.008 a	0.002 a	8.851 bc	1.067 a	6.117 a
<i>P. elaeagrifolia</i>	0.039 a	0.003 a	15.809 b	1.514 a	4.650 a

Los valores son medias de repeticiones por tratamiento. Los valores con diferente letra indican diferencias significativas a  $P \leq 0.001$  con la prueba de contrastes Tukey.



**Figura 34. Actividad de las enzimas A) catalasa (CAT), B) Peroxidasa (POD), C) Superóxido dismutasa (SOD) y D) Malondialdehído (MDA) medida en raíces de plántulas de *P. amygdaliformis persica* (Pap), *P. communis* “Williams” (Pcw), *P. communis cordata* (Pcc) y *P. elaeagnifolia* (Pe) cultivadas durante 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu$ M FeEDDHA y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>.**

En particular Pe55 mostró la mayor actividad catalasa (Figura 35 C). Estadísticamente, hubo diferencias significativas en la actividad SOD y MDA ( $P \leq 0.001$ ). Pcw12 presentó mayor actividad SOD, mientras que Pap103 presentó mayor actividad en MDA (Tabla 9).

Tabla 8. Actividad de las enzimas catalasa (CAT), Peroxidasa (POD), Superóxido dismutasa (SOD) y Malondialdehído (MDA) medida en raíces de plántulas de *P. amygdaliformis persica* (Pap101, Pap103), *P. communis* "Williams" (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38, Pcc45) y *P. elaeagnifolia* (Pe55, Pe111) cultivadas durante 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu\text{M}$  FeEDDHA y 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ .

	CAT (U/mg)	POD (U/mg)	SOD (% inh. XO)	MDA (nmol/g)	Fenoles (ppm (mg/L) GAE)
Pap101	0.009 a	0.002 a	5.5 b	0.82 b	6.6 a
Pap103	0.023 a	0.005 a	4.2 b	2.96 a	4.7 a
Pcw12	0.015 a	0.001 a	47.5 a	1.10 b	13.8 a
Pcc38	0.004 a	0.002 a	10.1 bc	1.10 b	9.2 a
Pcc45	0.012 a	0.001 a	3.2 bc	1.03 b	1.5 a
Pe55	0.066 a	0.001 a	11.6 bc	1.17 b	6.7 a
Pe111	0.011 a	0.004 a	20.0 c	1.86 ab	1.5 a

Los valores son medias de repeticiones por tratamiento. Los valores con diferente letra indican diferencias significativas a  $P \leq 0.001$  con la prueba de contrastes Tukey.

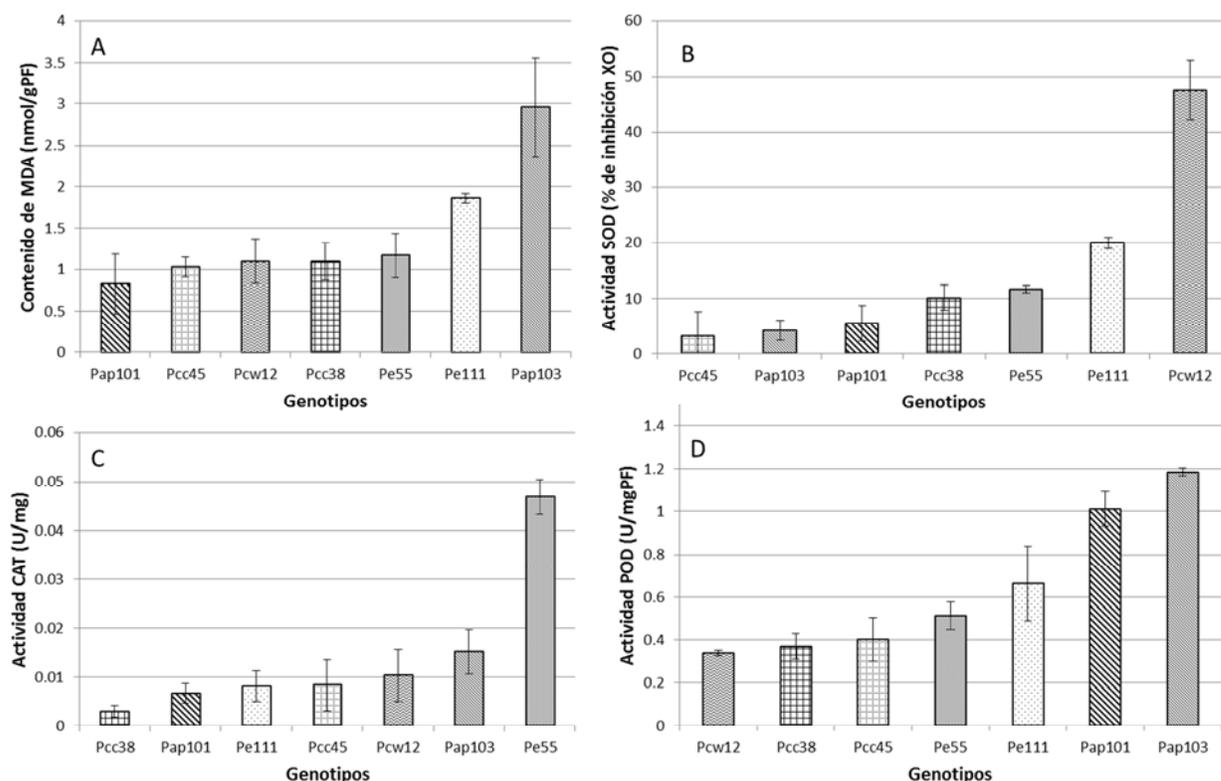


Figura 35. Actividad de las enzimas A) catalasa (CAT), B) Peroxidasa (POD), C) Superóxido dismutasa (SOD) y D) Malondialdehído (MDA) medida en raíces de plántulas de *P. amygdaliformis persica* (Pap101, Pap103), *P. communis* "Williams" (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38, Pcc45) y *P. elaeagnifolia* (Pe55, Pe111) cultivadas durante 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu\text{M}$  FeEDDHA y 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ .

### 3.3.4. Contenido de ácidos orgánicos en raíces

El oxalato es el ácido orgánico que se encontró en todos los individuos. Sin embargo los individuos perteneciente a *P. elaeagrifolia* fueron los que presentaron mayor y menor concentración de este ácido orgánico (Tabla 10). En el caso de Pe55 presentó 6673.52 µg/gPF, mientras que en Pe111 se encontraron tan solo 139.891 µg/gPF de oxalato. El único individuo que presentó citrato en las raíces fue Pcc45 (356.911 µg/gPF) donde también se encontró presencia de succinato (1373.971 µg/gPF). Pcw12 presentó mayor variedad de ácidos orgánicos como tartárico (498.826 µg/gPF), malato (601.428 µg/gPF) y succinato (1063.435 µg/gPF). El malato también se encontró en Pap101 (5318.323 µg/gPF), mientras que el ácido tartárico además de encontrarse en Pcw12 se encontró en las raíces de Pap103 (349.9 µg/gPF) y Pe111 (948.632 µg/gPF).

Tabla 9. Concentración de Oxalato en las raíces de las de *P. amygdaliformis persica* (Pap101, Pap103), *P. communis* “Williams” (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38, Pcc45) y *P. elaeagrifolia* (Pe55, Pe111) cultivadas durante 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2 µM FeEDDHA y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>.

Genotipo	Oxalato (µg/gPF)
Pcw12	223
Pcc38	3948
Pcc45	5560
Pe55	6673
Pap101	4938
Pap103	416
Pe111	139

### 3.3.5. Nutrición

En cuanto al contenido de macronutrientes medido en las hojas de las plántulas hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en los valores de K, Mg y Na. *P. elaeagrifolia* presentó el mayor contenido de Mg y Na; mientras que *P. communis cordata* presentó mayor contenido de K en hojas (Tabla 11).

Tabla 10. Concentración de macronutrientes (P, K, Ca, Mg, S) y Na medido en las hojas de plántulas de *P. amygdaliformis persica*, *P. communis* “Williams”, *P. communis cordata* y *P. elaeagrifolia* cultivadas durante 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu\text{M}$  FeEDDHA y 10 mM  $\text{NaHCO}_3$

Híbrido	P ( $\mu\text{g/g}$ )	K ( $\mu\text{g/g}$ )	Ca ( $\mu\text{g/g}$ )	Mg ( $\mu\text{g/g}$ )	S ( $\mu\text{g/g}$ )	Na ( $\mu\text{g/g}$ )
<i>P. amygdaliformis persica</i>	1689 a	13708 b	9676 a	4959 ab	1890.5 a	14972 ab
<i>P. communis</i> “Williams”	1437 a	8764 c	9896 a	3787 b	1383 a	14938 ab
<i>P. communis cordata</i>	1475 a	<b>16430a</b>	9220 a	4240 ab	1510 a	11479 b
<i>P. elaeagrifolia</i>	1639 a	12201 b	5788 a	<b>5250 a</b>	1904 a	<b>21346 a</b>

Los valores son medias de repeticiones por tratamiento. Los valores con diferente letra indican diferencias significativas a  $P \leq 0.001$  con la prueba de contrastes Tukey.

Se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en el contenido de K, Ca, Mg, S y Na entre los clones, siendo Pcc38 quien presentó mayor contenido de K y Ca, mientras que Pe111 de Mg, S y Na (Tabla 12). No hubo diferencias en los valores de P entre los individuos.

Tabla 11. Concentración de macronutrientes (P, K, Ca, Mg, S) y Na medido en las hojas de plántulas de *P. amygdaliformis persica*, *P. communis* “Williams”, *P. communis cordata* y *P. elaeagrifolia* cultivadas durante 7 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu\text{M}$  FeEDDHA y 10 mM  $\text{NaHCO}_3$

Híbrido	P ( $\mu\text{g/g}$ )	K ( $\mu\text{g/g}$ )	Ca ( $\mu\text{g/g}$ )	Mg ( $\mu\text{g/g}$ )	S ( $\mu\text{g/g}$ )	Na ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Pcw12</b>	1437.a	8764 c	5788 c	3787 cd	1383 c	14939 b
<b>Pcc38</b>	1535 a	<b>18021 a</b>	<b>12681 a</b>	5041 bc	1666 bc	11927 b
<b>Pcc45</b>	1414 a	14838 ab	7111 ac	3438 d	1355 c	11032 b
<b>Pe55</b>	1619 a	12361 bc	6922 bc	3973 bd	1440 c	12356 b
<b>Pap101</b>	1869 a	13186 b	9818 ac	4686 bd	2086 ab	13231 b
<b>Pap103</b>	1489 a	14288 ab	9518 ac	5264 b	1673 bc	16907 b
<b>Pe111</b>	1665 a	11933 bc	13049 ab	<b>7378 a</b>	<b>2678 a</b>	<b>36332 a</b>

Los valores son medias de repeticiones por tratamiento. Los valores con diferente letra indican diferencias significativas a  $P \leq 0.001$  con la prueba de contrastes Tukey.

En cuanto el contenido de micronutrientes se observaron diferencias significativas en los valores de Cu, Fe y Mn. *P. elaeagrifolia* presentó el mayor contenido de Cu y Fe, mientras que *P. communis cordata* presentó mayor contenido de Mn (Tabla 13).

Tabla 12. Concentración de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Zn) y Al medido en las hojas de plántulas de *P. amygdaliformis persica* (Pap101, Pap103), *P. communis* "Williams" (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38, Pcc45) y *P. elaeagrifolia* (Pe55, Pe111) cultivadas durante 7 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu$ M FeEDDHA y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>

Híbrido	B ( $\mu$ g/g)	Cu ( $\mu$ g/g)	Fe ( $\mu$ g/g)	Mn ( $\mu$ g/g)	Zn ( $\mu$ g/g)	Al ( $\mu$ g/g)
<i>P. amygdaliformis persica</i>	227 a	14 ab	102 ab	30 ab	27 a	49 a
<i>P. communis</i> "Williams"	173 a	14 ab	97 ab	23 b	34 a	33 a
<i>P. communis cordata</i>	240 a	11 b	56 b	<b>36 a</b>	22 a	62 a
<i>P. elaeagrifolia</i>	211 a	<b>18 a</b>	<b>157 a</b>	22 b	28 a	49 a

Los valores son medias de repeticiones por tratamiento. Los valores con diferente letra indican diferencias significativas a  $P \leq 0.001$  con la prueba de contrastes Tukey.

Pe111 presentó mayor contenido de todos los micronutrientes, con excepción del Mn, el cual fue mayor en el clon Pcc38 (Tabla 14).

Tabla 13. Concentración de micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn, Zn) y Al medido en las hojas de plántulas de *P. amygdaliformis persica* (Pap101, Pap103), *P. communis* "Williams" (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38, Pcc45) y *P. elaeagrifolia* (Pe55, Pe111) cultivadas durante 7 días en medio de cultivo hidropónico con 2  $\mu$ M FeEDDHA y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>

Híbrido	B ( $\mu$ g/g)	Cu ( $\mu$ g/g)	Fe ( $\mu$ g/g)	Mn ( $\mu$ g/g)	Zn ( $\mu$ g/g)
Pcw12	212 b	15 b	97 bc	22 b	34 ab
Pcc38	169 b	12 b	66 bc	<b>40 a</b>	24 ab
Pcc45	177 b	9 b	46 c	32 ab	18 b
Pe55	183 b	11 b	50 c	20 b	19 b
Pap101	204 b	15 b	70 bc	29 ab	28 ab
Pap103	253 ab	13 b	137 b	31 ab	27 ab
Pe111	<b>355 a</b>	<b>30 a</b>	<b>336 a</b>	26 ab	<b>42 a</b>

Los valores son medias de repeticiones por tratamiento. Los valores con diferente letra indican diferencias significativas a  $P \leq 0.001$  con la prueba de contrastes Tukey.

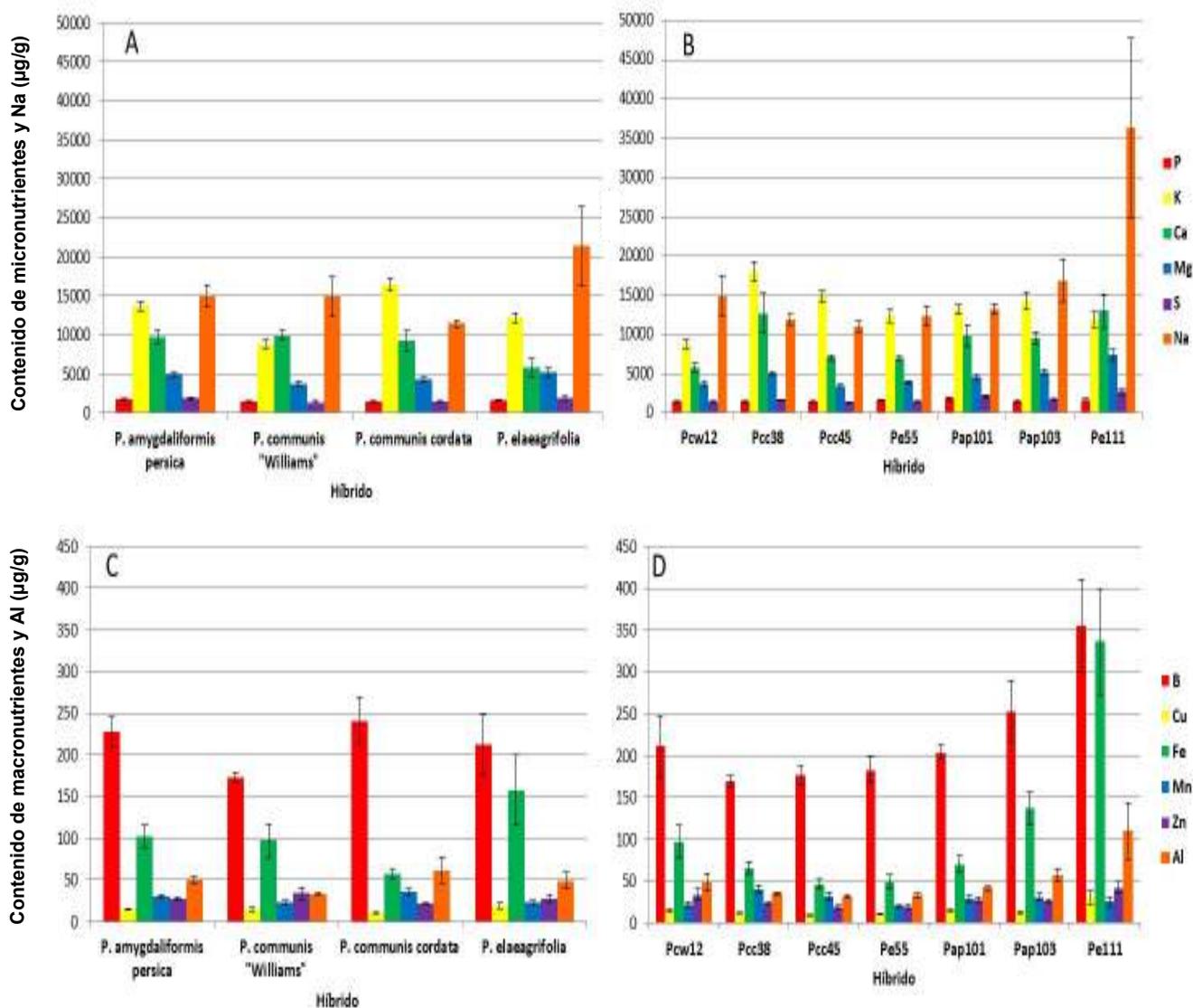


Figura 36. Contenido de A, B) micronutrientes y Na, C, D) macronutrientes y Al en hojas de plántulas de *P. amygdaliformis persica* (Pap101, Pap103), *P. communis* "Williams" (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38, Pcc45) y *P. elaeagnifolia* (Pe55, Pe111) cultivadas durante 3 días en medio de cultivo hidropónico con 2 µM FeEDDHA y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>.

*P. communis cordata* presentó el menor contenido de Fe en hojas, mientras que *P. elaeagnifolia* presentó el mayor contenido de hierro en hojas. Contradictoriamente, los individuos pertenecientes al híbrido *P. elaeagnifolia*, presentaron respuestas o comportamientos diferentes. Mientras Pe111 presenta el mayor contenido de Fe, Pe55 presenta uno contenido bajo.

Se realizó un análisis de correlación entre los niveles de clorofila y el contenido de hierro en hojas de los individuos estudiados, sin embargo, no se encontró correlación entre estos dos parámetros.

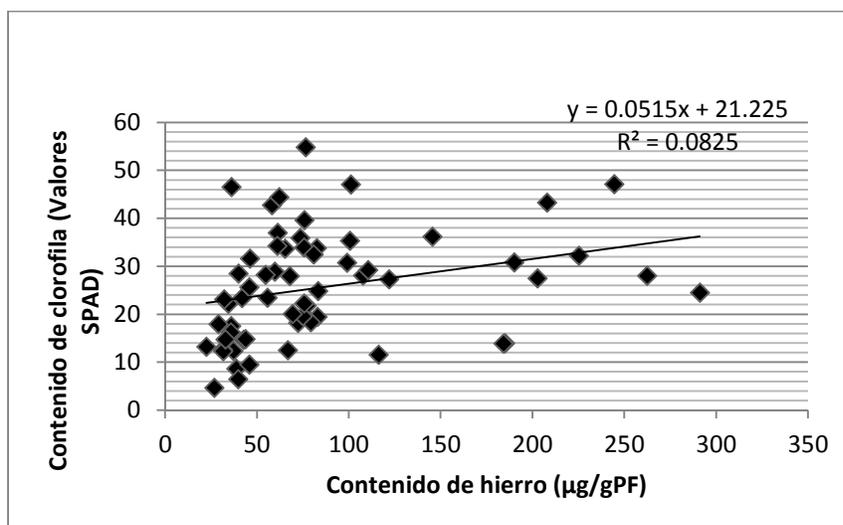


Figura 37. Correlación entre los niveles de clorofila y el contenido de hierro en hojas.

### 3.4. DISCUSIÓN

La inducción a la clorosis férrica por la adición de bicarbonato al medio de cultivo simula las condiciones clorosantes del suelo donde suelen crecer las plantas que presentan deficiencia de hierro. Los análisis fisiológicos y bioquímicos de las plantas sometidas a la privación de este elemento, nos permite conocer y comprender la respuesta y el grado de adaptación de estas plantas a condiciones de deficiencia de hierro en suelo.

Las condiciones de estrés, como la carencia de nutrientes como el hierro, incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gulen *et al.*, 2008 y Singh Gill y Tuteja, 2010) provocando una peroxidación lipídica que genera malondialdehído (MDA), el cual sirve como un indicador de daños celulares causados por estrés oxidativo en las plantas (Singh Gill y Tuteja, 2010). La adición de  $\text{NaHCO}_3$  10 mM al medio de cultivo hidropónico ocasionó una mayor producción de MDA en *P. amygdaliformis persica*, lo que nos indica que existe daño celular causado por estrés oxidativo.

Un incremento en los contenidos de MDA se relaciona con daños en las membranas tilacoidales de los cloroplastos, lo que conlleva a una reducción de la actividad fotosintética (Singh Gill y Tuteja, 2010); lo que nos sugiere que la disminución de aproximadamente el 30

% en los niveles de clorofila en las hojas de *P. amygdaliformis persica* podría deberse, en parte, al daño ocasionado a por especies reactivas de oxígeno. La observación de elevado niveles de MDA radicular evidencia el estrés oxidativo sufrido por las plantas de *P. amygdaliformis persica* expuestas a bicarbonato. No obstante, teniendo en cuenta el papel esencial del Fe en la biosíntesis de la clorofila no puede descartarse la contribución de la inhibición de la síntesis de clorofila en la clorosis observada.

Un incremento en los niveles de MDA radicular también está relacionado con una baja o un descenso de la actividad SOD (Demiral yTürkan, 2005).

En algunos estudios, niveles bajos de MDA sugieren que existe una mayor protección por parte del sistema antioxidante de la planta contra el daño oxidativo causado por estrés como por ejemplo la deficiencia de elementos y salinidad (Demiral yTürkan, 2005 y Singh Gill y Tuteja, 2010).

*P. communis cordata* mostró el menor contenido de MDA, sin embargo, los niveles de clorofila en las hojas de este híbrido, al igual que en *P. amygdaliformis persica*, disminuyeron casi un 30 % después de la adición de  $\text{NaHCO}_3$ . Algunos autores indican que las ROS son moléculas involucradas en procesos que conducen a la aclimatación del estrés (Singh Gill y Tuteja, 2010), de esta manera se podría sugerir que *P. communis cordata* se aclimata fácilmente a situaciones de estrés, por lo cual los niveles de MDA son bajos, y como se demostró en el Capítulo 2, este es un híbrido que muestra tolerancia a condiciones de deficiencia de hierro en condiciones *in vitro*.

Las enzimas que se activan bajo estrés para reducir los daños causados por las ROS muestran evidencia de que el alivio del daño oxidativo y el aumento de la resistencia ante tensiones ambientales se correlaciona a menudo con un sistema antioxidante eficiente (Demiral yTürkan, 2005 y Kumar Tewari *et al.*, 2013).

La deficiencia de hierro puede inducir la producción de especies reactivas de oxígeno en las plantas. En algunas especies frutales como melocotón, los contenidos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentan, mientras que la concentración de ascorbato y la actividad de las enzimas antioxidantes que contienen hierro (catalasas y peroxidasas) disminuyen tanto en tratamientos de privación de hierro como con la adición de bicarbonato (Cellini *et al.*, 2011 y Kumar Tewari *et al.*, 2013).

La catalasa y las peroxidasas pertenecen a las proteínas hemo, por lo que, en condiciones de deficiencia de Fe, la actividad de ambas enzimas disminuye debido a una reducción de la disponibilidad de Fe en las células (Pestana *et al.*, 2003 y Cellini *et al.*, 2011). Se ha reportado una disminución de la actividad enzimática de catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasa en especies frutales como cítricos (Hellín *et al.*, 1995) y melocotón (Cellini *et al.*, 2011) debido a la deficiencia de hierro. Ortega-Maldonado, et al. (2014) señalan que, particularmente, la actividad catalasa en hojas, es un indicador del estado nutricional de Fe en las plantas. En nuestro estudio no se encontró una correlación entre la deficiencia de hierro y la disminución de la actividad CAT, ya que Pe55 presentó la mayor actividad CAT, sin embargo presentó síntomas evidentes de clorosis férrica y un contenido bajo de hierro en hojas.

En algunas especies, la actividad CAT podría actuar como una protección constitutiva contra el estrés oxidativo, en lugar de una respuesta inducida a los factores de estrés, ya que suele ser baja o tiende a disminuir en los genotipos sensibles, y no existe una tendencia hacia un aumento en los tolerantes (Singh Gill y Tuteja, 2010 y Cellini *et al.*, 2011).

El peróxido, producido por la dismutación del superóxido, es reducido a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> por la CAT y la POD. Concentraciones altas de peróxido debido al incremento de la actividad SOD, pueden inactivar algunas enzimas, sobretodo POD (Trejo y Bustamante, 2010). *P. communis* "Williams" presenta una alta actividad SOD lo que podría inhibir la actividad POD.

Otro factor de inhibición de la actividad POD es el pH. El pH óptimo de actividad de la POD varía dependiendo de la fuente de la enzima, la composición de isoenzimas, el sustrato donador y el buffer aplicado (Trejo y Bustamante, 2010). La pérdida de actividad observada en acidificación es atribuida al cambio en la proteína de estado nativo a un estado reversible de desnaturalización. Los cambios de actividad que ocurren con los cambios de pH están relacionados a los cambios estructurales en la molécula de la enzima. Los bajos niveles de actividad POD en *P. communis cordata* puede atribuirse a la capacidad de acidificación de este híbrido, lo que inhibe la actividad de esta enzima.

*P. amygdaliformis persica* presentó mayor actividad POD, pero sin actividad significativa en SOD y CAT, lo que podría indicarnos que se está activando un sistema antioxidante no enzimático para la conversión of O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como glutatión (GSH) y ascorbato (Demiral y Türkan, 2005), ya que como se observó el nivel de estrés oxidativo indicado por MDA es alto.

Varios autores señalan que existe una correlación entre la respuesta de las enzimas antioxidantes como las peroxidasas y la tolerancia a las condiciones de estrés abiótico (Hellín, et al., 1995; Agnolon, et al., 2001; Demiral y Türkan, 2005 y López-Blancas *et al.*, 2014).

Bajo nuestras condiciones de cultivo *P. communis cordata*, no presenta daño por estrés oxidativo, reflejado por el contenido bajo de MDA, por lo que las enzimas SOD y CAT no presentan actividad alta en comparación con los otros clones.

Por último *P. elaeagnifolia* presenta una alta actividad de POD y CAT, lo que sugiere que la presencia de  $Fe^{2+}$  activa estas enzimas para evitar que estos aniones libres reaccionen con el peróxido y formen OH mediante la reacción de fenton. Este comportamiento se observa sobretodo en peroxidasas como la guaiacol peroxidasa y la ascorbato peroxidasa que desempeñan una función catalítica importante al reducir los niveles de  $H_2O_2$  en los tejidos vegetales (Singh Gill y Tuteja, 2010). También presenta la mayor actividad CAT, lo que puede deberse que el hierro reducido (ver Capítulo 2) está siendo utilizado para la producción de catalasas, ya que es un elemento que forma parte de su estructura molecular (Fernández López *et al.*, 1994).

El contenido foliar de hierro en peral se considera normal una concentración de 60-200  $\mu g/g$ , valores bajos < 60  $\mu g/g$  y elevado >200  $\mu g/g$  (Loué, 1988). Los híbridos que presentaron valores de hierro foliar inferiores a los datos referidos, fueron Pcc45 (46.2  $\mu g/g$ ) y Pe55 (49.8  $\mu g/g$ ). Sin embargo, el contenido bajo de hierro en las hojas de ambos híbridos puede deberse a diferentes razones.

Por una parte, Pcc45 presentó un descenso en los contenidos de clorofila en hojas, del día 0 al día 3; sin embargo, el contenido de carotenoides (evidente por la coloración roja) aumentó, lo que nos sugiere la posible destrucción de la clorofila como mecanismo de defensa inducida por la deficiencia de hierro y por tanto menor contenido de hierro en hojas. Por otro lado, Pe55 presentó un aumento en los niveles de clorofila pero con síntomas evidentes de clorosis (amarilleamiento de hojas) lo que explicaría el bajo contenido de hierro total en las hojas debido a la deficiencia de hierro.

Por su parte, Pe111 presentó una concentración de hierro total en hojas (336.3  $\mu g/g$ ) superior a los valores considerados como normales en hojas de peral (Loué, 1988). Los

síntomas de clorosis férrica en este híbrido fueron más severos, presentando necrosis en hojas y defoliación, además el contenido de clorofila también disminuyó. A pesar de que algunos autores señalan que el nivel de clorofila está relacionado directamente con el contenido foliar de Fe total cuando la deficiencia de hierro es inducida en condiciones de cultivo controladas (como cámara de cultivo o hidroponía) (Terry y Low, 1982), en nuestro ensayo de deficiencia de hierro en hidroponía, no se encontró correlación entre el contenido total de clorofila y hierro en hojas de híbridos *Pyrus*.

La escasa relación que existe entre la clorosis férrica y la concentración de Fe total en las hojas es un hecho comprobado en diversas especies frutales (López-Millán *et al.*, 2001), al punto que muchos laboratorios de análisis foliar no incluyen este nutriente en los trabajos rutinarios de diagnóstico (Jiménez *et al.*, 2009 y Ortega-Maldonado *et al.*, 2014).

Una explicación alternativa a la aparente falta de proporcionalidad entre los contenidos de hierro y clorofila puede encontrarse al considerar una determinada forma química de hierro en la hoja, denominada “Fe activo” (Terry y Abadía, 1986). Así, las hojas pueden estar cloróticas y tener una alta concentración de Fe total debido a la inactivación de este elemento en las hojas o bien, debido a la inhibición del crecimiento por la presencia de clorosis férrica (Fernández López *et al.*, 1994 y Pestana *et al.*, 2003). Pcw12 presentó un incremento en el contenido total de clorofila total en hojas, sin embargo, se presentó una parada de crecimiento en el 60 % de los individuos, por lo que en este caso, el incremento del contenido de clorofila total en hojas sería por consecuencia de la inhibición del crecimiento debido a la presencia de bicarbonato en el medio.

Se ha demostrado que la deficiencia de hierro causa un aumento en las concentraciones de ácidos orgánicos en raíces, exudados de tallo y hojas de diferentes especies de plantas tanto de tipo Estrategia I como de Estrategia II (Landsberg, 1981 y Ortega-Maldonado *et al.*, 2014). Algunos experimentos con plantas modelo han demostrado que los principales ácidos orgánicos presentes en genotipos tolerantes a clorosis férrica son citrato y malato, y en menor grado succinato, quinato, cisaconitato, fumarato, oxoglutarato, oxalato, ascorbato el tartrato (de Vos, *et al.*, 1986; López-Millán, *et al.*, 2000 y Larbi *et al.*, 2010).

En *Pyrus* encontramos, además de oxalato como principal ácido orgánico en todos los clones, presencia de malato en Pcw12 (601.428 µg/gPF) y Pap101 (5318.323 µg/gPF); citrato en Pcc45 (356.911 µg/gPF); succinato en Pcc45 (1373.971 µg/gPF) y Pcw12

(1063.435 µg/gPF) y por último tartrato en Pcw12 (498.826 µg/gPF), Pap103 (349.9 µg/gPF) y Pe111 (948.632 µg/gPF).

La acumulación de ácidos orgánicos en las plantas deficientes de hierro puede mejorar el transporte a larga distancia de este elemento (López Millán *et al.*, 2001). El incremento de ácidos orgánicos en las raíces bajo condiciones de deficiencia de hierro en especies frutales se ha demostrado en *Malus domestica* (Sun *et al.*, 1987), *Actinidia deliciosa* (Rombolà *et al.*, 1998) y en *Vitis* spp. (Covarrubias y Rombolà, 2015).

La mayor concentración de oxalato en las raíces de híbridos *P. communis cordata*, supondría una mayor tolerancia a la deficiencia de hierro debido a que los ácidos orgánicos se encargan de mantener solubilizado el hierro en las raíces. En el capítulo 2, *P. communis cordata* y *P. amygdaliformis persica* presentaron mayor resistencia a la deficiencia de hierro, la mayor acumulación de ácidos orgánicos en las raíces de las plantas de *P. communis cordata* indicaría que estos compuestos se producen como respuesta a la deficiencia de este elemento.

Alhendawi, *et al.* (1997) encontraron que la adición de bicarbonato en la solución nutritiva condujo a clorosis férrica y a un aumento en las concentraciones de citrato, malato, aconitato y succinato en las raíces de cebada, sorgo y maíz. En nuestro estudio, Pcc45 presentó, además de oxalato, citrato y succinato en las raíces, en el capítulo 2, este clon también presentó la mayor respuesta acidificante del medio de cultivo y el mayor contenido de clorofila en hojas, lo que sugiere que existe una mayor movilización del hierro debido a la presencia de estos ácidos orgánicos favorecida por la acidificación del medio.

Además, Landsberg (1986) indicó que uno de los posibles efectos beneficiosos del incremento del citrato en la raíz bajo deficiencia de Fe podría ser controlar el pH citoplásmico durante la extrusión de protones. Los incrementos en citrato suelen ser más altos que los del malato (Abadía *et al.*, 2002). Se sabe que el principal producto formado a partir de la reducción del pH del medio por acción de la enzima H<sup>+</sup>ATPasa es el malato, por lo que la acumulación de citrato en las raíces podría ser el evento primario inducido por la deficiencia de Fe, la excreción de protones es secundaria y ocurre o no dependiendo del equilibrio catión/anión (Bienfait, 1996 y Larbi *et al.*, 2010).

Por otra parte, la relación entre el incremento en la concentración de ácidos orgánicos y la activación de las enzimas FQ-R y la H<sup>+</sup>ATPasa en las raíces de las plantas sometidas a deficiencia de hierro es bien conocida. Sin embargo, la acumulación de ácidos orgánicos no siempre se desarrolla en paralelo con el incremento de la actividad FQ-R y H<sup>+</sup>ATPasa (Bienfait et al., 1989; Fournier et al., 1992; Landsberg, 1981; Schmidt, 1999; van Egmond and Aktas, 1977).

Por lo tanto, mientras que Pe111 presentó el mayor contenido de Fe en hojas al mismo tiempo presentó la menor concentración de oxalato en raíz, Pe55 presentó un nivel muy bajo de Fe en hojas, sin embargo, la presencia de oxalato en raíces fue superior que en el resto de híbridos analizados. Además Pe55 presentó un aumento en el contenido de clorofila después de 3 días transcurridos con el tratamiento de bicarbonato, mientras que los demás clones (a excepción del Pcw12 que también aumentó el contenido de clorofila) disminuyeron en contenido. La paradoja de la clorosis férrica sugiere que en deficiencia de hierro, parte del hierro reducido por la quelato reductasa se inmoviliza y se acumula como formas inactivas de hierro en alguna parte de la hojas (Morales et al., 1998), lo cual sugiere que el Fe puede estar acumulado en las raíces en forma de oxalato en Pe55. Esto nos sugeriría que incluso individuos pertenecientes a la misma especie pueden comportarse de manera muy diferente bajo condiciones de deficiencia de hierro.

Otra posible función de la exportación de ácidos orgánicos de las raíces a las hojas es el uso de compuestos de C para mantener los procesos básicos de la hoja, como la respiración, cuando la fotosíntesis es afectada (Abadía *et al.*, 2002 y Larbi *et al.*, 2010).

Generalmente las plantas con alta actividad antioxidante contienen compuestos fenólicos que actúan como agentes reductores, donadores de hidrógeno y favorecen la eliminación del anión O<sup>-</sup> (Singh Gill y Tuteja, 2010 y López-Blancas *et al.*, 2014)

El papel principal de los fenoles parece ser la inhibición de la degradación de los ácidos orgánicos, cuyo papel en la nutrición férrica como quelantes de Fe es muy importante. La alta concentración de fenoles en el medio de cultivo y la presencia de varios ácidos orgánicos en las raíces de Pcw12 sugeriría que estos fenoles previenen la degradación de los ácidos orgánicos.

Los compuestos fenólicos desempeñan un papel importante en la respuesta adaptativa a la deficiencia de Fe debido a sus propiedades antioxidantes y quelantes (Schmidt, 2003). En particular, se sugiere que los compuestos fenólicos intervienen en la remobilización del hierro apoplástico. Existen algunos estudios (Tato *et al.*, 2013) en los que, las condiciones de privación de Fe directa o inducida en cultivo hidropónico, produjeron un aumento significativo en el contenido de compuestos fenólicos en extractos y exudados de *P. judaica*, lo que confirma el aumento de estos compuestos como respuesta a un estrés ambiental.

## **CAPÍTULO 4. Fluorescencia de la clorofila**

### **4.1 INTRODUCCIÓN**

#### **4.1.1. Fotosíntesis y fluorescencia de la clorofila**

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas, algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas convierten la energía luminosa en energía química en forma de enlaces químicos y es la base de todas las cadenas alimenticias de las que depende la vida animal y humana (Loué, 1988).

La fotosíntesis se considera uno de los procesos metabólicos más importantes de las plantas y su rendimiento se ve afectado bajo condiciones de estrés. Sin embargo, en un entorno cambiante, las plantas podrían adaptar su metabolismo a fin de hacer frente al estrés y mantener un equilibrio permanente entre la producción y el consumo de energía (Oukarroum *et al.*, 2015)

El proceso fotosintético se inicia cuando la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y carotenoides) de los complejos antena de la membrana fotosintética. Parte de la energía absorbida es transferida como energía de excitación y atrapada por el centro de reacción mediante un flujo de electrones que es convertido posteriormente a energía química (Loué, 1988) y la otra parte es disipada principalmente como calor y en menor grado reemitida como energía luminosa de menor energía (fluorescencia) (Maxwell y Johnson, 2000; Pfündel, 2007 y Moreno *et al.*, 2008).

Esta distribución de la energía en los tres procesos ocurre simultáneamente, de tal forma que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos (Maxwell y Johnson, 2000). Por lo tanto, a través de la medición del rendimiento de la fluorescencia de la clorofila se puede obtener información de la eficiencia fotoquímica y la disipación térmica de la energía absorbida (Pfündel, 2007).

En la cadena de transferencia de electrones son dos los fotosistemas responsables de la conversión de la energía: los fotosistemas PSI y PSII (Loué, 1988). En las plantas, las moléculas de clorofila a asociadas a los fotosistemas I y II son las responsables de la emisión de la fluorescencia, sin embargo, a la temperatura de ambiente (25°C), la

contribución del PSI a la emisión total es mínima en comparación con el PSII (Pfündel, 2007).

El rendimiento de fluorescencia en hojas es modulado por dos vías de desexcitación competitivas, la fotoquímica y la emisión de calor. La disminución en el rendimiento de fluorescencia que se origina en el aumento de la fotoquímica se llama apagado (quenching) fotoquímico de la fluorescencia. Todas las demás modificaciones del rendimiento de fluorescencia se atribuyen a la disipación de calor y se resumen como inactivación de la fluorescencia no fotoquímica, o enfriamiento no fotoquímico (Pfündel, 2007 y González *et al.*, 2008).

El análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII del aparato fotosintético de plantas permite caracterizar los efectos causados por diferentes tipos de estrés ambiental como temperatura, sequía, alta intensidad luminosa, salinidad, inundación, deficiencia de nutrientes, presencia de metales pesados, herbicidas, detergentes, etc. (Gonzalo *et al.*, 2011).

Para distinguir entre el quenching fotoquímico y el no fotoquímico, en el análisis de la fluorescencia, se aplica un pulso de luz de alta intensidad y corta duración. De este modo se consigue cerrar momentáneamente todos los centros de reacción del fotosistema II, los cuales quedan abiertos tras un periodo de oscuridad previo (Pfündel, 2007 y Catalina, 2015). Un pulso de luz breve, inhibe la activación de la fracción no fotoquímica, y no se producen cambios en la eficiencia de la fotosíntesis a largo plazo. La medida de la fluorescencia durante el pulso, es el equivalente a la obtenida en ausencia de “quenching fotoquímico”, es decir, la fluorescencia máxima ( $F_m$ ). Comparando este valor con la medida de la fluorescencia en presencia de luz solar ( $F_s$ ) y la medida de la fluorescencia en ausencia de luz fotosintéticamente activa ( $F_o$ ) podemos obtener información acerca de la eficiencia del “quenching fotoquímico” y del estado del fotosistema II (Maxwell y Johnson, 2000; Pfündel, 2007 y Catalina, 2015).

Las características cinéticas de la reacción de la fluorescencia emitida son determinadas por la intensidad luminosa de excitación, la concentración de pigmentos que absorben la luz, la transferencia de la energía de excitación, la naturaleza y orientación de los pigmentos fluorescentes, el estado redox de aceptores y donadores del PSII, el apilamiento de los tilacoides y la translocación de protones, entre otros (Ortega-Maldonado, et al., 2014).

### **4.1.2. Deficiencia de hierro en fluorescencia**

La deficiencia de Fe tiene efectos negativos en el crecimiento de hojas, presentando menor número de células por unidad de área, así como un menor número de cloroplastos por célula y por tanto menor contenido de proteína por cloroplasto (Loué, 1988).

En las membranas tilacoidales hay alrededor de 20 átomos de Fe involucrados directamente en la cadena de transporte de electrones por cada unidad de PSII y PSI (Terry y Abadia, 1986). Debido al alto requerimiento de este elemento, la deficiencia de Fe provoca una disminución de los sitios de síntesis de proteínas. El reabastecimiento de Fe en hojas cloróticas aumenta la función de PS I, así como la de sus componentes individuales como P 700, citocromos y proteínas, lo cual sugiere que el Fe se encuentra involucrado en la regulación del desarrollo de PSI y en el ensamble de las subunidades en las membranas tilacoidales. Cuando la deficiencia de Fe es más severa, la actividad de PS II también disminuye drásticamente y es mucho más difícil de restaurar (Morales et al., 1991 y Ortega-Maldonado *et al.*, 2014).

La deficiencia de Fe induce un aumento considerable del nivel inicial de fluorescencia ( $F_0$ ), y una disminución de la proporción de fluorescencia variable ( $F_v$ ). Estos dos fenómenos reflejan una pérdida de eficiencia fotoquímica del PSII. Además, también existe un descenso en la relación entre fluorescencia variable y fluorescencia inicial ( $F_v/F_0$ ) (Catalina, 2015).

## **4.2. METODOLOGÍA**

### **4.2.1. Fluorescencia de clorofila**

Para medir la fluorescencia de la clorofila se utilizó la técnica de análisis del pulso saturante para distinguir entre los dos mecanismos de extinción de la fluorescencia (fotoquímica y no fotoquímica).

En esta técnica, un pulso saturante (SP) se suministra en el período oscuro que precede a la iluminación y otro al final de la iluminación. El término saturación significa que la luz es fuerte y suficientemente larga para reducir completamente la cadena de transporte de electrones entre los dos fotosistemas, de manera que PS II carece de aceptores de electrones. En ausencia de aceptores de electrones, los centros de reacción PS II no pueden realizar un trabajo fotoquímico y quedan cerrados, es decir, la extinción fotoquímica se convierte en cero (Pfündel, 2007).

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila que se midieron fueron la eficiencia fotoquímica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ) y la relación entre la fluorescencia variable e inicial ( $F_v/F_o$ ).

Para este ensayo se utilizaron plantas obtenidas *in vitro* ya aclimatadas de 6 meses de edad. Las plantas fueron sometidas a condiciones de oscuridad 24 h previas a los días de cuantificación para permitir la apertura de los centros de reacción PS II. Después de transcurrido este tiempo de adaptación a la oscuridad, las hojas se iluminaron con un pulso saturante de  $2100 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante 5 s para inducir la fluorescencia.

La primera medición se realizó al día 0 cuando las plantas se encontraban en sustrato turba y vermiculita 2:1. Después de tomar las mediciones, el sustrato en donde se encontraban las plantas fue reemplazado por suelo calcáreo obtenido de los terrenos experimentales de la Universidad Autònoma de Barcelona con un pH 8.05 y un contenido de 2.26 % de materia orgánica y 35 % de carbonatos.

Las siguientes mediciones se realizaron a los 3 y 7 días a partir del cambio de sustrato.

En este experimento se utilizaron de 2 plantas por especie de los individuos Pcw12, Pcc38, Pe55 y Pap101.

Los resultados presentados en este experimento corresponden a la media y desviación estándar de cuatro réplicas obtenidas a partir de tres plantas por genotipo y tratamiento.

El análisis estadístico se efectuó mediante Análisis de la Varianza (ANOVA) con R Project. Las medias se compararon utilizando el método Tukey a un nivel de confianza del 95 %.

## **4.3. RESULTADOS**

### **4.3.1. Estado del aparato fotosintético**

En cuanto al estado del aparato fotosintético, las condiciones de deficiencia de hierro inducidas por el trasplante de las plantas a suelo calcáreo, provocaron la reducción del 14.22 % y 8.32 % en la eficiencia fotoquímica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ) en los individuos Pcw12 y Pap101 respectivamente. En los individuos Pcc38 y Pe55 hubo una reducción al día 3 y después un ligero incremento del rendimiento ( $F_v/F_m$ ) al día 7. Por otro lado, se presentó

una disminución de la relación entre la fluorescencia variable e inicial (Fv/Fo) en todos los individuos.

No hubo diferencias significativas entre individuos en cuanto al rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) ( $P = 0.92$ ) y la relación entre la fluorescencia variable e inicial (Fv/Fo) ( $P = 0.721$ ). Se presentaron diferencias significativas entre los días de tratamiento para Fv/Fm y Fv/Fo ( $P \leq 0.05$ ) (Tabla 15).

**Tabla 14. Rendimiento cuántico máximo del fotosistema II (Fv/Fm) y relación entre la fluorescencia variable e inicial (Fv/Fo) medidas en hojas de plantas pertenecientes a *P. communis* “Williams” (Pcw12), *P. communis cordata* (Pcc38), *P. elaeagrifolia* (Pe55) y *P. amygdaliformis persica* (Pap1019 trasplantadas a suelo calcáreo por 3 y 7 días**

	Fv/Fm			Fv/Fo		
	Día 0	Día 3	Día 7	Día 0	Día 3	Día 7
<b>Pcw12</b>	0.702 a	0.627 a	0.602 a	2.486 a	2.010 a	1.673 a
<b>Pcc38</b>	0.665 a	0.632 a	0.635 a	2.198 a	2.034 a	1.980 a
<b>Pe55</b>	0.684 a	0.625 a	0.637 a	2.441 a	1.996 a	1.985 a
<b>Pap101</b>	0.664 a	0.632 a	0.609 a	2.080 a	1.961 a	1.727 a

Los valores son medias de repeticiones por tratamiento. Los valores con diferente letra indican diferencias significativas a  $P \leq 0.05$  con la prueba de contrastes Tukey.

#### 4.4. DISCUSIÓN

La fluorescencia de la clorofila se utiliza para determinar la eficiencia fotoquímica de las plantas ante diferentes condiciones ambientales. Ante condiciones adversas del ambiente que causan estrés a las plantas, se producen alteraciones del metabolismo fotosintético que modifican las proporciones de la disipación de energía, incrementándose la cinética de la emisión de la fluorescencia (González *et al.*, 2008 y Catalina, 2015).

Se ha demostrado que la deficiencia de Fe conduce a disminuciones en los pigmentos de recolección de luz, en particular las clorofilas (Morales *et al.*, 2001) y promueve la desconexión de antenas en PSII (Osório *et al.*, 2014).

La presencia de bicarbonato causó una disminución del rendimiento cuántico máximo del PSII (Fv/Fm) solo en los individuos Pcw12 y Pap101 y un descenso de la relación entre fluorescencia variable e inicial (Fv/Fo) de las hojas cloróticas de todos los clones. La cuantificación de la eficiencia fotoquímica máxima del PSII Fv/Fm permite establecer

situaciones de plantas no estresadas cuando su valor se encuentra entre 0.75 y 0.85 (Bjorman y Demmig, 1987). El valor inicial de Fv/Fm en los clones antes del trasplante a suelo calcáreo oscilo entre 0.66 y 0.7 (por debajo de los valores sugeridos como estables), sin embargo, los valores arrojados en este experimento señalan que la presencia de carbonatos en el suelo provocó estrés a las plantas ya que los valores Fv/Fm se redujeron al día 3 y 7.

Existen estudios acerca del comportamiento de diferentes parámetros de la fluorescencia de la clorofila en condiciones de deficiencia de hierro. La clorosis férrica afecta a nivel fisiológico en un descenso de la concentración de pigmentos fotosintéticos y de la tasa de transporte de electrones en la fotosíntesis (Morales *et al.*, 2001; Osório *et al.*, 2014 y Catalina, 2015). Se ha demostrado que la eficiencia energética de la fotosíntesis, medida mediante fluorescencia de clorofila, disminuye en plantas deficientes en Fe (Morales *et al.*, 2001). Estudios realizados en plantas cultivadas bajo condiciones de deficiencia de Fe y en presencia de bicarbonato, como en remolacha azucarera (Morales *et al.*, 1991), fresa (Osório *et al.*, 2014), cítricos (Pestana *et al.*, 2003 y Martínez Cuenca, 2012), demuestran una disminución de la relación Fv/Fm. Morales *et al.* (2000) observaron que la relación Fv/Fm era menor en hojas de peral cloróticas que en hojas sanas. La disminución de la relación Fv/Fm se acentúa a medida que la clorosis férrica avanza o en variedades más sensibles (Oukarroum *et al.*, 2015).

Además, las hojas deficientes en Fe muestran una menor rendimiento del PSII y una disminución en la proporción de centros de reacción PSII abiertos (Larbi *et al.*, 2006). También se ha demostrado que las hojas con deficiencia de Fe acumulan más hierro en la nervadura central y las venas, con menor concentración de Fe en las áreas foliares del mesófilo (Jiménez *et al.*, 2009). Por lo tanto, esta distribución no homogénea de pigmentos fotosintéticos y hierro en las hojas podría afectar de igual manera la eficiencia fotosintética.

En los últimos años, el análisis de fluorescencia de clorofila se ha aplicado como una herramienta no destructiva y rápida para obtener información sobre el estado del aparato fotosintético, especialmente de PSII (Osório *et al.*, 2014). Una de las principales desventajas de las mediciones convencionales de fluorescencia de la clorofila es que proporciona información sólo en un punto de la hoja, que no es representativa del estado fisiológico de la hoja entera. El desarrollo de instrumentos capaces de cuantificar la fluorescencia de la clorofila proporciona una poderosa herramienta para identificar la heterogeneidad espacial

del rendimiento fotosintético foliar y ofrece nuevas posibilidades para entender el funcionamiento y la regulación de la fotosíntesis bajo deficiencia de hierro.

Por último, en los organismos fotosintéticos, los centros de acción de los fotosistemas I y II (PSI y PSII) en los cloroplastos de los tilacoides, son el principal sitio de generación de ROS (Oukarroum *et al.*, 2015), por lo que la generación de ROS podría estar involucrada en el descenso de la actividad del aparato fotosintético. Esta última afirmación, junto con los resultados obtenidos en el ensayo de estrés oxidativo (capítulo 3), nos conduce a profundizar más en este tema y ampliar los ensayos a nivel *in vitro* e hidropónico incluyendo el parámetro de fluorescencia y su relación con el estrés oxidativo y la deficiencia de hierro.

## CONCLUSIONES

La selección de portainjertos tolerantes a la deficiencia de hierro sigue ofreciendo la mejor solución a la clorosis férrica en peral. Este es un enfoque a medio plazo, que a pesar de requerir tiempo de selección en campo, el programa de mejora está en la vía de producir selecciones mejor adaptadas.

La micropragación *in vitro* ofrece una solución para la obtención y multiplicación de patrones de peral resistentes a clorosis férrica. Las condiciones utilizadas para la propagación de *Pyrus in vitro* en nuestro estudio permitieron la regeneración y multiplicación de plantas. Lo que permite ensayar clones en suficientes réplicas y emplazamientos en campo, que permiten seleccionar los híbridos mejor adaptados a la clorosis férrica, en condiciones agronómicas y productivas.

Las respuestas fisiológicas que se correlacionaron con la resistencia a la clorosis férrica de los híbridos interespecíficos estudiados en condiciones *in vitro* fueron el contenido de clorofila en las hojas de las plantas *in vitro* y la acidificación del medio. La reducción de hierro por las raíces no está correlacionado con la tolerancia a deficiencia de hierro en *Pyrus* spp, Sería necesario estudiar a nivel de las hojas si el nivel de reducción de hierro está relacionado con la clorosis

Las respuestas de las plantas ante el estrés oxidativo ocasionado por la deficiencia de hierro indicaron que no hay una correlación directa entre la activación de enzimas antioxidantes y la tolerancia a la deficiencia de hierro. Sin embargo, es aconsejable ampliar el experimento con más réplicas.

No se encontró relación entre el contenido de hierro y el nivel de clorofila en hojas. Sin embargo la deficiencia de hierro sí ocasionó daños a nivel fotosintético.

El híbrido interespecífico más tolerante a clorosis férrica, en cultivo *in vitro* o en cultivo hidropónico de plántulas clonadas *in vitro*, fue *P. communis cordata*, seguido por *P. amygdaliforme persica*. El más susceptible fue *P. elaeagnifolia* junto con el control *P. communis* "Williams".

Las respuestas fisiológicas ante la deficiencia de hierro varían de un individuo a otro, incluso dentro de una misma especie. La caracterización fisiológica de cada individuo permite

comparar estas respuestas y seleccionar casi con exactitud el clon más tolerante a clorosis férrica.

Por último, es evidente que se necesitan más investigaciones para determinar un indicador fiable que pueda utilizarse de forma consistente para seleccionar patrones resistentes a clorosis férrica.

A pesar de las dificultades en encontrar las respuestas fisiológicas correlacionadas con la tolerancia a clorosis férrica en campo, el proceso de selección de un portainjerto de peral, tolerante a clorosis férrica, de vigor reducido, buena compatibilidad con variedades comerciales, temprana entrada en producción, calidad de producción, y de fácil propagación, está garantizada con el desarrollo del programa de mejora en el que se enmarca el presente estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abadía, J., López Millán, A. F., Rombolà, A., & Abadía, A. (2002). Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant and Soil* (241), 75–86.
- Aebi, H. (1984). Catalasa in Vitro. En *Methods in Enzymology* (págs. 121-126). New York, USA: Elsevier Inc.
- Agnolon, F., Santi, S., Varanini, Z., & Pinton, R. (2001). Enzymatic responses of cucumber roots to different levels of Fe supply. *Plant and Soil*, 241, 35-41.
- Alcántara, E., Cordeiro, A. M., & Barranco, D. (2003). Selection of olive varieties for tolerance to iron chlorosis. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1467-1472.
- Alcántara, E., Montilla, I., Ramírez, P., García-Molina, P., & Romera, F. J. (2012). Evaluation of quince clones for tolerance to iron chlorosis on calcareous soil under field conditions. *Scientia Horticulturae*(138), 50-54.
- Alhendawi, R. A., Römheld, V., Kirkby, E. A., & Marschner, H. (1997). Influence of increasing bicarbonate concentrations on plant growth, organic acid accumulation in roots and iron uptake by barley, sorghum and maize. *Journal of Plant Nutrition*, 20(1731–1753).
- Álvarez-Fernández, A., García-Marco, S., & Lucena, J. J. (2005). Evaluation of synthetic iron(III)-chelates (EDDHA/Fe<sup>3+</sup>, EDDHMA/Fe<sup>3+</sup> and EDDHSA/Fe<sup>3+</sup>) to correct iron chlorosis. *European Journal of Agronomy*(22), 119-130.
- Asín, L., Dolcet-Sanjuan, R., Vilardell, P., & Claveria, E. (2007). Selección de nuevos patrones de peral, con tolerancia a clorosis férrica y vigor reducido. *Fruticultura Profesional, Especial Peral III*(168), 19-28.
- Asín, L., Iglesias, I., Dolcet San-Juan, R., Vilardell, P., Bonany, J., & Simard, M. H. (2011). INRA-IRTA Pear Rootstock Breeding Program: Aiming for Tolerance to Iron Chlorosis. *Acta Horticulturae*, (903), 207-213.
- Aygun, A., & Dumanoglu, H. (2015). In vitro shoot proliferation and in vitro and ex vitro root formation of *Pyrus elaeagnifolia* Pallas. *Frontiers in Plant Science*, 6(225), 1-8.
- Azooz, M. M., Abou-Elhamd, M. F., & Al-Fredan, M. A. (2012). Biphasic effect of copper on growth, proline, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of wheat (*Triticum*

- aestivum cv. Hasaawi) at early growing stage. *Australian Journal of Crop Science*, 6(4), 688-694.
- Bailey, L. H. (1917). *Pyrus*. En *Standard Cyclopedia of Horticulture*, vol. V (págs. 2865-2878). New York: Macmillan.
- Bao, L., Chen, K., Dong, Z., Li, X., & Teng, Y. (2008). An assessment of genetic variability and relationships within Asian pears based on AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers. *Scientia Horticulturae*, 116, 374–380.
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (1985). *Química de los Alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Bell, R. L., Quamme, H. A., Layne, R. E., & Skirvin, R. M. (1996). Pears. En J. Janick, & J. N. Moore (Edits.), *Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Bohn, H. L., McNeal, B. L., & O'Connor, G. A. (1993). *Química del Suelo* (Primera ed.). (M. Sánchez Orozco, Trad.) México, D.F., México: Limusa.
- Briat, J.-F., & Lobréaux, S. (1997). Iron transport and storage in plants. *Trends in Plant Science*, 2(5), 187-193.
- Briat, J.-F., Curie, C., & Gaymard, F. (2007). Iron utilization and metabolism in plants. *Plant Biology*, 10, 276-282.
- Brini, W., Mars, M., & Hormaza, J. I. (2008). Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis* L.) studied with SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 115, 337–341.
- Bunnang, S., Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D. W., & Mok, M. C. (1996). Responses of Two Somaclonal Variants of Quince (*Cydonia oblonga*) to Iron Deficiency in the Greenhouse and Field. *J. Amer. So. Hort. Sci.*, 121(6), 1054-1058.
- Campbell, W. (1999). Nitrate Reductase Structure Function and Regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*(50), 277-303.
- Cañasveras Sánchez, J. C. (2014). *Nuevas técnicas de predicción y corrección de la clorosis férrica en suelos calcáreos: Reflectancia difusa, sales de hierro y cubierta con*

*gramíneas*. Córdoba, España: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.

Catalina Tomás, Á. (2015). *Utilización de medidas de fluorescencia de la clorofila para monitorizar el estado nutricional y estimar el potencial enológico en viñedos afectados por la clorosis férrica*. Valladolid, España: Universidad de Valladolid.

Cellini, A., Corpas, F. J., Bautista Barroso, J., & Masia, A. (2011). Nitric oxide content is associated with tolerance to bicarbonate-induced chlorosis in micropropagated *Prunus* explants. *J. of Plant Physio.*, 168, 1543-1549.

Chagné, D., Crowhurst, R. N., Pindo, M., Thrimawithana, A., Deng, C., Ireland, H., . . . al., e. (2014). The Draft Genome Sequence of European Pear (*Pyrus communis* L. "Bartlett". *PLos ONE*, 9(4), e92644.

Challice, J. S., & Westwood, M. N. (1973). Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters. *Bot. J. Linn. Soc.* (67), 121-148.

Chance, B., & Maehly, A. C. (1954). The assay of catalase and peroxidase. En D. Glick (Ed.), *Methods Biochem Anal* (págs. 357-424). New Yor, USA: Elsevier.

Chaney, R. L. (1984). Diagnostic practices to identify iron-deficiency in higher plants. *J. Plant Nutr.*, 7 (1-5): 47-67.

Chaney, R. L., Coulombe, B. A., Bell, P. F., & Angle, J. S. (1992). Detailed method to screen dicot cultivars for resistance to Fe-chlorosis using FeDTPA and bicarbonate in nutrient solutions. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10), 2063-2083.

Chen, L., Din, C., & Xiufeng, Z. (2015). Differential regulation of proteins in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep*, 34:83–96.

Chen, Y., & Barack, P. (1982). Iron nutrition in calcareous soils. *Advances in Agronomy*(35), 217-240.

Chevreau, E., & Hammerschlag, F. A. (1992). Pear. En F. A. Hammerschlag, & R. E. Litz (Edits.), *Biotechnology of Perennial Fruit Crops* (págs. 263-276). Wallingford: CAB International.

- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, *91*, 107–110.
- Claveria, E., Asín, L., Iglesias, I., Bonany, J., Simard, M. H., & Dolcet San-Juan, R. (2012). In Vitro Screening for Tolerance to Iron Chlorosis as a Reliable Selection Tool in a Pear Rootstock Breeding Program. *Acta Horticulturae*, *935*, 199-205.
- Covarrubias, J. I., & Rombolà, A. D. (2015). Organic acids metabolism in roots of grapevine rootstocks under severe iron deficiency. *Plant Soil*, DOI 10.1007/s1104-015-2530-5.
- de Vos, C. R., Lubberding, H. J., & Bienfiat, H. F. (1986). Rhizosphere acidification as a response to iron deficiency in bean plants. *Plant Physiology*(81), 842-846.
- Demiral, T., & Türkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, *53*, 247-257.
- Dolcet-Sanjuan, R., Asín, L., Vilardell, P., Bonany, J., & Simard, M. H. (2008). Towards the Selection of a New Pear Rootstock: In Vitro and Field Evaluation for Tolerance to Iron Chlorosis, Low Vigor and Micropropagation of Selected Clones. *Acta Hort.*, *800*, 683-690.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Bonany, J., Iglesias, I., Asín, L., & Simard, M. H. (2004). Selection for New Pear Rootstocks: In Vitro Screening and Field Evaluation for Tolerance to Iron Chlorosis. *Acta Horticulturae*, *658*, 463-468.
- Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D. S., & Mok, M. C. (1991). In vitro manipulation of *Pyrus* species and *Cydonia oblonga*. *Acta Horticulturae. In Vitro Culture*, *300*, 45-50.
- Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D. W., & Mok, M. C. (1990). Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *21*, 191-199.
- Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D. W., & Mok, M. C. (1992). Characterization and in vitro selection for iron efficiency in *Pyrus* and *Cydonia*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, *28P*, 25-29.

- Donnini , S., Castagna, A., Ranieri, A., & Zocchi, G. (2009). Differential responses in pear and quince genotypes induced by Fe deficiency and bicarbonate. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1181-1193.
- Echevarría, C., Monreal, J. A., Feria, A. B., Terencio Jiménez, E., León, A., Álvarez, R., & García-Mauriño, S. (2010). La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC): enzima clave de los metabolismos fotosintéticos C4 y CAM. En A. Chueca Sancho, & J. L. González Rebollar (Edits.), *C4 y CAM : características generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas : Homenaje al doctor Jilio López Gorgé* (págs. 85-97). Sevilla, España: Fundación Ramón Areces.
- Evans, R. C., & Campbell, C. S. (2002). The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes . *American Journal of Botany*, 89(9), 1478-1484.
- FAO-STAT. (2017). *FAOSTAT*. Recuperado el 14 de Junio de 2017, de <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>
- Fernández López, J. A., Almela Ruíz, L., & Fernández Rubio, J. (1994). *La Nutrición Férrica de las Plantas. El Problema de la Clorosis* . Murcia: Universidad de Murcia.
- Gabriel, J., Veramendi, S., Angulo, A., & Magne, J. (2013). Respuesta de variedades mejoradas de papa (*Solanum tuberosum* L.) al estres hídrico por sequía. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 1(1), 25-36.
- García Del Rosal, M. J. (2013). *Bases moleculares de la regulación de la respuesta a la deficiencia de hierro en plantas con Estrategia tipo I*. Córdoba, España: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
- García-Serrano Jiménez, P., Lucena Marotta, J. J., Ruano Criado, S., & Nogales García, M. (2009). *Guía Práctica de la Fertilización Racional de los Cultivos en España*. Madrid, España: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- García-Serrano Jiménez, P., Lucena Marotta, J. J., Ruano Criado, S., & Nogales García, M. (2014). *Guía Práctica de la Fertilización Racional de los Cultivos en España*. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

- Goldschmidt, V. M. (1937). The Principles of Distribution of Chemical Elements in Minerals and Rocks. *Journal Chemical Society*, 655-673.
- González Moreno, S., Perales Vela, H., & Salcedo Álvarez, M. O. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de los efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y de algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119-129.
- Gonzalo, M. J., Moreno, M. Á., & Gogorcena, Y. (2011). Physiological responses and differential gene expression in Prunus rootstocks under iron deficiency conditions. *Journal of Plant Physiology*, 168, 887-893.
- Gorgocena Aoiz, Y., Abadía Bayona, J., & Abadía Bayona, A. (2004). *Patente nº ES 2 177 430 A1*. España.
- Guedj, M., Sasias, G., & Chesne, C. (2009). *Tratado Práctico de Horticultura*. Chamalières, Francia: Ediciones Omega.
- Hancock, J. F., & Lobos, G. A. (2008). Pears. En J. F. Hancock (Ed.), *Temperate Fruit Crops Breeding* (págs. 299-340). Michigan: Springer.
- Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical Methods*. London, Great Britain: Chapman and Hall Ltd.
- Hellín, E., Hernández-Cortés, J. A., Piqueras, A., Olmos, E., & Sevilla, F. (1995). The influence of the iron content on the superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure of Citrus limon L. En J. Abadía (Ed.), *Iron nutrition in soils and plants* (págs. 247-254). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Herrero, J., & Tabuenca, M. C. (1962). Incompatibilidad entre patrón e injerto. VI. Observaciones en uniones de peral sobre membrillero. *An. Estac. Exp. Aula Dei* 7, 1/2, 64-78.
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. En D. Bartels, & A. Melis (Eds.), *Planta* (págs. 604-611). California: Springer.

- Iglesias Castellarnau, I., & Casals Pelegrí, E. (2013). Evolución de la producción de pera en España y análisis del mercado. *Vida Rural. Dossier frutales de pepita*, 36-43.
- Iglesias, I., Bonany, J., Vilardell, P., & Ruíz, S. (2015). El cultivo del peral en España: tecnología de producción, consumo e intercambios comerciales. *Fruticultura*(45), 6-33.
- Iglesias, I., Vilardell, P., Bonany, J., Claveria, E., & Dolcet-sanjuan, R. (2004). Micropropagation and Field Evaluation of the Pear (*Pyrus communis* L.) "IGE 2002", a New Selection of the Cultivar Dr. Jules Guyot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(3), 389-393.
- Inskeep, W. P., & Bloom, P. R. (1986). Effects of soil moisture on soil pCO<sub>2</sub>, soil solution bicarbonate, and iron chlorosis in soybeans. *Soil Sci. Soc. Am J.*, 50, 946-952.
- Jiménez, S., Morales, F., Abadía, A., Abadía, J., Moreno, J., & Gorgocena, Y. (2009). Elemental 2-D mapping and changes in leaf iron and chlorophyll in response to iron re-supply in iron-deficient GF 677 peach–almond hybrid. *Plant Soil*, 315, 93-106.
- Jiménez, S., Pinochet, J., Abadía, A., Moreno, M. Á., & Gorgocena, Y. (2008). Tolerance Response to Iron Chlorosis of Prunus Selections as Rootstocks. *HortScience*, 43(2), 304-309.
- Kim, S. A., & Guerinot, M. L. (2007). Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 581, 2273–2280.
- Kobayashi, T., Suzuki, M., Inoue, H., Nakanishi Itai, R., Takahashi, M., Nakanishi, H., . . . Nishizawa, N. (2005). Expression of iron-acquisition-related genes in iron-deficient rice is co-ordinately induced by partially conserved iron-deficiency-responsive elements. *Journal of Experimental Botany*, 56(415), 1305-1316.
- Krauskopf, K. B. (1972). Geochemistry of micronutrients. En J. J. Mortvedt (Ed.), *Micronutrients in agriculture* (págs. 7-40). Madison, WI: Soil Science Society of America.

- Kumar Tewari, R., Hadacek, F., Sassmann, S., & Lang, I. (2013). Iron deprivation-induced reactive oxygen species generation leads to non-autolytic PCD in *Brassica napus* leaves. *Environmental and Experimental Botany*, *91*, 74-83.
- Landsberg, E. C. (1981). Organic acid synthesis and release of hydrogen ions in response to Fe deficiency stress of mono and dicotyledonous plant species. *Journal of Plant Nutrition*(7), 579-591.
- Larbi, A., Abadía, A., Abadía, J., & Morales, F. (2006). Down co-regulation of light absorption, photochemistry, and carboxylation in Fe-deficient plants growing in different environments. *Photosynth. Res.*, *89*, 113-126.
- Larbi, A., Morales, F., Abadía, A., & Abadía, J. (2010). Changes in iron and organic acid concentrations in xylem sap and apoplastic fluid of iron-deficient *Beta vulgaris* plants in response to iron resupply. *Journal of Plant Physiology*, *167*, 255-260.
- Latowski, D., Surówka, E., & Strza, K. (2010). Regulatory Role of Components of Ascorbate–Glutathione Pathway in Plant Stress Tolerance. En N. A. Anjum , U. Shahid , & C. Ming-Tsair (Edits.), *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants* (págs. 1-54). Aveiro, New Delhi, Taiwan: Springer.
- Li, H., Wang, L., & Yang, Z. M. (2015). Co-expression analysis reveals a group of genes potentially involved in regulation of plant response to iron-deficiency. *Gene*, *554*, 16-24.
- Lindsay, W. L. (1974). Role of chelation in micronutrient availability. En E. W. Carson (Ed.), *The Plant Root and its Environment* (págs. 507-524). Virginia, USA: University Press of Virginia.
- Lindsay, W. L. (1979). *Chemical Equilibria in Soil*. New York.
- Lindsay, W. L. (1979). *Chemical Equilibria in Soils*. New York, USA: John Wileys and Sons.
- Lindsay, W. L. (1995). Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach. En J. Abadía (Ed.), *Iron Nutrition in Soils and Plants* (págs. 7-14). Holanda: Kluwer Academic Publishers.

- Loeppert, R. H. (1988). *Los micronutrientes en agricultura*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Loeppert, R. H., Wei, L. C., & Ocuwpaugh, R. (1994). Soil factors influencing the mobilization in calcareous soils. En J. A. Maethey, D. E. Crowley, & D. G. Luster (Edits.), *Biochemistry of metal micronutrients in the rizosphere* (págs. 343-360). Florida, USA: Lewis Publishers.
- Lombard, P. B., & Westwood, M. N. (1987). Pear rootstock. En R. C. Rom, & R. F. Carlson (Edits.), *Rootstocks for fruit crops* (págs. 145-183). New York, USA: Wiley.
- López-Blancas, E., Martínez-Damián, M., Colinas-León, M., Bautista-Buñuelos, C., Martínez-Solís, J., & Rodríguez-Pérez, J. (2014). ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ENZIMÁTICA DE ALBAHACA 'NUFAR' (*Ocimum basilicum* L.) ALMACENADA EN REFRIGERACIÓN. *Agron. Mesoam.*, 25(2), 255-265.
- López-Millán, A. F., Morales, F., Abadía, A., & Abadía, J. (2001). Changes induced by iron deficiency in the composition of the leaf apoplastic fluid from field-grown pear (*Pyrus communis* L.) trees. *Journal of Experimental Botany*, 52(360), 1489-1498.
- López-Millán, A. F., Morales, F., Abadía, A., & Javier, A. (2000). 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), 873-884.
- López-Millán, A. F., Morales, F., Andaluz, A., Gorgocena, Y., Abadía, A., de las Rivas, J., & Abadía, J. (2000a). Protective mechanisms in roots of iron deficient sugar beet: changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiology*(124), 885-897.
- Loué, A. (1988). *Los Microelementos en Agricultura*. (A. Domínguez Vivancos, Trad.) Madrid, España: Mundi Prensa.
- Lucena, J. J. (2009). El empleo de complejantes y quelatos en la fertilización de micronutrientes. *Revista Ceres*, 56(4), 527-535.
- Mäder, M., & Füssli, R. (1982). Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. II Regulation by phenolic compounds. *Plant Physiology*, 70, 1132-1134.

- MAPAMA. (2014). *Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente*. Recuperado el 31 de Mayo de 2017, de <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/default.aspx>
- Marschner, H. (1995). *Mineral Nutrition in Higher Plants*. Academic Press.
- Marschner, H., Röemheld, V., & Kissel, M. (1986). Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Jour. Plant Nutr.*(71), 695-713.
- Martínez Cuenca, M.-R. (2012). *Respuestas del sistema de absorción del hierro en las raíces de los cítricos ante diferentes condicione clorosantes del medio*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Maurer, F., Müller , S., & Bauer, P. (2011). Suppression of Fe deficiency gene expression by jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 530-536.
- Mengel, K., & Kirkby, E. (2001). *Principles of plant nutrition* . Dordretch, The Neatherlands: Kluwer Academic.
- Morales, F., Abadía, A., & Abadía, J. (1991). Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physol.*, 97, 886-893.
- Morales, F., Belkhdja, R., Abadía, A., & Abadía, J. (2000). Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron-deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis* L.). *Photosynth. Res.*, 63, 9-21.
- Morales, F., Moise, N., Quílez, R., Abadía, A., Abadía, J., & Moya , I. (2001). Iron deficiency interrupts energy transfer from a disconnected part of the antenna to the rest of Photosystem II. *Photosynth. Res.*, 70, 207-220.
- Murad, E., & Fischer, W. R. (1988). The geobiochemical cycle of iron. En J. W. Stucki (Ed.), *Iron in soils minerals* (págs. 1-18). Reidel Publishing Company.
- Nikolic, M., & Römheld, V. (1999). Mechanism of Fe uptake by leaf symplast: is Fe inactivation in leaf a cause of Fe deficiency chlorosis? *Plant Soil*(37), 215-229.

- Norvell, W. A. (1972). Equilibria of metal chelates in soil solution. En *Micronutrients in Agriculture* (págs. 115-138). Madison, USA: Soil Science Society of America.
- Orera, I., Abadía, J., Abadía, A., & Álvarez-Fernández, A. (2009). Nuevas metodologías aplicadas a la investigación de quelatos de hierro sintéticos. *Vida RURAL*, 60-64.
- Ortega-Maldonado, J., Ojeda-Barrios, D., Martínez-Téllez, J., Hernández-Rodríguez, A., Ruíz-Anchondo, T., & Escudero-Almanza, D. (2014). Aspectos relevantes sobre la bioquímica y la fisiología del hierro en plantas. *Tecnociencia Chihuahua*, 8(1), 30-38.
- Osório, J., Osório, M. L., Correia, P. J., de Varennes, A., & Pestana, M. (2014). Chlorophyll fluorescence imaging as a tool to understand the impact of iron deficiency and resupply on photosynthetic performance of strawberry plants. *Scientia Horticulturae*, 165, 148-155.
- Oukarroum, A., Bussotti, F., Goltsev, V., & Kalaji, H. M. (2015). Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems land II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 80-88.
- Pestana, M., de Varennes, A., & Araújo Faria, E. (2003). Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. *Food, Agriculture & Environment*, 1(1), 46-51.
- Pfündel, E. (2007). *JUNIOR-PAM Chlorophyll Fluorometer Operator's Guide*. Effeltrich, Germany: Heinz Walz GmbH.
- Pich, A., & Scholz, G. (1993). The relationship between the activity of various iron-containing and iron-free enzymes and the presence of nicotianamine in tomato seedlings. *Plant Physiology*(88), 172-178.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R. C., Oh, S., Smedmark, J. E., Morgan, D. R., . . . Campbell, C. S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 266, 5-43.
- Prado, R. M., & Alcantara-Vara, E. (2011). Tolerance to iron chlorosis in non-grafted quince seedling and in pear grafted onto quince plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 11(4), 119-128.
- Prognosfruit. (2016). *European Apple & Pear Crop Forecast*. Hamburg, Germany: Agrofresh.

- Rabotti, G., de Nissi, P., & Zocchi, G. (1995). Metabolic implications in the biochemical responses to iron deficiency in cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots. *Plant Physiology*(107), 1195-1199.
- Römheld, V., & Marschner, H. (1986). Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. En A. Tinker, & A. Läuchli (Edits.), *Advances in Plant Nutrition Vol. 2* (págs. 155-204). New York, USA: Praeger Scientific.
- Rubstov, G. A. (1944). Geographical distribution of the genus *Pyrus* and trends and factors in its evolution. *Am. Nat.*(78), 358-366.
- Sanz Encinas, M., & Montañés García, L. (1997). Diagnóstico visual de la clorosis férrica. *ITEA*, 93(1), 7-22.
- Schmidt, W. (2003). Iron Stress Responses in Roots of Strategy I Plants. En L. L. Barton, & J. Abadía (Edits.), *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms* (págs. 229-250). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Schwertmann, U., & Taylor, R. M. (1989). Iron Oxides. En J. B. Dixon, & B. Weed (Edits.), *Mineral in soil environments* (págs. 379-438). Madison, USA: Soil Science Society of America.
- Shibli, R. A., Ajlouni, M. M., Jaradat, A., Aljanabi, S., & Shatnawi, M. (1997). Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). *Sci. Hortic.*, 68, 237-242.
- Silva, G. J., Medeiros Souza, T., Barbieri, R. L., & Costa de Oliveira, A. (2014). Origin, Domestication, and Dispersing of Pear (*Pyrus* spp.). *Hindawi Publishing Corporation, Advances in Agriculture, 2014*, 1-8.
- Simard, M. H., & Michelesi, J. C. (2002). 'Pyriam': a New Pear Rootstock. *Acta Hort*, 596, 351-355.
- Singh Gill, S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.

- Singlenton, V. J., Orthofer, R. O., & Lamuela-Raventos, M. R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.*, 299, 152–178.
- Sun, X. P., Wang, S. Y., Tong, Y. A., Korcak, R. F., & Faust, M. (1987). Metabolic changes in iron-deficient apple seedlings. *Journal of Plant Nutrition*(10), 1021-1030.
- Tagliavini, M., & Rombolá, D. (2001). Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Eur. J. Agron.*, 15, 71-92.
- Tagliavini, M., Abadía, J., Rombolá, D., Abadía, A., Tsipouridis, C., & Marangoni, B. (2000). Agronomic means for the control of iron deficiency chlorosis in deciduous fruit trees. *J. Plant Nutr.*, 23, 2007-2022.
- Tato, L., De Nisi, P., Donnini, S., & Zocchi, G. (2013). Low iron availability and phenolic metabolism in a wild plant species (*Parietaria judaica* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 145-153.
- Teng, Y., Tanabe, K., Tamura, F., & Itai, A. (2002). Genetic Relationships of *Pyrus* Species and Cultivars Native to East Asia Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127(2), 262-270.
- Terry, N., & Abadía, J. (1986). Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition*, 9, 609-646.
- Terry, N., & Low, G. (1982). Leaf chlorophyll content and its relation to the intracellular location of iron. *Journal of Plant Nutrition*, 5, 301-310.
- The pH Requirement for in Vivo Activity of the Iron-Deficiency-Induced “Turbo” Ferric Chelate Reductase. (1996). *Plant Physiol.*, 110, 111-123.
- Tiffin, L. O. (1970). Translocation of iron citrate and phosphorus in xylem exudate of soybeans. *Plant Physiol.*, 45, 280-283.
- Trejo Márquez, M. A., & Pascual Bustamante, S. (2010). *Determinación de enzimas relacionadas con la maduración de productos vegetales*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Volk, G. M., Richards, C. M., Henk , A. D., & Reilley, A. A. (2006). Diversity of Wild *Pyrus communis* Based on Microsatellite Analyses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(3), 408-417.
- Wang, Y.-H., Garvin, D. F., & Kochian, L. V. (2002). Rapid Induction of Regulatory and Transporter Genes in Response to Phosphorus, Potassium, and Iron Deficiencies in Tomato Roots. Evidence for Cross Talk and Root/Rhizosphere-Mediated Signals. *Plant Physiol.*, 130, 1361-1370.
- Welkie, G. W., & Miller, G. W. (1989). Sugar beet responses to iron nutrition and stress. *J. Plant Nutr.*, 1041-1054.
- Westwood, M. N. (1982). Pear germplasm of the new national clonal repository: its evaluation and uses. *Acta Horticultureae*, 124, 57-65.
- Weydert, C. J., & Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dsmutase, cataase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissuei. *Nat Protoc.*, 5(1), 51-66.
- Wu, H., Li, L., Du, J., Yuan, Y., Cheng, X., & Ling, H.-Q. (2005). Molecular and Biochemical Characterization of the Fe(III) Chelate Reductase Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 46(9), 1505-1514.
- Wünsch, A., & Hormaza, J. I. (2007). Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. *Scientia Horticulturae*(113), 37-43.
- Yamamoto, T., & Terakami, S. (2016). Genomics of pear and other Rosaceae fruit trees. *Breeding Science*, 66, 148-159.
- Zheng, X., Cai, D., Potter, D., Postman, J., Liu , J., & Teng, Y. (2014). Phylogeny and evolutionary histories of *Pyrus* L. revealed by phylogenetic trees and networks based on data from multiple DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*(80), 54-65.
- Zocchi, G. (2006). Metabolic changes in iron-stressed dicotyledonous plants. En L. L. Barton , & J. Abadía (Edits.), *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms* (págs. 359-370). Dordrecht, The Netherlands: Springer.

