

CAMBIOS METABÓLICOS EN LA RAÍZ DEL PATRÓN GF 677 EN CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE HIERRO

JIMÉNEZ, S., MORENO, M. Á. Y GOGORCENA, Y.

*Dpto. de Pomología, Estación Experimental de Aula Dei
(Consejo Superior de Investigaciones Científicas)
Apdo. 202, 50080 Zaragoza (España)*

RESUMEN

La clorosis férrica es un problema muy extendido en zonas de suelos calizos con pH alcalino. Un patrón que responde de una forma eficiente a esta carencia de hierro es el híbrido almendro x melocotonero GF 677. Algunos cambios metabólicos producidos en la raíz forman parte de los mecanismos de respuesta para la tolerancia a clorosis férrica. A partir de plantas de GF 677 desarrolladas en cultivo hidropónico en condiciones de carencia de hierro, se realizó un seguimiento de los cambios producidos en la concentración de azúcares solubles y de ácidos orgánicos (malato y citrato) de las raíces. Los azúcares solubles mayoritarios fueron glucosa, fructosa, sacarosa y sorbitol. Excepto en este último, la deficiencia de hierro causó un incremento de la concentración de los mismos. El contenido en malato y citrato aumentó ligeramente con la carencia de hierro.

Palabras clave: clorosis, azúcares, ácidos orgánicos, hidropónico, *Prunus*.

ABSTRACT

The iron chlorosis is a widely extended problem in calcareous soils with alkaline pH. A rootstock that responds efficiently at this iron deficiency is the almond x peach hybrid GF 677. Some root metabolic changes are part of the response mechanism to iron chlorosis tolerance. From GF 677 plants grown in hydroponic culture under iron deficient conditions, the study of root concentration variation of sugars and organic acids (malate and citrate) was carry out. The major soluble sugars were glucose, fruc-

tose, sacarose and sorbitol. Except for the last one, the iron deficiency increased their concentration. Malate and citrate content increased slightly with the lack of iron.

Keywords: chlorosis, sugars, organic acids, hydroponic, *Prunus*.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más frecuentes en las áreas tradicionales de cultivo de melocotonero es la clorosis férrica. La deficiencia de hierro está causada por suelos calizos, que insolubilizan el hierro y dificultan su absorción por parte de la planta (Hell y Stephan, 2003). La carencia de hierro provoca un amarilleamiento internervial de las hojas más jóvenes debido a una disminución en la concentración de clorofila (Ferry y Abadía, 1986).

El híbrido interespecífico de almendro x melocotonero, GF 677, es probablemente el patrón de melocotonero y nectarina más utilizado en los países del área mediterránea (Felipe y Gómez-Aparisi, 1997). Posee una buena productividad, vigor, tolerancia a sequía y sobre todo una alta tolerancia a la clorosis férrica (Cinelli y Loreti, 2004). A diferencia de otros patrones sensibles a clorosis, el patrón GF 677 es capaz de poner en marcha una serie de mecanismos, a nivel radicular, para hacer frente a la baja concentración de Fe soluble en el medio. Entre ellos, cabe destacar la activación de la enzima reductasa de hierro (Gogorcena *et al.*, 2004).

Se conoce poco de los cambios metabólicos producidos en las raíces de patrones *Prunus* sometidos a deficiencia de hierro. Se han descrito algunos cambios en la concentración de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos al someter a plantas de *Prunus* a la carencia de hierro. En condiciones de cultivo hidropónico y tras 4 días de deficiencia de Fe, se ha observado un ligero aumento en la concentración de algunos azúcares, como glucosa y sacarosa, y ácidos orgánicos, como malato y citrato (Jiménez *et al.*, 2005).

En el presente estudio se realiza un seguimiento a lo largo del tiempo del contenido tanto en azúcares solubles como en algunos ácidos orgánicos, malato y citrato, de las raíces de plantas GF 677 sometidas a deficiencia de hierro, para conocer la adaptación de la planta a estas condiciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Plantas del patrón GF 677 (*P. amygdalus* x *P. persica*) procedentes de cultivo *in vitro* se establecieron en cultivo hidropónico. El material vegetal fue suministrado por Agromillora Catalana S.A. (Subirats, Barcelona). Las plantas crecieron en una solu-

ción nutritiva ½ strength Hoagland con 90 μM de Fe-EDTA en el tratamiento control (90Fe) y 0 μM de Fe-EDTA en el deficiente (0Fe).

A lo largo de 3 semanas se recogieron muestras de puntas de raíz de plantas deficientes. También se recogieron puntas de raíz de plantas control. Los metabolitos de las raíces previamente congeladas se extrajeron con una mezcla etanol/agua durante 20 min a 80°C. La extracción se realizó en tres pasos (uno con 3 ml etanol 80% y dos con 1 ml etanol 50%) seguidos de una centrifugación durante 10 min a 4800g y recojiéndose los sobrenadantes (Ollat *et al.*, 2003). Las muestras se separaron en dos fracciones: una para la cuantificación de azúcares y otra para la de ácidos orgánicos.

Los azúcares se purificaron por medio de resinas de intercambio iónico (Bio-Rad AG 1-X4 Resin 200-400 chloride form, Bio-Rad AG 50W-X8 Resin 200-400 mesh hydrogen form) (Moing y Gaudillère, 1992). Las muestras fueron concentradas a 0,2 ml y analizadas por HPLC, utilizando una columna de Ca (Aminex HPX-87C 300 mm 7,8 mm columna Bio-Rad), con un flujo de 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ de agua desionizada a 85°C y con un detector de índice de refracción (Waters 2410). Se inyectaron 20 microlitros de muestra.

Las concentraciones de sacarosa, fructosa, glucosa y sorbitol fueron analizadas para cada muestra utilizando manitol como estándar interno.

La cuantificación de los azúcares fue llevada a cabo con el software Millennium 3.2 de Waters (Milford, Mass). Se identificaron los picos de HPLC y se calcularon sus áreas utilizando estándares externos de concentración conocida (Panreac Química S.A.).

Los ácidos orgánicos, malato y citrato, fueron determinados enzimáticamente, utilizando kits específicos de Boehringer Mannheim (Roche), siguiendo las recomendaciones comerciales.

El análisis de los datos se realizó mediante el programa SPSS 13.0. La comparación de medias se realizó mediante la prueba t para muestras independientes estableciendo el nivel de significación en $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Los azúcares solubles mayoritarios presentes en la raíz fueron: fructosa, glucosa, sacarosa y sorbitol. Además se detectaron otros azúcares minoritarios como la rafinosa. La concentración de sorbitol fue considerablemente mayor que la del resto de los azúcares (Figura 1). La deficiencia de Fe provocó un aumento en la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa. Dichos cambios fueron significativos entre las concentraciones del tratamiento control (90Fe) y las del deficiente (0Fe) durante los 21 días estudiados. El contenido en fructosa de la raíz pasó de 1,12 mg g^{-1} PF (peso fresco) en el tratamiento 90Fe, hasta 2,17 mg g^{-1} PF en el 0Fe a las tres semanas. La concentración de glucosa de las raíces de plantas controles fue de 0,97 mg g^{-1} PF

mientras que la de las raíces de plantas deficientes del último día fue de 2,57 mg g⁻¹ PF. El contenido en sacarosa de la raíz pasó de 0,54 mg g⁻¹ PF en el tratamiento 90Fe hasta 1,16 mg g⁻¹ PF en el 0Fe a los 21 días. La concentración de sorbitol sufrió un ligero descenso tras 10 días de deficiencia de Fe, si bien los cambios no fueron significativamente diferentes. Previa a esta disminución se observó un aumento de concentración.

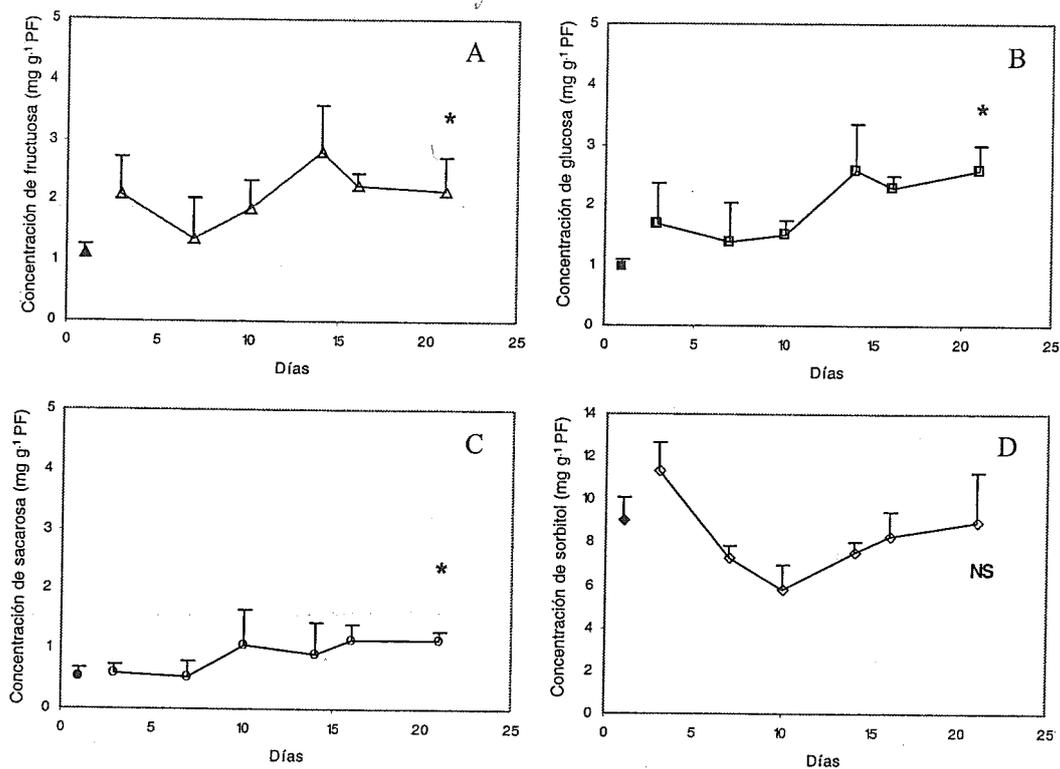


Figura 1. Concentración de los azúcares: fructosa (A), glucosa (B), sacarosa (C) y sorbitol (D), en la raíz del patrón GF 677 (mg por g de peso fresco) durante 21 días de deficiencia de hierro. Símbolos: Δ fructosa 0Fe (tratamiento deficiente de hierro), \square glucosa 0Fe, \circ sacarosa 0Fe, \diamond sorbitol 0Fe, \blacktriangle fructosa 90Fe (tratamiento control con 90 μ M Fe-EDTA), \blacksquare glucosa 90Fe, \bullet sacarosa 90Fe y \blacklozenge sorbitol 90Fe. Comparación de medias respecto al tratamiento 90Fe: (*), significación al $p \leq 0,05$; NS, no significativo.

La concentración de malato aumentó ligeramente en las raíces de plantas deficientes (Figura 2A), aunque no se encontraron diferencias significativas. Después de 2 semanas de deficiencia, la concentración de las raíces 0Fe alcanzó los 2 mg g⁻¹ PF. En la tercera semana se observó una concentración similar al tratamiento control.

De forma similar, la concentración de citrato aumentó en las raíces de las plantas deficientes (Figura 2B). La diferencia respecto al tratamiento 90Fe (1,06 mg g⁻¹ PF) fue significativa a los 21 días de deficiencia (1,77 mg g⁻¹ PF).

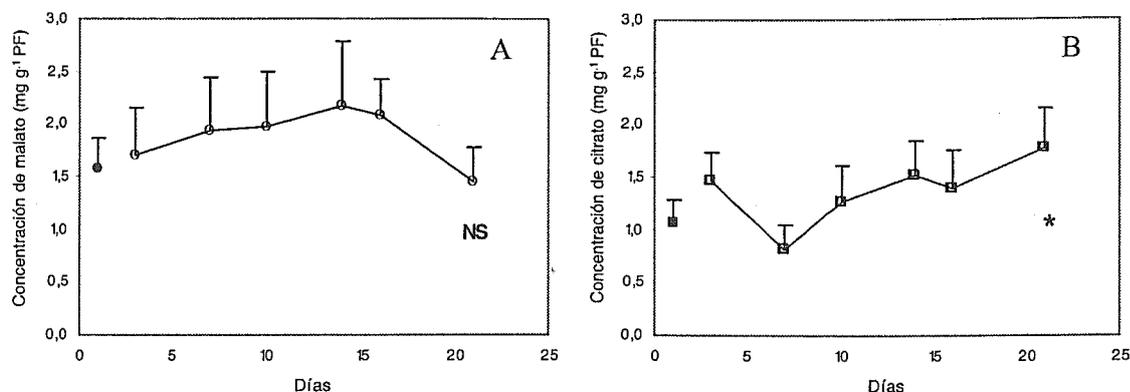


Figura 2. Concentración de los ácidos orgánicos: malato (A) y citrato (B) en la raíz del patrón GF 677 (mg por g de peso fresco) durante 21 días de deficiencia de hierro. Símbolos: ○ malato 0Fe (tratamiento deficiente de hierro), ● malato 90Fe (tratamiento control con 90 μ M Fe-EDTA), □ citrato 0Fe y ■ citrato 90Fe. Comparación de medias respecto al tratamiento 90Fe: (*), significación al $p \leq 0,05$; NS, no significativo.

DISCUSIÓN

La deficiencia severa de hierro duplicó la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa (Figura 1). Sin embargo, la concentración de sorbitol se vio ligeramente disminuida durante la deficiencia, probablemente debido a su oxidación a fructosa por medio de una deshidrogenasa NAD dependiente (Agustí, 2004). El sorbitol además de ser un producto final de la fotosíntesis y un azúcar de transporte es un carbohidrato que actúa como reserva soluble (Oliveira y Priestley, 1998). La acumulación de carbohidratos solubles en plantas sometidas a estrés hídrico ha sido observada con anterioridad. Un estrés ligero, que no sea capaz de provocar la inhibición completa de la fotosíntesis, puede inhibir el crecimiento del tallo, y a través de la relocalización de fotosintatos aumentar las reservas de carbohidratos, especialmente en la raíz (Loescher, 1990). De esta forma, la planta podría hacer frente al consumo energético que supone el poner en marcha los mecanismos radiculares de respuesta a la deficiencia de hierro.

En las raíces de plantas sometidas a deficiencia de hierro se produce una acumulación de ácidos orgánicos, principalmente malato y citrato (Abadía *et al.*, 2002; Ollat *et al.*, 2003). En el caso del patrón GF 677 se observó esta misma tendencia. Las concentraciones de malato y citrato fueron del mismo orden que las obtenidas en otras especies leñosas como la vid (Ollat *et al.*, 2003). Sin embargo, el aumento de estos metabolitos fue mucho más moderado que el observado en especies herbáceas como la remolacha (López-Millán *et al.*, 2000). En raíces de remolacha, el incremento de malato y citrato llega a ser de 16 y 26 veces, respectivamente. En cambio, en las raíces

ces de GF 677 la concentración de malato solo aumentó 1,4 veces y la de citrato 1,7 veces. Estas diferencias pueden ser debidas a la adaptación más lenta que tienen las especies leñosas a cualquier estrés.

El citrato es el ácido orgánico que más ve afectada su concentración en genotipos tolerantes a la clorosis férrica de vid (Ollat *et al.*, 2003) y kiwi (Rombolà *et al.*, 2002). En un trabajo recientemente realizado sobre raíz de patrones de vid, se observó una mayor concentración de malato que de citrato en condiciones de cultivo control. Sin embargo, al someter las plantas a deficiencia de Fe, el citrato fue el ácido orgánico que más se acumuló, especialmente conforme la deficiencia se prolongaba (datos no publicados). El mismo comportamiento se observó para el patrón GF 677, al experimentar un mayor incremento de citrato en raíz con la deficiencia de hierro.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CICYT (AGL2002-04219), PETRI (PTR1995-0580) y Acción Concertada (HF03-273) con cofinanciación FEDER. S. Jiménez ha sido beneficiario de una beca I3P del CSIC/FSE.

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.
- AGUSTÍ, M. 2004. *Fruticultura*. Madrid, Mundi-Prensa. pp 80.
- CINELLI, F.; LORETI, F. 2004. Evaluation of some plum rootstocks in relation to lime-induced chlorosis by hydroponic culture. *Acta Horticulturae* 658 (2): 421-427.
- FELIPE, A.J.; GÓMEZ-APARISI, J. 1997. The almond x peach hybrid rootstocks breeding program at Zaragoza (Spain). *Acta Horticulturae* 451: 259-262.
- GOGORCENA, Y.; ABADÍA, J.; ABADÍA, A. 2004. A new technique for screening iron-efficient genotypes in peach rootstocks elicitation of root ferric chelate reductase by manipulation of external iron concentrations. *Journal of Plant Nutrition* 27 (10): 1701-1715.
- HELL, R.; STEPHAN, U.W. 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* 216: 541-551.
- JIMÉNEZ, S.; OLLAT, N.; MORENO, M.A.; GOGORCENA, Y. 2005. Estudio de la respuesta metabólica de patrones *Prunus* frente a clorosis por medio de ¹H-Resonancia Magnética Nuclear Monodimensional. *Actas Portuguesas de Horticultura* 6 (2): 162-167.

- LOESCHER, W. H.; MCCAMANT, T.; KELLER, J.D. 1990. Carbohydrate reserves, translocation, and storage in woody plant roots. *Hortscience* 25 (3): 274-281.
- LÓPEZ-MILLÁN, A.F.; MORALES, F.; ANDALUZ, S.; GOGORCENA, Y., ABADÍA, A.; DE LAS RIVAS, J.; ABADÍA, J. 2000. Responses of sugar beet roots to iron deficiency changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiology* 124: 885-897.
- MOING, A.; GAUDILLÈRE, J.P. 1992. Carbon and nitrogen partitioning in peach/plum grafts. *Tree Physiology* 10: 81-92.
- OLLAT, N.; LABORDE, B.; NEVEUX, M.; DIAKOU-VERDIN, P.; RENAUD, C.; MOING, A. 2003. Organic acid metabolism in roots of various grapevine (*Vitis*) rootstocks submitted to iron deficiency and bicarbonate nutrition. *Journal of Plant Nutrition* 26: 2165-2176.
- ROMBOLÀ, A.D.; BRÜGGEMANN, W.; LÓPEZ-MILLÁN, A.F.; TAGLIAVINI, M.; ABADÍA, J.; MARANGONI, B.; MOOG, P.R. 2002. Biochemical responses to iron deficiency in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Tree Physiology* 22: 869-875.
- TERRY, N.; ABADÍA, J. 1986. Function of iron in chloroplasts. *Journal of Plant Nutrition* 9: 609-646.