

CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS EN HOJAS DE FRIJOL TOLERANTE Y SUSCEPTIBLE A DEFICIENCIA DE HIERRO

Leaf Morphological and Physiological Changes of Tolerant and Susceptible Bean Genotypes to Iron Deficiency

Fabiola Zavala Estrada¹, Ranferi Maldonado Torres^{2*}, Manuel Sandoval Villa¹, Ma. Edna Álvarez Sánchez², Ma. Teresa Colinas León² y Porfirio Ramírez Vallejo³

RESUMEN

La clorosis por deficiencia de hierro (Fe) es un estrés abiótico que se manifiesta principalmente en cultivos que crecen en suelos calcáreos o alcalinos, el grado de alteración en la morfología y fisiología de las plantas depende de su tolerancia al estrés. Se determinaron algunos cambios anatómicos y fisiológicos (lecturas SPAD, fotosíntesis neta, concentración de nutrimentos) en hojas de genotipos o líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tolerante y susceptible a clorosis férrica que ocurren por deficiencia de Fe provocadas por un escaso suministro o por condiciones de alcalinidad del medio. La estructura del mesófilo de la hoja clorótica del genotipo tolerante se mostró organizada pero con el parénquima esponjoso más compacto que en la hoja verde y con escasos cloroplastos y de menor tamaño. En la hoja clorótica del genotipo susceptible, el mesófilo presentó estructura desorganizada, con células de forma y tamaño irregular y, con aparente ausencia de cloroplastos. En hojas cloróticas de ambas líneas, el desarrollo de los tilacoides fue escaso y sin formación de grana. En cualquier condición de suministro de Fe y pH del medio, la línea de frijol tolerante presentó lecturas SPAD y fotosíntesis neta más alta que la línea susceptible. La mayor tasa fotosintética se alcanzó con 0.5 mg L⁻¹ para la línea tolerante (12.33 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y con 2 mg L⁻¹ de Fe para el genotipo susceptible (10.62 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). La composición nutrimental foliar, en la línea tolerante, presentó mayor concentración de K en tanto que la susceptible mostró mayor concentración de Ca, Cu y Zn. La concentración de Fe

en la hoja en ambas líneas se incrementó conforme aumentó el suministro de Fe y ésta disminuyó a pH 8.5, así como la concentración de Cu y Zn.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, deficiencia de hierro, cloroplastos, fotosíntesis, concentración nutrimental.

SUMMARY

The iron (Fe) chlorosis is an abiotic stress mainly found in crops growing on calcareous or alkaline soils, and the degree of morphological and physiological alteration deepens on genotype tolerance to Fe deficiency. In tolerant and susceptible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes to iron deficiency some morphological and physiological changes (SPAD readings, net photosynthesis, nutrient concentration) in leaves were detected when plants were exposed to Fe deficiency in order to identify the gradual response of both bean genotypes. In the chlorotic leaf of the tolerant genotype the structure of mesophyll was organized but with the spongy parenchyma more compacted and less and smaller chloroplasts than in the green leaf. In the chlorotic leaf of the susceptible line the mesophyll structure was disorganized, with irregular cells in form and size and resembling absence of chloroplasts. In chlorotic leaves of both genotypes, there was a small development of thylakoids and therefore there was no formation of grana. Independently of Fe supply and pH media the tolerant Fe chlorosis genotype showed higher SPAD readings and photosynthetic rate than the susceptible genotype. Higher net photosynthesis was reached with 0.5 and 2 mg L⁻¹ of Fe with the tolerant genotype (12.33 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and susceptible (10.62 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ CO}_2$), respectively. The tolerant genotype presented higher concentration in leaf of K and the susceptible genotype showed higher concentration of Ca, Cu, and Zn. The Fe concentration showed an increase as Fe increased in the nutrient

¹ Colegio de Postgraduados, ³ División de Genética, Campus Montecillo. 56230 Montecillo, estado de México.

² Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. 56230 Chapingo, estado de México.

* Autor responsable (ranferimt@yahoo.com.mx)

Recibido: septiembre de 2009. Aceptado: septiembre de 2011.

Publicado en Terra Latinoamericana 29: 267-276.

solution and it decreased with pH 8.5, and Cu and Zn concentration also decreased.

Index words: *Phaseolus vulgaris*, *iron deficiency*, *chloroplasts*, *photosynthesis*, *nutritional concentration*.

INTRODUCCIÓN

El hierro está presente en todos los suelos, sin embargo, el Fe disponible para las plantas es extremadamente bajo debido a la escasa solubilidad de los óxidos-Fe(III) en condiciones aeróbicas (Schmidt, 2003), lo que origina una disminución significativa del rendimiento y calidad de las cosechas. El Fe es un elemento esencial para el funcionamiento de diversos procesos metabólicos y enzimáticos relacionados con el transporte de electrones, fijación de N, síntesis de ADN, clorofila y hormonas, es constituyente de hemoproteínas (citocromos, catalasa y peroxidasa) (Lobreaux y Briat, 1997). El crecimiento de las plantas con baja disponibilidad de Fe tiene importancia económica, dado que disminuye de manera significativa el rendimiento y calidad de las cosechas (Álvarez-Fernández *et al.*, 2007) aunado a que las medidas correctivas que llevan a cabo los agricultores para prevenir o controlar la clorosis por deficiencia de Fe representan una proporción sustancial de los costos de producción total (Abadía *et al.*, 2004; Rombolà y Tagliavini, 2007). La deficiencia de Fe altera la morfología y fisiología de las hojas (Bertamini y Nedunchezian, 2005), consistentes en una disminución del número de células por unidad de superficie y desorganización en la estructura del cloroplasto, sin afectar el crecimiento de las hojas (Terry y Abadía, 1986). Cuando el estrés es severo, disminuye drásticamente la actividad fotosintética (Larbi *et al.*, 2006), se detiene la división celular en los meristemas y se inhibe la producción de primordios foliares en los ápices del brote y con ello el crecimiento foliar (Römelde y Maschner, 1991, 1988). A nivel ultraestructural, se hace evidente la inadecuada formación de las membranas de los tilacoides (Platt-Aloia *et al.*, 1983). El descenso en la concentración de clorofila está asociado con la disminución de proteínas, ya que ambas se unen mediante un enlace no covalente, para formar un complejo pigmento-proteínico que constituye la membrana de los tilacoides (Fodor *et al.*, 1995). En diversas investigaciones relativas a parámetros fisiológicos en hojas Fe-deficientes se menciona que aún es escasa

la información referente a los cambios que ocurren tanto en la estructura interna como en la superficie de las hojas afectadas por este estrés abiótico (Fernández *et al.*, 2008). Dichos cambios pueden ser típicos de cada especie de cultivo, en hojas de limón mexicano deficientes en Fe, en los cloroplastos los tilacoides se apilan de manera desordenada, con escaso desarrollo del grana; además, se afecta el grosor de los parénquimas de empalizada y esponjoso por cambios en las dimensiones de las células (Maldonado-Torres *et al.*, 2006). Hojas de pera y durazno Fe-deficientes no muestran cambios aparentes en cuanto al grosor (Morales *et al.*, 1998), pero disminuye el tamaño y el peso de materia fresca y el diámetro promedio de los poros estomatales, sin afectar la densidad estomatal (Fernández *et al.*, 2008). Para el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), no se han reportado investigaciones de este tipo, siendo necesario caracterizar y entender las alteraciones que pueden presentar los cultivares sensibles a deficiencias de Fe, como una oportunidad de generar tecnologías de corrección. El objetivo de la presente investigación fue determinar cambios anatómicos y fisiológicos en hojas jóvenes de frijol de genotipos tolerante y susceptible a clorosis férrica en plantas expuestas a deficiencia de Fe combinadas con bajo y alto pH en el medio de crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plantas de frijol de una línea tolerante (496) y una susceptible (33) a deficiencia de hierro; ambas derivadas de familias F3 e incrementadas siete generaciones, provenientes de la cruce de progenitores AC1028xPinto Sierra, susceptible y tolerante a la sequía, respectivamente (Ramírez y Nelly, 1998), adaptadas a los Valles Altos y seleccionadas a partir de 1992 por el Programa de Frijol de la Especialidad de Genética del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, en el Colegio de Posgraduados, México. Cuando las semillas, previamente germinadas, presentaron el primer par de hojas simples se trasplantaron en recipientes para ser nutridas con una solución preparada de macronutrientes (meq L^{-1}) (7 K^+ , 9 Ca^{+2} , 4 Mg^{+2} , 12 NO_3^- , $1 \text{ H}_2\text{PO}_4^-$, 7 SO_4^{-2} , y micronutrientes (mg L^{-1}) (0.62 Mn , 0.44 B , 0.11 Zn , 0.020 Cu y 0.48 Mo), sugeridas por Steiner (1984). El experimento se estableció en un invernadero con luz natural, con los factores de estudio: i) líneas de frijol (a) tolerante (496) y (b) susceptible (33), ii) tres niveles de Fe-EDTA (0, 0.5 y 2 mg L^{-1}) en la solución

indicada anteriormente y iii) dos condiciones de pH (6.0 y 8.5). Los doce tratamientos se distribuyeron completamente al azar con cuatro repeticiones, donde la unidad experimental fue un recipiente de 1.5 L con dos plántulas. La solución nutritiva se aireó cada 2 h durante 15 minutos, el pH se ajustó cada tres días de acuerdo al tratamiento y se cambió semanalmente. Las plantas desarrollaron durante cuatro semanas y al final se colectó la hoja trifoliada completamente expandida y más joven y se realizaron las siguientes determinaciones:

Estructura del Mesófilo y Anatomía del Cloroplasto

La anatomía del mesófilo se observó en el foliolo central de hojas trifoliadas jóvenes de la línea tolerante desarrollada con 2 mg L⁻¹ de Fe y pH 6, como testigo, y de las dos líneas desarrolladas sin Fe, como tratamientos contrastantes. Para la preparación de las muestras se siguió la metodología descrita por Maldonado-Torres *et al.* (2006).

Contenido de Clorofila y Capacidad Fotosintética

Como una medida indirecta de la concentración de clorofila, se realizaron lecturas SPAD en las hojas jóvenes recientemente desarrolladas en cada unidad experimental. La tasa fotosintética se cuantificó por medio de un sistema portátil de análisis de gases (IRGA) LI-6200, LI-COR, Lincoln. De cada planta se seleccionó una hoja recientemente madura y sana. Las evaluaciones se hicieron diariamente de las 11:00 a las 12:00 h.

Concentración Nutricional y Materia Seca

A las hojas jóvenes colectadas se les determinó la concentración de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn, para lo cual las muestras vegetales fueron digeridas con una mezcla de ácido nítrico y perclórico en proporción 2:1. Las lecturas se obtuvieron por espectrofotometría AES-ICP, en un equipo Varian, Liberty II. Para la determinación de N total, el material se digirió con una mezcla de ácido sulfúrico y ácido salicílico; posteriormente se destiló por arrastre de vapor (Bremner, 1965). La materia seca producida se determinó en el vástago de las plantas, las cuales se colocaron en una estufa con circulación de aire forzado a 70 °C durante 48 h.

Los datos de las variables consideradas fueron sometidos a un análisis de varianza de los efectos

factoriales y pruebas de comparación de medias (Tukey $P \leq 0.05$) con el programa estadístico SAS 9.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estructura Interna de Hojas Afectadas por Clorosis Férrica

En las micrografías electrónicas de los cloroplastos, que se presenta en la Figura 1, se observan las variaciones en la estructura del mesófilo de la hoja normal (A) y la clorótica (E) de la línea de frijol tolerante y la susceptible (I). En el corte transversal de la hoja verde (B) y su inverso (C) se observa un parénquima de empalizada y esponjoso bien organizados, con abundantes y bien estructurados cloroplastos. En la estructura interna de estos cloroplastos (D) se aprecia un sistema de tilacoides (t) estrechamente apretados en pilas, en forma de discos llamado grana (g) y los tilacoides (te) atraviesan el estroma (e) interconectándolos. En la hoja clorótica la sección transversal de la línea de frijol tolerante (F) y su inverso (G) muestran un mesófilo organizado pero el parénquima esponjoso más compactado y con menos espacios intercelulares que en la hoja verde, con escasos cloroplastos, de menor tamaño. En la hoja de la línea de frijol susceptible afectada por clorosis (J) y su inverso (K), el mesófilo se muestra desorganizado, con células de forma y tamaño irregular y con una aparente ausencia de cloroplastos. Estudios realizados por Terry y Abadía (1986) en plantas de remolacha con moderada clorosis férrica revelaron que la disminución de la actividad fotoquímica era debida a la reducción del número de unidades fotosintéticas por superficie de área foliar. En las hojas cloróticas de las dos líneas de frijol, el grado de desarrollo de los tilacoides fue escaso (H) y su inverso (L) y como consecuencia no hubo formación de grana. En hojas de remolacha azucarera se encontró que la falta de Fe provocaba una ruptura y deformación de las membranas del tilacoide, pobre orientación laminar, muy poco o nada de grana, pero un gran estroma (Platt-Aloia *et al.*, 1983). La alta sensibilidad de los cloroplastos a la deficiencia de Fe y en particular de los tilacoides, se debe al alto requerimiento de Fe para el transporte de electrones en los fotosistemas, la ferredoxina y la biosíntesis de clorofila (Abadía *et al.*, 2004).

El grosor de las hojas verdes y cloróticas de la línea de frijol tolerante fue de 0.15 y 0.14 mm, respectivamente, mientras que el de la línea susceptible

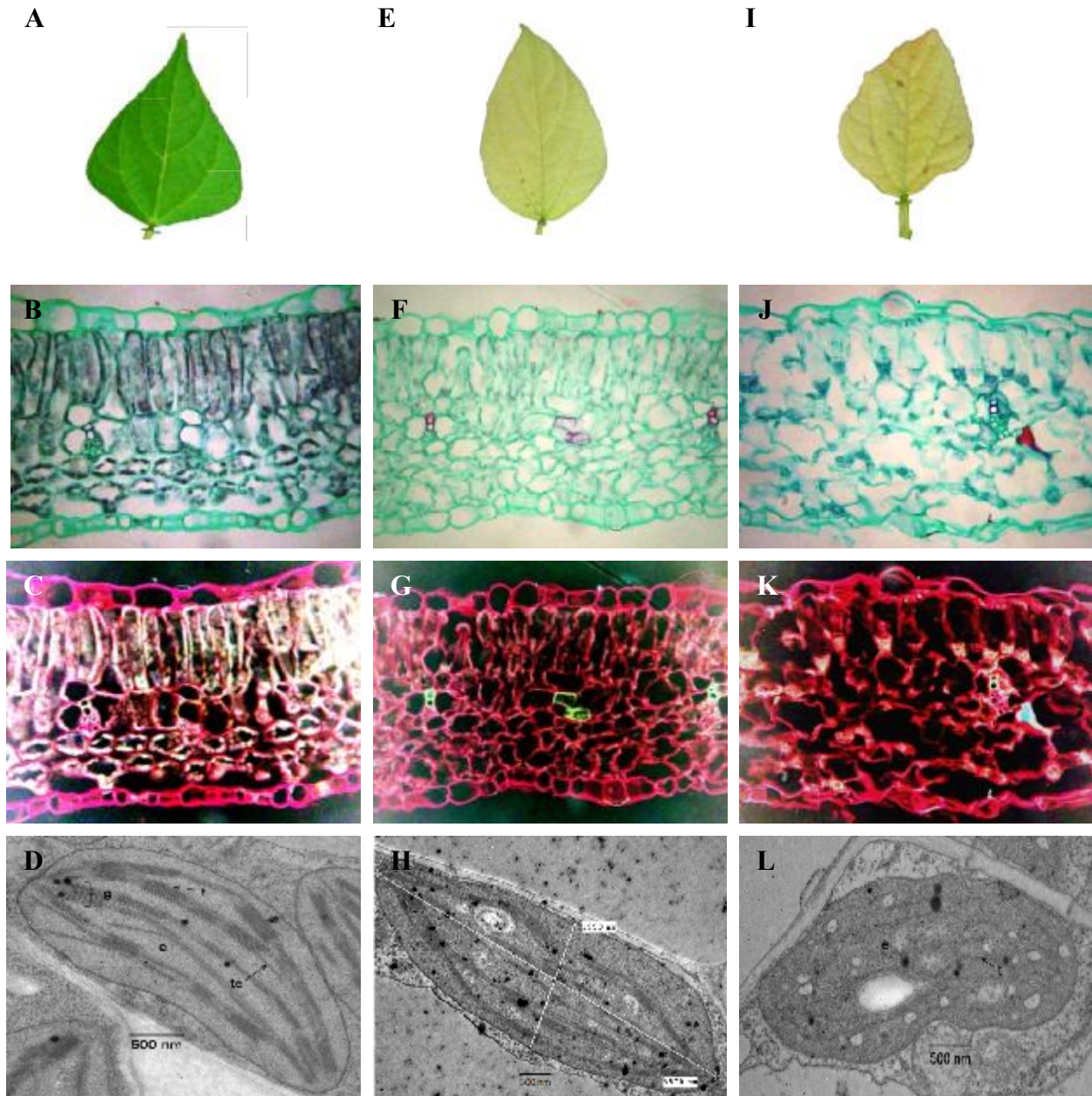


Figura 1. Apariencia de la estructura interna y ultracelular de hojas verdes y cloróticas de líneas de frijol tolerante y susceptible a clorosis férrica. Aspecto de la hoja verde de la línea tolerante (A, B, C, D), con 2 mg L⁻¹ de Fe en la solución, y hojas cloróticas de la línea tolerante (E, F, G, H) y susceptible (I, J, K, L) desarrolladas sin Fe. Sección transversal (B, F, J) e imagen inversa de la sección transversal (C, G, K) observadas en el microscopio compuesto y micrografías electrónicas de transmisión de la estructura de los cloroplastos (D, H, L).

fue mayor (0.19 mm), probablemente por la mayor desorganización que se observó en la estructura interna y no por aumento en grosor de los parénquimas. Diferentes investigaciones indican que esta alteración puede variar según el cultivo, hojas de pera y durazno, con suficiencia y deficiencia de Fe no mostraron diferencias significativas en el grosor de hojas (Morales

et al., 1998) o del mesófilo (Fernández *et al.*, 2008), pero sí en la estructura interna. En hojas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) con deficiencia de Fe, aumenta el grosor del mesófilo debido a un incremento en longitud y grosor de las células de parénquima en palizada y esponjoso, además de presentarse cambios a nivel celular y ultracelular (Maldonado-Torres *et al.*, 2006).

La deficiencia de Fe afectó significativamente el tamaño de los cloroplastos de las dos líneas de frijol cuando la solución nutritiva estuvo carente de Fe, con respecto a los cloroplastos del tratamiento con 2 mg L⁻¹ de Fe (Figura 2). El mayor efecto de la deficiencia de Fe ocurre en el tamaño de los cloroplastos y el contenido protéico de los mismos que en el número de células por unidad de área o el número de cloroplastos por célula. Aunque con deficiencia severa se inhibe la división celular y se reduce el crecimiento foliar (Terry y Abadía, 1986; Abadía *et al.*, 2004).

Lecturas SPAD y Capacidad Fotosintética

En el Cuadro 1 se muestran lecturas SPAD de hojas de líneas de frijol desarrolladas en soluciones con diferentes suministros de Fe y ajuste de pH. Los valores de las lecturas SPAD del genotipo tolerante fueron significativamente superiores (22.28) contra la susceptible (14.69). En ambas líneas las mayores lecturas SPAD se presentaron con un suministro de 2 mg L⁻¹ de Fe en la solución y pH 6.0, mientras que, las más bajas sin suministro de Fe y con pH 8.5. Es conocido que la clorosis férrica puede ser causada por ausencia o suministro subóptimo de Fe (Abadía *et al.* 2004), o por condiciones de pH alcalino donde la disponibilidad de Fe es baja (Álvarez-Fernández *et al.*, 2007).

La línea tolerante y susceptible presentaron las mayores lecturas SPAD (36.27 y 27.75, respectivamente) cuando desarrollaron en una solución nutritiva con un suministro de 2 mg L⁻¹ de Fe y éstas,

Cuadro 1. Efecto de la concentración de suministro de Fe y valor del pH en la solución nutritiva en las lecturas SPAD de hojas jóvenes de frijol provenientes del genotipo tolerante y susceptible a clorosis férrica.

Genotipo	pH	Suministro de Fe mg L ⁻¹	Lecturas SPAD [†]
Tolerante			22.28 a
Susceptible			14.69 b
	6		2.42 [‡]
	8.5		20.45 a
			16.52 b
			2.42 [‡]
Tolerante		2	36.27 a
Tolerante		0.5	28.18 b
Tolerante		0	2.46 d
Susceptible		2	27.75 b
Susceptible		0.5	15.36 c
Susceptible		0	0.96 d
			6.21 [‡]

[†] Medias con la misma letra, dentro de la columna y factor, son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). [‡] DMS = diferencia mínima significativa.

fueron estadísticamente iguales cuando la línea tolerante creció con 0.5 mg L⁻¹ (28.18) de Fe y la susceptible con 2 mg L⁻¹ de Fe (27.75). Estos resultados indican que la línea susceptible es menos eficaz en la utilización del Fe. Campbell y Nishio (2000) en plantas de remolacha susceptibles a deficiencia de Fe, también encontraron que la concentración de clorofila en la hoja disminuyó en mayor grado que en plantas tolerantes. Por otra parte,

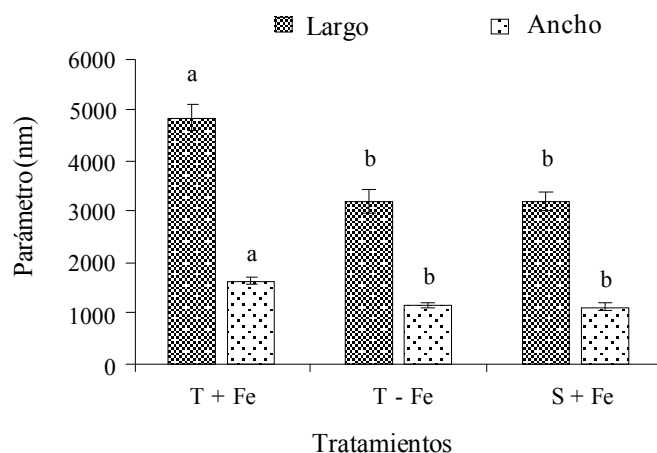


Figura 2. Largo y ancho de los cloroplastos de líneas de frijol tolerante (T) y susceptible (S) desarrolladas en solución nutritiva sin hierro (-Fe) y con 2 mg L⁻¹ de hierro (+Fe). Los valores representan la media ± error estándar (n = 15). Letras iguales sobre las barras de cada parámetro son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

los síntomas de clorosis fueron muy pronunciados en ambas líneas y con las más bajas lecturas SPAD cuando no se suministró Fe, debido a que la deficiencia de Fe disminuye la concentración de pigmentos fotosintéticos (Ksouri *et al.*, 2006). Aun cuando el Fe no forma parte de la molécula de clorofila, se considera esencial para su síntesis al formar parte de la protoclorofila (Abadía *et al.*, 2004), por lo que, un inadecuado abastecimiento de Fe afecta de forma severa la biosíntesis y el mantenimiento de los niveles de clorofila. En hojas deficientes de Fe, declinan en el mismo grado los contenidos de clorofila y β -caroteno, mientras que ciertas xantofilas pueden aumentar (Morales *et al.*, 1990). Este cambio en la composición de los pigmentos de los cloroplastos está probablemente relacionado con los cambios estructurales ya que la mayoría de las xantofilas están localizadas en la envoltura del cloroplasto y no en los tilacoides (Abadía *et al.*, 2004). El descenso en la concentración de clorofila está también asociado con la disminución de proteínas, ya que ambas se unen mediante un enlace no covalente, para formar un complejo pigmento-proteínico que constituye la membrana de los tilacoides (Fodor *et al.*, 1995).

El efecto de las concentraciones de Fe y pH de la solución nutritiva en la tasa fotosintética de hojas de frijol se muestra en la Figura 3. En los tratamientos con 0.5 y 2 mg L⁻¹ de Fe, la asimilación de CO₂ fue estadísticamente igual, pero significativamente mayor que en el tratamiento sin Fe. Las deficiencias extremas de Fe provocan reducción en el tamaño del follaje, en la capacidad de fijación y reducción de CO₂ y disminución en la velocidad de transporte de electrones (Terry

y Abadía, 1986). Römheld y Marschner (1991) indican que la falta de Fe en el follaje disminuye la estabilidad de la membrana de los tilacoides, acompañada de un decrecimiento en la cantidad de pigmentos, tales como clorofila a, b y carotenoides, así como una reducción en la actividad de los fotosistemas, generando un descenso significativo de la fotosíntesis neta. Una baja en la concentración de clorofila no sólo tiene repercusión en la capacidad fotosintética sino también en una mayor absorción de luz por la clorofila, la cual podría foto-inhibir procesos y foto-oxidar compuestos (Álvarez-Fernández *et al.*, 2007).

En las plantas que crecieron en solución nutritiva con pH 8.5 se observó una disminución significativa de la fijación de CO₂ con respecto a las que crecieron en pH 6 (Figura 3b). En condiciones de pH alcalino, los cultivos presentan problemas de clorosis férrica, no por escasez de Fe total, sino debido a una deficiente disponibilidad de este elemento provocada por la disminución de su solubilidad, inhibiendo en la planta tanto su absorción como incorporación en los procesos metabólicos (Abadía *et al.*, 2004). Por otra parte, la redistribución de Fe en la parte aérea puede ser fuertemente disminuida en suelos con altas concentraciones de HCO₃⁻ debido a que estos aniones originan un incremento en el pH (6.2-7.0) del apoplasto de la hoja (Loeppert, 1986).

Las interacciones Fe por línea y Fe por pH en la fijación de CO₂ en hojas jóvenes de frijol se presentan en el Cuadro 2. Los valores más altos de fotosíntesis en las dos líneas de frijol se obtuvieron cuando se agregaron 2 mg L⁻¹ (10.62 μ mol CO₂ m⁻² s⁻¹) y 0.5 mg L⁻¹

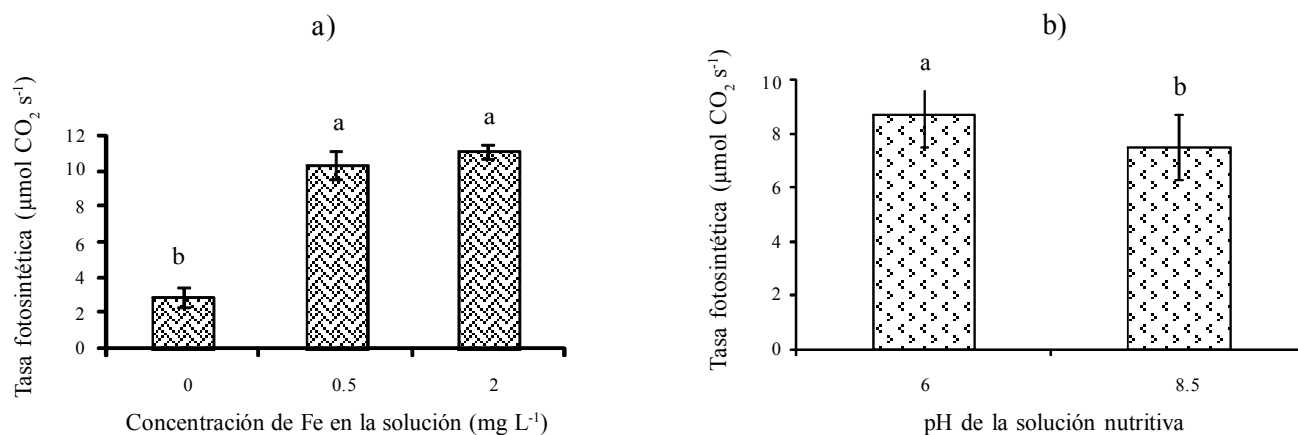


Figura 3. Efecto del nivel de suministro de Fe (a) y pH (b) de la solución nutritiva en la tasa fotosintética de hojas jóvenes de frijol. Los valores representan las medias $\pm$ error estándar ($n = 9, 8$ y 9 para $0, 0.5$ y 2 mg L⁻¹ de Fe, respectivamente; $n = 12$ y 14 para pH 6 y 8.5 , respectivamente). Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Efecto del suministro de Fe, la línea de frijol y el pH de la solución sobre la tasa fotosintética.

Suministro Fe [†]	Línea	Tasa fotosintética ^{††}	Suministro Fe	pH	Tasa fotosintética ^{††}
mg L ⁻¹		μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹	mg L ⁻¹		μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹
2	Tolerante	11.80 a	2	6	11.58 a
2	Susceptible	10.62 ab	2	8.5	10.79 a
0.5	Tolerante	12.33 a	0.5	6	10.69 a
0.5	Susceptible	8.42 b	0.5	8.5	10.05 a
0	Tolerante	2.45 c	0	6	3.85 b
0	Susceptible	3.56 c	0	8.5	2.22 b

[†] Concentración de Fe (mg L⁻¹) en la solución. ^{††}Medias con la misma letra, dentro de las columnas, son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

(12.33 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) de Fe en la solución nutritiva en la línea susceptible y tolerante, respectivamente, valores que fueron estadísticamente distintos entre líneas, lo cual es indicador de la diferencia entre éstas en la capacidad de utilización de Fe. Sin suministro de Fe, la fotosíntesis neta de ambas líneas se afectó severamente. Un estudio relacionado con el proceso de reverdecimiento de hojas severamente cloróticas mostró (Morales *et al.*, 1990) que la actividad fotosintética tiene una fuerte interrelación con la concentración de clorofila debido a que la deficiencia de Fe de la hoja afecta principalmente la fisiología de los cloroplastos.

El pH alcalino (8.5) no afectó la fotosíntesis neta de plantas que tuvieron Fe en el medio, de modo que estos datos fueron estadísticamente iguales a los de plantas desarrolladas con Fe y pH 6; sin embargo, sin suministro de Fe, la tasa fotosintética disminuyó significativamente, independiente del pH de la solución, lo cual era de esperarse pues aún con pH 6 no hubo Fe disponible.

Esto es lo que podría limitar la fotosíntesis y explicar, en parte, la menor tasa de fijación de CO₂ por unidad de clorofila en hojas Fe-deficientes comparadas con hojas Fe-suficientes (Sharma y Sanwal, 1992). En general, algunos autores Römheld y Marschner (1986), Abadía *et al.* (2004) y Jolley *et al.* (2004) e indican que la baja tasa fotosintética por la falta de Fe en la solución en ambas líneas de frijol, se puede atribuir a los bajos contenidos de almidón y azúcares, provocado por el deterioro del transporte fotosintético de electrones, al bajo contenido de clorofila y ferredoxina, y la baja regeneración de ferredoxina reducida. Adicionalmente, la lenta regeneración del bisfosfato de ribulosa, que actúa como sustrato para el CO₂ en el ciclo de Calvin, contribuye al bajo contenido de carbohidratos.

Concentraciones Nutrimientales y Materia Seca

Concentraciones nutrimentales en hojas jóvenes de frijol por línea, nivel de suministro de Fe y pH se muestran en el Cuadro 3. La comparación de medias entre líneas muestra que el frijol tolerante tuvo mayor concentración de K, mientras que la susceptible mayor concentración de Ca, Cu y Zn. La mayor concentración de K puede atribuirse a que este elemento está involucrado en la función de dos enzimas asociadas con la actividad de respuesta al estrés por Fe, la ATPasa y la Fe³⁺-reductasa. Además con el simporte de H⁺ y con la acumulación de citrato para el transporte de Fe (Marschner *et al.*, 1986) que presentan los fenotipos Fe-eficientes. Tagliavini y Rombolà (2001) hipotetizaron que la actividad y regulación de la ATPasa del plasmalema podría proveer niveles de pH apoplástico favorables y mejorar así la actividad Fe³⁺-reductasa.

Shmidt (2003) y Álvarez-Fernández *et al.* (2007) mostraron que las hojas afectadas por clorosis férrica no modifican su concentración de Ca, sino más bien incrementan la absorción y acumulación de K. En cuanto a los micronutrientes, se han listado interacciones importantes como un mecanismo de respuesta al estrés por Fe, especialmente la interacción con Zn (Jolley *et al.*, 2004). Bajo deficiencia de Zn, una variedad de frijol (*Phaseolus vulgaris*) Zn-ineficiente activó dos de los tres mecanismos de respuesta al estrés por Fe e incrementó la absorción de Fe, acentuando más la deficiencia de Zn; mientras que la variedad Zn-eficiente minimizó la absorción de Fe, disminuyendo su actividad Fe³⁺-reductasa, para prevenir de esta manera un desbalance Zn/Fe (Jolley y Brown, 1991). Un comportamiento similar ocurrió en frijol deficiente en Fe,

Cuadro 3. Efecto del genotipo de frijol, suministro de Fe y pH de la solución nutritiva en la concentración nutrimental en hojas jóvenes.

Factor línea		N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
		----- g kg ⁻¹ -----					----- mg kg ⁻¹ -----			
Tolerante		37.5 a [†]	5.8 a	27.9 a	12.4 b	4.5 a	117.4 a	203.0 a	14.9 b	66.8 b
Susceptible		40.1 a	5.4 a	24.3 b	15.9 a	5.1 a	134.4 a	223.9 a	19.4 a	76.2 a
DMS [‡]		3.0	0.8	3.4	2.5	0.7	29.4	49.7	2.7	8.6
Fe mg L ⁻¹	0	45.4 a	8.1 a	37.3 a	16.7 a	5.8 a	95.4 b	432.8 a	32.0 a	103.4 a
	0.5	37.9 b	4.3 b	19.7 b	12.8 b	4.5 b	134.5 ab	111.4 b	10.5 b	55.14 b
	2	33.2 c	4.4 b	21.4 b	12.9 b	4.1 b	147.7 a	96.2 b	9.1 b	56.0 b
DMS		4.5	1.2	4.9	3.7	1.0	43.3	73.40	4.0	12.7
pH	6	38.8 a	5.5 a	26.2 a	14.3 a	4.6 a	142.1 a	192.8 a	19.3 a	76.1 a
	8.5	38.8 a	5.7 a	26.0 a	14.1 a	5.0 a	109.6 b	234.2 a	15.0 b	67.0 b
DMS		3.0	0.8	3.4	2.5	0.7	29.4	49.7	2.7	8.6

[†] Medias con la misma letra, dentro de la columna para cada factor, son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). [‡] DMS: diferencia mínima significativa.

donde la concentración de Zn, Mn y Cu de la línea tolerante fue menor y estadísticamente diferente a la concentración de la línea susceptible. Sin embargo, en condiciones normales un exceso de Cu en tabaco provocó una severa clorosis férrica, debido a una distribución anormal de Fe, con tres veces más Fe en las raíces de plantas ricas en Cu que en plantas normales en Cu (Kobayashi *et al.*, 2003).

La deficiencia de Fe extrema provocó significativamente mayores concentraciones de N, P, K, Ca, Mg, Mn, Cu y Zn, debido a una disminución importante de la biomasa. En los tratamientos con 0.5 y 2 me L⁻¹ de Fe, la concentración de Fe foliar mostró un incremento conforme aumentó la concentración del mismo en la solución. La deficiencia de Fe estimula la acumulación de K (Shmidt, 2003; Maldonado-Torres *et al.*, 2006), Mg (Álvarez-Fernández *et al.*, 2007), Mn (Alam *et al.*, 2001), Cu y Zn (Jolley *et al.*, 2004) en hojas jóvenes, por su efecto catiónico. La mayor concentración de N en plantas que crecieron sin Fe pudo ser consecuencia de una menor producción de materia seca. La movilización y absorción de Mn puede incrementarse con la deficiencia de Fe en dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas usando la Estrategia I (Alam *et al.*, 2001).

Las concentraciones de N, P, K, Ca, Mg y Mn no fueron afectadas por el pH de la solución, en tanto que las concentraciones de Fe, Cu y Zn disminuyeron significativamente a pH 8.5, con respecto al pH 6. El pH de la solución nutritiva tuvo una función importante en la absorción de nutrimentos ya que afecta las reacciones de disociación, complejación y precipitación.

Estas reacciones químicas impactan significativamente la especiación y disponibilidad de los metales (Steiner, 1984).

En el Cuadro 4 se muestra la interacción de líneas por Fe en la concentración de nutrimentos en las hojas. La adición de Fe a la solución no provocó diferencias significativas en la concentración de P, K, Mn, Cu y Zn en las dos líneas, pero cuando no se agregó Fe, la concentración de estos elementos se incrementó y fue significativamente diferente. Estos resultados coinciden parcialmente con otros estudios como el de Jolley *et al.* (2004), quienes encontraron en hojas cloróticas de *Prunus persica* mayor concentración de N, K, Ca, Mg y Mn que en hojas verdes. En otro experimento similar se obtuvieron incrementos de N, P, K y Mg, mientras que las concentraciones de Ca, Zn, Mn y Fe disminuyeron (Rombolá y Tagliavini, 2007). Por su parte, Abadía *et al.* (1989) no encontraron diferencias en los niveles de P, Mg, Na, Fe, Mn, Cu y Zn, en hojas de peral Fe-deficientes y normales. Por lo anterior, es claro que el efecto de la clorosis férrica en la composición mineral de las hojas difiere con la especie, el cultivar y las condiciones de desarrollo del cultivo (Morales *et al.*, 1998).

La acumulación de materia seca del vástago de ambas líneas (Cuadro 4) fue afectada significativamente cuando las plantas crecieron sin Fe, mientras que no hubo diferencia significativa entre líneas de frijol cuando éstas desarrollaron a la misma concentración de Fe (0, 0.5 o 2 mg L⁻¹) en la solución. En promedio, la línea tolerante produjo 75.9% más materia seca y la susceptible 81.5%, cuando se les suministró 2 mg L⁻¹

Cuadro 4. Efecto del genotipo de frijol y suministro de Fe en la acumulación de materia seca del vástago y contenido nutrimental en hojas jóvenes.

Fe	Línea [†]	Materia seca	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn
mg L ⁻¹		g planta ⁻¹	mg planta ⁻¹								
0	T	1.5 b	66.9 a	12.0 a	57.3 a	21.2 ab	8.4 a	0.146 a	0.616 a	0.039 b	0.142 a
0	S	1.2 b	55.4 a	9.7 a	43.7 a	23.0 ab	7.3 a	0.112 a	0.546 a	0.046 a	0.135 a
0.5	T	7.1 a	257.7 bc	32.7 b	151.2 b	84.5 b	30.5 ab	0.806 a	0.792 b	0.071 c	0.366 b
0.5	S	6.8 a	269.3 ab	27.2 b	122.4 b	93.8 ab	32.0 ab	1.057 a	0.757 b	0.074 c	0.399 b
2	T	6.8 a	216.2 c	32.6 b	165.2 b	74.8 b	25.2 b	0.962 a	0.592 b	0.062 c	0.370 b
2	S	7.0 a	242.2 bc	27.3 b	128.8 b	104.3 ab	30.8 ab	1.077 a	0.737 b	0.064 c	0.403 b

[†] T = tolerante; S = susceptible; ^{††} Medias con la misma letra, dentro de la columna, son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$).

de Fe en la solución, respecto a la acumulación de estas mismas sin adición de Fe. En general, los parámetros de crecimiento están negativamente correlacionados con el grado de clorosis por Fe. En un estudio con plantas de *Parietaria difusa* desarrolladas en solución nutritiva carente de Fe, se presentaron síntomas de clorosis y disminución del crecimiento (Dell'Orto *et al.*, 2003). En *Trifolium sp.* cultivado en suelo calcáreo, Wei *et al.* (1994) obtuvieron elevados coeficientes de correlación negativos entre el índice de clorosis y el peso de materia seca del brote, de la raíz, peso de la materia seca total y la relación peso seco de la raíz/peso seco de la parte aérea. Lo anterior debido a la participación del Fe en la síntesis de clorofila y en el funcionamiento de los sistemas captadores de energía luminosa, ligados con la fotosíntesis y la producción de materia seca.

CONCLUSIONES

- El suministro de (hierro) Fe y el pH de la solución nutritiva provocaron respuestas morfológicas, fisiológicas y nutrimentales diferentes en las hojas de los genotipos o líneas de frijol tolerante y susceptible a clorosis férrica. En ausencia de Fe, las hojas de la línea tolerante presentaron un mesófilo más organizado, un parénquima más compactado, menos espacios intercelulares, aunque, escasa cantidad de cloroplastos y de menor tamaño respecto de las hojas verdes sin clorosis férrica. Por su parte, en las hojas cloróticas de la línea susceptible, el mesófilo se mostró desorganizado, con células de forma y tamaño irregular y con aparente ausencia de cloroplastos. En ambas líneas se observó escaso desarrollo de los tilacoides y ausencia de grana. En cualquier condición de los factores de suministro de Fe y pH del medio, la línea tolerante presentó

concentraciones de clorofila más altas que la línea susceptible con excepción al nulo abastecimiento de Fe. El nivel de suministro de Fe de 2 mg L⁻¹ en la solución nutritiva y el pH de 6 promovieron la mayor concentración de clorofila en ambas líneas, mientras que en ausencia de Fe y con pH 8.5 en el medio, se provocó el mayor grado de clorosis, evidenciado al presentar las lecturas SPAD más bajas.

- La tasa fotosintética fue función de la línea de frijol y del suministro de Fe pero no del pH del medio. La línea tolerante presentó mayor tasa fotosintética con menos suministro de Fe (12.33 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ y 0.5 mg L⁻¹ de Fe) que la línea susceptible (10.62 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ y 2.0 mg L⁻¹ de Fe). En ambos casos la capacidad fotosintética fue severamente afectada en ausencia de Fe en la solución.

- La composición nutrimental foliar promedio en la línea tolerante, presentó significativamente mayor concentración de K en tanto que la susceptible mayor de Ca, Cu y Zn. La concentración de Fe en la hoja en ambas líneas se incrementó conforme aumentó el suministro de Fe y disminuyó a pH de 8.5, así como la de Cu y Zn.

- En el período evaluado, la producción de materia seca del vástago de ambas líneas de frijol fue afectada significativamente cuando las plantas desarrollaron en ausencia de Fe independientemente del pH en la solución nutritiva.

LITERATURA CITADA

Abadía, J., A. Álvarez-Fernández, A. D. Rombolà, M. Sanz, M. Tagliavini, and A. Abadía. 2004. Technologies for the diagnosis and remediation of Fe deficiency. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 965-971.

- Abadía, A., M. Sanz, J. de las Rivas, and J. Abadía. 1989. Photosynthetic pigments and mineral composition of iron deficient pear leaves. *J. Plant Nutr.* 12: 827-838.
- Alam, S., S. Kamei, and S. Kawai. 2001. Response of iron-deficient barley plants to manganese in nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 24: 147-158.
- Álvarez-Fernández, A., J. Abadía, and A. Abadía. 2007. Iron deficiency, fruit yield and fruit quality. pp: 85-101. *In: L. L. Barton, J. Abadía (eds.). Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms.* Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Bertamini, M. and N. Nedunchezian. 2005. Grapevine growth and physiological responses to iron deficiency. *J. Plant Nutr.* 28: 737-749.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. pp: 595-622. *In: C Black (ed.). Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9.* Madison, WI, USA.
- Campbell, S. A. and J. N. Nishio. 2000. Iron deficiency studies of sugar beet using an improved sodium bicarbonate-buffered hydroponic growth system. *J. Plant Nutr.* 23: 741-757.
- Dell'Orto, M., P. de Nisi, A. Pontiggia, and G. Zocchi. 2003. Fe deficiency response in *Parietaria diffusa*: a calcicole plant. *J. Plant Nutr.* 26: 257-268.
- Fernández, V., T. Eichert, V. Del Río, G. López, J. A. Heredia G., A. Abadía, A. Heredia, and A. Abadía. 2008. Leaf structural changes associated with iron deficiency chlorosis in field-grown pear and peach: physiological implications. *Plant Soil* 311: 161-172.
- Fodor, F., B. Böddi, E. Sárvári, G. Záray, E. Cseh, and F. Láng. 1995. Correlation of iron content, spectral forms of chlorophyll and chlorophyll-proteins in iron deficient cucumber (*Cucumis sativus*). *Physiol. Plant.* 93: 750-756.
- Jolley, V. D. and J. C. Brown. 1991. Factors in iron-stress response mechanism enhanced by Zn-deficiency stress in Sanilac, but not Saginaw navy bean. *J. Plant Nutr.* 14: 257-265.
- Jolley, V. D., N. C. Hansen, and A. K. Shiffler. 2004. Nutritional and management related interaction with iron deficiency stress response mechanisms. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 973-981.
- Kobayashi, T., T. Yoshimura, T. Jiang, F. Goto, H. Nakanishi, S. Mori, and N. Nishizawa. 2003. Combined deficiency of iron and other divalent cations mitigates the symptoms of iron deficiency in tobacco plants. *Physiol. Plant.* 119: 400-408.
- Larbi, A., A. Abadía, J., Abadía, and F. Morales. 2006. Down co-regulation of light absorption, photochemistry, and carboxylation in Fe-deficient plants growing in different environments. *Photosynth. Res.* 89: 113-126.
- Lobreaux, S. and J. F. Briat. 1991. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem. J.* 274: 601-606.
- Loeppert, R. H. 1986. Reactions of iron and carbonates in calcareous soils. *J. Plant Nutr.* 9: 195-214.
- Maldonado-Torres, R., J. D. Etchevers B., G. Alcántar G., J. Rodríguez A., and M. T. Colinas L. 2006. Morphological changes in leaves of Mexican lime affected by iron chlorosis. *J. Plant Nutr.* 29: 615-628.
- Marschner, H., V. Römheld, and M. Kissel. 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9: 695-713.
- Morales, F., A. Abadía, and J. Abadía. 1990. Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 94: 607-613.
- Morales, F., R. Grasa, A. Abadía, and J. Abadía. 1998. Iron chlorosis paradox in fruit trees. *J. Plant Nutr.* 21: 815-825.
- Platt-Aloia, K. A., W. W. Thomson, and N. Terry. 1983. Changes in plastid ultrastructure during iron mediated-chloroplast development. *Protoplasma* 114: 85-92.
- Ramírez V., P. and J. D. Kelly. 1998. Traits related to drought resistance in common bean. *Euphytica* 99: 127-136.
- Rombolà, A. D. and M. Tagliavini. 2007. Iron nutrition of fruit tree crops. pp: 61-83. *In: L. L. Barton and J. Abadía (eds.). Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms.* Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Romera, F. J., E. Alcántara, and M. D. De la Guardia. 1992. Effect of bicarbonate, phosphate and high pH on the reducing capacity of the Fe-deficient sunflower and cucumber plants. *J. Plant Nutr.* 15: 1519-1530.
- Römheld, V. and H. Marschner. 1991. Function of micronutrients in plant. pp: 297-328. *In: J. J. Mortvedt, F. R. Cox, L. Shuman, and R. M. Welch (eds.). Micronutrients in agriculture.* Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI, USA.
- Schmidt, W. 2003. Iron homeostasis in plants: sensing and signaling pathways. *J. Plant Nutr.* 26: 2211-2230.
- Sharma, S. and G. G. Sanwal. 1992. Effect of Fe deficiency on the photosynthetic system of maize. *J. Plant Physiol.* 140: 527-530.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. pp: 633-650. *In: International Society for Soilless Culture. Proceedings of 6th International Congress on Soilless Culture.* Wageningen, The Netherlands.
- Tagliavini, M. and A. D. Rombolà. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Eur. J. Agron.* 15: 71-92.
- Terry, N. and J. Abadía. 1986. Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr.* 9: 609-646.
- Wei, L. C., W. R. Ocumpaugh, and R. H. Loeppert. 1994. Differential effect of soil-temperature on iron-deficiency chlorosis in susceptible and resistant subclovers. *Crop Sci.* 34: 715-721.