



Universidad de Valladolid

Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

**Parámetros de eficiencia fotosintética al
final de la maduración como
indicadores del potencial enológico del
viñedo.**

Alumno: Luis Garrido Gómez

Tutora: María Rosa González García

Junio de 2016

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 La clorosis férrica.....	2
2.1.1. Síntomas.....	3
2.1.2. Causas de la clorosis férrica.....	3
2.1.3. Efectos de la clorosis férrica.....	4
2.1.4. Absorción y transporte del hierro	4
2.1.5. Corrección de la clorosis férrica.....	4
2.2. Fotosíntesis y fluorescencia clorofílica.....	5
2.3. Eficiencia fotosintética en viñedos afectados por clorosis férrica	6
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1. Descripción de la zona de estudio	7
4.2. Controles y observaciones	8
4.2.1. Determinación del nivel foliar de clorofila	8
4.2.2. Determinación de la actividad fotosintética	8
4.2.3. Estimación del rendimiento.....	9
4.2.4. Vigor del viñedo	9
4.3. Análisis de la composición de la uva.....	9
4.3.1. Composición del mosto	9
4.3.2. Parámetros de madurez fenólica.....	10
4.4. Análisis de datos.....	10
5. RESULTADOS	11
5.1. Contenido foliar de clorofila y actividad fotosintética	11
5.2. Relaciones entre la eficiencia fotosintética, y el rendimiento y vigor del viñedo	12
5.3. Relaciones entre la eficiencia fotosintética y la composición de la uva.....	14
6. CONCLUSIONES	17
7. BIBLIOGRAFÍA.....	18

1. RESUMEN

La actividad fotosintética es fundamental en el crecimiento y desarrollo de la vid, y de ella depende el grado de madurez de la uva y su composición específica en el momento de la vendimia. La eficiencia fotosintética es muy sensible al estrés biótico y abiótico, por lo que su determinación podría ser interesante para estimar el potencial enológico del viñedo bajo esas situaciones de estrés. El estudio tiene como objetivo estudiar la utilidad de los niveles foliares de clorofilas, la asimilación neta, conductancia estomática y parámetros de fluorescencia de la clorofila, medidos a nivel de hoja al final de la maduración, como estimadores de las características fisicoquímicas del mosto y los índices de madurez fenólica de la uva en vendimia, para su aplicación en viticultura de precisión. Para ello, se llevó a cabo en 2015 un seguimiento en 20 subzonas de viñedo distintas, perteneciente a la Denominación de Origen "Ribera del Duero", afectadas y no afectadas por deficiencia nutricional de hierro. Se han encontrado relaciones significativas entre el peso de la madera de poda y diferentes parámetros de fluorescencia clorofílica. Los niveles foliares de clorofila en fechas próximas a la vendimia no han sido buenos indicadores de la incidencia de la clorosis férrica sobre las componentes del rendimiento y la composición del mosto. Sin embargo, parámetros como la fluorescencia estacionaria o el apagado fotoquímico tomados al final de la maduración de la uva podrían resultar útiles para estimar el potencial fenólico de la uva en viñedos afectados por deficiencia de hierro.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La clorosis férrica

El hierro es un elemento esencial en la formación de clorofila, cuya carencia en el suelo o inducida por una excesiva presencia de calcio, produce clorosis. Además, el hierro tiene un importante papel en las reacciones de oxidación y reducción de la planta (Hidalgo, 2011).

El hierro necesario estimado para los cultivos agrícolas es de 0.5 ppm en la parte arable (Lindsay, 1974). Los altos niveles de bicarbonato en el suelo es uno de los principales factores que inducen clorosis férrica (Mengel y Malissiovas, 1981).

La clorosis férrica es un problema que afecta tanto a árboles frutales como a la vid, está extendido principalmente en la región del Mediterráneo y en otras áreas semiáridas. Las plantas cloróticas se caracterizan por el color amarillento internerval de las hojas, produciéndose primero en las hojas más jóvenes, y por la reducción del vigor y rendimiento (Bavaresco et al., 2005).

2.1.1. Síntomas

Los síntomas de la clorosis férrica en viñedos suelen ser más frecuentes en primavera, cuando las lluvias causan un aumento en la concentración de bicarbonato del suelo (Boxma, 1972). El crecimiento de los brotes es más rápido, dado que la solubilidad de los óxidos de hierro dependen del pH, en suelos alcalinos y calcáreos la disponibilidad de Fe está muy por debajo de la necesaria para satisfacer la demanda de la planta (Tagliavini y Rombolà, 2001).

Los síntomas de la deficiencia del hierro los vemos manifestados en las hojas, en las que el limbo adquiere colores verde pálido que evoluciona hasta colores amarillentos, e incluso blanco marfil. Las nerviaciones mantienen su color habitual. También pueden aparecer partes necróticas en las hojas. En las bayas no suelen mostrarse los síntomas (Fernández et al., 1994). También se sabe que el crecimiento de las plantas es frecuentemente menor (Mengel y Malissiovas, 1981).

Según algunos autores (Tagliavini et al., 2000), dentro del mismo viñedo, la clorosis es a menudo más severa en las ramas de segundo o tercer orden (nietos) que en aquellas ramificaciones que salen directamente desde el tronco.

La clorosis férrica provoca cambios importantes en la composición de los tejidos y de la savia. Modifica proporciones relativas de constituyentes minerales, como las relaciones K/Ca y P/Fe, que son más elevadas en hojas cloróticas (Abadía et al., 1989).

Es frecuente que el contenido de hierro en las hojas cloróticas, expresado sobre materia seca, sea similar o incluso superior al de las hojas verdes. Este hecho, conocido como “paradoja de la clorosis férrica” (Bavaresco et al., 1999), es debido a un crecimiento menor de las hojas cloróticas que produce un efecto de concentración, y también a la acumulación de hierro fisiológicamente inactivo en los tejidos.

2.1.2. Causas de la clorosis férrica

Entre los factores que inducen la clorosis, se encuentra el alto nivel de pH, la presencia de CaCO_3 , la compactación y mala aireación del suelo, bajas temperaturas en las capas del suelo donde se encuentran las raíces, el riego con aguas ricas en bicarbonatos, excesiva disponibilidad de nitratos, bajos niveles de materia orgánica en el suelo, y otras causas no relacionadas con los suelos como la infección de patógenos, daños en el sistema radicular, etc. (Tagliavini y Rombolà, 2001).

Una de las causas más habituales de la clorosis es el efecto que produce el ión bicarbonato en la rizosfera, que neutraliza los protones del medio y los liberados por la bomba de protones de la membrana citoplasmática de las raíces, aumentando el pH y pudiendo provocar la precipitación del hierro, disminuyendo su absorción (Kolesch et al., 1987).

Además de las causas descritas, también el antagonismo entre elementos como el potasio o el manganeso con el Fe puede provocar la clorosis férrica (Colugnati et al., 1993).

2.1.3. Efectos de la clorosis férrica

La carencia de hierro disminuye la concentración de clorofila y daña la estructura y función del aparato fotosintético (Terry y Abadía, 1986), disminuyendo las tasas de fotosíntesis neta, la conductancia estomática y la transpiración (Bavaresco y Poni, 2003).

Estas deficiencias fotosintéticas conllevan un rendimiento y vigor deprimidos (Chen y Barak, 1982), hasta una mala calidad de la uva al reducir las concentraciones de azúcares y antocianinas (Castino et al., 1987).

2.1.4. Absorción y transporte del hierro

Como la mayoría de las especies de árboles frutales, la vid pertenece a las plantas de Estrategia I (que no producen fitosideróforos en sus raíces), y la captación de hierro está precedida por una etapa de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} (Crowley et al., 1991; Fox y Guerinot, 1998).

La estrategia I está caracterizada por la activación de las reductasas situadas en la membrana plasmática. El incremento de la actividad reductasa intensifica la reducción de Fe^{3+} orgánico (Fernández et al., 1994).

Después se transporta hasta el canopy donde se somete a una segunda reducción antes de entrar en las células del mesófilo. Este segundo paso es necesario para la disponibilidad del hierro en las células de las hojas (Kosegarten y Koyro, 2001).

Los síntomas de clorosis férrica no siempre son uniformes dentro de la misma planta, donde las partes cloróticas del canopy están a menudo presentes junto con ramas verdes.

Esto es debido a la poca movilidad del hierro por el floema (Tagliavini y Rombolà, 2001).

2.1.5. Corrección de la clorosis férrica

Los portainjertos de la vid responden de distinta manera ante el contenido en caliza activa del suelo. Los patrones más tolerantes a la caliza son más resistentes ante la clorosis férrica (Juste et al., 1967; Kolesch et al., 1987). El uso de patrones tolerantes es un método económico y eficiente para prevenir la fisiopatía. Los patrones de vid recomendados en España más resistentes a la caliza activa son 140 Ruggieri, 41 B, y 333 Esc. Montpellier (M.A.P.A., 2003), etc.

Hay diversas formas de hacer frente a este problema, entre ellas realizar laboreo que mejoren las condiciones del suelo, evitando su compactación y facilitando el drenaje. Las cubiertas vegetales previenen la aparición de la clorosis al reducir la compactación del suelo, aumentar la porosidad, la infiltración de agua y el contenido de materia orgánica.

Se ha demostrado que las gramíneas cultivadas en condiciones clorosantes generan fitosideróforos capaces de quelar el hierro en el suelo (Fernández et al., 2003; Martín et al., 2005).

Como correctores del suelo se pueden utilizar sales inorgánicas como el sulfato ferroso, el nitrato férrico o el fosfato ferroso, quelatos sintéticos, compuestos orgánicos, enmiendas acidificantes, o subproductos industriales (López et al., 1994).

El control de la clorosis férrica con quelatos de hierro es una práctica agronómica generalizada en los viñedos, pero implica altos costes, y potenciales riesgos ambientales (Rombolà y Tagliavini 2006; Tagliavini y Rombolà 2001).

2.2. Fotosíntesis y fluorescencia clorofílica

La fotosíntesis es la función mediante la cual la planta transforma el carbono inorgánico en carbono orgánico aprovechando la energía luminosa. La actividad fotosintética es fundamental en el crecimiento de la vid, y de ella depende el desarrollo de la uva y su composición específica en el momento de la vendimia.

El proceso fotosintético se inicia con la absorción de luz a través de los pigmentos fotosintéticos (principalmente clorofila a, b y carotenoides) en los complejos antena.

No toda la energía luminosa que incide sobre la planta es absorbida por la clorofila y transformada durante la fotosíntesis en energía fotoquímica. Una parte de la energía incidente se disipa en forma de calor, y otra en forma de fluorescencia (Moreno et al., 2008). Así, mediante la medición de la fluorescencia de la clorofila se puede obtener información de la eficiencia fotoquímica y de la disipación térmica de la energía absorbida (Maxwell y Johnson 2000).

Se sabe que cualquier alteración fisiológica puede influir en el funcionamiento del fotosistema II (PSII), teniendo repercusión en la fluorescencia, que puede utilizarse para estimar el estrés sufrido por la planta. La eficiencia del PSII a su vez se relaciona con la asimilación de CO₂ (Genty et al., 1989; Siebke et al., 1997), y en general, se usa para examinar el rendimiento fotosintético de las hojas.

Para la medida de la fluorescencia de la clorofila se utilizan unos instrumentos llamados fluorímetros, que cuantifican la luz emitida a longitudes de onda de entre 670 y 750 nm (Maxwell y Johnson 2000; Oxborough, 2004).

Uno de los parámetros principales a tener en cuenta es el valor de la fluorescencia en presencia de luz solar o estacionaria (Fs). Durante la exposición inmediata a la luz, la fluorescencia alcanza el nivel mínimo llamado Fo, que es obtenido cuando los centros de reacción PSII están en estado "abierto". Seguidamente la fluorescencia se eleva al nivel de inflexión transitoria, Fi, hasta llegar al nivel máximo, Fm. La diferencia entre Fm y Fo se denomina fluorescencia variable Fv.

La relación Fv/Fm expresa el rendimiento cuántico máximo de reducción de la quinona A. La relación Fv/Fm es un buen indicador de diversos estreses bióticos y abióticos en plantas (Maxwell y Johnson 2000; Baker, 2008).

Aplicando luz actínica y flashes de luz saturantes en determinados intervalos, obtenemos la fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la presencia de luz, Fm'.

La fluorescencia variable (Fv') es la diferencia entre Fm' y Fo'. Después del flash, eliminando la luz actínica se puede medir Fo' (Maxwell y Johnson, 2000).

Son de interés algunos coeficientes como la eficiencia del fotosistema II, ΦPSII, que indica la proporción de luz absorbida por la clorofila asociada al fotosistema II y es usada en los procesos fotoquímicos. Se puede calcular como:

$$\Phi_{PSII} = (Fm' - Fs)/Fm'$$

El "decaimiento fotoquímico", qP, determina la eficiencia de la hoja para eliminar electrones de los aceptores de la quinona del PSII, se calcula como:

$$qP = (Fm' - Fs)/(Fm' - Fo')$$

Respecto a los procesos de "decaimiento no fotoquímico", el parámetro más utilizado es NPQ:

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m' = (F_m/F_m') - 1$$

El valor obtenido tiene una relación lineal con la disipación de energía en forma de calor (Maxwell y Johnson 2000; Baker y Rosenqvist, 2004).

2.3. Eficiencia fotosintética en viñedos afectados por clorosis férrica

Diversos estudios han demostrado que las plantas cloróticas tienen tasas más bajas de fotosíntesis neta, conductancia estomática y transpiración en comparación con plantas sanas. La clorosis férrica reduce la tasa de transporte de electrones (ETR) y el "decaimiento fotoquímico" (qP) (Bavaresco y Poni, 2003).

El contenido foliar en clorofila a y b es muy sensible a procesos de estrés en las plantas. Diversos estudios han demostrado la utilidad de este contenido para analizar la variación espacial del comportamiento agronómico y para estimar componentes de calidad de la uva en viñedos afectados por clorosis férrica (Zarco-Tejada et al., 2005; Martín et al., 2007).

La actividad fotosintética tiene gran influencia en la síntesis y acumulación de azúcares, ácidos y compuestos fenólicos en la uva (Smart y Robinson, 1991). Todo ello, depende de la superficie foliar expuesta del contenido de clorofila de la vid (Hall et al., 2002).

Diferentes estudios han demostrado la utilidad de parámetros de fluorescencia de la clorofila para la detección de estrés en las plantas, y por tanto, su repercusión en el rendimiento y calidad del fruto (Krause y Weis, 1991). Además Flexas et al. (1999) han mostrado que F_s y el ratio F_s/F_o podrían ser útiles para la detección precoz del estrés hídrico en vides. Baker y Rosenqvist (2004) proponían detectar el estrés por altas temperaturas con el ratio F_v/F_m , mientras que qP podría usarse para detectar la deficiencia de nitrógeno. Wang y Jin (2005) planteaban el uso del ratio F_o/F_v para detectar el estrés producido por la carencia de cobre y zinc.

En 2011, Catalina (2016) pudo relacionar significativamente el contenido de potasio y los índices de polifenoles de la uva con los parámetros F_o , F_v/F_m y F_o/F_v medidos en cuajado en viñedos afectados por clorosis férrica. Durante el envero también se correlacionaron los contenidos en polifenoles del mosto con F_o' , F_m' , F_v' , F_s , NPQ y F_s/F_o .

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La disminución de la actividad fotosintética asociada a la carencia de hierro provoca una reducción en la productividad del viñedo y la calidad de la uva (Bavaresco et al., 2005). Los parámetros de la fluorescencia de la clorofila foliar pueden evaluar cambios en la respuesta fotosintética del viñedo ante situaciones de estrés, debido a la relación entre la eficiencia del fotosistema II y la asimilación neta de CO₂ (Baker y Rosenqvist, 2004). Esta técnica no destructiva, permite analizar el rendimiento fotosintético de una forma rápida y sencilla (Maxwell y Johnson, 2000).

Por ello, las medidas de fluorescencia podrían ser útiles en viticultura de precisión para detectar estrés por carencia de hierro en las plantas, y estimar la variación espacial del potencial enológico de la uva en viñedos afectados. Es interesante estudiar hasta qué punto las medidas del contenido clorofílico foliar y del rendimiento fotosintético realizadas unos días antes de la vendimia serían útiles para estos fines.

El objetivo de este trabajo es estudiar la utilidad de los niveles foliares de clorofilas, asimilación neta, conductancia estomática y parámetros de fluorescencia de la clorofila, medidos a nivel de hoja al final de la maduración, como estimadores de las características fisicoquímicas del mosto y los índices de madurez fenólica de la uva en vendimia, para su aplicación en viticultura de precisión.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en 20 subparcelas de viñedo en la Denominación de Origen "Ribera del Duero". En la campaña de 2015 se tomaron medidas de la actividad fotosintética y del nivel foliar de clorofila una semana antes de la vendimia, y se evaluó el rendimiento, vigor y parámetros de composición de la uva. Se dispone también de datos de niveles de clorofila foliar en enero recogidos en la campaña de 2014. Mediante análisis de regresión lineal se estudiaron las relaciones entre las diferentes variables medidas.

4.1. Descripción de la zona de estudio

El área de estudio se localiza en Pesquera de Duero (Valladolid), en la Denominación de Origen "Ribera del Duero". La altitud varía de los 746 a 800 m sobre el nivel del mar. La zona de estudio comprende 20 subparcelas de aproximadamente 100 m². El marco de plantación es de 3 x 1,5 m., exceptuando cuatro parcelas cuyo marco es de 3,1 x 1,5 m. Por cada subzona hay comprendidas 27 cepas divididas entre tres líneas consecutivas, de nueve vides por línea.

Los viñedos corresponden a la variedad Tempranillo, injertada sobre el portainjerto 110-Richter. Se cultivan en secano, en espaldera con un sistema de poda en cordón Royat.

En general los suelos son calizos, básicos, y con texturas franco-arcillosas. El contenido en materia orgánica es muy bajo. Existe una gran variabilidad entre parcelas en cuanto a la disponibilidad de hierro para las plantas, con zonas afectadas y no afectadas por clorosis férrica (Martín et al., 2008).

4.2. Controles y observaciones

4.2.1. Determinación del nivel foliar de clorofila

Se utilizó un medidor portátil CL-01 (Hansatech Instrument Ltd., Norfolk, UK,).

Las medidas se realizaron el día 7 de Septiembre de 2015, escogiendo aleatoriamente tres cepas por línea en cada subparcela. Las mediciones se tomaban en el tercio superior de la vegetación.

Para obtener los valores de contenido en clorofila por unidad de superficie foliar, los datos proporcionados por el medidor portátil se transformaron con la recta de regresión adaptada a la variedad "Tempranillo" (Martín et al., 2005).

$$Y = (6,0817 \times X) + 7,608$$

Dónde:

Y = concentración de clorofila foliar ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)

x = lecturas del CL-01

4.2.2. Determinación de la actividad fotosintética

Se midió el intercambio de gases y el nivel de fluorescencia de clorofila de las hojas mediante un analizador infrarrojo de gases (IRGA) portátil LICOR 6400, equipado con una cámara de medida de fluorescencia 6400-40 (Li-Cor, Inc. Lincoln, Nebr., EE.UU). Se tomaron medidas de 9 hojas del tercio superior de la vegetación por cada subzona, entre las 11 y las 13 horas, los días 8 y 9 de Septiembre de 2015, con condiciones meteorológicas despejadas.

Las condiciones de la cámara se mantuvieron constantes para todas las mediciones. La densidad de flujo de fotones fotosintético incidente en las hojas se fijó en $1500 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El nivel de CO_2 en el analizador se estableció en $370 \text{ mol CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$ de aire. El caudal de aire a través de la cámara se conservó a $500 \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}$. Los factores de absorción de los fotones en las longitudes de onda 635 nm (rojo) y 465 nm (azul) de las hojas se añadieron en el IRGA para cada subparcela, utilizando las estimaciones tomadas previamente con el medidor portátil CL-01 (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, Reino Unido).

La fotosíntesis neta y la conductancia estomática se hallaron por diferencias de concentración de CO_2 y H_2O que entra y sale de la cámara que contiene la hoja.

Para determinar las variables de fluorescencia, el equipo dispone de diodos emisores de luz, y detectores que captan la señal fluorescente. Además de inducir la emisión de fluorescencia, también se provoca la producción de pulsos de luz saturantes que cierran los centros de reacción del PSII, para tomar la medida de F_m' .

Al coincidir radiación solar con las características espectrales de la clorofila (670-750 nm) exige usar luz de medida modulada de baja intensidad para distinguir la fluorescencia de la luz solar.

Las variables de fluorescencia medidas son:

- F_o' : mínimo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz.
- F_m' : máximo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz.
- F_s : fluorescencia estacionaria.
- F_v' : diferencia entre el máximo y el mínimo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz ($F_v' = F_m' - F_o'$).
- F_v'/F_m' : eficiencia máxima del fotosistema II.
- Φ_{PSII} : eficiencia del fotosistema II ($F_m' - (F_s / F_m')$).
- qP : proporción de centros de reacción que están abiertos del fotosistema II.
- ETR: tasa aparente de transporte de electrones.

4.2.3. Estimación del rendimiento

La vendimia se realizó los días 14 y 15 de Septiembre de 2015, y se contabilizaron el total de cosecha recogida, el número de racimos por subzona, y se recogieron 2 muestras de 100 bayas por subparcela, una para el análisis de mostos y otra para determinar los parámetros de madurez fenólica de la uva. Se determinaron así los racimos por cepa, rendimiento por cepa, peso medio del racimo y peso medio de cien bayas.

4.2.4. Vigor del viñedo

El vigor se ha estimado mediante el peso medio de la madera de poda. Durante la poda también se contó el número de sarmientos por cepa, un dato necesario para obtener el peso medio del sarmiento y también, con los datos de vendimia, el número de racimos por brote.

Todos estos datos se pudieron tomar únicamente en 16 de las 20 subzonas estudiadas.

4.3. Análisis de la composición de la uva

4.3.1. Composición del mosto

Las bayas recogidas y separadas por subparcelas, fueron prensadas mediante una prensa de acción manual, separando la fracción líquida de la sólida. La parte líquida se introdujo en tubos Falcón que centrifugamos a 3500 rpm durante tres minutos.

A continuación se midió el grado Brix, la acidez total, el pH, índice de polifenoles totales, parámetros CIELAB y contenido en potasio.

El grado Brix se midió mediante un refractómetro digital tras calibrarlo con agua destilada. La temperatura con la que se tomaron las muestras era de 21 °C, y se corrigieron usando una tabla de corrección, y siguiendo la siguiente fórmula:

$$^{\circ}\text{Brix}_{20^{\circ}\text{C}} = ^{\circ}\text{Brix}_t + c$$

Para la medida de la acidez total y pH del mosto utilizamos un valorador modelo 7025 M de la marca Metrohm. Se calibró el aparato con soluciones tampón de pH 7 y 4.

La medida de acidez total se expresó en $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácido tartárico. Se siguió el procedimiento CEE N° 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino (Comisión Europea, 1990).

El índice de polifenoles totales se obtuvo como la absorbancia del vino a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Visible, JASCO V-630. Las absorbancias se registraron diluyendo las muestras con un factor de 1:25, tomando como referencia una muestra de agua destilada, en cubetas de 1 mm. Por medio de un espectrofotómetro de llama con el fotómetro PFP7, de Jemway, medimos el contenido en potasio de los mostos, siguiendo la metodología oficial de la CEE 2676/90 de la UE (Comisión Europea, 1990).

Los parámetros CIELAB medidos en el mosto fueron la luminosidad de negro a blanco (L), relación entre verde y rojo (a), relación entre azul y amarillo (b), la cromaticidad (C) y el tono (H). La intensidad colorante resulta de la suma de las absorbancias medidas a las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm. La tonalidad se da por la relación entre la absorbancia a 420 nm y la absorbancia a 520 nm (Glories, 1978).

Para el uso de todos los parámetros cromáticos mencionados utilizamos un espectrofotómetro UV-Visible JASCO V-630, cubetas de cuarzo de 1 mm, y el software "JASCO Spectra Manager corporation" con observador patrón CIE64 (10° campo de visión) y el iluminante D65 (CIE, 1986).

4.3.2. Parámetros de madurez fenólica

Las muestras de 100 bayas recogidas en cada subzona para estos análisis se batieron durante dos minutos en una batidora, y se separaron dos muestras de 50 gramos cada una. A una fracción le añadimos 50 ml de una solución de pH 3,2, y a la otra fracción le añadimos 50 ml de una solución a pH 1. Maceramos ambas durante 4 horas a temperatura ambiente, las centrifugamos y filtramos.

Con las muestras de pH 3,2 se halla el contenido de fenoles totales mediante espectrofotometría (absorbancia a 280 nm), y antocianos fácilmente extraíbles (absorbancia a 520 nm). A partir de las muestras a pH 1 se miden los antocianos totales (absorbancia a 520 nm). Los índices de madurez celular (IMC) se calculan (García Barceló, 1990):

$$\text{IMC (\%)} = ((\text{Antocianos totales} - \text{Antocianos fácilmente extraíbles}) / \text{Antocianos totales}) \times 100$$

4.4. Análisis de datos

El análisis de datos se efectuó por medio del paquete informático SAS, versión 9.1 (SAS Institute INC, 2004).

Las relaciones entre las variables de vigor, rendimiento y composición de la uva con los contenidos foliares de clorofila y los parámetros de eficiencia fotosintética se estudiaron mediante métodos de regresión lineal. Las diferencias en el comportamiento agronómico de subzonas en función de los niveles de clorofila también se estudiaron mediante análisis de la varianza y separaciones de medias con el test de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1. Contenido foliar de clorofila y actividad fotosintética

La cantidad de clorofila por unidad de superficie foliar se considera un indicador de la capacidad fotosintética de las plantas, además de ser un parámetro importante que mide el desarrollo del cloroplasto, el contenido de nitrógeno foliar, o la salud general de la planta (Taiz y Zieger 2004; Ling et al., 2011).

En la Tabla 1 podemos ver que los parámetros de actividad fotosintética no han sido significativamente distintos en las zonas de estudio con alto y bajo nivel de clorofila foliar, a excepción de la relación Fv'/Fm' . Estos resultados concuerdan con los de Flexas y Medrano (2002). Y difieren de los obtenidos por Bavaresco et al. (2006), que advirtieron que las hojas de vid cloróticas tenían tasas más bajas de asimilación neta, conductancia estomática y transpiración en comparación con las hojas de plantas control.

Mandal et al. (2009) también han mostrado relaciones significativas de Fv'/Fm' con los niveles de clorofila, indicando que este ratio puede ser útil en la detección de estreses en las plantas.

Tabla 1. Valores medios de parámetros fotosintéticos en zonas de estudio con niveles de clorofila altos (AC) y bajos (BC) al final de la maduración de 2015. Pn: Asimilación neta; gs: Conductancia estomática; Fo': Fluorescencia mínima en hojas adaptadas a la luz; Fm': Fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz; Fv': Fluorescencia variable en hojas adaptadas a la luz; Fs: Fluorescencia estacionaria; PSII: Fotosistema 2; qP: "decaimiento fotoquímico";

Parámetros	Clorofila 2014 Enero				Clorofila 2015 Vendimia			
	AC	n	BC	n	AC	n	BC	n
Pn	6,73a	10	7,49a	10	7,42a	10	6,79a	10
gs	0,07a	10	0,06a	10	0,076a	10	0,053a	10
Fo'	498,63a	10	498,26a	10	508,76a	10	488,13a	10
Fm'	962,76a	10	914,19a	10	998,61a	10	878,33a	10
Fv'/Fm'	0,46a	10	0,44a	10	0,47a	10	0,42b	10
Fs	873,2a	10	827,46a	10	906,37a	10	794,29a	10
PSII	0,09a	10	0,10a	10	0,09a	10	0,10a	10
qP	0,23a	10	0,24a	10	0,22a	10	0,25a	10
ETR	67,07a	10	68,93a	10	67,19a	10	68,80a	10

Dentro de un mismo año, los valores con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$, test Tukey). n: número de muestras.

5.2. Relaciones entre la eficiencia fotosintética, y el rendimiento y vigor del viñedo

En la Tabla 2 se pueden observar los coeficientes de determinación de las regresiones lineales del rendimiento y vigor del viñedo sobre parámetros de eficiencia fotosintética una semana antes de vendimia.

La producción de uva por hectárea, y el índice de Ravaz se relacionaron significativamente con el contenido foliar de clorofila. En cuanto a las componentes del rendimiento, solo el número de racimos por brote se relacionó significativamente con el nivel de clorofila.

Numerosos estudios apuntan a la clorosis férrica como causa de reducciones del vigor y rendimiento del viñedo (Chen y Barak, 1982; Tagliavini y Rombolà, 2001). Zarco Tejada et al. (2005) y Martín et al. (2007) han mostrado que los niveles foliares de clorofila a+b se ven muy reducidos por situaciones de estrés y están muy directamente ligados al potencial fotosintético del viñedo.

Diversos parámetros fotosintéticos se relacionaron significativamente con el peso de la madera de poda, tales como la asimilación neta, y la fluorescencia máxima, mínima y estacionaria en hojas adaptadas a la luz, lo que demuestra que la capacidad fotosintética de la planta está relacionada con el vigor de la misma.

Tabla 2. Coeficiente de determinación, nivel de significación y pendiente de la regresión de los parámetros de rendimiento y vigor sobre el nivel de clorofila foliar ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), la fotosíntesis neta ($\text{Pn}\cdot\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), la conductancia estomática ($\text{gs}\cdot\text{molH}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y los parámetros de fluorescencia de la clorofila medidos al final de la maduración.

	Clorofila	Pn	gs	Fo'	Fm'	Fv'/Fm'	Fs	PSII	qP	ETR
P100	(+)0,08	(-)0,00	(-)0,00	(-)0,09	(-)0,09	(-)0,04	(-)0,09	(+)0,03	(+)0,11	(+)0,05
PMR	(+)0,15	(-)0,01	(-)0,02	(+)0,00	(-)0,00	(-)0,01	(+)0,00	(-)0,10	(-)0,00	(-)0,06
REND	(+)0,22*	(-)0,00	(-)0,05	(-)0,00	(-)0,00	(-)0,00	(-)0,00	(-)0,06	(-)0,00	(-)0,04
NRB	(+)0,34*	(-)0,19	(-)0,28*	(+)0,01	(-)0,00	(-)0,03	(+)0,00	(-)0,20	(-)0,01	(-)0,20
PMP	(+)0,02	(+)0,64**	(+)0,17	(+)0,29*	(+)0,37*	(+)0,25	(+)0,34*	(-)0,00	(-)0,23	(-)0,00
IR	(+)0,35*	(-)0,33*	(-)0,16	(-)0,18	(-)0,16	(-)0,08	(-)0,14	(-)0,03	(+)0,08	(-)0,03

Niveles de significación: * $p<0,05$; ** $p<0,01$. P100: Peso 100 bayas (g); PMR: Peso medio de los racimos (g); REND: rendimiento (kg/ha); NRB: Número de racimos por brote; PMP: Peso de la madera de poda (kg/ha); IR: Índice de Ravaz.

El análisis de la varianza del peso medio del racimo del año 2015 ha resultado significativo en función de los niveles de clorofila foliar (Tabla 3). Autores como Bavaresco et al. (2005) expusieron que la clorosis férrica provoca disminuciones en la productividad, reduciendo el número de racimos por planta, el peso del racimo y el peso de la baya.

En la Tabla 3 se observa como más componentes del rendimiento fueron relacionadas significativamente con los niveles de clorofila en enero del año 2014 que con los valores de vendimia en 2015. El rendimiento y el número de racimos por brote fueron significativamente diferentes en subparcelas afectadas y no afectadas por la clorosis férrica, cuando esta clasificación se hizo con los valores de contenido foliar de clorofila en enero. Estos resultados son compatibles con la hipótesis de que los niveles de clorofila al final de la maduración no reflejan claramente los niveles de carencia nutricional de hierro, ya que podrían verse afectados por otras variables como las condiciones meteorológicas durante la maduración o la aplicación de técnicas de cultivo específicas. En cualquier caso, también habría que valorar que las diferentes condiciones de las dos campañas (temperaturas, régimen hídrico...) podrían haber modificado la respuesta productiva del viñedo a la clorosis férrica en los dos años de estudio.

Tabla 3. Valores medios de rendimiento y vigor de 2015 en relación con niveles de clorofila altos (AC) y bajos (BC) de los años 2014 (datos tomados durante el enero) y 2015 (datos recogidos al final de la maduración). P100: Peso 100 bayas (g); PMR: Peso medio de los racimos (g); REND: rendimiento (kg/ha); NRB: Número de racimos por brote; PMP: Peso de la madera de poda (kg/ha); IR: Índice de Ravaz

Parámetros	Clorofila 2014 Enero				Clorofila 2015 Vendimia			
	AC	n	BC	n	AC	n	BC	n
P100	143,72a	10	140,58a	10	142,48a	10	137,48a	9
PMR	199,71a	10	173,52a	10	196,58a	10	167,38b	9
REND	5331,6a	10	4057,7b	10	5066,5a	10	4322,9a	10
NRB	0,90a	7	0,77b	10	0,86a	7	0,80a	10
PMP	4342,2a	6	4051,5a	10	4437,2a	7	3945,3a	9
IR	0,81a	1	0,80a	6	1,33a	7	1,11a	9

Dentro de un mismo año, los valores con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$, test Tukey). n: número de muestras.

5.3. Relaciones entre la eficiencia fotosintética y la composición de la uva

En la Tabla 4 vemos como la conductancia estomática se relaciona significativamente con los niveles de IPT y de acidez total del mosto. En condiciones de estrés hídrico, la conductancia estomática disminuye (Flexas et al., 2000), favoreciendo una disminución de la acidez y un aumento de los polifenoles (Catalina, 2016).

Respecto a la madurez fenólica, el contenido fenólico total y el contenido en antocianos fácilmente extraíbles se relacionaron significativamente con los parámetros de fluorescencia. Esto indica que estos parámetros, medidos al final de la maduración pueden ser de utilidad para la estimación del potencial fenólico de la uva.

Tabla 4. Coeficiente de determinación, nivel de significación y pendiente de la regresión de los parámetros físico-químicos del mosto, y madurez fenólica de la uva sobre el nivel de clorofila foliar ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), la fotosíntesis neta ($\text{Pn}\cdot\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), la conductancia estomática ($\text{gs}\cdot\text{mol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y los parámetros de fluorescencia de la clorofila medidos al final de la maduración.

	Clorofila	Pn	gs	Fo'	Fm'	Fv'/Fm'	Fs	PSII	qP	ETR
IPT	(-)0,14	(-)0,01	(-)0,29*	(+)0,04	(+)0,02	(+)0,00	(+)0,02	(-)0,08	(-)0,04	(-)0,11
pH	(+)0,00	(+)0,02	(-)0,02	(+)0,04	(+)0,09	(+)0,13	(+)0,09	(-)0,01	(-)0,11	(-)0,02
AcTotal	(+)0,18	(-)0,00	(+)0,38*	(-)0,02	(-)0,00	(+)0,02	(-)0,00	(+)0,15	(+)0,02	(+)0,11
Brix	(-)0,15	(+)0,03	(+)0,00	(+)0,06	(+)0,00	(-)0,04	(+)0,00	(-)0,00	(-)0,00	(+)0,01
K	(+)0,01	(+)0,02	(+)0,08	(+)0,02	(+)0,09	(+)0,12	(+)0,09	(-)0,00	(-)0,09	(-)0,00
CFT	(-)0,04	(+)0,01	(-)0,16	(+)0,18	(+)0,13	(+)0,02	(+)0,15	(-)0,20*	(-)0,22*	(-)0,17
AFE	(-)0,02	(+)0,01	(-)0,00	(+)0,18	(+)0,23*	(+)0,12	(+)0,22*	(-)0,01	(-)0,12	(-)0,03
ANT	(+)0,03	(-)0,17	(-)0,13	(+)0,05	(+)0,09	(+)0,05	(+)0,10	(-)0,15	(-)0,10	(-)0,20
IMC	(+)0,09	(-)0,24*	(-)0,08	(-)0,08	(-)0,08	(-)0,04	(-)0,07	(-)0,05	(+)0,02	(-)0,04

Niveles de significación: * $p<0,05$; ** $p<0,01$. IPT: Índice de polifenoles totales; pH; AcTotal: Acidez total (g ácido tartárico/L); Brix; K: Potasio (ppm); CFT: Contenido en fenoles totales; AFE: Antocianos fácilmente extraíbles; ANT: Antocianos totales; IMC: Índice de madurez celular.

Apenas se encontraron relaciones significativas entre los niveles foliares de clorofila y el resto de parámetros de composición de la uva. Cabría esperar que el contenido en pigmentos fotosintéticos de la vegetación repercutiese en un aumento de azúcares, polifenoles y antocianos, y disminuyese el pH, así como el potasio tuviese valores superiores en plantas con menor potencial fotosintético (Martínez de Toda, 2011). Lo que ocurre, probablemente, es que el contenido en clorofilas a final de la maduración no es un buen indicador de la eficiencia fotosintética de todo el periodo del desarrollo del fruto. Cuando las zonas de estudio se clasifican en función de los contenidos foliares en clorofila en envero del año anterior, sí se han encontrado diferencias entre grupos para el grado Brix y el contenido en fenoles totales (Tabla 5).

El contenido fenólico de las bayas se considera un parámetro fundamental para la calidad del vino, ya que es responsable del color, sabor, y la estructura del vino. Por lo tanto, para determinar el momento más indicado para la vendimia, se ha de hacer un seguimiento de compuestos fenólicos (Kennedy et al., 2006). De acuerdo con los resultados del presente estudio (Tabla 5), las vides con estrés nutricional de hierro producen una mayor acumulación de polifenoles en las bayas (Bavaresco et al., 2005). Mientras que el grado Brix aumenta en viñedos con niveles bajos de clorofila, la acidez total es superior en vides con niveles de clorofila mayores.

Tabla 5. Valores medios de componentes físico-químicos del mosto y de madurez fenólica de 2015, en relación con niveles de clorofila altos (AC) y bajos (BC) de los años 2014 (datos tomados durante el envero) y 2015 (datos recogidos al final de la maduración). IPT: Índice de polifenoles totales; pH; AcTotal: Acidez total (g ácido tartárico/L); Brix; K: Potasio (ppm); CFT: Contenido en fenoles totales; AFE: Antocianos fácilmente extraíbles; ANT: Antocianos totales; IMC: Índice de madurez celular.

Parámetros	Clorofila 2014 Envero				Clorofila 2015 Vendimia			
	AC	n	BC	n	AC	n	BC	n
IPT	23,15a	10	26,02a	10	22,95b	10	26,21a	10
pH	3,88a	10	3,90a	10	3,89a	10	3,88a	10
AcTotal	4,10a	10	3,50b	10	4,04a	10	3,55b	10
Brix	24,22b	10	25,12a	10	24,46a	10	24,88a	10
K	3263,6a	10	3341,6a	10	3400,7a	10	3204,5a	10
CFT	23,74b	10	29,00a	10	25,39a	10	27,35a	10
AFE	1095,12a	10	1111,65a	10	1077,98a	10	1128,80a	10
ANT	1399,67a	10	1397a	10	1392,00a	10	1404,66a	10
IMC	21,53a	10	20,31a	10	22,28a	10	19,56a	10

Dentro de un mismo año, los valores con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$, test Tukey). n: número de muestras.

Varios parámetros de la fluorescencia de la clorofila mostraron relaciones significativas con medidas cromáticas del mosto (Tabla 6), siendo reseñable la fluorescencia mínima, máxima y principalmente la fluorescencia estacionaria. La conductancia estomática mostró una relación positiva con la luminosidad, y negativa con la intensidad colorante. Además, el “decaimiento fotoquímico” (qP) se relacionó de forma significativamente positiva con la luminosidad.

Tabla 6. Coeficiente de determinación, nivel de significación y pendiente de la regresión de los parámetros cromáticos del mosto sobre el nivel de clorofila foliar ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), la fotosíntesis neta ($\text{Pn}\cdot\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), la conductancia estomática ($\text{gs}\cdot\text{molH}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y los parámetros de fluorescencia de la clorofila medidos al final de la maduración.

	Clorofila	Pn	gs	Fo'	Fm'	Fv'/Fm'	Fs	PSII	qP	ETR
C	(-)0,01	(-)0,01	(-)0,12	(+)0,19	(+)0,18	(+)0,06	(+)0,19	(-)0,07	(-)0,14	(-)0,11
H	(+)0,01	(-)0,00	(+)0,05	(-)0,18	(-)0,19	(-)0,05	(-)0,20*	(+)0,10	(+)0,14	(+)0,14
L	(+)0,01	(-)0,00	(+)0,21*	(-)0,23*	(-)0,26*	(-)0,08	(-)0,26*	(+)0,12	(+)0,21*	(+)0,11
a	(-)0,01	(-)0,01	(-)0,10	(+)0,21*	(+)0,20*	(+)0,06	(+)0,21*	(-)0,08	(-)0,15	(-)0,12
b	(+)0,00	(-)0,00	(+)0,03	(-)0,11	(-)0,13	(-)0,03	(-)0,13	(+)0,07	(+)0,07	(+)0,09
ICOL	(-)0,01	(-)0,00	(-)0,20*	(+)0,28*	(+)0,24*	(+)0,08	(+)0,25*	(-)0,11	(-)0,20	(-)0,10
TONCOL	(+)0,00	(-)0,00	(+)0,01	(-)0,12	(-)0,15	(-)0,05	(-)0,16	(+)0,05	(+)0,09	(+)0,08

Niveles de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. C: Croma; H: Tono; L: Luminosidad; a*: Relación verde/rojo; b*: Relación amarillo/azul; ICOL: Intensidad de color; TONCOL: Tonalidad de color.

En contra de lo observado en otros trabajos (Martín et al., 2007; Meggio et al., 2010), el nivel foliar de clorofila no ha sido un buen indicador de las características cromáticas en este estudio (Tabla 7). Esto nos revela que a final de la maduración de la uva, parámetros fotosintéticos como la fluorescencia estacionaria son mucho más eficaces en la estimación de las características cromáticas del mosto que el contenido foliar de clorofila.

Tabla 7. Valores medios de componentes cromáticos del mosto de 2015, en relación con niveles de clorofila altos (AC) y bajos (BC) de los años 2014 (datos tomados durante el envero) y 2015 (datos recogidos al final de la maduración). C: Croma; H: Tono; L: Luminosidad; a*: Relación verde/rojo; b*: Relación amarillo/azul; ICOL: Intensidad de color; TONCOL: Tonalidad de color.

Parámetros	Clorofila 2014 Envero				Clorofila 2015 Vendimia			
	AC	n	BC	n	AC	n	BC	n
C	14,74a	10	15,47a	10	14,89a	10	15,31a	10
H	19,25a	10	17,55a	10	18,75a	10	18,05a	10
L	82,12a	10	80,60a	10	81,49a	10	81,21a	10
A	13,88a	10	14,71a	10	14,06a	10	14,53a	10
B	4,67a	10	4,40a	10	4,66a	10	4,41a	10
ICOL	6,78a	10	7,34a	10	7,02a	10	7,09a	10
TONCOL	0,93a	10	0,92a	10	0,92a	10	0,93a	10

Dentro de un mismo año, los valores con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$, test Tukey). n: número de muestras.

6. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio muestran que las medidas de eficiencia fotosintética registradas al final de la maduración, a excepción del ratio Fv'/Fm' , no se relacionan significativamente con los niveles foliares de clorofila. Por otra parte, los parámetros de eficiencia fotosintética se correlacionaron significativamente con parámetros de vigor y rendimiento del viñedo en la zona de estudio.

Teniendo en cuenta los niveles foliares de clorofila en el envero del año anterior, se comprueba cómo la clorosis férrica provoca en el área de estudio disminuciones significativas de rendimiento, fertilidad de las yemas, peso medio del racimo y del índice de Ravaz. Sin embargo, las relaciones de estas variables con las medidas de clorofila unos días antes de vendimia no fueron tan claras, lo que indica que estas medidas tan tardías podrían ser alteradas por otros factores diferentes a la deficiencia de hierro.

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila tomados al final de la maduración no se relacionaron significativamente con los parámetros habituales de composición del mosto. Sin embargo, los resultados muestran que estos parámetros podrían ser mejores indicadores del potencial fenólico de la uva y de las características cromáticas del mosto que los niveles foliares de clorofila, en viñedos afectados por clorosis férrica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la colaboración a todas aquellas personas que hicieron posible la publicación de este trabajo. En primer lugar quisiera agradecer la ilustración durante este estudio y su dirección, a mi tutora María Rosa González García, y a Pedro Martín Peña. Así como la inestimable ayuda de Alfonso García García en la parte práctica del trabajo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abadía, A; Sanz, M; de las Rivas, J; y Abadía, J. 1989. Photosynthetic pigments and mineral composition of iron deficient pear leaves. *J Plant Nutr* 12(7):827-38.
- Baker, NR. 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annu.Rev.Plant Biol.* 59:89-113.
- Baker, NR; y Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. *J Exp Bot* 55(403):1607-21.
- Bavaresco, L., Giachino, E. y Colla, R. 1999. Iron chlorosis paradox in grapevine. *Journal of plant nutrition*, 22: 1589-1 597
- Bavaresco, L; y Poni, S. 2003. Effect of calcareous soil on photosynthesis rate, mineral nutrition, and Source-Sink ratio of table grape. *J Plant Nutr* 26(10-11):2123-35.
- Bavaresco, L; Civardi, S; Pezzutto, S; Vezzulli, S; y Ferrari, F. 2005. Grape production, technological parameters, and stilbenic compounds as affected by lime-induced chlorosis. *VITIS-Journal of Grapevine Research* 44(2):63.
- Bavaresco, L; Bertamini, M; y Iacono, F. 2006. Lime-induced chlorosis and physiological responses in grapevine (*vitis vinifera* L. cv. pinot blanc) leaves. *Vitis-Journal of Grapevine Research* 45(1):45.
- Boxma, R. 1972. Bicarbonate as the most important soil factor in lime-induced chlorosis in the netherlands. *Plant Soil* 37(2):233-43.
- Castino, M; Ubigli, M; Corino, L; Luzzati, A; Siragusa, N; y Nappi, P. 1987. Oenological effects of nutrients deficiencies on the grape variety barbera cultivated in piedmont vineyards. *VigneVini, Bologna* 14:37-54.
- Catalina Tomás, Á. 2016. Utilización de medidas de fluorescencia de la clorofila para monitorizar el estado nutricional y estimar el potencial enológico en viñedos afectados por clorosis férrica. .
- Chen, Y; y Barak, P. 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Adv Agron* 35(21):240.
- CIE. 1986. Colorimetry. (2ª edición). Publicación C.I.E. Viena, 152
- Colugnati, G; Camerlynck, R; Kiekens, L; y Bekaert, P. 1993. Content patterns of Fe, Mn and B in four grapevine cultivars. *Mineral Nutrition of Deciduous Fruit Plants* 383:273-80.
- Comisión Europea. 1990. Reglamento (CEE) nº 2676/90 de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos oficiales de análisis de vinos, zumos y mostos de uva. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L272* (3 de Octubre de 1990). Comisión Europea (Ed.) Bruselas, pp. 1-192
- Crowley, D; Wang, Y; Reid, C; y Szaniszlo, P. 1991. Siderophore-iron uptake mechanisms by microorganisms and plants. *Plant Soil* 130:179-98.

- Fernández, AMA; Bayona, AA; Marotta, JLL; y Bayona, JA. 2003. Diagnóstico y corrección de la clorosis férrica. *Fruticultura Profesional* (139):158-66.
- Fernández López, JA; Almela Ruiz, L; y Fernández Rubio, J. 1994. La nutrición férrica de las plantas: El problema de la clorosis. Murcia: Universidad de Murcia.
- Flexas, J.; Escalona, J.M.; y Medrano, H. 1999. Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant, Cell and Environment*, 22: 39-48
- Flexas; J; Briantais, J; Cerovic, Z; Medrano, H; y Moya, I. 2000. Steady-state and maximum chlorophyll fluorescence responses to water stress in grapevine leaves: A new remote sensing system. *Remote Sens Environ* 73(3):283-97.
- Flexas, J.; y Medrano, H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitation revisited. *Annals of Botany*, 89: 183-189.
- Fox, TC; y Guerinot, ML. 1998. Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Biology* 49(1):669-96.
- García Barceló, J. 1990. "Compuestos fenólicos". En: *Técnicas Analíticas para Vinos*. G.A.B. (ed.). Moja-Olérdola. 8: 3-33.
- Genty, B; Briantais, J; y Baker, NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 990(1):87-92.
- Glories, Y. 1978. Recherches sur la matière colorantes des vins rouges. Thèse doctorat d'état, Université de Bordeaux II. 364 p.
- Hall, A; Lamb, D; Holzappel, B; y Louis, J. 2002. Optical remote sensing applications in viticulture-a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 8(1):36-47.
- Hidalgo Fernández Cano, L; y Hidalgo Togores, J. 2011. Tratado de viticultura. 4º rev y amp ed. Madrid: Mundi prensa.
- Juste C, Pouget, R; y Bruzau, F. 1967. Influence du ph et de lanion bicarbonique sur laborption du fer par des racines de vigne. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l academie des sciences serie d* 264(24):2781.
- Kennedy, JA; Saucier, C; y Glories, Y. 2006. Grape and wine phenolics: History and perspective. *Am J Enol Vitic* 57(3):239-48.
- Kolesch, H; Höfner, W; y Schaller, K. 1987. Effect of bicarbonate and phosphate on iron chlorosis of grape vines with special regard to the susceptibility of two rootstocks. part II: Pot experiments. *J Plant Nutr* 10(2):231-49.
- Kosegarten, H; y Koyro, H. 2001. Apoplastic accumulation of iron in the epidermis of maize (zea mays) roots grown in calcareous soil. *Physiol Plantarum* 113(4):515-22.
- Krause, G; y Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Biology* 42(1):313-49.

- LI-COR Biosciences, Inc. 2003. Using the LI-6400. Portable Photosynthesis System. Lincoln, EEUU. Book, 1: 2-6
- Lindsay, W.L. 1974. Role of chelation in micronutrient availability. En: The plant root and environment. E.W. Carson eds. Univ. Press of Virginia, USA. 507-524.
- Ling, Q; Huang, W; y Jarvis, P. 2011. Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in arabidopsis thaliana. Photosynthesis Res 107(2):209-14.
- López, JAF; Ruiz, LA; y Rubio, JF. 1994. La nutrición férrica de las plantas: El problema de la clorosis. Editum.
- Mandal, K.; Saravanan, R.; Maiti, S; y Kothari, I.L. 2009. Effect of downy mildew disease on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Plantago ovata* Forsk. Journal of Plant Diseases and Protection, 116 (4): 164–168.
- M.A.P.A. 2003. Registro de variedades comerciales de vid. M.A.P.A. Madrid.
- Martín, P.; Núñez, LC; González, MR; Zarco Tejada, PJ; y Alonso A. 2005. Correction of vineyard iron chlorosis by iron lignosulfonate: Influence of yield, vigour and grape composition. Congresos y jornadas-instituto tecnológico agrario de Castilla y León (España) ITACyL.
- Martín, P.; Zarco-Tejada, P. J.; González, M. R.; y Berjón, A. 2007. Using hyperspectral remote sensing to map grape quality in 'Tempranillo' vineyards affected by iron chlorosis. *Vitis*, 46(1), 7–14.
- Martín, P.; Zarco-Tejada, P.J.; González, R.; y González, M.R. 2008. Diagnóstico nutricional y recomendaciones de abonado en suelos calizos de la Ribera del Duero. *Vida Rural*, 270: 26-32
- Martínez de Toda, F. 2011. Claves de la viticultura de calidad. Mundi-Prensa.
- Maxwell, K; y Johnson, GN. 2000. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J Exp Bot* 51(345):659-68.
- Meggio, F.; Zarco-Tejada, P.J.; Núñez, L.C.; Sepulcre-Cantó, G.; González, M.R.; y Martín, P. 2010. Grape quality assessment in vineyards affected by iron deficiency chlorosis using narrow-band physiological remote sensing indices. *Remote Sensing of Environment*, 114: 1968-1986
- Mengel, K; y Malissiovas, N. 1981. Bicarbonat als auslosender faktor der eisenchlorose bei der weinrebe (*vitis vinifera*). *Vitis* .
- Moreno, SG; Vela, HP; y Alvarez, MOS. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista De Educación Bioquímica* 27(4):119-29.
- Oxborough, K. 2004. Using chlorophyll a fluorescence imaging to monitor photosynthetic performance. In: Chlorophyll a fluorescence. Springer. 409 p.

- Rombolà, AD; y Tagliavini, M. 2006. Iron nutrition of fruit tree crops. In: Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms. Springer. 61 p.
- SAS INSTITUTE. 2004. SAS Procedure Guide, Version 9.1.3. SAS Institute Inc. Cary (Estados Unidos).
- Siebke, K; Von Caemmerer, S; Badger, M; y Furbank, RT. 1997. Expressing an RbcS antisense gene in transgenic flaveria bidentis leads to an increased quantum requirement for CO₂ fixed in photosystems I and II. *Plant Physiol* 115(3):1163-74.
- Smart, R; y Robinson, M. 1991. Sunlight into wine: A handbook for winegrape canopy management. Winetitles.
- Tagliavini, M; Abadía, J; Rombolà, AD; Abadía, A; Tsipouridis, C; y Marangoni, B. 2000. Agronomic means for the control of iron deficiency chlorosis in deciduous fruit trees. *J Plant Nutr* 23(11-12):2007-22.
- Tagliavini, M; y Rombolà, AD. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Eur J Agron* 15(2):71-92.
- Taiz, L; y Zieger, E. 2004. Fisiología vegetal.(trad.). Santarem er et al 3.
- Terry, N.; y Abadía, J. 1986. Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr.*, 9: 609-646
- Wang, H.; y Jin, J.Y. 2005. Photosynthetic rate, chlorophyll fluorescence parameters, and lipid peroxidation of maize leaves as affected by zinc deficiency. *Photosynthetica*, 43(4): 591-596
- Zarco-Tejada, PJ; Berjón, A; López-Lozano, R; Miller, J; Martín, P; Cachorro, V; González, M; y De Frutos, A. 2005. Assessing vineyard condition with hyperspectral indices: Leaf and canopy reflectance simulation in a row-structured discontinuous canopy. *Remote Sens Environ* 99(3):271-87.