



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

**Vigor, rendimiento y composición del
mosto en viñedos de Tempranillo
afectados por clorosis férrica en la D.O.
Ribera del Duero**

Alumno/a: Esther Pérez Alejos

Tutor/a: M^a Rosa González García

Junio de 2016

Copia para el tutor/a

Índice

1. Resumen	2
2. Introducción	3
2.1. El hierro en la planta: absorción y transporte	3
2.2. Síntomas de la clorosis férrica	6
2.3. Causas de la deficiencia de hierro	7
2.4. Efectos de la clorosis férrica sobre la actividad fotosintética	8
2.5. Efectos sobre la capacidad productiva del viñedo y la composición de la uva	9
2.6. Diagnóstico y seguimiento de la clorosis férrica	10
3. Objetivos	11
4. Materiales y métodos	12
4.1. Descripción de las parcelas y del material vegetal	12
4.2. Controles y observaciones. Métodos de análisis	12
4.2.1. Determinación del nivel de clorofila foliar en campo	12
4.2.2. Asimilación neta y conductancia estomática	13
4.2.3. Medidas de la fluorescencia de la clorofila a nivel de hoja	14
4.2.4. Vigor del viñedo	15
4.2.5. Rendimiento y sus componentes	15
4.2.6. Composición de los mostos	15
4.2.6.1. pH y acidez total	16
4.2.6.2. Nitrógeno fácilmente asimilable	16
4.2.6.3. Índice de polifenoles totales	16
4.2.6.4. Contenido en potasio	17
4.2.6.5. Grado Brix	17
4.2.6.6. Ácido málico	17
4.3. Análisis de datos	18
5. Resultados y discusión	19
5.1. Relación entre la actividad fotosintética y los niveles foliares de clorofila	19
5.2. Efectos de la clorosis férrica sobre el vigor y rendimiento	20
5.3. Efectos de la clorosis férrica sobre la composición del mosto	22
6. Conclusiones	24
BIBLIOGRAFÍA	25

1. Resumen

La clorosis férrica o carencia nutricional de hierro, es una de las principales fisiopatías que afectan a la viña. Habitualmente, dicha carencia, se produce en suelos con un alto contenido en caliza activa y elevado pH. Siendo este mineral un constituyente esencial para las plantas, su carencia es capaz de alterar gran número de procesos fisiológicos en los que interviene.

El objetivo de este trabajo consiste en evaluar los efectos de la carencia nutricional de hierro sobre la actividad fotosintética, el vigor, las componentes del rendimiento y los parámetros de composición del mosto en las condiciones ecofisiológicas de la Denominación de Origen Ribera del Duero. Por otra parte, se pretende analizar si los niveles de clorofila y los parámetros de eficiencia fotosintética a nivel foliar, en época de envero, son útiles para estimar el rendimiento y la calidad de la vendimia en viñedos afectados por clorosis férrica.

Para poder llevar a cabo los objetivos citados, se ha realizado un seguimiento en campo de la actividad fotosintética y los niveles de clorofila en un conjunto de 20 subparcelas de viñedo en la D.O. Ribera del Duero durante el año 2014. También se obtuvieron los valores de vigor, rendimiento y composición del mosto (contenido en ácido málico, potasio, acidez total, índice de polifenoles, Brix, y pH). El análisis estadístico de los datos incluyó análisis de varianza y métodos de regresión lineal.

Los resultados muestran que la deficiencia de hierro provoca un descenso en la actividad fotosintética, el vigor y el rendimiento en la zona de estudio, pero mejora los índices de madurez tecnológica y el contenido fenólico de la uva. Los valores de asimilación neta y los parámetros de fluorescencia clorofílica medidos en envero podrían ser útiles para la estimación de parámetros como la acidez total y el índice de polifenoles del mosto.

Los parámetros de fluorescencia de la clorofila medidos en envero podrían ser útiles para estimar los vigores de las subparcelas, el contenido en ácidos y polifenoles del mosto en viñedos afectados por clorosis férrica, pero no tanto las componentes del rendimiento del viñedo.

2. Introducción

La carencia de hierro o clorosis férrica es uno de los problemas más comunes en agricultura. Aunque su origen puede ser consecuencia de una carencia directa de hierro en el terreno, está fundamentalmente asociado a suelos con un alto contenido en caliza. La clorosis limita de forma considerable la capacidad productiva del cultivo (Anderson, 1982; Chen y Barak, 1982).

Aunque las necesidades nutricionales de la vid en lo que a elementos minerales se refiere no son elevadas, el hierro resulta ser un micronutriente indispensable. En caso de carencia, el nivel de fotosíntesis será menor, provocando así no solo una pérdida de rendimiento en la vid, sino también una merma importante en las componentes de calidad de las uvas, mostos y vinos (Martín *et al.*, 2007).

Habitualmente el estado nutricional de una planta se valora en función a su concentración foliar, sin embargo, para el caso de la clorosis férrica este parámetro no es plenamente satisfactorio. Es muy común encontrar plantas afectadas por clorosis con concentraciones foliares de hierro similares o superiores a las de las plantas sanas. Esta “paradoja de la clorosis” (Rhömeld, 1997), se debe a una acumulación de hierro fisiológicamente inactivo en las hojas y a un menor desarrollo de éstas, produciendo un efecto de concentración del elemento en los tejidos.

La deficiencia de hierro modifica la absorción, asimilación y transporte de otros nutrientes y provoca la acumulación de zinc, manganeso, cobalto y cadmio en los tejidos entre otros cationes (Curie y Briat, 2003).

2.1. El hierro en la planta: absorción y transporte

En la fotosíntesis el hierro es un elemento clave, ya que, entre otras cosas, interviene en la síntesis de clorofilas (Miller *et al.*, 1984) aunque no forma parte de ellas, e influye en la morfología de los cloroplastos (Abadia, 1992; Marschner, 1995).

Cuando se producen deficiencias de hierro, la estructura del tilacoide se altera y se generan desequilibrios entre clorofilas y carotenos dando lugar al característico color amarillo de las hojas cloróticas.

La deficiencia de hierro además afecta al número de ribosomas de las células, de forma que, en hojas deficitarias su contenido se reduce significativamente con respecto al de hojas sanas (Lin *et al.*, 1997). En casos muy severos de carencia de hierro también puede inhibir la división celular, lo que provoca una reducción del crecimiento de la vid.

El hierro también activa una serie de enzimas, tales como la ácido-aminolevulínico-sintetasa y la coproporfirinógeno-oxidasa, teniendo así un papel importante en las síntesis de RNA. Además interviene en reacciones fundamentales de óxido-reducción (Suazo, 2012).

Absorción

El hierro (Fe) es un elemento que se caracteriza por su facilidad para cambiar de un estado de oxidación Fe (III) a Fe (II) y viceversa, además de por su facilidad para formar complejos. De los dos estados de oxidación en que se presenta el hierro en el suelo, las plantas toman preferentemente el catión soluble Fe (II), por lo que para ello se ven obligadas a reducir la forma predominante en el suelo Fe (III).

Las plantas superiores han desarrollado diferentes mecanismos para aumentar la disponibilidad del hierro en la disolución del suelo. Según el modelo de respuesta, podemos diferenciar dos tipos de plantas, las de “Estrategia I” y las de “Estrategia II”.

- Estrategia I:

Esta estrategia la presentan dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas y se caracteriza por desarrollar varias sub-estrategias.

La vid toma la molécula de Fe (III) y la enzima reductasa de quelatos férricos (FCR) la transforma a Fe (II) en la membrana plasmática de las células de la raíz (Varanini y Maggioni, 1982; Bavaresco *et al.*, 1991; Schmidt, 2003).

- Sub-estrategia I: Consiste en aumentar la actividad de una enzima reductasa para reducir el hierro con electrones provenientes de NADPH citoplasmático. Este sistema es complementario al de la reductasa estándar y da lugar a un aumento de la velocidad de descomposición de los quelatos de Fe³⁺ y por lo tanto, a la toma del hierro reducido por la planta.
- Subestrategia II: Se produce un bombeo al medio de protones (H⁺) y ácidos orgánicos (malato y citrato) desde las raíces hasta la rizosfera con el fin de acidificar la solución del suelo, mejorar la actividad de la reductasa y aumentar la solubilización del hierro (Mengel y Malissiovas, 1982; Bancadoro *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 2007). La liberación de H⁺ da lugar a variaciones morfológicas en las raíces de las plantas. La cantidad de raíces laterales se ve incrementada, aparecen pelos radiculares y se genera una acumulación de mitocondrias cerca de las paredes celulares.

- Subestrategia III: como consecuencia de la acidificación del medio, pueden liberarse sustancias reductoras, principalmente de naturaleza fenólica, que además tiene poder quelante.
- Estrategia II:

Ésta estrategia se desarrolla en gramíneas y en comparación con la “Estrategia I” es mucho más eficaz ya que las plantas no llegan a presentar síntomas de clorosis férrica. Consiste en la liberación de aminoácidos no proteicos, fitosideróforos, capaces de formar complejos muy estables con el Fe^{3+} . De este modo son introducidos en la planta.

Transporte

Una vez que la planta ha reducido el Fe^{3+} a Fe^{2+} , el ion obtenido es desplazado rápidamente a través de la membrana plasmática gracias a un transportador específico de Fe^{2+} (Fox y Guerinot, 1998). Después es conducido hasta las hojas vía xilema en la forma metabólicamente inactiva de complejos de citrato-quelato Fe^{3+} (Curie y Briat, 2003).

Al ser depositado en las hojas, antes de pasar a formar parte del mesófilo foliar, vuelve a reactivarse a Fe^{2+} mediante la intervención de una enzima reductasa similar a la que se encuentra en la membrana plasmática de las raíces.

La proteína que forma parte de la enzima reductasa de quelatos férricos (FCR) es muy sensible al pH, por lo que en este segundo proceso de reducción podría ser inactivada por un incremento de pH en el interior del apoplasto (Nikolic *et al.*, 2000).

Dentro de las células, el hierro inutilizado es de nuevo quelado, esta vez por un aminoácido no proteico, nicotianamina, que sirve para mantener el hierro en su forma soluble y asegurar su correcta distribución entre los distintos tejidos celulares y el floema (Curie y Briat, 2003; Schmidt, 2003; Curie *et al.*, 2009).

La capacidad del floema para transportar el ion Fe^{2+} parece estar relacionada con la respuesta de las plantas a la carencia de hierro. Este hecho hace pensar que las hojas y los tallos deben constituir junto con las raíces un sistema regulador global de la respuesta del vegetal ante situaciones de carencia de hierro.

La existencia de altas concentraciones de Fe (II) en el citoplasma celular tiene efectos tóxicos (Mengel y Kirkby, 2001). Por este motivo, ese hierro en exceso es reducido y almacenado en los cloroplastos en forma de fosfoproteína (fitoferritina), constituyendo una reserva de hierro no tóxica en la célula (Laulhere y Briat, 1993).

2.2. Síntomas de la clorosis férrica

Los primeros síntomas de la clorosis se manifiestan en primavera, época en la que se produce el más activo desarrollo de la vegetación. Las variaciones edáficas de una misma parcela, las condiciones propias de las plantas e incluso las diferencias entre porta-injertos, pueden originar una falta de uniformidad del desarrollo de la carencia en el viñedo.

La pérdida gradual o total de producción de clorofila y la desorganización de los cloroplastos se manifiesta externamente en la coloración de los órganos verdes, acompañado de raquitismo, fundamentalmente de las extremidades de los pámpanos (Hidalgo, 1999). Las hojas más jóvenes serán las primeras afectadas, mostrando tonalidades verde claras.

Según vaya avanzando el estado carencial se podrá observar la característica clorosis inter-nervial, sólo quedan de color verde los nervios, contrastando con el color amarillento del limbo. Aunque en casos de carencia fuerte, el amarilleamiento puede llegar a ser total y aparecen zonas necróticas en los bordes del limbo, produciéndose una caída precoz de las hojas.

En casos aún más graves la afección se generaliza, las hojas jóvenes detienen su crecimiento, se enrollan, se secan y caen, los pámpanos dejan de crecer y quedan con los entrenudos de color rosa, desarrollándose pequeñas hojas muy dentadas, inicialmente verdes que también se decoloran rápidamente, pudiendo llegar a secarse y caer, adquiriendo la planta un aspecto raquíptico y arrepollado.

Debido a la disminución de vigor por la falta de función clorofílica antes del cuajado, la producción se ve seriamente afectada. Los zarcillos e inflorescencias también se vuelven cloróticos y la fructificación es pobre (Gärtel, 1993).

Paralelamente se produce una desaparición parcial del almidón de las partes vivaces. Estas dificultades en el agostamiento se traducen en una brotación tardía al año siguiente, un crecimiento más débil y por consiguiente en un adelanto de los síntomas de la clorosis férrica.

La clorosis de las hojas es un síntoma común de gran número de afecciones parasitarias y no parasitarias de la vid, incluyendo carencias de otros oligoelementos como el magnesio, cinc, manganeso o boro. El ambiente edáfico que favorece la carencia de hierro en los cultivos afecta también a la asimilación de otros oligoelementos como el cobre, el manganeso y el zinc.

2.3. Causas de la deficiencia de hierro

Aunque el hierro es el cuarto elemento más abundante en la superficie terrestre, en suelos alcalinos y calcáreos (Chen y Barak, 1982), se encuentra en forma de óxidos e hidróxidos de muy baja solubilidad, por lo que su disponibilidad para la planta es baja. Varias pueden ser las causas que induzcan un déficit de hierro (Marschner, 1995):

- Carencia directa por disponibilidad de hierro en el suelo; Existe una serie de factores que afectan a la solubilidad y movilidad del hierro en el suelo:
 - pH: el aumento de una unidad de pH supone una disminución de solubilidad de hierro del orden de mil unidades.
 - Aireación: debido a la presencia de oxígeno, el hierro generalmente se encuentra en la forma oxidada Fe^{3+} .
 - Estructura del hierro: la mayoría del hierro se presenta con una estructura mineral muy cristalina, que durante la meteorización en medios aerobios precipitan como óxidos e hidróxidos de Fe (III) muy insolubles.
 - Potencial redox del suelo: pH ácidos y condiciones reductoras, aumentan la concentración de hierro soluble.
 - Cantidad de agentes quelantes: El ion férrico en presencia de muchas moléculas orgánicas e inorgánicas forma complejos solubles (Loeppert, 1986).

- Carencia inducida por la caliza activa del suelo:

A pesar de que el hierro puede ser abundante en terrenos calcáreos, las altas concentraciones de iones bicarbonatos (HCO_3^-) y el pH de la disolución afectan a la toma y transporte del hierro por la planta. La mayoría de los suelos calizos tienen un pH en torno a 7,5 - 8,5. A estos pH, la concentración de hierro soluble es bastante baja (Lindsay, 1979, 1991; Lindsay y Schwab, 1982) y además afecta de forma negativa a la puesta en marcha de las estrategias de defensa de la planta. Los factores que favorecen en suelos calizos el déficit de asimilación del hierro son:

- Humedad y aireación: un exceso de humedad reduce la disponibilidad del Fe (así como el N, K, y Mn) y restringe el crecimiento de las raíces. La falta de aireación en suelos compactos aumenta el contenido de HCO_3^- porque se reduce la difusión de CO_2 (Currle *et al.*, 1983; Williams *et al.*, 1994).
- Temperatura del suelo: Si además de un exceso de humedad, existen bajas temperaturas en el terreno, se ve provocada una disminución del desarrollo radicular y consecuentemente de la capacidad de absorción del hierro (Chaney, 1984; Davenport y Stevens, 2006).

- Profundidad de la capa laborable: La exploración de horizontes pobres en hierro o ricos en caliza por las raíces de la vid, como defensa de supervivencia en terrenos secos o en periodos de sequía, causan la aparición de la clorosis.
- Vigor: El vigor conferido por el porta-injerto interviene en la resistencia a la clorosis.
- Edad del viñedo: Influye en la intensidad del ataque. Las cepas jóvenes son más sensibles debido al vigor de las mismas.

2.4. Efectos de la clorosis férrica sobre la actividad fotosintética

El complejo antena o complejo recolector de luz, se encuentra presente en los cloroplastos. La luz recolectada por dicho complejo está formada por fotones y la energía de cada uno de ellos es absorbida en cualquier punto del conjunto de moléculas de clorofila de la antena, migrando después a un centro de reacción que promueve la transferencia de los electrones. La energía de los fotones absorbida por la clorofila es transferida por resonancia inductiva hasta los centros de reacción y al haber muchos pigmentos en la antena, hacen que se absorba luz con diferente longitud de onda, lo que permite un mayor espectro de absorción y genera una mayor eficacia en la fotosíntesis (Calero, 2010).

La energía creada en esta fase será utilizada durante la fase oscura, para de esta forma continuar con la fotosíntesis (Lincoln, 2006).

La eficiencia de captación de luz y de la carboxilación en las hojas se ve regulada a la baja, en respuesta a la deficiencia de Fe (Larbi et al., 2006). Se ha visto que esta deficiencia causa una reducción en la regeneración de la enzima RuBisCo, reduciendo por lo tanto a su vez la fijación de CO₂ y la fotorespiración (Arulanantham et al., 1990).

Son varios los parámetros de fluorescencia de la clorofila que han mostrado ser útiles para evaluar el rendimiento fotosintético, conteniendo información sobre el estado fisiológico de las plantas y su respuesta a cambios ambientales. La obtención de los parámetros de fluorescencia ha resultado ser un método interesante para la evaluación del estado fotosintético de las plantas, debido a su rapidez y versatilidad (Iacono y Sommer, 1999).

La principal utilidad de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila, es su uso como fuente de información acerca del estado del fotosistema II en las hojas. Esto permite estimar el estado fotosintético bajo condiciones en las que otros métodos podrían no resultar efectivos (Maxwell y Johnson, 2000). Los daños en el fotosistema II son frecuentemente la primera manifestación del estrés en las hojas (Maxwell y Johnson, 2000).

La reducción en la fotosíntesis neta en condiciones de deficiencia de hierro ha sido observada en muchas especies de plantas (Terry y Abadía, 1986; Abadía, 1992; orales et al., 2000; Larbi et al., 2006) y se atribuye principalmente a la disminución de la eficiencia del fotosistema II, debido al cierre de centros de reacción y a la propia reducción de la eficiencia intrínseca del fotosistema II (Morales et al., 2000; Covarrubias et al., 2014).

Diversos autores han utilizado con éxito los parámetros de fluorescencia de la clorofila para la detección de diferentes tipos de estrés. Por ejemplo; F_s y el ratio F_s/F_o podrían resultar útiles para la detección precoz del estrés hídrico en vides (Flexas et al., 2002c) y F_v/F_m resulta ser una buena herramienta para detectar el estrés por altas temperaturas (Baker y Rosenqvist, 2004).

Otros autores han estudiado el comportamiento de diferentes parámetros de la fluorescencia de la clorofila en condiciones de clorosis férrica. La deficiencia de hierro se traduce a nivel fisiológico en un descenso de la concentración de pigmentos fotosintéticos y de la tasa de transporte de electrones en la fotosíntesis (Bavaresco et al., 2006).

La deficiencia de hierro induce un aumento considerable del nivel inicial de fluorescencia F_o y una disminución de la proporción de fluorescencia variable F_v (Morales et al., 1991), lo que refleja una pérdida de eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Greene et al., 1992). Además, puede apreciarse un descenso en la relación entre fluorescencia variable y fluorescencia inicial (F_v/F_o) (Molassiotis et al., 2006).

La reducción producida en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II puede ser cuantificado mediante el parámetro F_v/F_m (Bertamini et al., 2001). Los valores de F_m y la relación F_v/F_m disminuyen a medida que se acentúa la clorosis férrica (Pestana et al., 2005).

La relación F_v/F_m es menor en hojas cloróticas que en hojas sanas y además la clorosis férrica reduce el transporte aparente de electrones (ETR) y el apagado fotoquímico (qP) (Bavaresco et al., 2006). En definitiva, la disminución de la eficiencia del fotosistema II (PSII) se debe a una disminución del apagado fotoquímico y de la eficiencia intrínseca del mismo (Abadía et al., 1999).

2.5. Efectos sobre la capacidad productiva del viñedo y la composición de la uva

En plantas cloróticas la alteración de los procesos fotosintéticos se traduce en un lento y reducido crecimiento, limitando a su vez potencialmente la productividad y el vigor del viñedo (Anderson, 1982; Chen y Barak, 1982; Tagliavini y Rombolá, 2001).

Las pérdidas de rendimiento en cultivos frutales pueden deberse a la disminución en el número de frutos por árbol, la disminuciones en el tamaño del fruto o una combinación de ambos factores (Álvarez-Fernández, 2006). En la vid, la deficiencia de Fe induce una reducción de la tasa de cuajado, disminuye el diámetro de la baya y la compacidad de los racimos (Bavaresco et al., 2010a).

Las condiciones de estrés por clorosis férrica pueden disminuir el tamaño de la hoja, la fotosíntesis del conjunto del dosel y la producción total de materia seca (Kosegarten et al., 1999; Bavaresco y Poni, 2003; Bertamini y Nedunchezian 2005). Una severa carencia nutricional de hierro puede causar una drástica reducción en la longevidad y la productividad del viñedo, el crecimiento de la raíz y tallos y pérdidas en el rendimiento y la calidad de la uva (Bavaresco et al., 2003).

Por otro lado, como consecuencia de estos cambios fisiológicos, se produce una maduración deficitante de las uvas, lo cual acarrea la reducción de la acumulación de azúcares, que a su vez se traduce en la obtención de bajas graduaciones alcohólicas (Hidalgo, 1999), así como desequilibrios fenólicos y bajos niveles de pigmentos, e incrementos de la acidez total (Castino *et al.*, 1987; Veilksar *et al.*, 2005). La capacidad fotosintética de la viña y la exposición a la radiación solar influyen en la síntesis y acumulación de los compuestos fenólicos en las uvas durante la maduración (Pirie y Mullins, 1980; Smart y Robinson, 1991).

La deficiencia de hierro modifica los procesos de síntesis y acumulación de compuestos aromáticos y polifenoles en la uva, lo que puede llevar a defectos patentes en el aroma, color y las propiedades de astringencia de los vinos (Catalina, 2016).

Sin embargo, la clorosis férrica leve puede mejorar la calidad del vino debido al incremento en la calidad de la uva en cuanto a los sólidos solubles, pH, antocianinas y el resveratrol. Es probable que la alta concentración de azúcar y polifenoles sea consecuencia de la reducción del rendimiento de uva, relacionado con un peso medio del racimo y de la baya más bajo. Las concentraciones totales de antocianinas y polifenoles son mayores en vides cloróticas debido a la mayor proporción de contacto ente el hollejo y la pulpa como consecuencia de la reducción de tamaño de las bayas (Bavaresco et al., 2005).

2.6. Diagnóstico y seguimiento de la clorosis férrica

Para corregir la carencia es necesario disponer de métodos de diagnóstico correctos. El método más directo para la evaluación de la intensidad de la carencia de hierro es la medida de pigmentos foliares. El contenido foliar de clorofila puede estimarse fácilmente en campo mediante colorímetros portátiles como el denominado SPAD (Peryea y Kammereck, 1997). Sin embargo, la clorosis de las hojas puede ser causada por el suministro deficitario de elementos esenciales para el desarrollo de la planta, por la existencia de un estrés hídrico o por el ataque de insectos, hongos, bacterias y virus.

Es importante realizar un análisis edáfico que incluya mediciones de la disponibilidad de hierro, así como pruebas que determinen el contenido de caliza activa (Pestana *et al.* 2003).

Los análisis químicos de distintas estructuras vegetales se utilizan para la determinación de la concentración de hierro total y extraíble y para ver las relaciones entre micronutrientes y otros compuestos capaces de predecir o diagnosticar la clorosis férrica.

A nivel foliar, se ha descartado el uso de mediciones de hierro total, debido a la comprobada existencia de hierro inactivo en el apoplasto de la hoja de especies vegetales sobre suelos calcáreos (Morales *et al.*, 1998; Bavaresco *et al.*, 1999; Álvarez – Fernández *et al.*, 2000).

Los procesos fotosintéticos pueden verse modificados de diferentes maneras, ya que algunos se inactivan o regulan de un modo deficitario y otros en cambio permanecen prácticamente inalterados. En el caso de la deficiencia de Fe, la reducción de la tasa fotosintética en las hojas cloróticas se atribuye a la reducción de la eficiencia del fotosistema II, variable que puede ser estimada mediante medidas de la fluorescencia de clorofila (Morales *et al.*, 2000; Covarrubias *et al.*, 2014).

La medida de la fluorescencia de la clorofila podría ser una herramienta muy útil para detectar el estrés en las plantas en una etapa temprana, cuando aún no hay síntomas visibles de clorosis. Esta técnica, no invasiva, proporciona información rápida y extensa acerca de la eficiencia fotosintética, la integridad del aparato fotosintético, la funcionalidad de los diferentes mecanismos fotoprotectores y la tasa de transferencia de electrones (Maxwell y Johnson, 2000; Baker y Rosenqvist, 2004).

3. Objetivos

El objetivo de este trabajo consiste en evaluar los efectos de la carencia nutricional de hierro sobre la actividad fotosintética, el vigor, las componentes del rendimiento y los parámetros de composición de la uva en las condiciones ecofisiológicas de la Denominación de Origen Ribera del Duero.

Por otra parte se pretende analizar si los niveles de clorofila y los parámetros de eficiencia fotosintética a nivel foliar, en época de envero, son útiles para estimar el rendimiento y la calidad de la vendimia en viñedos afectados por clorosis férrica.

4. Materiales y métodos

Con el fin de llevar a cabo los objetivos planteados en el anterior apartado, se realizó el seguimiento de un conjunto de 20 subzonas de viñedo en la zona oeste de la D.O. Ribera del Duero durante el año 2014.

4.1. Descripción de la zona de estudio y selección de las subzonas

El área de estudio se encuentra a una altitud media de 800 m.s.n.m. con pendientes suaves y suelos arcillo-arenosos. Son además suelos poco profundos, fuertemente calcáreos, permeables y de textura media-gruesa.

El clima es de tipo mediterráneo y con carácter continental. Los inviernos son fríos y con un largo periodo de heladas y los veranos son cortos, secos y calurosos.

Con un portainjerto como el 110- R, sensible a la clorosis férrica, existen en el área de estudio zonas afectadas y no afectadas por deficiencia de hierro. Las subzonas se seleccionaron buscando la máxima variabilidad en este sentido.

Cada subzona cuenta con una superficie aproximada de 10 x 10 m², corresponde a viñedo de secano en plena producción de la variedad Tempranillo, injertada sobre 110-Richter. El viñedo está conducido en espaldera en doble cordón Royat.

La densidad de plantación ronda las 2.200 plantas/ha y la carga habitual es de 16 yemas por planta, repartidas homogéneamente en cada brazo, resultando una carga aproximada de 36.000 yemas/ha.

La variedad Tempranillo es la principal en la Ribera de Duero y es por lo general una variedad de porte erguido, vigoroso y con sarmientos largos. Su brotación es relativamente tardía y su maduración temprana. Además, es especialmente sensible al oídio y a la acariosis.

El portainjerto 110-Richter (*Vitis berlandieri* cv. *Rességuier n° 2* x *Vitis rupestris* cv. *Martin*) presenta una amplia adaptabilidad a distintas condiciones edáficas, es tolerante a la sequía y sensible al encharcamiento. Retrasa la maduración, absorbe bien el potasio y es poco eficiente en la absorción del magnesio.

4.2. Controles, observaciones y métodos de análisis

4.2.1 Determinación del nivel de clorofila foliar en campo

Para realizar la medida de clorofila en campo se ha utilizado el medidor portátil de clorofila CL-01 (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK). Dicho medidor utiliza un

fotodiodo de silicón para detectar la transmitancia de la hoja desde dos luces emitidas por los diodos: una con un pico de emitancia de 650 nm, y otra de 940 nm.

Las lecturas del CL-01 se correlacionan con la concentración de clorofila a+b por unidad de superficie foliar. Puede comprobarse en el caso de la variedad Tempranillo (González et al., 2005a) con la siguiente recta de regresión:

$$y = (6,0817x) + 7,6084$$

Donde;

x = ABS CL-01

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

Las medidas se tomaron en el estado fenológico de envero. Se realizaron 30 lecturas en cada una de las subzonas en distintas plantas y a distintas alturas de un modo aleatorio.

4.2.2 Asimilación neta y conductancia estomática

Las medidas se llevaron a cabo en el envero, utilizando un analizador portátil de gases por infrarrojo (IRGA) LI-Cor 6400, equipado con una cámara de medida de fluorescencia 6400-40 (Li-Cor, Inc. Lincoln, Nebr., EE.UU).

La densidad de flujo de fotones fotosintético incidente (PPFD) en las hojas se fijó en $1500 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, que está por encima de la saturación fotosintética en vides cultivadas en el campo (Escalona et al., 1999; Flexas et al., 1998) y el nivel de CO_2 en el analizador se mantuvo constante a $370 \text{ mol } \text{CO}_2\cdot\text{mol}^{-1}$ de aire. La temperatura, presión y humedad relativa se mantuvieron a niveles ambientales y el caudal de aire a través de la cámara de medida se mantuvo fijó en $500 \text{ mol}\cdot\text{s}^{-1}$.

Los factores de absorción de los fotones en las longitudes de onda 635 nm (rojo) y 465 nm (azul) dentro del espectro de radiación fotosintética activa (PAR) de las hojas en cada subzona se introdujeron en el IRGA, ya que las propiedades espectrales de la hoja se ven fuertemente afectadas por diferentes variables, entre ellas la pigmentación (Walter-Shea et al., 1991) y por lo tanto, la precisión de las medidas de la fluorescencia depende directamente de ello. Esto fue estimado a partir de los datos de la concentración de clorofila en la hoja previamente obtenidos con el medidor portátil CL-01 (González et al., 2005a).

El LI 6400 dispone de un circuito abierto, lo que significa que la fotosíntesis y la conductancia estomática se basan en las medidas de diferencia de concentración de CO_2 y H_2O entre el flujo de aire que fluye por la hoja y el de una corriente de aire análoga que no ha tenido contacto con la misma. El aparato dispone de dos analizadores de gases para determinar las tasas de fotosíntesis neta y conductancia estomática a través de las siguientes expresiones:

$$\text{Fotosíntesis neta (Pn)} = (\text{flujo de aire} \times \Delta\text{CO}_2) / \text{área foliar}$$

$$\text{Conductancia estomática (gs)} = (\text{flujo de aire} \times \Delta\text{H}_2\text{O}) / \text{área foliar}$$

4.2.3. Medidas de la fluorescencia de la clorofila a nivel de hoja.

Las medidas de la fluorescencia de la clorofila se llevaron a cabo mediante la cámara de fluorescencia acoplada en el analizador portátil LI-Cor 6400. La cámara del equipo contiene una serie de diodos emisores de luz y detectores que captan la señal fluorescente. Los parámetros de fluorescencia medidos por el equipo en las hojas fueron los siguientes:

- F_o' (mínimo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz): Se obtiene después de la aplicación de un flash saturante, eliminando la luz actínica (Maxwell y Johnson, 2000).
- F_m' (máximo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz): Se obtiene al aplicar luz actínica y flashes de luz saturantes en intervalos apropiados.
- F_s (fluorescencia estacionaria en hojas adaptadas a la luz): Se obtiene del valor de la fluorescencia inmediatamente anterior al flash.

Por otra parte el equipo Li-6400, registra las siguientes relaciones entre los parámetros anteriores, aportando así información sobre el comportamiento fotosintético de la planta:

- F_v' (diferencia entre el máximo y el mínimo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz). Se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$F_v' = F_m' - F_o'$$

- Φ_{PSII} (eficiencia del fotosistema II en operativo): Se obtiene mediante la fórmula:
 $(F_m' - F_s) / F_m'$

Este parámetro indica la proporción de luz absorbida por la clorofila asociada al fotosistema II y que es usada en los procesos fotoquímicos. Existe una relación lineal entre este parámetro y la fijación de carbono, aunque en ciertas situaciones de estrés se pueden encontrar anomalías (Maxwell y Johnson, 2000). El parámetro estima la eficiencia con la que la luz absorbida por las antenas del fotosistema II es convertida en energía química.

- q_P (apagado fotoquímico) Se obtiene mediante la fórmula:

$$(F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$$

Este parámetro indica la proporción de los centros de reacción del fotosistema II que están abiertos. Relaciona la máxima eficiencia del fotosistema II con la eficiencia a la que opera.

- F_m' / F_v' ; Máxima eficiencia del fotosistema II: Máxima eficiencia con la que la luz absorbida por las antenas del fotosistema II es convertida en energía química. Se obtiene a partir del siguiente cálculo:

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m = (\Phi_{PSII}/qP)$$

- ETR (Ratio de transporte de electrones): Se calcula de la siguiente manera:

$$ETR = PPFD \times \Phi_{PSII} \times 0,5$$

Donde;

PPFD es la densidad del flujo de fotones incidente ($\mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

El factor 0,5 tiene en cuenta el reparto de energía entre el PSII y el PSI. Se asume que el 50% de la energía es absorbida por el PSII (Genty et al., 1989).

4.2.4. Vigor del viñedo

Como índice de vigor se ha tomado el peso de madera de poda, expresado en $\text{kg de madera}\cdot\text{m}^{-2}$. Además se realizó el conteo de sarmientos por unidad de superficie y el control del peso medio de los mismos.

4.2.5. Rendimiento y sus componentes

Para estimar el rendimiento de cada subparcela se contabilizaron los racimos y se pesaron. A partir de estos datos se obtuvo el rendimiento ($\text{Kg uva}\cdot\text{m}^{-2}$) y el peso medio del racimo en gramos.

El número medio de racimos por brote se calculó teniendo en cuenta el número de sarmientos por unidad de superficie contabilizados en la poda.

Además se determinó el peso de cien bayas, pesando las muestras que después se utilizaron para los análisis de la composición del mosto. El muestreo se realizó cogiendo uvas al azar de distintas plantas, brazos de las plantas, racimos y de zonas distintas de los propios racimos, para que los resultados de los análisis posteriores fueran lo más representativos posibles.

4.2.6. Composición de los mostos

Se extrajo el mosto triturando las uvas con una batidora manual y separándolo de la fracción sólida mediante un colador y un embudo. El mosto obtenido se depositó en tubos Falcon para centrifugarlo durante tres minutos a 3500 rpm en una centrífuga Centronic-BL (JP Selecta S.A., Barcelona). Después se realizaron las siguientes analíticas:

4.2.6.1. pH y acidez total (AT)

Las medidas de acidez total y pH se obtuvieron mediante una valoración potenciométrica siguiendo la metodología oficial de la UE, establecida en el reglamento CEE 2676/90 (Comisión Europea, 1990).

Se utilizó un equipo automatizado de valoración 702-SM Titrino acoplado a un cambiador de muestras 730-SC (Metrohm Schweiz AG, Zofingen, Suiza). Una vez el equipo estuvo perfectamente calibrado con las correspondientes soluciones patrón, se procedió a realizar una medida del pH inicial del mosto, para posteriormente valorar las muestras con NaOH 0,1N hasta alcanzar un pH de 7,00.

La acidez se expresó en g/l de ácido tartárico según los ml de NaOH 0,1 N empleados para neutralizar la muestra (García-Barceló, 1990).

4.2.6.2. Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA)

El nitrógeno fácilmente asimilable es la principal fuente de alimento de las levaduras durante la fermentación, por lo que es importante la acumulación de unas concentraciones mínimas para que no sea un factor limitante a la hora de realizar las vinificaciones.

Para su estimación se utilizó el mismo equipo automatizado de valoración 702-SM Titrino acoplado a un cambiador de muestras 730-SC (Metrohm Schweiz AG, Zofingen, Suiza).

El método utilizado se basa en añadir una solución de formaldehído a la muestra en unas condiciones de pH concretas. La reacción del formaldehído con el amonio y las aminas primarias produce protones en el medio que hacen disminuir el pH. La valoración con NaOH hasta restablecer el pH inicial permite hacer un cálculo del nitrógeno fácilmente asimilable que existe en el medio a partir del volumen de base utilizado.

Una vez el equipo estuvo perfectamente calibrado con las correspondientes soluciones patrón, se procedió a neutralizar las muestras con NaOH 0,1N hasta alcanzar un pH de 8,5. Posteriormente, sobre 10 ml de cada una de las muestras obtenidas fueron añadidos 4ml de formaldehído previamente neutralizado a pH 8,5.

Para finalizar, se neutralizaron de nuevo las muestras a pH 8,5 con NaOH 0,1 N en el valorador. El cálculo del nitrógeno asimilable de la muestra se realizó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Nitrógeno fácilmente asimilable (mg/l)} = \text{ml NaOH } 0,1 \text{ N} \times 14$$

4.2.6.3. Índice de polifenoles totales (IPT)

Los compuestos fenólicos son los responsables del color del mosto y del vino. Para determinar el IPT se aplica sobre la muestra un espectro de emisión opuesto (radiación UV a 280nm) y se mide la cantidad de radiación que la atraviesa. La absorbancia a 280 nm es una medida muy útil para estimar la intensidad colorante en mostos de uvas tintas ya que a ésta longitud de onda los anillos bencénicos,

característicos de los compuestos fenólicos presentes en mostos y vinos, absorben fuertemente la radiación ultravioleta. Para las medidas espectrofotométricas de las muestras se emplea como medida de referencia agua destilada.

La absorbancia del mosto a 280 nm se determinó mediante un espectrofotómetro ultravioleta/visible (V-530, Jasco Inc, Easton, Maryland, Estados Unidos), utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mm de longitud de paso. La medición se realizó directamente sobre las muestras de mostos.

El IPT se obtuvo multiplicando los resultados del espectrofotómetro por 10, para expresar el valor según el método oficial, ya que se utilizan cubetas de 10mm.

4.2.6.4. Contenido en potasio (K)

El potasio es un factor de considerable influencia sobre el balance ácido de mostos y vinos, afectando al pH y a la limpidez del vino, que puede verse disminuida por la formación de cristales de bitartrato.

El contenido en potasio se determinó mediante fotometría de llama siguiendo la metodología oficial de la UE establecidos en el reglamento CEE 2676/90 (Comisión Europea, 1990).

Se utilizó un fotómetro PFP-7 Jenway (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Reino Unido), con filtro específico para mediciones de potasio.

Para calibrar el aparato se preparó una solución de referencia con potasio y con diversos aniones, cationes y compuestos orgánicos (etanol, ácido cítrico, sacarosa, glicerol, fosfato mono-sódico, cloruro cálcico y cloruro magnésico) en proporciones similares a las que existe en el vino. Como el rango de concentración de potasio en el mosto es muy elevado para la sensibilidad del método, se realizaron diluciones de las muestras utilizando una solución que contenía los mismos componentes que la solución de referencia exceptuando el potasio. El contenido en potasio del mosto se expresó en mg/l.

4.2.6.5. Grado Brix

Los grados Brix de los mostos se obtuvieron mediante el refractómetro digital DR-101 BRIX de Optic ivymen, a una temperatura de 20°C. Una vez calibrado el refractómetro y se tomaron las medidas de los mostos.

4.2.6.6. Ácido málico

El contenido en ácido málico se obtuvo mediante el método enzimático (Método Oficial de la CEE) empleando cartuchos de kits enzimáticos (Novakit, SL). Los reactivos vienen preparados en un kit (Novakit, Biotech Products), y son los siguientes:

Solución 1: Tampón de glicilglicina (pH 10.0) con ácido l-glutámico.
Solución 2: B-NAD liofilizado. (Reconstituir con agua bidestilada 6 ml)

Suspensión 3: Glutamato-oxolacetato-transaminasa (GOT), en sódico n de sulfato de amonio.

Solución 4: l-malato deshidrogenasa (L-MDH) en sódico n de glicerina, ácido L-málico (Fluka) y agua mili-Q.

En primer lugar, sobre cubetas de PVC de 1 cm se prepararon las soluciones requeridas para cada muestra y el blanco mediante los reactivos anteriormente señalados siguiendo la metodología descrita por García-Barceló (1990).

Una vez preparadas y bien mezcladas las muestras se dejaron reposar durante 30 segundos, después de los cuales se añadieron 0,01 ml de reactivo 3 al blanco y a cada muestra respectivamente. Se mezcló todo bien de nuevo y se dejó reposar de 10 a 15 minutos. Después se procedió a la lectura de la absorbancia para cada muestra a una longitud de onda de 340 nm, tomando como referencia el blanco preparado (A1).

Tras esta lectura, en las mismas cubetas, se añade el reactivo 4 (0,01 ml por solución) dejándolo reposar 5-10 minutos y volviendo a medir a la misma longitud de onda (A2).

El contenido de ácido málico en g/L será el resultado del cálculo:

$$(\text{g/l de ácido málico}) = 0,472 \times (A2 - A1)$$

4.3. Análisis de datos

El tratamiento de los datos se ha realizado mediante el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute INC, 2004).

Las relaciones entre el contenido foliar de clorofila, la eficiencia fotosintética, el vigor, el rendimiento y los componentes de calidad del mosto se han analizado mediante métodos de regresión lineal y análisis factoriales de la varianza, separando las medias con el test de Tukey.

5. Resultados y discusión

Para estudiar los efectos de la clorosis férrica sobre la actividad fotosintética y el comportamiento agronómico del viñedo se ha realizado una partición equilibrada de las subzonas (el mismo número de elementos en cada clase) en las de alto, medio y bajo nivel de clorofila foliar.

El efecto más obvio de la deficiencia de Fe es una gran disminución de las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en las hojas de las plantas afectadas (Val et al., 1987; Morales et al., 1990, 1994). La concentración de clorofila foliar se considera un indicador de la capacidad fotosintética de las plantas (Taiz y Zeiger, 2002), e indica también el contenido de nitrógeno foliar y la salud general de la planta (Ling et al., 2011).

5.1. Relación entre la actividad fotosintética y los niveles foliares de clorofila

En la Tabla 1 se muestra la comparación de los valores medios de parámetros de eficiencia fotosintética respecto en los grupos de subparcelas con diferente nivel foliar de clorofila. No se observan diferencias significativas en cuanto a asimilación neta y conductancia estomática. Sin embargo, en el estudio de la eficiencia del fotosistema II en operativo, se han obtenido diferencias significativas respecto a los distintos niveles de clorofila de las subparcelas (Tabla I). El máximo valor de eficiencia se obtiene en el caso de las parcelas con alto nivel de clorofila foliar, que difiere significativamente del valor obtenido para el nivel de clorofila bajo. Para niveles medios de clorofila foliar, no se han obtenido diferencias significativas respecto a ninguno de los otros dos niveles.

Tabla 1. Valores medios de asimilación neta (Pn), conductancia estomática (gs) y parámetros de fluorescencia de la clorofila en el conjunto de parcelas clasificadas por su nivel foliar de clorofila en enero.

	Nivel de clorofila					
	Alto		Medio		Bajo	
Pn ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	12,67	a	11,51	a	10,75	a
gs ($\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	0,168	a	0,144	a	0,143	a
Fo'	547,22	a	591,17	a	574,82	a
Fm'	1030,30	a	1177,26	a	1153,60	a
Fv/Fm'	0,487	a	0,489	a	0,501	a
Fs	905,37	a	1008,34	a	1033,54	a
PSII	0,136	a	0,119	ab	0,110	b
qP	0,300	a	0,274	a	0,235	a
ETR	92,86	a	81,22	ab	75,34	b

Fo': mínimo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz; Fm': máximo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz; Fv/Fm': máxima eficiencia del fotosistema II; Fs: fluorescencia estacionaria en hojas adaptadas a la luz; PSII: eficiencia del fotosistema II en operativo; qP: apagado fotoquímico; ETR: ratio de transporte de electrones. En cada una de las variables, los valores con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$, test Tukey).

La variación en los valores de la eficiencia del fotosistema II se debe a una disminución del apagado fotoquímico y de la eficiencia intrínseca del PSII (Abadía et al., 1999). En el presente estudio el apagado fotoquímico tiende a disminuir en las parcelas con bajo nivel de clorofila aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

Es bien conocido que la deficiencia de hierro produce un descenso en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II en los cultivos, (Nedunchezian et al., 1997; Morales et al., 2000; Bertamini et al., 2002; Bavaresco et al., 2006) atribuible a las alteraciones de la ruta biosintética de la clorofila, una estequiometría alterada entre el PSI y PSII, o la inactividad de proteínas del PSI y PSII como el complejo citocromo b6f del que el Fe es un constituyente fundamental.

Para el ratio de transporte de electrones, también se han obtenido diferencias significativas entre subparcelas con distintos niveles foliares de clorofila, de acuerdo con lo observado por Bavaresco et al. (2006). El máximo valor se obtiene en las parcelas con altos niveles de clorofila foliar, que difiere significativamente del valor obtenido para el nivel de clorofila bajo. Los niveles medios de clorofila foliar no han obtenido diferencias significativas respecto a ninguno de los otros dos niveles.

5.2. Efectos de la clorosis férrica sobre el vigor y rendimiento

La Tabla 2 presenta los resultados del análisis de los valores medios de los parámetros de rendimiento y vigor en relación a los distintos niveles foliares de clorofila en enero. Puede observarse cómo las subparcelas afectadas por clorosis férrica manifiestan un vigor (peso de madera de poda) inferior al de las parcelas con alto nivel foliar de clorofila.

El rendimiento (kg uva/ha) muestra su máximo valor cuando el nivel foliar de clorofila de las parcelas es alto y va decreciendo a medida que el nivel de clorofila de las parcelas lo va haciendo. Existen diferencias significativas para niveles altos y bajos de clorofila, pero no entre los niveles de clorofila medios con el resto.

Tabla 2. Valores medios de los parámetros de rendimiento y vigor respecto a los niveles de clorofila foliar de las parcelas.

	Nivel de clorofila					
	Alto		Medio		Bajo	
Rto (Kg uva/ha)	10.834,53	a	9.109,12	ab	6.211,77	b
P100 (g)	206,12	a	204,53	a	207,31	a
PMR (g)	392,74	a	342,54	ab	298,87	b
NRB (ud.)	1,91	a	1,97	b	1,48	c
PMP (kg/ha)	1.783,47	a	1.509,80	ab	1.043,15	b

Rto: rendimiento; P100: peso de 100 bayas; PMR: peso medio del racimo; NRB: número de racimos por brote; PMP: peso de madera de poda (vigor). Los valores con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$, test Tukey).

Como puede observarse en la Tabla 2, la disminución del rendimiento en las subzonas cloróticas se debe tanto a la disminución de la fertilidad de las yemas (número de racimos por brote) como a la merma en el tamaño del racimo. El peso de cien bayas no muestra diferencias significativas en los tres niveles de clorofila foliar.

Los resultados del estudio de regresión recogidos en la Tabla 3 muestran cómo todas las componentes del rendimiento se relacionan directamente con el nivel foliar de clorofila y los valores de asimilación neta registrados en enero. Para el peso de cien bayas se obtienen regresiones significativamente positivas en relación a la asimilación neta, el mínimo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz y en la máxima eficiencia del fotosistema II.

Por su parte el peso medio de la madera de poda no obtuvo regresiones significativas con la asimilación neta, pero sí con al máximo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz, la eficiencia del fotosistema II, al apagado fotoquímico y al ratio de transporte de electrones (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficiente de determinación R^2 y pendiente de la regresión lineal de los parámetros de rendimiento y vigor respecto al nivel foliar de clorofila en enero y las variables de eficiencia fotosintética.

	Rto (kg uva/ha)	P100 (g)	PMR (g)	NRB (Uds.)	PMP (Kg/ha)
CL (uds. de clorofila)	(+)0,463*	0,004	(+)0,355*	(+)0,334*	(+)0,459*
Pn ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	0,166	(+)0,277*	(+)0,290*	(+)0,197*	0,026
Fo'	0,025	(+)0,198*	0,077	0,027	0,050
Fm'	0,123	0,0004	0,095	0,040	(+)0,226*
Fv'/Fm'	0,036	(+)0,341*	0,0008	0,035	0,088
Fs	0,135	0,0001	0,115	0,077	0,193
PSII	0,185	0,0343	0,158	0,133	(+)0,222*
qP	(+)0,216*	0,0037	0,159	0,159	(+)0,210*
ETR	0,188	0,0340	0,160	0,135	(+)0,223*

Pn: asimilación neta; Fo': mínimo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz; Fm': máximo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz; Fv'/Fm': máxima eficiencia del fotosistema II; Fs: fluorescencia estacionaria en hojas adaptadas a la luz; PSII: eficiencia del fotosistema II en operativo; qP: apagado fotoquímico; ETR: ratio de transporte de electrones; Rto: rendimiento; P100: peso de 100 bayas; PMR: peso medio del racimo; NRB: número de racimos por brote; PMP: peso de madera de poda (vigor). Nivel de significación: * $p < 0,05$ (+) o (-) indica si la relación lineal entre las variables es positiva o negativa.

Los resultados mostrados confirman que, en plantas cloróticas la alteración de los procesos fotosintéticos se traduce en un lento y reducido crecimiento, limitando a su vez potencialmente la productividad y el vigor del viñedo (Anderson, 1982; Chen y Barak, 1982; Tagliavini y Rombolá, 2001). Estos resultados provisionales apuntan a que las medidas de fluorescencia en enero podrían ser útiles para estimar los vigores de las subparcelas pero no tanto las componentes del rendimiento del viñedo.

5.3. Efectos de la clorosis férrica sobre la composición del mosto

La comparación de medias de las variables de composición del mosto en relación al nivel de clorofila foliar en enero de las subparcelas (Tabla 4.) refleja que el índice de polifenoles totales alcanza su máximo valor en las parcelas con bajo nivel de clorofila foliar y va disminuyendo a medida que el nivel de clorofila aumenta. El mayor contenido fenólico en las subparcelas afectadas por clorosis está relacionado probablemente con el menor rendimiento registrado (ver apartado anterior), y con una mayor síntesis de polifenoles en las plantas como consecuencia del estrés o por deficiencia de hierro.

Tabla 4. Valores medios de los parámetros de composición del mosto en el conjunto de parcelas clasificadas por su nivel foliar de clorofila en enero.

	Nivel de clorofila					
	Alto		Medio		Bajo	
IPT	17,33	a	18,78	ab	21,50	b
pH	3,59	a	3,60	a	3,63	a
AT (g/l ácido tartárico)	4,70	a	4,33	ab	3,95	b
Brix (°)	22,93	a	23,38	ab	24,17	b
NFA (g/l)	22,60	a	22,63	a	24,00	a
Málico (g/l)	0,73	a	0,77	a	0,49	a
K (mg/l)	1678,17	a	1550,15	a	1503,52	a

IPT: índice de polifenoles totales; AT: acidez total; Brix: grados Brix; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable; Málico: ácido málico; K: potasio. Los valores con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0,05$, test Tukey).

El pH y el nitrógeno fácilmente asimilable se comportan de la misma manera que el índice de polifenoles totales, solo que en este caso no se obtienen diferencias significativas entre los distintos niveles foliares de clorofila en enero.

La acidez total disminuye a medida que el nivel de clorofila también lo hace (Tabla 4). Se obtienen valores significativamente diferentes entre el nivel alto y el bajo de clorofila foliar. La pérdida de acidez en las subzonas afectadas por clorosis se podría deber a una caída en la concentración de ácido málico, que tiende a ser inferior en las parcelas cloróticas que en el resto. El contenido medio en potasio tiende a disminuir con el contenido foliar de clorofila, sin valores significativamente distintos entre niveles.

Los contenidos en azúcares (grados Brix) aumentan a medida que el nivel de clorofila va descendiendo. Tanto el incremento de este parámetro como la disminución de la acidez total hacen que las subparcelas afectadas por clorosis alcancen índices de madurez tecnológica en la vendimia muy superiores a las subparcelas con nivel de clorofila alto.

Diversos autores han demostrado que la calidad de los mostos de plantas afectadas por clorosis férrica se ve afectada de forma negativa, reduciéndose el contenido en azúcares y antocianos acumulados en las bayas durante la maduración, e incrementando la acidez total (Castino *et al.*, 1987; Veilksar *et al.*, 2005). En contra de esto, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los niveles de clorosis férrica de las subparcelas de la zona de estudio reducen drásticamente el rendimiento

del viñedo pero mejoran los índices de madurez tecnológica y el contenido fenólico de la uva.

Tabla 5. Coeficiente de determinación R² y pendiente de la regresión lineal (entre paréntesis) de los parámetros de composición del mosto respecto al nivel foliar de clorofila en envero y las variables de eficiencia fotosintética.

	IPT	pH	AT	Brix	NFA	Málico	K
Uds. de clorofila	(+)0,355*	0,030	(+)0,316*	(+)0,364*	0,002	0,178	(+)0,248*
Pn (μmol CO₂·m⁻²s⁻¹)	(+)0,232*	(+)0,253*	(+)0,291*	0,09	0,024	0,164	0,046
Fo´	0,143	(+)0,199*	(+)0,296*	0,061	0,001	0,119	0,033
Fm´	(+)0,253*	0,191	(+)0,310*	0,099	0,000	0,049	0,0006
Fv´/Fm´	0,006	0,068	0,0092	0,02	0,019	0,006	0,009
Fs	(+)0,298*	(+)0,300*	(+)0,297*	0,089	0,011	0,070	0,004
PSII	(+)0,261*	(+)0,231*	(+)0,280*	0,128	0,014	0,097	0,005
qP	(+)0,309*	(+)0,318*	(+)0,261*	0,117	0,035	0,080	0,006
ETR	(+)0,264*	(+)0,229*	(+)0,284*	0,130	0,013	0,097	0,006

Pn: asimilación neta; Fo´: mínimo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz; Fm´: máximo valor de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz; Fv/Fm´: máxima eficiencia del fotosistema II; Fs: fluorescencia estacionaria en hojas adaptadas a la luz; PSII: eficiencia del fotosistema II en operativo; qP: apagado fotoquímico; ETR: Ratio de transporte de electrones; IPT: índice de polifenoles totales; AT: acidez total (g/l ácido tartárico); Brix: grados Brix; NFA: nitrógeno fácilmente asimilable (g/l); Málico: ácido málico (g/l); K: potasio (mg/l). Nivel de significación: *p<0,05 (+) o (-) indica si la relación lineal entre las variables es positiva o negativa.

El análisis de regresión realizado (Tabla 5) revela que el índice de polifenoles, pH y la acidez total del mosto se relacionan de forma positiva con la asimilación neta y la mayoría de los parámetros de fluorescencia clorofílica medidos en envero, sin que se den regresiones significativas con el resto de variables de composición del mosto. En concordancia con resultados obtenidos con anterioridad en la zona de estudio (Catalina, 2016), los parámetros de fluorescencia de la clorofila medidos en envero podrían ser útiles para estimar el contenido en ácidos y polifenoles del mosto de vendimia en viñedos afectados por clorosis férrica.

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

La deficiencia de hierro produce un descenso en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II y el ratio de transporte de electrones. Estas dificultades en la actividad fotosintética hacen que las subparcelas afectadas por clorosis férrica manifiesten un vigor y un rendimiento inferior al de las subparcelas con alto nivel foliar de clorofila.

Las subparcelas afectadas por clorosis alcanzan índices de madurez tecnológica en la vendimia superiores a las subparcelas con nivel de clorofila alto. Se ha observado un mayor contenido fenólico en las subparcelas afectadas por clorosis, que podría estar relacionado con el menor rendimiento registrado en las mismas y con una mayor síntesis de polifenoles en las plantas afectadas por la carencia.

Las medidas de fluorescencia clorofílica en enero podrían ser útiles para estimar el vigor del viñedo, el contenido en ácidos y polifenoles del mosto de vendimia en zonas afectadas por clorosis férrica.

BIBLIOGRAFÍA

- ABADÍA, J. (1992). Leaf responses to Fe deficiency. A review. *J. Of Plant Nutrition*. 15: 1699-1713.
- ABADÍA, J., MORALES, F. y ABADÍA, A. 1999. Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant Soil*, 215: 183-192
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.M. (2000): Calidad y eficacia de los quelatos férricos (Fe-DDHA, Fe-EDDHA, Fe-EDDHA, Fe-EDDHA) como fertilizantes. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, 2006. Iron deficiency, fruit yield and quality. In: Abadia J, Barton LL (eds). *Iron Nutrition and Interactions in Plants*. Springer, Dordrecht, pp. 85-101
- ANDERSON, W.B. (1982). Diagnosis and correction of iron deficiency in field crops an overview. *J. Plant Nutr.* 5: 785-795.
- ARULANANTHAM, A.R., RAO, I.M. y TERRY, N. 1990. Limiting factors in photosynthesis. VI. Regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate limits photosynthesis at low photochemical capacity. *Plant Physiol.*, 93: 1466-1475
- BAKER, N.R. y ROSENQVIST, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.*, 55: 1607-1621
- BANCADORO, L., RABOTTI, G., SCIENCZA, A., ZOCCHI, G. (1995). Mechanisms of Fe-deficiency in roots of vitis spp. In response to iron-deficiency stress. *Plant and Soil*. 171:229-234.
- 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*, 44: 63-65
- BAVARESCO, L., FREGONI, M. y FRASCHINI, P. (1991). Investigations on iron uptake and reduction by excised roots of different grapevines rootstock and a *V. vinifera* cultivar. *Plant and Soil*, 130:109-113.
- BAVARESCO, L., GIACHINO, E., COLLA, R. (1999). Iron chlorosis paradox in grapevine. *Journal of Plant Nutrition*. 22 (10): 1589-1597.
- BAVARESCO, L., BERTAMINI, M. y IACONO, F. 2006. Lime-induced chlorosis and physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot blanc) leaves. *Vitis*, 45: 45-46
- 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: 2123-2135
- BAVARESCO, L., van ZELLER, M.I., CIVARDI, S., GATTI, M. y FERRARI, F. 2010a. Effects of traditional and new methods on overcoming lime-induced chlorosis of grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 61: 186-190

BELKHODJA, R., MORALES, F., SANZ, M., ABADÍA, A. y ABADÍA, J. (1998). Iron deficiency in peach trees: effects on leaf chlorophyll and nutrient concentrations in flowers and leaves. *Plant and Soil*. 203: 257-268.

BERTAMINI, M., MUTHUCHELIAN, K. y NEDUNCHEZHIAN, N. 2002. Iron deficiency induced changes on the donor side of PS II in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *Plant Sci*, 162: 599-605

BERTAMINI, M. y NEDUNCHEZHIAN, N. 2005. Grapevine growth and physiological responses to iron deficiency. *J. Plant Nutr.*, 28 (5): 737-749

BERTAMINI, M., NEDUNCHEZHIAN, N. y BORGHI, B. 2001. Effect of iron deficiency induced changes on photosynthetic pigments, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, and photosystem activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir) leaves. *Photosynthetica*, 39(1): 59-65

CALERO, M. (2010) Modelización de la emisión de fotones en el complejo excitado LH-II (Light harvesting complex II) de la bacteria púrpura.

CASTINO, M., UBIGLI, M., CORINO, L., LUZZATI, A., SIRAGUSA N. y NAPPI, P. (1987). Oenological effects of nutrient deficiencies on the grapes variety Barbera cultivated in Piedmont vineyards. *Vignevini*, Bologna. 14: 37-54.

CATALINA, A. 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). Tesis doctoral, Universidad de Valladolid.

CHANEY, R.L. (1984). Diagnostic practises to indentify iron deficiency in higher plants. *J. Plant Nutr.* 7:47-67.

CHEN, Y. y BARAK, P. (1982). Iron Nutrition in calcareous soils. *Adv. Agron.* 35: 217-240.

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. 0001-0192.

COVARRUBIAS, J.I., PISI, A. y ROMBOLÀ, A.D. 2014. Evaluation of sustainable management techniques for preventing iron chlorosis in the grapevine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 20: 149-159.

CURIE, C., CASSIN, G., COUCH, D., DIVOL, F., HIGUCHI, K., LE JEAN, M., *et al.* (2009). Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany*. 103: 1-11.

CURIE, C., y BRIAT, J.F. (2003). Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 54: 183-206.

CURRLE, O.; BAUER, O.; HOFÄCKER, W.; SCHUMANN, F. Y FRISCH, W. (1983) *Biologie der Rebe*. Meininger. Ed. Neustadt an der Weinstrasse. Germany

DAVENPORT, J.R. y STEVENS, R.G. (2006). High soil moisture and low soil temperature are associated with chlorosis occurrence in Concord grape. *Hortscience*. 41:418-422

ESCALONA, J.M., FLEXAS, J., y MEDRANO, H. 1999. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 26: 421-433

FLEXAS, J., ESCALONA, J.M. y MEDRANO, H. 1998. Down-regulation of photosynthesis by drought under field condition in grapevine leaves. *Australian Aust. J. Plant. Physiol.*, 25: 893-900

FLEXAS, J., BOTA, J., ESCALONA, J.M., SAMPOL, B. y MEDRANO, H. 2002a. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Funct. Plant Biol.*, 29: 461-471

FOX, T.C. y GUERINOT, M.L., (1998) Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 669-676

GARCÍA-BARCELÓ, J., (1990). "Compuestos fenólicos". En: *Técnicas Analíticas para Vinos*. G.A.B. (ed.). Moja-Olérdola. 8: 3-33p.

GÄRTEL, W. (1993). Grapes. En: *Nutrient deficiencies and toxicities in crop plants*. W.F. Bennett (Ed.). ST, Paul. MN: APS Pres, pp.177-183.

GENTY, B., BRIANTAIS, J.M. y BAKER N.R. 1989. The relationship between the quantum yield photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990: 87-92

GONZÁLEZ, R., NUÑEZ, L.C., MARTÍN, P. BERJON, A., ZARCO, P. (2005). Estimación de la absorbancia de radiación PAR en hojas de vid a partir de su contenido en clorofila. V Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas. *Actas Portuguesas de Horticultura*. 6: 384-389.

GREENE, R.M., GEIDER, R.J., KOLBER, Z. y FALKOWSKI, P.G. 1992. Iron induced changes in light harvesting and photochemical energy conversion processes in eucaryotic marine algae. *Plant Physiol.*, 100: 565-575

GRUBER, B. y KOSEGARTEN, H. 2002. Depressed growth of non-chlorotic vine grown in calcareous soil is an iron deficiency symptom prior to leaf chlorosis. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 165: 111-117

GUO, Y y TAN, J. 2015. Recent Advances in the Application of Chlorophyll a Fluorescence from Photosystem II. *J. Photochem. Photobiol.*, 91: 1-14

HIDALGO, L. (1999). *Tratado de viticultura general*. Ediciones Mundiprensa. Madrid, pp.1172.

IACONO, F. y SOMMER, K.J. 1999. The measurement of chlorophyll fluorescence as a tool to evaluate the photosynthetic performance of grapevine leaves. *Acta Horticulturae*, 493: 31-44

JIMÉNEZ, S., GOGORCENA, Y., HEVIN, C., ROMBOLÀ, A.D. y OLLAT, N. 2007. Nitrogen nutrition influences some biochemical responses to iron deficiency in tolerant and sensitive genotypes of *Vitis*. *Plant Soil*, 290: 343-355

KOSEGARTEN, H., HOFFMANN, B. y MENGEL, K. 1999. Apoplastic pH and Fe^{3+} Reduction in intact sunflower leaves. *Plant Physiol.*, 121: 1069-1079

LAULHERE, J.P. Y BRIAT, J.F. (1993) Iron release and uptake by plant ferritin: effects of pH, reduction and chelation. *Biochem. J.* 290: 693-699.

LARBI, A., ABADÍA, A., ABADÍA, J. y MORALES, F. 2006. Down co-regulation of light absorption, photochemistry, and carboxylation in Fe-deficient plants growing in different environments. *Photosynth. Res.*, 89: 113-126

LIN, S.F.; CIANZIO, S.R. y SHOEMAKER, R.C. (1997). Molecular marker detection of genetic mechanisms responsible for iron deficiency chlorosis in soybean. In: Abstract of 9th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Hohenheim, Stuttgart, Alemania, pp.104.

LINCOLN, T. (2006). *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume. p. 1265

LINDSAY, W.L. (1979). *Chemical equilibria in soils*. Ed. John Wiley and sons. N.Y, pp. 471.

LINDSAY, W.L. (1991). *Micronutrients in agriculture*. Ed. Soil Science Society of America. Madison, pp.89-112.

LINDSAY, W. L. y SCHAWAB, A. P. (1982). The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J.Plant Nutr.* 5: 821-840.

LING, Q., HUANG, W. y JARVIS, P. 2011. Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*, *Photosynth. Res.*, 107: 209–214

LOEPPERT, R.H. (1986). Reactions of iron and carbonates in calcareous soils. *J. Plant Nutr.* 9(3 y 7): 195-214.

MARSCHNER, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd edition. Academic Press. Inc. London.

MARSCHNER, H., RÖEMHELD, V. y KISSEL, M. (1986). Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9: 695-713.

MARTÍN, P.; GONZÁLEZ, M.R.; GONZÁLEZ, R.; BONED, J. y PÉREZ, J. (2007). Efectos de la clorosis férrica en la calidad de la uva de vinificación. *Viticultura/Enología Profesional*. 110: 33-42.

MAXWELL, K. y JONSON, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51: 659-668

MENGEL, K. y KIRKBY, A. E. (2001). *Principles of plant nutrition*. Kluwer academic Publishers (PB).

- MENGEL, K. y MALISSIOVAS, N. (1982). Light dependent proton excretion by roots of entire vine plants (*Vitis vinifera* L.). Z. Pflanzenernähr. Bodenk. 145: 261-267.
- MILLER, R. W., PUSHNIK, J. C. y WELKIE, G. W. (1984). Iron chlorosis, a world wide problem, the relation of chlorophyll biosynthesis to iron. J. Plant Nutr. 7: 1-22.
- MIRANDA, V., BAKER, N.R. y LONG, S.P. 1981. Limitations of photosynthesis in different regions of the Zea mays leaf. New Phytol., 89: 179-190
- MOLASSIOTIS, A., TANOU, G., DIAMANTIDIS, G., PATAKAS, A. y THERIOS, I. 2006. Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. J. Plant Physiol., 163:176-185
- MOLNÉ, R. (1991). Abonado anual. Análisis foliar. Interpretación de resultados en viña. Fruticultura profesional. 43: 7-16.
- MORALES, F., ABADÍA, A. y ABADÍA, J. 1991. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Plant Physiol., 97(3), 886-893
- MORALES, F., ABADÍA, A. y ABADÍA, J. 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., GRASA, R., ABADÍA, A. y ABADÍA, J. (1998). Iron chlorosis paradox in fruit trees. J. Plant Nutr. 21: 815-825
- MORALES, F., ABADÍA, A., BELKHODJA, R. y ABADÍA, J. 1994. Iron deficiency-induced changes in the photosynthetic pigment composition of field-grown pear (*Pyrus communis* L.) leaves. Plant Cell Environ., 17: 1153-1160
- MORALES, F., BELKHODJA, R., ABADÍA, A. y ABADÍA, J. 2000. Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron-deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis* L.). Photosynth. Res., 63: 9-21
- MORALES, F., MOISE, N., QUÍLEZ, R., ABADÍA, A., ABADÍA, J. y Moya, I. 2001. Iron deficiency interrupts energy transfer from a disconnected part of the antenna to the rest of photosystem II. Photosynth. Res., 70(2): 207-220
- NEDUNCHEZHIAN, N., MORALES, F., ABADÍA, A. y ABADÍA, J. 1997. Decline in photosynthetic electron transport activity and changes in thylakoid protein pattern in field grown iron deficient Peach (*Prunus persica* L.). Plant Sci., 129: 29-38
- NETTO, A.T., CAMPOSTRINI, E., de OLIVEIRA, J.G. y BRESSAN-SMITH, R.E. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves Scientia Horticulturae, 104: 199-209
- NIKOLIC, M., RÖMHELD, V. y MERKT, N. (2000). Effect of bicarbonate on uptake and translocation of Fe in two grapevine rootstocks differing in their resistance to Fe deficiency chlorosis vitis. 39: 145-149.

- PERYEA, F., y KAMMERECK, R. (1997). Use of SPAD meter to quantify the effectiveness of midsummer trunk injection of iron on iron deficient pear trees. *Acta Horticulturae*. 448: 359-360.
- PESTANA, M., VARENNE, A., ABADÍA, J. y FARIA, E. A. 2005. Differential tolerance to iron deficiency of citrus rootstocks grown in nutrient solution. *Scientia Horticulturae*, 104: 25-36
- PESTANA, M., VARENNE, A. y ARAUJO-FARIA, E. 2003. Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. *J. Food Agric. Environ.*, (1): 46-51
- PIRIE, A.J.G. y MULLINS, M.G. (1980). Concentration of phenolics in the skin of grape berries during fruit ripening and development. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 34-36.
- RÖMHELD, V. (1997). The chlorosis paradox: Fe inactivation in leaves as a secondary event in Fe deficiency chlorosis. In: *Abstracts 9th International Symposium on iron Nutrition and Interactions in Plants*. Hohenheim, Stuttgart, Germany, pp.10
- SCHMIDT, W. (2003). Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends in Plant Science*. 8: 188-193.
- SMART, R. y ROBINSON, M. (1991). *Sunlight into Wine*. Winetitles, Adelaide.
- SUAZO, E. (2012). Relación entre los contenidos foliares de pigmentos y nutrientes minerales y el potencial enológico de la uva en viñedos afectados por clorosis férrica.
- TAGLIAVINI, M. y ROMBOLÁ, A.D. (2001). Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Eur. J. Agronomy*. 15:71-92.
- TAIZ, L. y ZEIGER, E. 2002. *Plant Physiology*, 3rd edition, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- VAL, J., MONGE, E., HERAS, L. y ABADÍA, J. 1987. Changes in photosynthetic pigment composition in higher plants as affected by iron nutrition status. *J. Plant Nutr.*, 10: 995-1001
- VARANINI, Z. y MAGGIONI, A. (1982). Iron reduction and uptake by grapevine roots. *Journal of Plant Nutrition*. 5: 360-396.
- VEILKSAR, S.G., TOMA, S.I. y KREIDMAN, J. (2005). Effect of Fe-Containing Compounds on the Chlorosis Manifestation and Grape Quality. *Proc. Int. Workshop Adv. Grapevine Wine Res.*, Venosa, Italy.
- WALTER-SHEA, E.A., NORMAN, J.M., BLAD, B.L. y ROBINSON, B.F. 1991. Leaf reflectance and transmittance in soybean and corn. *Agron. J.*, 83: 631-636
- WELKIE, G.W., MILLER, G.W. (1993). Plant iron uptake physiology by siderophore systems. En: *Iron Chelation in plants and Soil Microorganisms*. Barton LL and Hemming BC. Academic Press, San Diego, USA. pp. 345-369
- WILLIAMS, L.E.; DOKOOZLIAN, N.K. y WAMPLE, R. (1994). Grape. En: *Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops*. Vol.1. Temperate Crops. Eds. B.Schaffer y P.C. Andersen. FL: CRC Press. Boca Raton, pp.85-133.