

ABSORCION Y ASIMILACION DE HIERRO EN LAS PLANTAS

DR. ADALBERTO BENAVIDES MENDOZA - DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA, UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

1. INTRODUCCION

Más de un tercio de la población mundial padece de deficiencia de hierro (Fe) siendo los sectores de la población más afectados el de las mujeres en edad reproductiva y el de los niños (Robinson *et al.*, 1999). Los estudios recientes que conectan la deficiencia de Fe con un desarrollo cognoscitivo deficiente enfatizan el impacto de este problema. Las plantas son la principal fuente de hierro en la mayoría de las dietas, por lo que asegurar el consumo de vegetales con un adecuado nivel de hierro constituye una parte medular en las estrategias de mejoramiento del nivel nutricional de los humanos (Theil *et al.*, 1997). Lo antes dicho adquiere mayor relevancia sobre todo en referencia a los sistemas de producción agrícola ubicados en áreas con suelos calcáreos, en donde es probable que las cosechas muestren niveles subóptimos de Fe.

Un problema característico asociado a la producción de cultivos en suelos calcáreos es la condición llamada clorosis férrica, consecuencia de la carencia extrema de hierro y cuyo síntoma más característico es la clorosis intervenal la cual se corrige con la aplicación de Fe en formas disponibles para la planta (Emery, 1982). Los suelos calcáreos no carecen *per se* de Fe, pero la disponibilidad del mismo es limitada. Por otra parte la condición de clorosis férrica no es exclusiva de suelos calcáreos, aunque la mayor parte de los problemas de este tipo se presentan en regiones con suelos de esta clase (Brown y Jolley, 1989).

Los suelos calcáreos cubren aproximadamente un tercio de la superficie terrestre y se presentan predominantemente en regiones que reciben menos de 500 mm de precipitación anual. Las características importantes de un suelo calcáreo son un pH alto (de 7 a 9) y un contenido significativo de carbonatos libres (Gildersleeve y Ocampo, 1989). Cuando una planta carente de ciertas habilidades metabólicas se desarrolla en un suelo calcáreo, presenta síntomas de clorosis férrica como consecuencia de que el Fe no se encuentra en una forma disponible. Los medios utilizados hasta el momento para resolver este problema son: aplicación localizada de sales y quelatos de Fe a las plantas (aplicación al suelo o por vía foliar), modificación artificial del pH de la solución del suelo (aplicación de ácidos orgánicos o inorgánicos) y el uso de cultivares de la especie de cultivo con la habilidad de tomar el Fe de suelos en donde este elemento se encuentra poco disponible (Olsen *et al.*, 1987; Chen y Barak, 1982; Emery, 1982).

2. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DEL HIERRO

En plantas y otros organismos una gran parte del Fe presente se encuentra asociado con porfirinas. Las porfirinas con Fe de animales y hongos son principalmente moléculas hem, mientras que en las plantas son los citocromos los más comunes. Los citocromos se encuentran como partes funcionales de los sistemas respiratorio y fotosintético y su propiedad más importante, la función redox, se deriva de la capacidad del Fe de ser oxidado de manera reversible de Fe(II) a Fe(III). Esta capacidad se utiliza en donde se requiere realizar reacciones redox rápidas por transferencia de electrones, es decir, reacciones que no requieren transferencia de H⁺ o formación/rompimiento de enlaces covalentes. La mayor parte del Fe activo en la planta se ve implicado en las reacciones redox de cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. El hierro se encuentra también implicado en muchos sistemas enzimáticos en donde no se asocia a un grupo prostético o, incluso, no se asocia estructuralmente a la enzima, si bien cumple un papel que se supone importante aunque poco definido. El Cuadro 1, modificado de Rains (1976), sirve como resumen:

Cuadro 1. Papeles funcionales del hierro.

- | |
|--|
| 1. Componente estructural de las moléculas de porfirina: citocromos, hem, hematina, ferricromo, hemoglobinas animales y vegetales. Involucrado en reacciones de oxidación-reducción en la respiración y la fotosíntesis. |
| 2. Componente estructural de moléculas no hem: ferredoxinas y proteínas Fe-S. |
| 3. Sistemas enzimáticos: citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa, aconitasa, desaturasa de ácidos grasos, síntesis de clorofila (varias enzimas), peptidilprolina hidrolasa, nitrogenasa, etc. |

3. ABSORCION Y ASIMILACION DE HIERRO

Aunque el Fe es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre, la deficiencia de hierro es un problema común a prácticamente todas las especies de seres vivos. El Fe se presenta en dos estados de oxidación: el Fe^{+3} ($\text{Ar}3d^5$) o férrico y el Fe^{+2} ($\text{Ar}3d^6$) o ferroso. En presencia de O_2 el Fe^{+2} es oxidado rápidamente a Fe^{+3} , el cual es poco soluble en agua y en donde precipita como óxidos de Fe. Por lo tanto, en nuestra atmósfera rica en O_2 , la forma termodinámicamente más estable del hierro es también la de más difícil acceso para los organismos. La pregunta que surge es ¿cómo resuelven las entidades biológicas este problema?

Se sabe que los iones de metales pesados (como el Fe, Zn o Cu) no atraviesan libremente la membrana celular. Las formas de paso de estos metales son quelatos. Los quelatos sintetizados biológicamente y cuya función es acarrear iones de metales son llamados ionóforos, y los ionóforos específicos para el hierro son conocidos como sideróforos (Emery, 1982; Olsen *et al.*, 1981; Kloepper *et al.*, 1980). Un mecanismo general de acción entre las bacterias, cianobacterias y hongos, como respuesta a la carencia de hierro, es la excreción de sideróforos hacia el medio de crecimiento y la posterior recuperación de los mismos a través de un mecanismo de absorción, asociado al metabolismo energético, que involucra un reconocimiento por parte de un receptor de membrana (Emery, 1982). En muchos habitats y bajo muchas condiciones llega a presentarse competencia por el Fe entre diferentes organismos; lo que resuelve la cuestión a favor de uno u otro es la habilidad relativa que presentan los sideróforos de cada uno de ellos para complejar el hierro (Emery, 1982; Olsen *et al.*, 1981; Kloepper *et al.*, 1980; Murphy *et al.*, 1976).

3.1. Absorción de Hierro por *Ustilago sphaerogena* y Otros Microorganismos

El hongo *Ustilago sphaerogena* fue estudiado por J. Neilands, a partir de 1950, en relación con el metabolismo del hierro ya que, bajo condiciones normales de disponibilidad de Fe en el medio de crecimiento este organismo es capaz de producir hasta un 1% de su peso seco en forma de citocromo c, una proteína que contiene hierro. En un estudio reportado en 1952 (J. Am. Chem. Soc. 74:4846-4847) Neilands observó que bajo estrés de carencia de hierro el hongo excretaba una gran cantidad de una sustancia que fue cristalizada, caracterizada y llamada por Neilands como ferricromo. Se demostró posteriormente que el sideróforo ferricromo tiene 3 grupos hidroxinámicos --CO--NOH-- los cuales se sabe son potentes agentes quelatantes del Fe(III) (Emery, 1982).

El sistema de transporte de Fe de *U. Sphaerogena* es parecido al de muchos microorganismos (Figura 1). Cuando se detecta carencia de hierro se inducen una serie de cambios metabólicos que se traducen en mayor eficiencia en la asimilación de dicho elemento. La síntesis de proteína celular disminuye y la actividad se canaliza hacia la producción de deferriferricromo (la parte orgánica del ferricromo) sin el hierro. El deferriferricromo tiene una constante de afinidad hacia el Fe de aproximadamente 10^{29} (un valor de 10^{15} ó 10^{20} se considera muy alto) por lo que es capaz de solubilizar los óxidos de hierro.

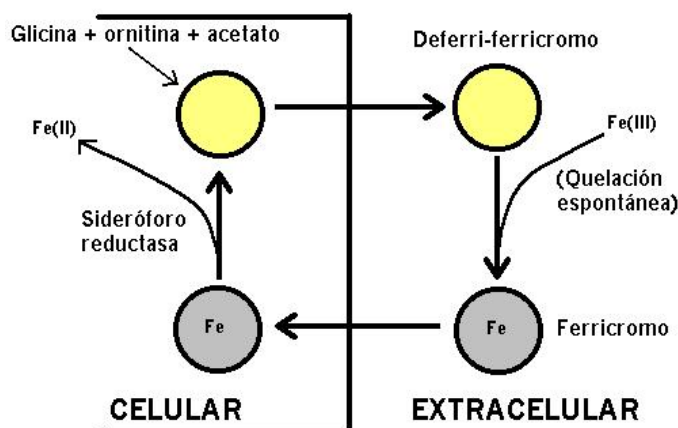


Figura 1. El sistema transportador de Fe de *U. sphaerogena* es típico de muchos microorganismos. El ferricromo es un hexapéptido cíclico que consiste de tres residuos de glicina y tres residuos de ornitina. Los N terminales de la ornitina son oxidados a hidroxilamina, -NOH-, y combinados con tres grupos acetilo, $\text{CH}_3\text{CO}-$, para dar lugar a los grupos hidroxamato que complejan el Fe. El deferriferricromo presenta gran afinidad por el Fe(III) por lo que rápidamente forma complejos ferricromo+Fe(III). Dicho complejo es acarreado a la célula por un sistema₂

transportador y una vez en el interior el complejo es reducido por la sideróforo reductasa lo que causa la liberación del Fe(II) formándose de nuevo el ferricromo que al ser excretado al medio de crecimiento inicia de nuevo el ciclo.

Con el hierro férrico Fe(III) se asocian tres cargas positivas. Cuando el Fe(III) es quelado por el ferricromo cada grupo hidroxinámico pierde un protón y lo que resulta es una molécula eléctricamente neutra. Al mismo tiempo, al llevarse a cabo el complejamiento, el ferricromo cambia su conformación y toma una forma globular muy regular. Este hecho implica que el receptor/acarreador de membrana distingue entre el ferricromo que acarrea el Fe y el que aún no lo hace. Una vez en el interior de la célula, el Fe(III) es reducido a Fe(II), utilizando NADPH o NADH, por enzimas llamadas sideróforo reductasas. Ya que la constante de afinidad del ferricromo hacia el Fe(II) es muy pequeña el mencionado Fe(II) se libera inmediatamente del anillo quelante y es canalizado hacia la síntesis de grupos hem. Una vez libre de hierro, el deferriferricromo es de nuevo excretado al medio para iniciar un nuevo ciclo (Emery, 1982). Al igual que *U. Sphaerogena* el hongo *Ustilago maydis* produce un sideróforo llamado ferricromo que el cual compleja el Fe(III), este Fe-ferricromo es absorbido y en el interior de la célula el Fe(III) es reducido a Fe(II). Además de esta actividad Ardon *et al.* (1998) demostraron que *Ustilago maydis* es capaz de reducir Fe(III) complejado con sideróforos no nativos (xenosideróforos), al contrario de lo que ocurre con el ferricromo los autores encontraron que la actividad reductiva se asoció a la membrana pero no involucró transferencia intracelular del xenosideróforo.

En algunos organismos el sideróforo libre de hierro no es reciclado, en vez de ello el compuesto es hidrolizado y debe sintetizarse una molécula de ligando por cada átomo de Fe que es incorporado. Tal es el caso que se observa en *Escherichia coli* y *Fusarium roseum* (Emery, 1982).

3.2. Absorción de Hierro por Plantas

El contenido normal de Fe en el tejido vegetativo de hortalizas es de 50-300 mg kg⁻¹ (ppm) en términos de materia seca (Zuang, 1982). Olsen *et al.* (1981) mencionan que, en general, la cantidad de hierro requerida por un cultivo típico por temporada de crecimiento es de 5-10 kg ha⁻¹. El contenido de Fe(III) de muchos suelos es mucho mayor que esta cantidad aunque, como fue mencionado, el problema con esta forma iónica radica en su escasa solubilidad (Chen y Barak, 1982; Olsen *et al.*, 1981). En la solución de agua del suelo la concentración mínima reportada para obtener un crecimiento razonable en diferentes cultivos es de 10⁻⁹ molar. Incluso bajo condiciones estándar con pH=7 la concentración de Fe derivado del Fe(OH)₃ es de 2x10⁻¹⁸ molar (ver recuadro 1). Así pues, las plantas deben tener forzosamente medios de solubilizar el Fe(III) de los óxidos e hidróxidos de hierro.

Recuadro 1. Efecto del pH sobre la solubilidad del Fe(III).



La constante de solubilidad es: $k_{sp} = 2 \times 10^{-39} = [\text{Fe}^{+3}][\text{OH}^-]^3$

Por lo tanto: $[\text{Fe}^{+3}] = (2 \times 10^{-39}) [\text{OH}^-]^{-3}$

Si el pH = 7 entonces $[\text{OH}^-] = 10^{-7}$ y $[\text{Fe}^{+3}] = 2 \times 10^{-18}$ M

si el pH = 9 entonces $[\text{OH}^-] = 10^{-5}$ y $[\text{Fe}^{+3}] = 2 \times 10^{-24}$ M

si el pH = 6 entonces $[\text{OH}^-] = 10^{-8}$ y $[\text{Fe}^{+3}] = 2 \times 10^{-15}$ M

si el pH = 4 entonces $[\text{OH}^-] = 10^{-10}$ y $[\text{Fe}^{+3}] = 2 \times 10^{-9}$ M

Las plantas tienen dos diferentes vías o estrategias por medio de las cuales son capaces de aumentar la disponibilidad de Fe(III) en la solución de agua del suelo:

(i) Estrategia I. Las monocotiledóneas no gramíneas y las dicotiledóneas pueden disminuir el pH en la rizosfera. La disminución en el pH solubiliza el Fe(III) y promueve la reducción del mismo a Fe(II). El Fe(III) solubilizado debe reducirse a Fe(II) antes de atravesar la membrana celular a través de la acción de proteínas reductoras asociadas a las membranas celulares.

(ii) Estrategia II. Las gramíneas excretan fitosideróforos, aminoácidos no proteínicos, que solubilizan los iones Fe⁺³ formando un complejo Fe-fitosideróforo (estrategia II). La liberación de fitosideróforos se correlaciona

positivamente con diferencias genóticas en la resistencia a la clorosis férrica. Se sabe que los fitosideróforos acarrean también otros cationes como el Zn, Mn y Cu.

Las plantas con la estrategia I disponen de aminoácidos no proteínicos para el transporte interno de Fe (es decir, intra e intercelular) como la nicotinamina. La carencia de nicotinamina da lugar a déficit de hierro en los tejidos como se ha observado en el mutante *cloronerva* del tomate (*Lycopersicon esculentum*) que tiene una falla en el gene que controla la síntesis del mencionado compuesto (Ling *et al.*, 1996). Los fitosideróforos de las gramíneas presentan estructuras químicas muy parecidas a la nicotinamina (Figura 2), siendo de hecho la metionina el precursor y la nicotinamina un intermediario en la síntesis (Römheld, 1991), por ello se ha dicho que la estrategia II es una extensión extratisular de los mecanismos de transporte de Fe intra e intercelulares.

En la estrategia I la disminución en el pH es realizada a través de la excreción de protones (provenientes de una ATPasa asociada a la membrana plasmática) y, en menor medida, de una mezcla compleja de ácidos orgánicos, principalmente citrato y malato, los cuales pueden funcionar como agentes quelantes del hierro y como fuente de carbono para microorganismos. Se supone que la mayor actividad respiratoria de los microorganismos asociados a la rizosfera disminuye el nivel de O₂ generando microambientes facilitadores de la reducción de Fe(III). La producción y acumulación de citrato y malato en las raíces se consigue por la inducción de mayor actividad de PEPcarboxilasa en las raíces. En el caso de las gramíneas con estrategia II estas producen ácidos orgánicos pero aparentemente no excretan protones (Bienfait, 1988).

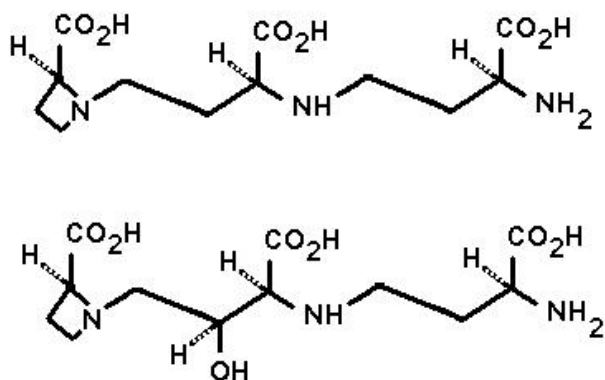


Figura 2. Estructura química de la nicotinamina (arriba) y el ácido muginéico (abajo).

En algunas plantas la respuesta inicial a la deficiencia de Fe es la formación de células de transferencia en la epidermis de las raíces. Estas células liberan iones H⁺ además de ser la interfase en donde se lleva a cabo la reducción del Fe (III). En caso de volverse disponible el Fe en el sustrato las mencionadas células de transferencia disminuyen su actividad y terminan por desaparecer (Brown y Jolley, 1989). Según los resultados de Moog *et al.* (1995) la inducción de las células de transferencia, como respuesta a la carencia de Fe, puede ocurrir de manera independiente respecto a un incremento en la actividad reductiva de Fe(III). Este hecho parece indicar que las respuestas morfológicas y fisiológicas al Fe se controlan de forma separada.

Se mencionó que asociada al proceso de acidificación de la solución del suelo, y a la consiguiente solubilización del Fe(III), las plantas llevan a cabo la reducción del Fe(III) solubilizado a Fe(II). Este cambio parece evitar la posible competencia que pudiera surgir por parte de los sideróforos de microorganismos, que se encuentran en los suelos en cantidades significativas, y que tienden a atrapar el Fe(III) disponible. Se pensaba que esta reducción Fe(III)® Fe(II) se realizaba en buena parte por una serie de compuestos fenólicos reductores de Fe(III) como ácido caféico y sus derivados (Olsen *et al.*, 1981), sin embargo la cantidad de compuestos reductores producidos no es suficiente para cubrir las necesidades de Fe(II) de la planta por lo que, al parecer, dicha actividad es llevada a cabo en su mayor parte por reductasas de los complejos Fe-quelato que son proteínas asociadas a las membranas. Se supone que la función de los fenólicos se refiere más bien a mantener estable la concentración de Fe(II) para que este sea tomado por los complejos transportadores ubicados en la membrana y que se encargan de acarrearlo al interior de la célula. En la soya (*Glycine max*) el sitio de reducción Fe(III)® Fe(II) se encuentra principalmente en las regiones de alargamiento y en proceso de maduración de la raíz así como en las raíces laterales jóvenes (Ambler *et al.*, 1971). Algunas plantas como el melón (*Cucumis melo*) no liberan reductores a la rizosfera, pero compensan la ausencia de los mismos con una sobreproducción y excreción de protones (Brown y Jolley, 1989).⁴

Yi y Guerinot (1996) confirmaron, utilizando mutantes de *Arabidopsis thaliana*, que la actividad reductiva Fe(III)® Fe(II) ocurre de manera independiente de la excreción de protones.

La reducción del Fe(III) complejado con el quelato requiere la transferencia de electrones (e^-) desde el citosol a través de la membrana plasmática. Las células vegetales de plantas con estrategia II poseen dos sistemas de transferencia de e^- , un sistema "estándar" presente en todas las células y un sistema "turbo" de alta eficiencia (Figura 3), reductor de distintos complejos Fe-quelato, que es inducido diferencialmente en las células epidérmicas de la raíz por ausencia de Fe. Al parecer el potencial reductor del sistema turbo proviene del NADPH producido por la NADP⁺-isocitrato deshidrogenasa citosólica. El isocitrato es formado a partir del citrato por acción de la enzima aconitasa mitocondrial (Bienfait, 1988). En este sistema turbo se encuentra la enzima Fe-quelato reductasa (FCR), que es utilizada por la mayoría de las plantas (excepto gramíneas que carecen del sistema turbo) para adquirir Fe soluble, no mostrando relación aparente con la absorción de otros cationes como el Zn y Mn (Yi y Guerinot, 1996). Según Moog *et al.* (1995) la enzima FCR es inducida por la deficiencia de hierro y sigue una cinética Michaelis-Menten con un Km de 45 $\mu\text{Mol Fe(III)-EDTA}$ y una Vmax de 42 $\text{nMol Fe}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Dada su importancia potencial en la ingeniería de plantas se busca localizar a los genes responsables de la codificación de la reductasa de Fe-quelato. Robinson *et al.* (1999) aislaron un gene llamado FRO2 que se expresa en raíces de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de deficiencia de Fe. Dicho gene FRO2 parece corresponder a una reductasa de Fe-quelato y pertenece a una superfamilia génica de flavocitocromos que transportan electrones a través de membranas. De acuerdo a los autores el aislamiento de FRO2 tiene implicaciones para la generación de cultivos con mayor calidad nutricional y mejor crecimiento en suelos con bajo nivel de Fe disponible.

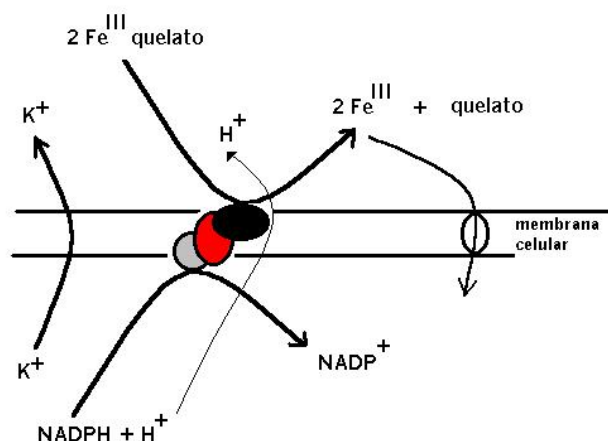


Figura 3. El sistema turbo de transferencia de electrones asociado a la membrana plasmática de las plantas con estrategia I.

La absorción de Fe(II) por las plantas con estrategia I puede ser en forma complejada con ligandos de bajo peso molecular o bien en la forma iónica libre, siendo al parecer esta última forma la más común. En *Arabidopsis thaliana* la proteína IRT1 (iron-regulated transporter) es al parecer un acarreador de Fe(II) en forma iónica libre asociado a la membrana. Se sabe que IRT1 se expresa en las raíces, que la síntesis es inducida por la deficiencia de Fe y que su actividad es inhibida por cadmio (Eide *et al.*, 1996). En las plantas que utilizan la estrategia II los complejos Fe-fitosideróforo, que se encuentran en alta concentración (de 1 a 2 mMol) alrededor de las raíces, son acarreados desde el exterior hacia el interior de la célula por una proteína transportadora de alta afinidad. Como se mencionó los fitosideróforos pueden funcionar como acarreadores de otros cationes como el Zn, Mn y Cu, pero el mencionado sistema de transporte de alta afinidad es inducido exclusivamente por Fe (Römheld, 1991).

Una vez que es absorbido por las raíces el Fe(II) se incorpora en primera instancia en ferritinas, que son proteínas de almacenamiento de hierro que se acumulan en los plástidos de hojas y semillas (Clarkson y Hanson, 1980; Caris *et al.*, 1995). El Fe es liberado de las ferritinas por la acción reductora del ascorbato (Laulhere y Briat, 1993) o de fenólicos reductores como el ácido caféico, el ácido clorogénico, el ácido dihidrocaféico y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico. Según los resultados de Boyer *et al.* (1988) la tasa de removilización de Fe de las ferritinas depende de la concentración de fenólicos y del poder reductor de los mismos. Los mismos autores observaron₅

que las enzimas y compuestos atrapadores de radicales como la catalasa, la superóxido dismutasa y el manitol no mostraron efecto sobre la tasa de remoción de Fe. Por el contrario el EDTA y el oxalato inhibieron la liberación de Fe.

Las ferritinas son proteínas con estructura altamente conservada en plantas y animales pero con diferente localización citológica y distinto control en respuesta al exceso de Fe. Las ferritinas de las plantas se exportan a los plástidos y se regulan transcripcionalmente en respuesta a la disponibilidad de Fe, por su parte las ferritinas de animales se encuentran en el citoplasma y su expresión se regula principalmente al nivel de traducción de mRNA almacenado. Otra diferencia importante es que los animales presentan varios tipos de ferritina dependiendo de si la misma será utilizada para almacenar Fe o para detoxificar las células en caso de exceso del mencionado elemento. En cambio, las plantas parecen mostrar un solo tipo de ferritina cuya función no se asocia con detoxificación del exceso de Fe al menos en *Arabidopsis thaliana*. Esta fue la conclusión de Lescure *et al.* (1991) considerando que la vacuola posee gran capacidad de almacenar Fe y que las ferritinas de expresión constitutiva de las plantas no difieren de las ferritinas inducidas por exceso de Fe (caso contrario a lo que se observa en animales) por lo que, según los mencionados autores, es poco probable que rápida síntesis de las mencionadas proteínas constituya una respuesta orientada a la detoxificación en caso de exceso de Fe. Sin embargo, los resultados de Becker *et al.* (1998), quienes utilizaron mutantes de chícharo (*Pisum sativum*) con defectos en la regulación de la absorción del hierro, mostraron que las plantas acumularon Fe en las ferritinas y precipitaron dicho metal en depósitos en forma de partículas denso-electrónicas en el citoplasma, mitocondrias y retículo endoplásmico. La conclusión de los autores fue que las respuestas observadas constituyeron un mecanismo de defensa de la planta contra la acumulación excesiva de Fe soluble el cual se sabe da lugar a estrés oxidativo. La misma conclusión fue obtenida por Deak *et al.* (1999) quienes trabajaron con plantas de tabaco transgénicas que sintetizaban ferritina de alfalfa en los tejidos vegetativos. El tabaco transgénico retuvo la función fotosintética normal en presencia de toxicidad causada por radicales libres generados por exceso de Fe o tratamiento con paraquat. Adicionalmente la progenie de las plantas transgénicas que acumulaba ferritina foliar exhibió tolerancia al daño necrótico causado por patógenos virales (virus de la necrosis del tabaco) o fúngicos (*Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*). Al parecer la captura intracelular del Fe por las ferritinas protegió a las plantas del daño oxidativo inducido por varios tipos de estrés.

Al ser liberado de las ferritinas del tejido radical el Fe(II) se moviliza a las restantes partes de la planta vía el xilema en donde toma de nuevo la forma Fe(III). El pH promedio del exudado de xilema de diferentes especies es 5.5, lo cual tiende a convertir el Fe(II) en Fe(III). Este último es transportado hacia las partes aéreas de la planta como citrato férrico. Existe evidencia que indica que antes de la incorporación del hierro a las ferritinas en las hojas o semillas el Fe(III) unido al citrato debe reducirse de nuevo a Fe(II) (Laulhere y Briat, 1993). Al parecer esta reducción de Fe(III) a Fe(II) es una reacción fotoquímica inducida por la luz en el rango azul-ultravioleta (Emery, 1982).

Lobréaux *et al.* (1992) determinaron que en el maíz (*Zea mays*) la presencia de Fe (575×10^{-6} Mol) en plántulas expuestas a carencia de Fe indujo rápida y abundante acumulación (24 horas) del mineral así como de mRNA de ferritina en las hojas. En el caso del nivel de mRNA de ferritina en las raíces este se mostró más estable frente al estímulo de adición de hierro. Los autores encontraron que el Fe acumulado en las raíces se encontró en la fracción apoplástica. Por otra parte, Lobréaux *et al.* (1993) encontraron que el caso de las plantas las ferritinas, además de ser inducidas por el Fe, responden a la aplicación de ácido abscísico (ABA) exógeno, generándose un incremento transitorio de los mRNA de ferritina. La inducción del mRNA de la ferritina es muy baja en el mutante vp2 de maíz que muestra deficiencia de ABA. Los mencionados autores concluyeron que el ABA se ve involucrado en la respuesta de las plantas al Fe. Por último, el reporte de Van Wuytswinkel *et al.* (1999) ilustra la importancia de la regulación de la concentración de ferritinas. En dicho trabajo se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con sobreacumulación de ferritinas foliares lo que originó una deficiencia inducida de Fe en los tejidos. A su vez esta deficiencia dio lugar a la inducción de actividad de Fe-reductasa en la raíz. Siguiendo lo dicho en los párrafos anteriores tal parece que la sobreexpresión de ferritina disminuye el estrés oxidativo originado por el Fe, pero la sobreexpresión arriba de cierto nivel da lugar a deficiencia de Fe.

Las ferritinas son sujeto de interés en los estudios de mejoramiento e ingeniería genética orientados a mejorar el aporte de Fe a la población humana. Según Theil *et al.* (1997) la selección de genotipos con mayor contenido de ferritina en las semillas puede ser una estrategia viable para aumentar la concentración de Fe biodisponible en la dieta.

3.3. Papel del Hierro en el Estrés Oxidativo

Al igual que otros metales del grupo de transición el Fe puede dar lugar a estrés oxidativo. Este último término se define como la oxidación destructiva de proteínas, DNA, esteroides y lípidos insaturados de las membranas por acción de las especies y metabolitos reactivos de oxígeno (como el anión superóxido, O_2^- , y el peróxido de hidrógeno, H_2O_2) generadas en procesos endógenos. El estrés oxidativo es controlado por los niveles de compuestos reductores como los tioles glutatión y cisteína así como por la actividad de enzimas atrapadoras de radicales libres como la superóxido dismutasa y la catalasa. De acuerdo con Aust (1989) la peroxidación de lípidos requiere Fe(III) ó Fe(II) probablemente en la forma de complejos O_2-Fe . Por sí mismo el Fe es capaz de catalizar reacciones redox entre el oxígeno y biomacromoléculas, reacciones que no ocurrirían en ausencia de Fe. Por otro lado, se sabe que el hierro complejado con ADP, histidina, EDTA, citrato y otros agentes quelantes es capaz de facilitar la formación de especies reactivas de oxígeno capaces de oxidar tioles y que dan lugar a la destrucción de lípidos por peroxidación.

Vansuyt *et al.* (1997) demostraron que la sobrefertilización con Fe en plántulas de *Brassica napus* origina rápida acumulación del mRNA de la ascorbato peroxidasa, una enzima atrapadora de H_2O_2 . Se encontró además que la expresión inducida por Fe de la ascorbato peroxidasa fue independiente de las respuestas de la planta a otros agentes que inducen daño oxidativo lo cual parece indicar la existencia de vías múltiples de respuesta al estrés oxidativo. En la planta acuática *Hydrilla verticillata* la aplicación de $FeCl_3$ fue equivalente a la aplicación de otros agentes oxidantes (Sinha *et al.*, 1997), encontrándose que el Fe generó daño peroxidativo de lípidos, pérdida de K^+ hacia el medio externo (sugiriendo daño a las membranas), disminución de la forma reducida de glutatión e incremento de la forma oxidada, aumento en la actividad de superóxido dismutasa y disminución del contenido de clorofila. Los resultados de estos investigadores indicaron que el efecto oxidativo del Fe se relacionó con la oxidación de tioles y con la generación de especies reactivas de oxígeno.

De manera análoga Caro y Puntarulo (1996) observaron que la adición de Fe-EDTA *in vivo* hasta llegar a una concentración exógena de 5×10^{-4} M (es decir, 500,000 veces sobre el mínimo de 10^{-9} M), da lugar a incremento en el contenido de Fe en los tejidos acompañado de estrés oxidativo en la raíz de la soya (*Glycine max*). Al nivel subcelular los autores encontraron que el contenido de Fe y la tasa de reducción de Fe-EDTA aumentaron en los microcuerpos aislados de las raíces expuestas al Fe, en comparación con un testigo sin adición de Fe. Al compararse con los de dicho testigo, los microcuerpos del retículo endoplásmico de las raíces en el medio con Fe mostraron un 55% de aumento en la generación de aniones superóxido, así como cuatro veces la tasa de producción de radicales hidroxilo. Por otra parte, la suplementación de Fe no afectó la actividad de enzimas antioxidantes ni el contenido total de tioles, aunque sí disminuyó de manera significativa el contenido de alfa-tocoferol. A este respecto es interesante el reporte de Caris *et al.* (1995) quienes indican que el Fe quelatado con un sideróforo sintético (O-Trensox) no genera daño oxidativo, cosa que sí ocurre con el Fe-EDTA y Fe-citrato.

3.4. Absorción de Hierro por Simbiontes Diazótrofos

Literalmente diazótrofo significa "comedor de dinitrógeno ó N_2 ", y se refiere a la conocida capacidad de las leguminosas para asociarse con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* formando tejidos simbiotes con la capacidad de reducir el N_2 a NH_3 . La deficiencia de Fe puede limitar la fijación simbiótica de N_2 modificando la supervivencia y crecimiento de los rhizobia en el suelo, restringiendo la iniciación y desarrollo de los nódulos así como afectando negativamente la función del nódulo y el crecimiento de la planta. Tanto en los simbiotes bacterianos como en las plantas hospederas se ha detectado extensa variación en la habilidad para sobrevivir y crecer bajo estrés de carencia de Fe. Se sabe por ejemplo que diferentes cepas de *Bradyrhizobium* tienen distinta capacidad de excreción de sideróforos, y que dichas diferencias parecen relacionarse con la habilidad de las bacterias para nodular las raíces en suelos calcáreos (Tang *et al.*, 1992).

En ausencia de Fe se presentan fallas en la nodulación relacionadas con escaso crecimiento y liberación de bacteroides de los hilos de infección. El resultado final es la restricción en el crecimiento de meristemos del nódulo y la ausencia de un nódulo funcional (Tang *et al.*, 1992). En *Rhizobium leguminosarum* la carencia de Fe origina niveles reducidos de citocromos b y c así como la acumulación de porfirinas (precursores de los grupos hem), que se detectan por la fluorescencia roja-rosada al iluminar las colonias con luz UV. Por otra parte, algunos mutantes como el 116 de *Rhizobium leguminosarum*, con muy baja capacidad de asimilación de Fe dan lugar a nódulos pequeños de color blanco pero sin anomalías micromorfológicas obvias tanto en el nódulo como en los bacteroides (Nadler *et al.*, 1990).

Para el caso de las leguminosas el manejo y producción de nuevos cultivares para suelos calcáreos requiere un enfoque integral que tome en cuenta la presencia del sistema leguminosa-simbionte diazotrófico (Tang *et al.*, 1992).

3.5. Competencia por Hierro en la Rizosfera y Fitopatogenicidad

La presencia o la aplicación de ciertas bacterias con el objetivo de suprimir enfermedades causadas por patógenos del suelo puede traducirse, aunque no es una regla, en mayor crecimiento y rendimiento de las plantas. Los mecanismos del antagonismo son la competencia, el parasitismo, la depredación y la antibiosis. Se ha dicho que en el caso de ciertas rizobacterias (bacterias asociadas a la raíz), como *Pseudomonas*, la habilidad para complejar el Fe con sideróforos es clave como mecanismo de supresión de patógenos. Sin embargo dicha afirmación está lejos de ser un hecho demostrado (Alabouvette *et al.*, 1996) y se ha encontrado que la producción de antibióticos e inhibidores del crecimiento pueden ser más importantes como factor supresivo (Gill y Warren, 1988).

3.6. Consecuencias Fisiológicas de la Carencia de Hierro

El síntoma más obvio de una fuerte carencia de hierro es la clorosis férrica foliar. La clorosis férrica es un desorden fisiológico complejo, se conocen al menos 10 causas diferentes que inducen la clorosis férrica y, al observarla, lo común es que estén actuando al menos dos de ellas conjuntamente (Peterson y Onken, 1992). La fase final de una clorosis férrica, con carencia extrema de Fe, genera necrosis y muerte de las hojas. Sin embargo, antes de ocurrir esto se observan grandes disfunciones en el aparato fotosintético. Winder y Nishio (1995) determinaron que el contenido y actividad de fijación de CO₂ de Rubisco disminuyeron en un 60% y un 66%, respectivamente, en hojas con estrés severo de Fe. El contenido de Rubisco fue dependiente de la disponibilidad de mRNAs y tanto dicha disminución en la cantidad de polipéptidos como la caída en la actividad de fijación de CO₂ se correlacionaron directamente con el contenido de clorofila. Por otra parte la activación de Rubisco por la Rubisco activasa fue también menor en 27% en las hojas estresadas.

En la cianobacteria *Oscillatoria tenuis* se observó que, dentro del rango de concentración de Fe 4.2×10^{-5} hasta 5.1×10^{-9} , la tasa de crecimiento no se vio limitada por la capacidad fotosintética sino por otra función celular no determinada. Asimismo la carencia de Fe en el medio de crecimiento indujo la síntesis de sideróforos extracelulares y de proteínas específicas cuya función se relacionó probablemente con el transporte de Fe hacia el interior de la célula, dicha actividad se correlacionó con la recuperación del crecimiento de las células en el medio pobre en hierro. Sin embargo, a pesar de la activación de este sistema de transporte de alta afinidad la tasa de crecimiento no llegó a los niveles observados en un medio con adecuado nivel de Fe (Trick *et al.*, 1995).

4. DIFERENCIAS INTER- E INTRAESPECIFICAS EN LA HABILIDAD PARA ASIMILAR HIERRO

La habilidad para asimilar hierro por parte de una planta u otro organismo depende de la acción conjunta de una serie de mecanismos que fueron analizados brevemente en párrafos anteriores. Esta habilidad o eficiencia se sabe que varía bastante entre especies así como entre cultivares, cepas o variedades dentro de cada especie (Bianfait, 1988). Como un ejemplo, Brown y Olsen (1980, J. Plant Nutrition 2:661-682) encontraron que las plantas dicotiledóneas son en general más eficientes para enfrentarse a las deficiencias de hierro que las monocotiledóneas. Del mismo modo, se han detectado diferencias en aptitud para esta característica entre cultivares de especies de cultivo como la soya, frijol, tomate, girasol, maíz, cebada, sorgo, etc. Entre las gramíneas que utilizan la estrategia II se encuentran especies resistentes a la clorosis férrica (como el trigo, la cebada y el centeno) así como especies susceptibles a dicho problema (como el sorgo). Se ha demostrado que la diferencia en eficiencia depende de la cantidad de fitosideróforos excretados a la rizosfera en combinación con la acción de otros mecanismos alternativos para la absorción de Fe como la capacidad de absorción de sideróforos microbianos, la inducción de una reductasa de Fe⁺³ así como la absorción pasiva de quelatos de hierro (Römheld, 1991).

Rodríguez de Cianzio (1991) menciona que aunque la clorosis férrica es un problema extendido el mejoramiento genético orientado a esta característica se realiza en pocas especies como la avena (*Avena byzantina*), sorgo (*Sorghum bicolor*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), soya (*G. max*), cacahuate (*Arachis hypogea*), tréboles (*Trifolium* spp.), pastos forrajeros (*Botriochloa* sp.), chile (*Capsicum annuum*), cítricos (*Citrus* sp.), mango (*Mangifera indica*) y aguacate (*Persea americana*).

Al respecto Ambler *et al.* (1971) encontraron diferencias en la habilidad para reducir el Fe(III) a Fe(II) entre dos cultivares de soya clasificados uno como eficiente y el otro como ineficiente para asimilar hierro y Gildersleene *et*

al. (1989) detectaron gran variabilidad en la respuesta a la deficiencia de Fe en 22 cultivares de trébol pertenecientes a tres especies.

Asimismo, el grupo de Fehr, de la Universidad de Iowa, desarrolló un programa de selección recurrente para la obtención de cultivares de soya con eficiencia en la absorción y asimilación de hierro en suelos calcáreos. El resultado a mediano plazo fue una población llamada AP9 la cual es fuente para la derivación de líneas que han mostrado buen desempeño en los ensayos estatales y nacionales de USDA y la Universidad de Iowa (Rodríguez de Cianzio y Fehr, 1982; Beeghly y Fehr, 1989; Dranonuk *et al.*, 1989; Diers *et al.*, 1991).

La selección de progenitores y progenies mejoradas para resistencia a la clorosis férrica requiere de la correcta identificación de genotipos superiores. Para caracterizar la resistencia a la clorosis férrica se han utilizado con éxito diferentes métodos como los índices visuales, el contenido foliar de clorofila y la habilidad de excretar compuestos reductores por la raíz. En particular los índices visuales, que muestran alta correlación con el contenido foliar de clorofila, resultan útiles y prácticos (Peterson y Onken, 1992).

Algunas plantas utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de la anemia presentan niveles muy altos de Fe en los tejidos. Como ejemplo se tiene a *Bridelia cathartica* con 356.9 ppm de Fe y a *Lannea stuhlmannii* con 352.1 ppm, ambas plantas del continente africano (Omolo *et al.*, 1997). Probablemente el estudio de los mecanismos de absorción y acumulación de Fe de plantas como estas pueda dar mayor luz sobre los mecanismos genéticos y fisiológicos implicados. Asimismo, se requiere mayor cantidad de estudios para clarificar si la obtención de genotipos resistentes a la clorosis férrica asegura que se contará con cosechas de mayor calidad nutricional con un nivel adecuado de Fe biodisponible.

5. CORRECCION DE LA CARENCIA DE HIERRO

Un valor de Fe disponible en el suelo menor a 11 ppm se considera bajo. Los valores que se consideran óptimos se ubican entre 12 y 24 ppm y el manejo del suelo y fertilización se dirige hacia lograr y mantener dichos valores ya que normalmente existe correlación entre la concentración de Fe disponible en el suelo y el observado en los tejidos vegetales.

La materia orgánica en el suelo ejerce un efecto positivo sobre la solubilidad del hierro a través de un efecto reductor más que por el propio aporte de Fe contenido en la biomasa. Se sabe por ejemplo que se ejerce un efecto positivo sobre las plantas al añadir materia orgánica a un suelo deficiente en Fe disponible, por otra parte la misma respuesta no se observa al añadir las cenizas provenientes de la combustión de la misma cantidad de materia orgánica. La degradación biológica de la materia orgánica aporta e^- y otros agentes reductores que bajan el potencial redox del suelo, creando microambientes de reducción (deficientes en O_2) en el suelo en donde la concentración de Fe(II) disponible para las plantas se incrementa. Se sigue de este hecho que la aplicación y mantenimiento de la materia orgánica en el suelo se traduce en adecuada disponibilidad a largo plazo de Fe (Lindsay, 1991).

Un aporte adecuado de potasio se relaciona con una mejor respuesta a la carencia de Fe, tanto en plantas que muestran la estrategia I como en aquellas que presentan la estrategia II (Hughes *et al.*, 1992).

A corto plazo las formas de corregir la carencia de hierro son, básicamente (Zuang, 1982; Morard, s.a.):

- Aplicación de quelatos de hierro (EDTA, DTPA, HEDTA ó EDDHA) al suelo o por vía foliar, en cultivos anuales las aplicaciones al suelo son caras y poco efectivas.
- Aplicación de sales de hierro (como el sulfato de hierro) al suelo o por vía foliar, en cultivos anuales las aplicaciones al suelo son caras y poco efectivas.
- Aplicación de ácido fosfórico, sulfúrico o nítrico (o KOH si el suelo es ácido) en el agua de riego para modificar la solución del suelo. Las dosis recomendadas varían de acuerdo a la situación, pero las aplicaciones de 10 a 20 litros por hectárea por semana son comunes en sistemas de producción con riego por goteo.

Alternativamente puede realizarse lo siguiente:

- Aplicación al suelo de 60-200 kg de azufre agrícola más 10-15 kg de sulfato de hierro heptahidratado (20% de Fe) por hectárea e incorporarlo con la rastra. Esta aplicación puede ser localizada solo en la cama de siembra en cuyo caso se utilizan 40-80 kg de azufre y 3-5 kg de sulfato de hierro por hectárea y se incorpora con rotocultivadora. El efecto acidificante del azufre y el sulfato facilita la absorción del Fe por parte de la planta.

- Aplicación de sulfato de amonio (300-500 kg por hectárea ó 30-50 g por m²) disuelto en agua por vía fertirriego o aplicado superficialmente y después incorporado con máquina.

El Cuadro 2 (Zuang, 1982) presenta información acerca de las condiciones de aplicación de los quelatos de hierro usados en la práctica agrícola:

Cuadro 2. Información básica acerca de los quelatos de hierro.

QUELATO	CONTENIDO DE Fe	RANGO DE CONDICIONES DE USO
EDDHA	5.9 a 7 %	pH del suelo 3 a 9; no exponer a radiación ultravioleta
HEDTA	2 %	PH del suelo de 3 a 7.8
DTPA	2.0 a 2.2 %	PH del suelo de 3 a 7
EDTA	1.8 a 2.3 %	PH del suelo de 3 a 6.5

La solución nutritiva aplicada por vía foliar debe contener entre 0.6 y 1.5 mg/l (ppm) de Fe, es decir, de 0.06 a 0.15 g de Fe por cada 0.1 m³ ó bien de 1.07×10^{-5} a 2.69×10^{-5} molar de Fe. Esta dosis puede duplicarse en caso de presentarse de nuevo los síntomas de clorosis. Si el aporte es al suelo la dosis media es de 20 a 25 kg de producto comercial por hectárea (desde 300 hasta 3000 g de Fe por hectárea). En campos de golf Glinski *et al.* (1992) aplicaron 1.12 kg de Fe por hectárea cada 30 días en forma de Sequestrene 330 (DTPA).

Al aplicar productos comerciales que llevan varios microelementos incorporados en su fórmula las dosis de Fe (promedios para cultivos hortícolas) son las siguientes:

NOMBRE DEL PRODUCTO	CONTENIDO DE Fe	DOSIS FOLIAR DEL PRODUCTO	DOSIS AL SUELO
Fertiquel-Combi (BASF)	5 %	0.5 - 1.5 kg/ha	3 - 10 g/m ²
Poliquel Fierro (GBM)	8 %	2 - 3 litros/ha	
Foltrón plus (GBM)	500 ppm	2 - 3 litros/ha	
Mastergrow (Mastergrow International)	0.10 %	0.5 kg/ha	

Karkosh *et al.* (1988) realizaron aplicaciones de Sequestrene 138 Fe (Fe-EDDHA) a las semillas (aplicando 10 g de Fe-EDDHA más 5 g de Biosorb* por kg de semilla) de cultivares de soya con diferente eficiencia en la absorción de Fe. Las semillas tratadas fueron sembradas en suelos calcáreos de pH=8.0. Los autores encontraron que la aplicación mejoró significativamente el rendimiento de los cultivares eficientes, pero no lo aumentó en el caso de los ineficientes.

*Biosorb (Energo, Inc.) es un polímero hidrofílico a base de almidón con el cual se cubre la semilla.

6. BIODISPONIBILIDAD DEL Fe

Según Gibson (1997) la estrategia tecnológica más efectiva para combatir la deficiencia de hierro en los países menos industrializados incluye varias tácticas como son: (i) suplementación de Fe a los grupos de alto riesgo, (ii) promoción del uso de alimentos fortificados así como dietas diseñadas para maximizar la biodisponibilidad de Fe en los mismos y (iii) maximización de la biodisponibilidad del Fe intrínseco en los alimentos de origen animal y vegetal. En el caso de los vegetales el Fe intrínseco es aquel que se acumula en los tejidos a partir del suelo o de la fertilización foliar y es el susceptible de incrementarse a través del manejo agronómico.

Alta concentración de Fe en el tejido vegetal no implica necesariamente que dicho elemento se encuentre disponible al ser consumido. La deficiencia de hierro en humanos es parcialmente producida por la ingestión de dietas que contienen niveles bajos de Fe biodisponible, sea por la acción de inhibidores como los taninos o el fitato, por el bajo nivel de promotores o bien por bajo nivel *per se* de hierro (Gibson, 1997). Se le llama biodisponible a la fracción del contenido de un elemento que es realmente utilizable por el organismo que consume el tejido vegetal. Dicha biodisponibilidad se ve modificada por multitud de factores genéticos y ambientales. Al respecto Reddy *et al.* (1993) demostraron que existe una relación directa entre la cantidad de Fe disponible en el suelo y la concentración de Fe en los tejidos de espinaca (*Spinacea oleracea*), pero que mayor cantidad de Fe no implica mayor biodisponibilidad del mismo. Esta última propiedad fue dependiente más bien de la concentración de Zn en la planta. Los valores de 30 ppm de Fe y de 15 ppm de Zn en el suelo optimizaron la biodisponibilidad *in vitro* de Fe. Considerando los anteriores datos es obvio que se tiene una gran oportunidad en el desarrollo y optimización de tecnologías de pre y postcosecha que permitan obtener granos, semillas, frutas y vegetales calidad nutricional superior.

7. CONCLUSIONES

La regulación y control de la captura-asimilación-acumulación de Fe por parte de las plantas es muy compleja, involucrando diferentes mecanismos que mejoran tanto la solubilización como la absorción de dicho elemento. Estos procesos fueron revisados de manera somera pero es apreciable la existencia de grandes lagunas en el conocimiento de estos procesos. La carencia de Fe es un problema muy extendido que puede aliviarse en parte mejorando el aporte de este elemento en los vegetales, semillas, frutas y granos que consume la población. Sobre todo para las regiones en donde la disponibilidad de Fe en el suelo es baja son necesarios mayores estudios orientados no solo a evitar y corregir la clorosis férrica, también debe considerarse la biodisponibilidad de dicho Fe como parte integral de los programas de manejo y optimización de tecnología. Aunque a corto plazo la administración de complementos y la fortificación de alimentos resulta en un aporte aumentado de Fe a la población que lo consume, en realidad solo cierto sector de la población se ve beneficiada. A largo plazo el aporte adecuado de Fe para toda la población humana surgirá de la mayor comprensión de los mecanismos que utiliza la naturaleza para resolver dicho problema.

8. LITERATURA CITADA

- Alabouvette, C., P. Lemanceau, and C. Steinberg. 1996. Biological control of fusarium wilts: opportunities for developing a commercial product. In: R. Hall (Ed.) Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens. APS Press, St. Paul, Minnesota. pp. 192-212.
- Ambler, J.E., J.C. Brown and H.G. Gauch. 1971. Sites of iron reduction in soybean plants. *Agron. J.* 63:95-97.
- Ardon, O., R. Nudelman, C. Caris, J. Libman, A. Shanzer, Y. Chen and Y. Hadar. 1998. Iron uptake in *Ustilago maydis*: tracking the iron path. *J. Bacteriol.* 180:2021-2026.
- Aust, S.D. 1989. Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl. Nutr. Diet.* 43:266-277.
- Becker, R., R. Manteuffel, D. Neumann and G. Scholz. 1998. Excessive iron accumulation in the pea mutants dgl and brz: subcellular localization of iron and ferritin. *Planta* 207:217-223.
- Beeghly, H.H. and W.R. Fehr. 1989. Indirect effects of recurrent selection for Fe efficiency in soybean. *Crop Sci.* 29:640-643.
- Bienfait, H.F. 1988. Mechanisms in Fe-Efficiency Reactions of Higher Plants. *J. Plant Nutr.* 11:605-629.
- Boyer, R.F., H.M. Clark and A.P. LaRoche. 1988. Reduction and release of ferritin iron by plant phenolics. *J. Inorg. Biochem.* 32:171-181.
- Brown, J.C. and V.D. Jolley. 1989. Plant metabolic responses to iron-deficiency stress. *BioScience* 39:546-551.
- Caris, C., P. Baret, C. Beguin, G. Serratrice, J.L. Pierre and J.P. Laulhère. 1995. Metabolization of iron by plant cells using O-Trensox, a high-affinity abiotic iron-chelating agent. *Biochem. J.* 312:879-885.
- Caro, A. and S. Puntarulo. 1996. Effect of *in vivo* iron supplementation on oxygen radical production by soybean roots. *Biochim. Biophys. Acta* 1291:245-51.
- Chen, Y. and P. Barak. 1982. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Adv. Agron.* 35:217-240.

- Clarkson, D.T. and J.B. Hanson. 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:239-298.
- Deak, M., G.V. Horvath, S. Davletova, K. Torok, L.Sass, I. Vass, B. Barna, Z. Kiraly and D. Dudits. 1999. Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nat. Biotechnol.* 17:192-196.
- Diers, B.W., B.K. Voss and W.R. Fehr. 1991. Moving-mean analysis of field tests for iron efficiency of soybean. *Crop Sci.* 31:54-56.
- Dranonuk, M.B., W.R. Fehr and H.J. Jessen. 1989. Effectiveness of nutrient-solution evaluation for recurrent selection efficiency of soybean. *Crop Sci.* 29:952-955.
- Eide, D., M. Broderius, J. Fett and M.L. Guerinot. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93:5624-5628.
- Emery, T. 1982. Iron metabolism in human and plants. *Am. Sci.* 70:626-632.
- Gibson, R.S. 1997. Technological approaches to combatting iron deficiency. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51 Suppl. 4:S25-S27.
- Gildersleeve, R.R. and W.R. Ocampo. 1989. Greenhouse evaluation of subterranean clover species for susceptibility to iron-deficiency chlorosis. *Crop Sci.* 29:949-951.
- Gill, P.R. Jr. and G.J. Warren. 1988. An iron-antagonized fungistatic agent that is not required for iron assimilation from a fluorescent rhizosphere pseudomonad. *J Bacteriol* 1988 Jan 170:1 163-70
- Glinski, D.S., R.N. Carrow and K.J. Karnok. 1992. Iron fertilization effects on shoot/root growth, water use, and drought stress of creeping bentgrass. *Agron. J.* 84:496-503.
- Hughes, D.F., V.D. Jolley and J.C. Brown. 1992. Roles for potassium in the iron-stress response mechanisms of strategy I and strategy II plants. *J. Plant Nutr.* 15: 1821-1839.
- Karkosh, A.E., A.K. Walker and J.J. Simmons. 1988. Seed treatment for control of iron-deficiency chlorosis of soybean. *Crop Sci.* 28:369-370.
- Kloepper, J.W., J. Leong, M. Teintze and M.N. Schroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886.
- Laulhere, J.P. and J.F. Briat. 1993. Iron release and uptake by plant ferritin: effects of pH, reduction and chelation. *Biochem. J.* 290:693-699.
- Lescure, A.M., D. Proudhon, H. Pesey, M. Ragland, E.C. Theil and J.F. Briat. 1991. Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8222-8226.
- Lindsay, W.L. 1991. Iron oxide solubilization by organic matter and its effect on iron availability. *Plant Soil* 130:27-34.
- Ling, H.Q., A. Pich, G. Scholz and M.W. Ganal. 1996. Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 252:87-92.
- Lobréaux, S., O. Massenet and J.F. Briat. 1992. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol. Biol.* 19:563-575.
- Lobréaux, S., T. Hardy and J.F. Briat. 1993. Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. *EMBO J.* 12:651-657.
- Moog, P.R., T.A. van der Kooij, W. Brüggemann, J.W. Schiefelbein and P.J. Kuiper. 1995. Responses to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana*: the Turbo iron reductase does not depend on the formation of root hairs and transfer cells. *Planta* 195:4 505-13.
- Morard, P. (s.a.) *Elements mineurs nécessaires*. Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse.
- Murphy, T.P., D.R.S. Lean and C. Nalewajko. 1976. Blue green algae: their excretion of iron-selective chelators enables them to dominate other algae. *Science* 192:900-902.

- Nadler, K.D., A.W. Johnston, J.W. Chen and T.R. John. 1990. A *Rhizobium leguminosarum* mutant defective in symbiotic iron acquisition. *J Bacteriol.* 172:670-677.
- Olsen, R.A., R.B. Clark and J.H. Bennett. 1981. The enhancement of soil fertility by plant roots. *Am. Sci.* 69:378-384.
- Omolo, O.J., S.C. Chhabra and G. Nyagah. 1997. Determination of iron content in different parts of herbs used traditionally for anaemia treatment in East Africa. *J. Ethnopharmacol.* 58:97-102.
- Peterson, G.C. and A.B. Onken. 1992. Relationship between chlorophyll concentration and iron chlorosis in grain sorghum. *Crop Sci.* 32:964-967.
- Rains, D.W. 1976. Mineral metabolism. In: Bonner, J. And J.E. Varner (Eds.). *Plant Biochemistry*, Academic Press, Inc. New York, pp. 561-597.
- Reddy, N.S., C.V. Sondge and T.N. Khan. 1993. *In vitro* bioavailability of iron from spinach (*Spinacea oleracea*) cultivated in soil fortified with graded levels of iron and zinc. *Plant Foods Hum. Nutr.* 44:241-247.
- Robinson, N.J., C.M. Procter, E.L. Connolly and M.L. Guerinot. 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397:694-697.
- Rodriguez de Cianzio, S.R. 1991. Recent advances in breeding for improving iron utilization by plants. *Plant Soil* 130:63-68.
- Rodriguez de Cianzio, S.R. and W.E. Fehr. 1982. Variation in the inheritance of resistance to iron deficiency chlorosis in soybeans. *Crop Sci.* 22:433-434.
- Römheld, V. 1991. The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. *Plant Soil* 130:127-134.
- Sinha, S., M. Gupta and P. Chandra. 1997. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle: response of antioxidants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38:286-291
- Tang, C., A.D. Robson and M.J. Dilworth. 1992. The role of iron in the (*Brady*)*Rhizobium* legume symbiosis. *J. Plant Nutr.* 15:2235-2252.
- Theil, E.C., J.W. Burton and J.L. Beard. 1997. A sustainable solution for dietary iron deficiency through plant biotechnology and breeding to increase seed ferritin control. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51 Suppl. 4:S28-S31.
- Trick, C.G., S.W. Wilhem and C.M. Brown. 1995. Alterations in cell pigmentation, protein expression, and photosynthetic capacity of the cyanobacterium *Oscillatoria tenuis* grown under low iron conditions. *Can. J. Microbiol.* 41:1117-1123.
- Vansuyt, G., F. Lopez, D. Inze, J.F. Briat and P. Fourcroy. 1997. Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. *FEBS Lett.* 410:195-200
- Van Wuytswinkel, O., G. Vansuyt, N. Grignon, P. Fourcroy and J.F. Briat. 1999. Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant J.* 17:93-97.
- Winder, T.L. and J.N. Nishio. 1995. Early iron deficiency stress response in leaves of sugar beet. *Plant Physiol.* 108:1487-1494.
- Yi, Y. And M.L. Guerinot. 1996. Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J.* 10:835-844.
- Zuang, H. 1982. La fertilisation des cultures légumières. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes. Paris.