



## INFORME FINAL DE PROYECTOS DE I+D+i

### A. Datos del proyecto

Relacione los datos del proyecto. En caso de que haya algún cambio, indíquelo cambiando de color el texto

Referencia	AGL2009-09018
Investigador principal	Anunciación Abadía
Título	Nuevos enfoques para el estudio de la disponibilidad, movimiento y localización del Fe en la fertilización de árboles frutales
Entidad	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Centro	Estación Experimental de Aula Dei
Fecha de inicio	01-01-2010
Fecha final	31-12-2012
Duración	3 años
Total concedido	196.020 euros

### B. Resumen del proyecto para difusión pública

Resuma los principales avances y logros obtenidos del proyecto con una **extensión máxima de 30 líneas**, teniendo en cuenta su posible difusión pública (páginas webs institucionales)

El proyecto AGL2009-09018, titulado "Nuevos enfoques para el estudio de la disponibilidad, movimiento y localización del Fe en la fertilización de árboles frutales" estaba dirigido a aumentar el conocimiento sobre la deficiencia férrica en frutales, y los trabajos realizados han permitido lograr resultados en todos los objetivos propuestos en el proyecto inicial. En primer lugar, se han hecho importantes avances en la caracterización de compuestos flavínicos y fenólicos sintetizados, acumulados en las raíces y/o excretados por las plantas en casos de deficiencia de Fe en diversas especies de plantas modelo, en todos los casos utilizando diversas técnicas de espectrometría de masas. Estos compuestos pueden tener una función importante en la toma de Fe en plantas afectadas por deficiencia de este nutriente. Además, se han caracterizado respuestas relacionadas con la toma de Fe en casos de corrección de la deficiencia por vía foliar y radicular, tanto a nivel enzimático como proteómico. En cuanto al transporte de nutrientes, se han usado isótopos para el seguimiento del Fe dentro de la planta a partir del aporte de un quelato marcado isotópicamente. La caracterización del xilema en deficiencia de Fe y después del aporte de este elemento se ha abordado desde estudios metabólicos y proteómicos, tanto en plantas modelo como frutales y se han discutido los resultados obtenidos según la función del compuesto en la planta. En cuanto a contenido de nutrientes, se ha estudiado la posibilidad de realizar diagnóstico precoz de deficiencias a partir de materiales vegetales distintos de las hojas utilizadas habitualmente (por ejemplo utilizando madera o yemas) y se han definido los requerimientos nutricionales a partir de las pérdidas estacionales de macro y micro-nutrientes en frutales de hoja caduca. Se han estudiado diversos métodos de localización de nutrientes en hoja (LT-SEM-EDX, STIM-PIXE y tinciones específicas de localización como Perls-DAB para Fe) y se han discutido los resultados y su posible aplicación práctica. Por último, se ha comenzado la caracterización del mercado de los fertilizantes de micronutrientes en España, con el objeto de empezar el estudio de las interacciones en los compuestos más utilizados.



## C. Informe de progreso y resultados del proyecto

### C1. Desarrollo de los objetivos planteados

Describe los objetivos y el grado de cumplimiento de los mismos (en porcentaje respecto al objetivo planteado y, en su caso, con indicación de lo que queda por realizar en cada uno de ellos)

Objetivo 1 Estudiar el movimiento del Fe en la planta tras la fertilización	Consecución del objetivo: 100%. Hay algunos datos que todavía no han sido elaborados y, por lo tanto, están sin publicar
Objetivo 2 Localizar nutrientes y compuestos relacionados con la nutrición mineral después de la fertilización	Consecución del objetivo: 100%. Se han acabado los objetivos propuestos, y se han comprobado las limitaciones de los métodos empleados
Objetivo 3 Caracterizar las soluciones de fertilizantes de micronutrientes usadas para la corrección de la deficiencia de Fe	Consecución del objetivo: 90%. Se han sentado las bases y los trabajos se están continuando dentro del nuevo proyecto AGL y de un proyecto INNPACTO (ambos con financiación de 2013 a 2015)

### C2. Actividades realizadas y resultados alcanzados

Describe las actividades científico-técnicas realizadas para alcanzar los objetivos planteados en el proyecto. Indique para cada actividad los miembros del equipo que han participado. **Extensión máxima 4 páginas**

Los resultados se detallan siguiendo el orden de los objetivos propuestos en el proyecto inicial, y se explican más detalladamente aquellos trabajos que todavía están en curso y no se tienen resultados presentados en publicaciones o comunicaciones.

1. Movimiento del Fe en la planta tras la fertilización. (AA-F, AA, HE-J, MP).

#### Tareas 1 y 2. Toma de Fe y distribución en la planta

*Toma de Fe por la raíz.* Sobre respuestas de las raíces a la deficiencia de Fe se ha seguido trabajando en plantas modelo y frutales sobre cambios inducidos por la deficiencia en el proteoma de la raíz analizando las funciones afectadas por la deficiencia (D1.5, D1.13, D2.6, D2.16 y D2.24). Se ha continuado con los estudios desarrollados sobre síntesis de riboflavina (Rbfl) y/u otros compuestos flavínicos no descritos hasta ahora (D1.5, D1.9, D2.4, y D2.27). Los nuevos compuestos sintetizados en raíces de plantas afectadas por deficiencia de Fe se han descrito en *Medicago truncatula* y se han identificado como 7-hydroxy-Rbfl, 7 $\alpha$ -hydroxy-Rbfl and 7-carboxy-Rbfl. En este tema se ha presentado una Tesis Doctoral en 2012, parcialmente financiada por el proyecto (D3.3) y una tesis master (D3.7) en la que se desarrolló un método de HPLC-MS(TOF) que permite determinar las flavinas de interés en la nutrición férrica de las plantas junto con las flavinas de interés biológico. Otra Tesis Doctoral, empezada hace un año, se enmarca en este objetivo, estudiando los compuestos fenólicos excretados por plantas modelo y su posible implicación en la tolerancia a la deficiencia de Fe (D2.27 y D3.5). Se ha estudiado el metabolismo de carbohidratos en una especie modelo con estrategia II, encontrando respuestas similares aunque menos intensas que en plantas de Estrategia I (D2.25 y D4.2).

*Efectos de la toma de Fe de forma radicular o foliar.* Sobre los efectos de la deficiencia de Fe en raíces y la toma de este elemento por las plantas se han realizado varias aportaciones al proyecto en las especies *Prunus* (D4.1), *Citrus* y algarrobo (D1.7, D2.13 y D2.14), estas dos últimas especies en colaboración con el grupo de la Dra. Pestana de la Universidad del Algarve, Portugal, participante en el proyecto. Con este grupo se han descrito respuestas de plantas a la deficiencia de Fe y movilidad de Fe aportado a la planta en forma foliar y en otras formas alternativas de corrección (D2.18 y D2.19). También se ha descrito la diferencia en la des-inducción de las respuestas inducidas por la deficiencia en fresa dependiendo de la vía de entrada del Fe, radicular o foliar (D1.11).

*Distribución de Fe en la planta.* Se ha utilizado el método de doble trazador isotópico para seguir la distribución del Fe en todos los órganos de plantas de remolacha (resultado D1.1). Las plantas se trataron con [Fe(III)-o,oEDDHA] en las formas *racémico* y *meso* marcadas con distintos isótopos de Fe. Se presentó una Tesis Doctoral (2010) que recoge esta parte del trabajo, junto con otros desarrollos de nuevas metodologías analíticas para el estudio de fertilizantes férricos (D3.2). Trabajos derivados de este subobjetivo se llevan a cabo actualmente en el marco de los proyectos en vigor (AGL-2012 e INNPACTO).

*Transporte de Fe y fertilización.* Se ha hecho una descripción de los conocimientos que se tienen



en este momento sobre la ruta del Fe en la planta (desde raíces hasta hojas) haciendo hincapié en los puntos relacionados con la fertilización (D1.3 y D2.1). Se ha publicado una guía práctica sobre la manera de realizar los estudios sobre la eficacia de los fertilizantes usados en el caso de deficiencia de Fe (D1.4 y D2.3) y sobre la fertilización en cultivos hidropónicos (D2.29). Se ha estudiado el perfil proteico de la savia de xilema en una planta modelo, con especial interés en proteínas conteniendo Fe y Zn (D1.14)

*Implicaciones de la deficiencia de Fe (y otros metales) en fotosíntesis.* Se ha estudiado la composición de pigmentos fotosintéticos en melocotonero y remolacha tras un aporte foliar de Fe (D1.16 y D2.20). Se ha escrito un capítulo invitado sobre la disipación térmica de energía en hojas en casos de deficiencia o toxicidad de diferentes nutrientes (D4.5).

**Tarea 3. Caracterización de savia de xilema y apoplasto después de la toma de Fe.**

*Ácidos orgánicos.* Se ha desarrollado un método por HPLC-ESI-TOFMS para la determinación de ácidos orgánicos en distintos tejidos (oxálico, cis-aconítico, 2-oxoglutarico, cítrico, málico, quínico, ascórbico, shikímico, succínico y fumárico) (D1.6). La clorosis férrica provoca un aumento del contenido de a. orgánicos, aunque las bajas concentraciones de estos compuestos hacen difícil su determinación, por lo que el desarrollo de este método es interesante para estudios de plantas deficientes en Fe.

*Metabólica y proteómica.* Se han publicado resultados sobre cambios en el perfil metabólico del xilema en plantas deficientes en Fe (estrategia I), usando tanto plantas modelo como frutales (D1.8, D2.5, D2.9 y D2.12, D2.22 y D2.26). Se han descrito los cambios en el nivel de Fe transportado vía xilema y el perfil metabólico del xilema después de la fertilización en especies modelo (D1.1 y D1.8). Se ha hecho un estudio sobre proteómica de xilema en frutales y apoplasto en remolacha (D1.15, D1.16 y D2.21). En 2011 se ha presentado una Tesis Doctoral que recoge algunos de los trabajos incluidos en este objetivo y que ha sido financiada parcialmente por el proyecto (D3.4). Se han hecho trabajos complementarios de proteómica relacionados con el transporte como la caracterización de la proteómica de tallo (D2.17), o la caracterización de las envolturas cloroplásticas en hojas (D2.30) en plantas modelo. En este momento hay una Tesis Doctoral en ejecución sobre la caracterización de membrana plasmática afectada por deficiencia de Fe (D3.4).

**Tarea 4. Balance de nutrientes**

*Análisis mineral de macro y micronutrientes en frutales.* Se ha utilizado la concentración de nutrientes en diversos tejidos en frutales (melocotonero y peral) para su uso en el diagnóstico precoz del estado nutricional (D1.10). También se han estudiado las pérdidas globales de nutrientes a lo largo del ciclo vegetativo para conocer los requerimientos de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn) en el caso de frutales de hoja caduca (D1.12, D2.23, D3.1 y D4.4). Hay una Tesis Doctoral presentada en 2012, que se enmarca en este objetivo del proyecto (D3.1).

*Nutrientes tras fertilización foliar.* Se ha estudiado el efecto de la fertilización foliar en el contenido mineral y balance de nutrientes en hojas de melocotonero crecidas en campo (D1.17 y D2.15) y en plantas modelo de fresa y remolacha crecidas en hidropónico (D2.15, D2.19 y D2.20).

*Interacciones Fe-otros metales.* Se ha estudiado la relación entre deficiencia de hierro y contenido de otros metales (D2.7 y D2.16).

*Publicaciones derivadas de objetivos anteriores que pueden ser incluídas en este apartado.* Algunos de los resultados obtenidos proceden de trabajos empezados en proyectos anteriores y finalizados en éste, y se pueden incluir en el primer objetivo de toma, distribución y balance de nutrientes (D1.2, D2.2, D2.10, D2.11, D2.28 y D4.3,). Estos resultados están relacionados con la influencia de la clorosis en la calidad de fruto (incluyendo su composición mineral y el contenido de ciertos metabolitos), aspecto que se había manejado en proyectos precedentes.

## 2. Localización de nutrientes y compuestos relacionados con la nutrición mineral después de la fertilización. (AA-F, AA, HE-J, SV)

El trabajo propuesto finalizó en el segundo año de proyecto como se había previsto, por lo que el informe corresponde al que se presentó para el segundo informe. Se ha hecho la microlocalización de elementos minerales (**Tarea 5**) y se han llevado a cabo estudios de gradientes en hoja (**Tarea 6**). En este último año se ha presentado una Tesis de Master sobre la aplicación de técnicas de microscopía a la determinación de cambios morfológicos inducidos por deficiencia en plantas modelo. En este trabajo se ha hecho un repaso sobre distintas técnicas, incluyendo fluorescencia y tinciones específicas en cortes de raíces y tallo en plantas afectadas por deficiencia (D3.8).

En cuanto a la **Tarea 5**, se han llevado a cabo análisis en remolacha y melocotonero, utilizando



diversas técnicas: i) microscopía electrónica de barrido a baja temperatura con una microprueba de rayos X (LT-SEM-EDX) en modo de análisis de spots para analizar la distribución de Fe mediante la medida de las señales relativas de este elemento en secciones transversales de hojas (Instituto de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid); ii) microscopía SEM-EDX (realizado en el Instituto de Carboquímica (CSIC), Zaragoza) en hojas fijadas mediante un proceso a baja temperatura realizado en el Parque Científico de Barcelona; iii) microscopía iónica de transmisión de barrido mediante Rayos-X inducidos por partículas (STIM-PIXE) en el Microanalytical Center, Jozef Stefan Institute en Ljubljana, Eslovenia; y iv) tinción de Perls (teñido de Fe con ferrocianuro de K), en la que se ha aumentado la sensibilidad añadiendo un potenciador (diaminobencidina) para teñir Fe en secciones de hojas.

*LT-SEM-EDX.* Se ha obtenido información morfológica de los tejidos de las hojas (adaxial, parénquima en empalizada, vasos del xilema, parénquima esponjoso y epidermis abaxial, D1.16, D1.16. D2.8 y D3.1). Se ha observado un menor espesor total en las secciones de las hojas cloróticas con un tejido más compacto en mesófilo en relación con las hojas control. La distribución de la señal de Fe realizada por análisis de EDX refleja niveles más elevados de la señal de Fe en las secciones de las hojas control y hojas después de la fertilización que en las hojas cloróticas. En las hojas deficientes, Fe parece estar preferentemente acumulado en el parénquima esponjoso en comparación con los otros tejidos de las hojas. En hojas, después de la fertilización tanto foliar como en suelo, los niveles más altos de la señal de Fe relativa se encontraron en los parénquimas de empalizada y esponjoso. No es posible realizar una cuantificación del elemento y los valores son señales relativas. La segunda de las técnicas sólo da buenos resultados en elementos mayoritarios como Ca. En el caso de STIM-PIXE se han visto también problemas en elementos minoritarios (D2.8).

*Perls-DAB.* En hojas controles y fertilizadas foliarmente en Fe se acumula en el parénquima de empalizada mientras que en el caso de fertilización en el suelo, el Fe aparece homogéneamente distribuido por mesófilo y tejidos vasculares. En hojas cloróticas, sólo hay señal en los tejidos vasculares. Hay una publicación en preparación con estos datos (D1.17).

Con respecto a la **Tarea 6** (Estudios de gradientes en hoja) ya se comentó en informes anteriores que no se había podido realizar en hojas de melocotonero ya que son demasiado duras y finas (160  $\mu\text{m}$ ). En las secciones obtenidas a partir de hojas de remolacha se han llevado a cabo análisis de pigmentos y ácidos orgánicos (publicación en preparación).

### 3. Soluciones de fertilizantes de micronutrientes usadas para la corrección de la deficiencia de Fe. (AA-F, AA)

**Tareas 7 y 8.** Desarrollo de técnicas para la identificación y cuantificación de fertilizantes de micronutrientes y Estudio de interacciones entre surfactantes y productos conteniendo Fe.

En el tercer objetivo se han asentado las bases para posteriores estudios sobre fertilizantes que se seguirán desarrollando en dos proyectos ya financiados para el periodo 2013-2015 (AGL2012-31988, IPT-2012-0004-060000). Se ha realizado un estudio sobre el mercado de fertilizantes dedicados a la corrección de carencias que incluyen los nutrientes tanto individuales (simples) como combinados (dobles, triples y múltiples). Este estudio refleja que una proporción importante de los fertilizantes correctores de carencias (36% de los simples, 14% de los dobles, 12% de los triples, 32% de los múltiples) contienen uno o varios agentes quelantes sintéticos. Estos quelantes sintéticos son especialmente numerosos cuando los fertilizantes contienen Fe, Mn o Zn. Así, 81% de los fertilizantes simples que contienen Fe presenta al menos un agente quelante sintético y en el caso de los fertilizantes simples de Mn y Zn, los porcentajes son del 47 y 44%, respectivamente. Estos resultados muestran la necesidad de crear métodos de análisis que permitan la determinación simultánea de los quelatos sintéticos de micronutrientes y para ello, en primer lugar, se ha probado durante el proyecto la separación de los compuestos por cromatografía de interacción hidrofílica y su detección por espectrometría de masas de alta resolución (MS(TOF)) acoplado a una fuente de electrospray (ESI) y se han encontrado intercambios y disociaciones entre el metal y el agente quelante sintéticos durante la etapa de separación. Esto se debe a diferencias entre el pH del fertilizante y el pH del eluyente cromatográfico utilizado, ya que la estabilidad de los quelatos metálicos varía con el pH. Se ha comprobado que el pH de los fertilizantes objeto de estudio está en el intervalo de 2-8. Por consiguiente, la etapa de separación cromatográfica se descartó para el análisis de estos fertilizantes y se probó el análisis por inyección directa al ESI-MS(TOF). Esta aproximación analítica ha permitido la detección (por masa exacta y huella isotópica específica de cada metal) de quelatos metálicos en un número limitado de productos y presenta la ventaja de no alterar la muestra. Actualmente, esta metodología está



siendo mejorada para evitar las interferencias isobáricas provenientes de la matriz. Para ello, se está utilizando como analizador un espectrómetro de masas de alta resolución en tándem (quadropolo-tiempo de vuelo) y se están estudiando los patrones de fragmentación de los quelatos de Fe, Mn, Cu y Zn de todos los agentes quelantes sintéticos permitidos por la legislación europea.

### **C3. Problemas y cambios en el plan de trabajo**

Describe las dificultades y/o problemas que hayan podido surgir durante el desarrollo del proyecto, así como cualquier cambio que se haya producido respecto a los objetivos o el plan de trabajo inicialmente planteados. **Extensión máxima 1 página**

Los problemas encontrados en el proyecto ya se reseñaron en informes anteriores, y no ha habido incidencias en este último año. Así, los problemas en Túnez y Portugal han continuado, aunque en el caso de Portugal se ha seguido trabajando activamente en otros objetivos dentro del proyecto. Esta última colaboración viene refrendada por varias publicaciones y comunicaciones (ver más abajo).

Como ya se comentó en el último informe, el tercer objetivo (caracterización de los fertilizantes) se ha retrasado con respecto al plan inicial, aunque se han realizado trabajos en 2012 (ver actividades realizadas).

### **C4. Colaboraciones con otros grupos de investigación directamente relacionadas con el proyecto**

Relacione las colaboraciones con otros grupos de investigación y el valor añadido para el proyecto. Describe, si procede, el acceso a equipamientos o infraestructuras de otros grupos o instituciones.

- con el grupo del Dr. J. I. García Alonso (Universidad de Oviedo) se está trabajado en la utilización de isótopos estables en metrología química y también se ha iniciado la aplicación de la ablación laser acoplada a ICPMS para el estudio de la localización de metales en hoja. Resultado D1.1.
- con el grupo de la Dra. M. Pestana (Universidad del Algarve, Portugal) se continúa colaborando en el estudio de balances nutricionales y respuestas de plantas ante la deficiencia de Fe. La IP del proyecto (A. Abadía) ha participado en un proyecto de la FCT-Portugal (ref PTDC/AGR-AAM/100115/2008, 2009-2011) y participa en otro (ref PTDC/AGR-PRO/3861/2012, 2013-2015). Resultados D1.7, D1.11, D2.13, D2.14, D2.19, D2.20, D2.28 y D2.29.
- para análisis de metabolitos trabajamos en colaboración con el Laboratorio de Metabolómica en el Genome Center (Dr. Fiehn), UC Davis, USA. Resultados D1.8, D2.5, D2.9, D2.22, D2.12.
- para los análisis relacionados con Biología Molecular que no se podían llevar a cabo en la EEAD se ha contado con la colaboración Michael Grusak (USDA-ARS Houston, US). Resultados D1.5, D2.4, D2.25 y D4.2.
- para estudios de ESI-MS/MS (Q-TOF) se continúa una estrecha colaboración con el ICMA-CSIC (Dr. Orduna, Zaragoza, España). Resultado D1.9.
- para identificación de proteínas con la Dra. J. Kehr (Centro de Biotecnología y Genómica de plantas, UPM, Madrid). Resultado D2.18.
- para algunas técnicas específicas de microscopía con el Research Institute for Bioresources (Dr. Y.F. Ma), Okayama University, Japón.
- con el grupo del Dr. A. Larbi (Instituto de Olivicultura, Túnez) se prosigue el estudio de balances de nutrientes. Resultado D4.4.
- con el grupo del Dr. J.M. Andrés, (ICB-CSIC, de Zaragoza) se sigue colaborando en los estudios de SEM-EDX en materiales vegetales.
- con el Dr. M. Uemura (Cryobiosystem Research Center, Faculty of Agriculture, Iwate University, Japón) en estudios específicos de caracterización de proteínas (label free shotgun proteomics)
- con el Dr. J-F Briat (Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes-CNRS, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Montpellier, Francia) sobre toma y transporte de



nutrientes. Resultado D1.13.

- con la Dra. S. Lütge (Biozentrum Klein Flottbek und Botanischer Garten, Hamburgo University, Alemania) se colabora en el estudio de la caracterización de la membrana plasmática en raíces de plantas afectadas por deficiencias y toxicidades.
- con investigadores de la EEAD de los departamentos de Genética y Producción Vegetal (Dr. E. Igartua, resultado D1.10) y Pomología (Dra. Y. Gogorcena, resultado D4.1).

#### **C5. Colaboraciones con empresas o sectores socioeconómicos**

Relacione las colaboraciones con empresas o sectores socioeconómicos y el valor añadido para el proyecto, la transferencia de conocimientos o resultados del mismo.

En el proyecto se contó con el respaldo de una EPO (TimacAgro, grupo Rouiller, Dr. JM. García-Mina). La colaboración con este equipo es habitual y comenzó en 2009 con un proyecto KBBE finalizado el pasado año 2012. A finales del año 2012 fue financiado un proyecto dentro de la convocatoria INNPACTO, para los años 2013-2015. Igualmente, esta empresa ha apoyado la ejecución del nuevo proyecto financiado en la convocatoria 2012 de Plan Nacional de Agricultura.

Durante el año 2012 se ha comenzado una colaboración con Fertiberia. Con esta empresa se mantiene un pequeño contrato y uno de sus contratados perteneciente al departamento de I+D de la empresa trabaja integrado en nuestro grupo de investigación

Además, nuestro grupo trabaja habitualmente en colaboración con otras empresas del sector, en general para el estudio de la eficacia de fertilizantes y bajo términos de confidencialidad. Estos trabajos permiten hacer transferencia de conocimiento y, al mismo tiempo, mantienen el contacto de los proyectos con la actividad del sector.

#### **C6. Actividades de formación y movilidad de personal**

Indique las actividades de formación y movilidad de personal relacionadas con el desarrollo del proyecto. Además, si procede, las actividades realizadas en colaboración con otros grupos o con actividades de formación en medianas o grandes instalaciones.

	Nombre	Tipo (becario, técnico, contratado con cargo al proyecto, posdoctoral, otros)	Descripción de las actividades de formación
1	Saúl Vázquez	Posdoctoral	Análisis de imagen micro Pixe, Microanalytical Center, Jozef Stefan Institute en Ljubljana, Eslovenia (2010)
2	Patricia Sisó	Becario FPI	Estudios de ESI-MS/MS (Q-TOF) en el ICMA-CSIC, Universidad de Zaragoza (2011)
3	Patricia Sisó	Becario FPI	Curso de Especialización: Especiación de elementos traza: metodología analítica y aplicaciones, Universidad de Barcelona (2011)
4	Patricia Sisó	Becario FPI	Estancia FPI en la Universidad de Montpellier, Francia (2012)

#### **C7. Actividades de internacionalización y otras colaboraciones relacionadas con el proyecto**

Indique si ha colaborado con otros grupos o si ha concurrido, y con qué resultado, a alguna de las convocatorias de ayudas (proyectos, formación, infraestructuras, otros) del Programa Marco de I+D de la UE y/o a otros programas internacionales, en temáticas relacionadas con la de este proyecto. Indique el programa, socios, países y temática y, en su caso, financiación recibida.

Todas las colaboraciones internacionales se han detallado ya en el apartado C4 de este informe. A continuación se amplían las que han dado lugar a un mayor porcentaje de resultados dentro del proyecto.

El equipo de investigación de la EEAD participó en un proyecto ERANET KBBE (Euroinvestigación EUI 2008-03618, 2009-2012), relacionado parcialmente con el proyecto en algunos trabajos complementarios. En este proyecto participaron los Drs. Philippar (Universidad de Múnchen, Alemania), Briat (Universidad de Montpellier, Francia), von Wirén (IPK Gatersleben, Alemania) y García-Mina (Roullier Group, España), para estudiar los procesos reguladores de la relación en la homeostasis de Fe en el cloroplasto y el citosol de células vegetales con los mecanismos de adquisición y transporte de Fe. Financiación recibida: 382.000 euros; fecha finalización Marzo 2012. En este momento se sigue colaborando activamente con todos ellos, sobre todo con la



Universidad de Montpellier (Dr. Briat). Con los investigadores de este proyecto se han conseguido los resultados D1.13 y D2.30.

Con la Dra. Pestana (Universidad de Algarve, Portugal) se ha seguido colaborando y se acaba de obtener financiación para el proyecto "Transport of iron in plants: novel approaches to an old problem. Improved iron mobility and development of a new fertilizer based on grass-clipping extracts (PTDC/AGR-PRO/3861/2012)", financiado por la Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (Portugal). En este proyecto (2013-2015), A Abadía consta como participante. Asimismo, M Pestana participa en el nuevo proyecto AGL2012 que acaba de empezar en 2013 y en el que A Abadía es la IP.

Con el Dr. Larbi (Institut de l'Olivier, Túnez) se mantiene el proyecto "Hacia el desarrollo de técnicas para un estudio fisiológico del olivo en cultivo hiper-intensivo (AP/040397/11)", financiado por AECID (España-Túnez).

## D. Difusión de los resultados del proyecto

Relacione únicamente los resultados derivados de este proyecto

**En los siguientes apartados D1, D2 y D4 se relacionan todos los resultados en los que se ha hecho constar la financiación del proyecto AGL2009-09018.**

### D1. Publicaciones científico-técnicas (con peer-review) derivadas del proyecto y patentes

Autores, título, referencia de la publicación...

1. Orera I, Rodríguez-Castrillón JA, Moldovan M, García-Alonso JI, Abadía A, Abadía J, Álvarez-Fernández A (2010) Using a dual-stable isotope tracer method to study the uptake, xylem transport and distribution of Fe and its chelating agent from stereoisomer of a xenobiotic Fe(III)-chelate used as fertilizer in Fe-deficient Strategy I plants. **Metalomics**, 2:646-657. **Factor de Impacto: 3,902**
2. Álvarez-Fernández A, Melgar JC, Abadía J, Abadía A (2011) Effects of moderate and severe iron deficiency chlorosis on fruit yield, appearance and composition in pear (*Pyrus communis* L.) and peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). **Environmental and Experimental Botany**, 71:280-286. **FI: 2,985**
3. Abadía J, Vázquez S, Rellán-Álvarez R, El Jendoubi H, Abadía A, Álvarez-Fernández A, López-Millán A-F (2011) Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. **Plant Physiol Biochem**, 49:471-482. **FI: 2,838**
4. El Jendoubi H, Melgar JC, Álvarez-Fernández A, Sanz M, Abadía A, Abadía J (2011) Setting good practices to assess the efficiency of iron fertilizers. **Plant Physiol Biochem**, 49:483-488. **FI: 2,838**
5. Rodríguez-Celma J, Lattanzio G, Grusak MA, Abadía A, Abadía J, López-Millán A-F (2011) Root responses of *Medicago truncatula* plants grown in two different iron deficiency conditions: changes in root protein profile and riboflavin biosynthesis. **J Proteom Res**, 10:2590-2601. **FI: 5,113**
6. Rellán-Álvarez R, López-Gomollón S, Abadía J, Álvarez-Fernández A (2011) Development of a new high-performance liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry method for the determination of low molecular mass organic acids in plant tissue extracts. **J Agric Food Chem**, 59, 6864-6870. **FI: 2,823**
7. Pestana M, Correia PJ, David M, Abadía A, Abadía J, de Varennes A (2011) Response of five citrus rootstocks to iron deficiency. **J Plant Nutr Soil Sci** 174, 837-846. **FI: 1,596**
8. Rellán-Álvarez R, El-Jendoubi H, Wohlgemuth G, Abadía A, Fiehn O, Abadía J, Álvarez Fernández A (2011) Metabolite profile changes in xylem sap and leaf extracts of strategy I plants in response to iron deficiency and resupply. **Frontiers Plant Sci** 2, 66.
9. Rodríguez-Celma J, Vázquez-Reina S, Orduna J, Abadía A, Abadía J, Álvarez-Fernández A, López-Millán AF (2011) Characterization of flavins in roots of Fe-deficient Strategy I plants, with a focus on *Medicago truncatula*. **Plant Cell Physiol** 52, 2173-2189. **FI: 4,702**
10. El-Jendoubi H, Igartua E, Abadía J, Abadía A (2012) Prognosis of iron chlorosis in pear (*Pyrus communis* L.) and peach (*Prunus persica* L. Batsch) trees using bud, flower and leaf mineral concentrations. **Plant Soil** 354, 121-139. **FI: 2,733**
11. Pestana M, Correia PJ, Saavedra T, Gama F, Abadía A, de Varennes A (2012) Development and recovery of iron deficiency by iron resupply to roots or leaves of strawberry plants. **Plant Physiol Biochem** 53, 1-5. **FI: 2,838**
12. El-Jendoubi H, Abadía J, Abadía A (2013) Assessment of nutrient removal in bearing peach trees (*Prunus*



*persica* L. Batsch) based on whole tree analysis. **Plant Soil**, in press. **FI: 2,733**

13. Rodríguez-Celma J, Lattanzio G, Jiménez S, Briat JF, Abadía J, Abadía A, Gogorcena Y, López- Millán AF (2013) Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the root protein profile of a peach-almond hybrid rootstock. **J Proteom Res**, in press. **FI: 5,113**
14. Lattanzio G, Andaluz S, Matros M, Calvete JJ, Kehr J, Abadía A, Abadía J, López-Millán A-F (2013) Protein profile of *Lupinus texensis* phloem sap exudates: searching for Fe and Zn containing proteins. *Proteomics*, 2ª revisión. **FI: 4,505**
15. El-Jendoubi H, Gutiérrez-Carbonell E, Lattanzio G, Abadía J, Abadía A, López-Millán AF Changes in the protein profile of *Prunus persica* xylem with Fe deficiency. In prep
16. Lattanzio G, Gutiérrez-Carbonell E, Abadía A, Abadía J, López-Millán AF Comparative proteomics of apoplastic fluid of *Beta vulgaris* as affected by Fe deficiency. In prep
17. El-Jendoubi H, Vázquez S, Calatayud A, Abadía J, Abadía A, Morales F The effects of foliar Fe application to Fe-deficient leaves are restricted to the leaf area treated. A study with peach trees grown in the field and sugar beet grown in hydroponics. In prep

## **D2. Asistencia a congresos, conferencias o workshops relacionados con el proyecto**

Nombre del congreso, tipo de comunicación (invitada, oral, póster), autores.

### **2010 15th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (15th ISINIP).**

Budapest, Hungría, Junio

- (1) Abadía J, Álvarez-Fernández A, Rellán-Álvarez R, López-Millán AF, Abadía A. Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis (Conferencia invitada).
- (2) Álvarez-Fernández A, Melgar JC, Abadía J, Abadía A. Fruit quality and yield changes in field-grown pear and peach trees as affected by iron deficiency induced chlorosis (Comunicación/poster).
- (3) El Jendoubi H, Melgar JC, Abadía A, Álvarez-Fernández A, Abadía J. Do's and do not's when assessing the efficacy of iron fertilizers (Comunicación/oral).
- (4) López-Millán A-F, Rodríguez-Celma J, Abadía A, Grusak MA, Abadía J. Effects of Fe deficiency on the riboflavin synthesis pathway in *Medicago truncatula* plants (Comunicación/poster).
- (5) Rellán-Álvarez R, El Jendoubi H, Wohlgenuth G, Abadía A, Fiehn O, Abadía J, Álvarez-Fernández A. Delving into iron deficiency metabolomics (Comunicación/oral).
- (6) Rodríguez-Celma J, Abadía A, Abadía J, López-Millán AF. Changes in the *Medicago truncatula* root proteome under Fe deficiency (Comunicación/poster).
- (7) Sagardoy R, Morales F, López-Millán AF, Abadía A and Abadía J. Zinc toxicity and iron deficiency in sugar beet (Comunicación/poster).
- (8) Vázquez S, Abadía A, Abadía J. Micro-localization of iron in iron-deficient and iron-sufficient sugar beet leaves (Comunicación/poster).

### **2010 XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. FESPB 2010.** Valencia, España, Julio

- (9) Rellán-Álvarez R, El Jendoubi H, Wohlgenuth G, Fiehn O, Abadía A, Abadía J, Álvarez-Fernández, A. Xylem metabolomics and iron deficiency (Comunicación/poster).

### **2010 28th Horticultural Congress.** Lisboa, Portugal, Agosto

- (10) El Jendoubi H, Lastra M, Melgar JC, Abadía A, Abadía J. Evaluation of a soil-applied compound applied to control iron chlorosis in peach trees: regreening and fruit quality (Comunicación/poster).
- (11) Álvarez-Fernández A, Melgar JC, Abadía J, Abadía A. Effects of iron deficiency chlorosis on fruit quality and yield in *Pyrus communis* L. and *Prunus persica* L. Batsch (Comunicación/poster).

### **2010 XIII Simposio Ibérico de Nutrición Mineral de las Plantas.** San Sebastián, España, Septiembre

- (12) Rellán-Álvarez R, El Jendoubi H, Wohlgenuth G, Fiehn O, Abadía A, Abadía J, Álvarez-Fernández, A. Delving into iron deficiency metabolomics (Comunicación/poster).

### **2011 XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal, XII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal.** Castellón, España, Junio

- (13) Pestana M, Gama F, Saavedra T, Duarte A, Abadía A, de Varennes A, Correia PJ. Estudo comparativo da resposta fisiológica de *Ceratonia siliqua* (L.) e *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. à deficiência de ferro. (Comunicación/poster).
- (14) Pestana M, Correia PJ, David M, Gama F, Abadía A, Abadía J, de Varennes A. Clorose férrica induzida. Estudo sobre a tolerância de alguns porta-enxertos de citrinos. (Comunicación/poster).





(15) El Jendoubi H, Lastra M, Abadía J, Abadía A. Effects of foliar Fe application on mineral and photosynthetic pigment composition in field grown peach leaves (Comunicación/oral).

(16) Rodríguez-Celma J, Lattanzio G, Rellán R, Abadía A, Abadía J, López-Millán AF. Root proteomics and heavy metal homeostasis: Fe and Cd in the foccus (Comunicación/oral).

**2011 3rd International Symposium on "Frontiers in Agriculture Proteome Research: Contribution of proteomics technology in agricultural sciences" . Japón**

(17) Rodríguez-Celma J, Gutierrez-Carbonell E, Lattanzio G, Kehr J, Abadía A, López-Millán AF, Abadía J. Changes in the *Medicago truncatula* stem protein profile as a result of Fe deficiency

**2012 IV Colóquio Nacional da Produção de Pequenos Frutos.** Faro, Algarve, Portugal, Abril

(18) Pestana M, Gama F, Saavedra T, Pinto JC, Abadía A, de Varennes A, Correia PJ. A caraterização e correção da deficiência de ferro em plantas de morangueiro: novas abordagens. (Comunicación/oral).

(19) Pestana M, Gama F, Saavedra T, El-Jendoubi H, Correia PJ, Abadía A. A mobilidade do ferro nas folhas de morangueiros cloróticos. (Comunicación/poster).

**2012 VII International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops.** Chanthaburi, Thailand, Mayo

(20) El-Jendoubi H, Calatayud A, Morales F, Abadía J, Abadía A. Effects of foliar Fe application on photosynthetic pigment composition and Chl fluorescence parameters in field grown peach leaves (Comunicación/poster).

**2012 16th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants (16th ISINIP).** Amherst, Massachusetts, USA, Junio

(21) Álvarez-Fernández A, Abadía A, Abadía J, López-Millán AF. Proteomic and metabolomic studies in Fe deficient Strategy I plants. (Comunicación invitada).

(22) El-Jendoubi H, Rellán-Álvarez R, Álvarez-Fernández A, Fiehn O, Abadía J, Abadía A. Changes in xylem metabolite profile during fruit development in peach trees affected by iron deficiency (Comunicación/poster).

(23) El Jendoubi H, Abadía J, Abadía A. Assessment of nutrient removal in bearing peach trees (*Prunus persica* L. Batsch) based on whole tree analysis. (Comunicación/oral).

(24) Rodríguez-Celma J, Lattanzio G, Jiménez S, Abadía J, Abadía A, Gogorcena G, López-Millán AF. Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the protein profile of *Prunus amygdalo x persica* roots. (Comunicación/oral).

(25) López-Millán AF, Grusak MA, Abadía J. Carboxylate metabolism changes induced by Fe deficiency in barley, a Strategy II plant species (Comunicación invitada).

**2012 XIV Simposio Hispano-Luso de Nutrición Mineral de las Plantas.** Madrid, España, Julio

(26) Álvarez-Fernández A, Abadía A, Abadía J, López-Millán AF. Proteomic and metabolomic studies in Fe deficient Strategy I plants. (Ponencia invitada).

(27) Sisó P, Abadía J, Abadía A, Álvarez-Fernández A. The role of iron deficiency-induced release of flavins into the rizosphere: the case of *Beta vulgaris* (Comunicación/poster).

**2012 V Congreso Ibérico de la Ciencia del Suelo.** Azores, Portugal, septiembre

(28) Gama F, Saavedra T, de Varennes A, Álvarez-Fernández A, Orera I, Abadía A, Correia PJ, Pestana M. Estudo comparativo da qualidade de laranjas provenientes de pomares instalados em solos calcários e não calcários (Comunicación/poster).

**2012 Simposio culturas sem solo e as novas tecnologias,** Torres Vedras, Portugal, Noviembre

(29) M Pestana Fertilização em culturas sem solo. (Comunicación invitada)

**2013 5th Congress of the Spanish Proteomics Society.** Barcelona, Spain, Enero

(30) Gutierrez-Carbonell EF, Takahashi D, Lattanzio G, Philippar K, Uemura M, Abadía J, López-Millán AF. Proteomic profiles of *Pisum sativum* inner and outer chloroplast envelope membranes (Comunicación/poster).



### D3. Tesis doctorales finalizadas relacionadas con el proyecto

Nombre del doctor, director de tesis, título, calificación, organismo...

#### Tesis realizadas

1. Hamdi El-Jendoubi, Fruit tree nutrition: Nutritional requirements and unbalances. Universidad de Lleida, Abril 2012, sobresaliente cum laude. Directores A Abadía /J Abadía
2. Irene Orera, Desarrollo y aplicación de nuevas metodologías analíticas para el estudio de fertilizantes férricos. Universidad de Zaragoza, Julio 2010, sobresaliente cum laude. Directores A Álvarez/J Abadía

#### Tesis parcialmente cubiertas

3. Jorge Rodríguez-Celma, Respuesta radicular a la deficiencia de Fe y la toxicidad por Cd. Universidad de Zaragoza, Enero 2012. Premio extraordinario de doctorado 2012-2013. Directores AF López/J Abadía
4. Rubén Rellán, Long distance transport and metabolism changes in iron deficient plants. Universidad Autónoma de Madrid, Febrero 2011. Premio extraordinario de doctorado 2010-2011. Directores A Álvarez/J Abadía

#### En realización

5. Patricia Sisó-Terraza. The role of organic compounds on iron acquisition. Universidad de Lleida, fecha prevista final 2014. Directores A Álvarez/A Abadía
6. Elain Gutierrez-Carbonell. Proteómica de la homeostasis de metales en plantas. Universidad Autónoma de Madrid, fecha prevista final 2014. Director J Abadía

#### Tesis de Master

7. Patricia Sisó-Terraza. Desarrollo de metodologías analíticas que permitan el aislamiento y la determinación de flavinas de interés en la nutrición Férrica de las plantas. Septiembre, 2011. Universidad de Zaragoza. Director A Álvarez
8. Dido Villaroya. Aplicación de técnicas de microscopía a la determinación de cambios morfológicos inducidos por deficiencia de hierro en *Medicago truncatula*. Diciembre 2012. Universidad de Zaragoza. Director J Abadía

### D4. Otras publicaciones derivadas de colaboraciones mantenidas durante la ejecución del proyecto y que pudieran ser relevantes para el mismo, así como artículos de divulgación libros, conferencias

Autores, título, referencia de la publicación...

#### Artículos SCI

1. Jiménez S, Ollat N, Deborde C, Maucourt M, Rellán-Álvarez R, Moreno M, Gogorcena Y (2011) Metabolic response in roots of *Prunus* rootstocks submitted to iron chlorosis. **J Plant Physiol** 168, 415-423. **FI: 2,791**
2. López-Millán AF, Grusak MA, Abadía J (2012) Carboxylate metabolism changes induced by Fe deficiency in barley, a Strategy II plant species. **J Plant Physiol** 169, 1121-1124. **FI: 2,791**

#### Divulgación

3. Álvarez-Fernández A, Melgar JC, Larbi A, Abadía J, Abadía A (2011) Efectos de la clorosis férrica en la producción, apariencia y composición química de los frutos. **Vida Rural**, 323, 44-48
4. El-Jendoubi H, Abadía J, Abadía A (2013) Estimación de las necesidades de nutrientes en frutales de hoja caduca: el caso del melocotonero. **Vida Rural**, 357, 32-36.

#### Capítulo Invitado

5. Morales F, J Abadía, A Abadía. Thermal energy dissipation in plants under unfavorable soil conditions. In Demmig-Adams B, Garab G, Adams WW, Govindjee (eds), Advances in photosynthesis and respiration: Non-photochemical Fluorescence Quenching. Springer, in press.



## E. Personal activo en el proyecto

Relacione la situación de todo el personal de las entidades participantes que haya prestado servicio en el proyecto en la anualidad que se justifica, o **que no haya sido declarado anteriormente**, y cuyos costes (salariales, dietas, desplazamientos, etc.) se imputen al mismo

	Nombre	NIF/NIE	Catg. <sup>a</sup> profesional	Incluido solicitud original	Si no incluido en solicitud original:		
					Función en el proyecto	Fecha de alta	Observaciones
1	Abadía, Anunciación	17854929Y	Prof Investigación	S			
2	Álvarez, Ana	09392534R	Científico Titular	S			
3	Vázquez, Saúl	50205647M	Cont. JAE	S			Finalización contrato Marzo 2011
4	El Jendoubi, Hamdi	X7799529E	Becario FPI	S			
5	Pestana, Maribela	7761742	Prof. Tit. Portugal	S			
6	Larbi, Ajmi	Z411218	Inv. Túnez	S			
7	Lastra, Mónica	13931192T	Temporal		Apoyo campo	01-04-10	Contratado a cargo de proyecto

-En este capítulo solo debe incluir al personal vinculado de las entidades participantes en el proyecto. Los gastos de personal externo (colaboradores científicos, autónomos...) que haya realizado tareas para el proyecto deben ser incluidos en el capítulo de "Varios".

-Las "Altas" y "Bajas" deben tramitarse de acuerdo con las instrucciones para el desarrollo de los proyectos de I+D+i expuestas en la página web del ministerio.

## F. Gastos realizados durante la anualidad

Debe cumplimentarse este apartado independientemente de la justificación económica enviada por la entidad

**Se recomienda consultar las instrucciones para la elaboración de los informes de seguimiento científico-técnico de proyectos**

**Este último apartado se ha completado con los datos pasados por la Gerencia de la EEAD con fecha 13 de marzo. Para finalizar la justificación económica el plazo termina el 4 de abril, mientras que para la técnica es el 20 de marzo. Es por ello que, aunque las cifras totales de gasto serán las mismas, los sub-apartados pueden modificarse en la justificación económica final.**

### F1. Gastos de personal

	Nombre	Situación laboral	Función desempeñada	Importe
1	Mónica Lastra Hernández	Contratada laboral GP 2	Trabajos descritos en la petición original (campo y mantenimiento de hidropónicos)	21.723,52
<b>Total gastos de personal</b>				<b>21.723,52</b>

### F2. Material inventariable (describa el material adquirido)

	Identificación del equipo	Descripción del equipo	Importe	Previsto en la sol. original (S/N)
1				
<b>Total gastos material inventariable</b>				

### F3. Material fungible

	Concepto	Importe	Previsto en la sol. original (S/N)
1	Fungible y otros gastos	26.819,59	S



<b>Total gastos material fungible</b>	<b>26.819,59</b>
---------------------------------------	------------------

<b>F4. Viajes y dietas</b>				
	<b>Concepto</b>	<b>Importe</b>	<b>Nombre del participante</b>	<b>Previsto en la sol. original (S/N)</b>
1	XIV SIMPOSIO HISPANO-LUSO DE NUTRICIÓN MINERAL		Anunciación Abadía	
2	XIV SIMPOSIO HISPANO-LUSO DE NUTRICIÓN MINERAL		Patricia Sisó	
3	XIV SIMPOSIO HISPANO-LUSO DE NUTRICIÓN MINERAL		Ana Álvarez	
4	ASISTENCIA CONGRESO ISNIP		Ana Álvarez	
<b>Total viajes y dietas</b>		<b>2.928,45</b>		

<b>F5. Otros gastos</b>				
	<b>Concepto</b>	<b>Importe</b>	<b>Nombre del participante</b>	<b>Previsto en la sol. original (S/N)</b>
1	Servicios (análisis mineral y alquiler cámaras de cultivo)	1.838,70		
2	Servicios análisis	558,00		
<b>Total otros gastos</b>		<b>2.426,70</b>		

<b>F6. Total ejecutado (costes directos únicamente)</b>	
<b>Importe total ejecutado durante la anualidad</b>	<b>53.898,26</b>

<b>F7. Descripción de gastos no contemplados en la solicitud original (si ha realizado algún gasto no contemplado en la solicitud original, justifique la necesidad de su adquisición en este apartado)</b>
Los gastos de anteriores anualidades se han descrito en informes anteriores. En esta última anualidad tres personas han asistido al XIV Simposio Hispano-Luso de Nutrición Mineral en Madrid y una persona al Simposio sobre Nutrición de Fe celebrado en Amherst, USA. En ambos casos, al tratarse del último año de proyecto, no se habían incluido en la solicitud inicial (redactada en enero de 2009).

## **G. Gastos realizados desde el inicio del proyecto**

<b>Importe total ejecutado (costes directos únicamente)</b>	<b>162.000,89</b>
---	-------------------