



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología

Área de Fisiología Vegetal

Efecto de fitofortificantes y otros productos sobre el crecimiento y metabolismo de cultivos hortícolas

Efecto de fitofortificantes e outros produtos sobre o crecemento e metabolismo de cultivos hortícolas

Effect of phytofortifiers and other products on the growth and metabolism of horticultural crops

Trabajo de fin de grado presentado por: **Brais Castelo López**

Dirigido por: **Dr. Federico Pomar Barbeito y Dña. Alba García Ulloa**

Fecha de defensa: **28 de Junio del 2017**

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN	1
1. Los fitofortificantes	1
1.1. Concepto	1
1.2. Mecanismos de acción	1
1.3. Fitofortificante utilizado: Manvert Sulphos®	1
2. El azufre como nutriente.....	2
3. El azufre en la planta	3
3.1. Captación de azufre en la planta.....	3
3.2. Deficiencia de azufre en la planta	3
3.3. El azufre en el metabolismo secundario	4
OBJETIVOS	5
MATERIAL Y MÉTODOS	6
1. Material de laboratorio	6
2. Material vegetal	6
3. Aplicación Manvert Sulphos®	7
4. Determinación del crecimiento vegetativo.....	7
5. Determinación de la actividad fotosintética	8
6. Determinación de proteínas totales y actividad peroxidasa.....	10
7. Determinación de clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos	11
8. Análisis estadístico	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
1. Desarrollo vegetativo	13
1.1. Evaluación de las características externas	13
1.2. Peso fresco y peso seco.....	13
1.3. Peso de cenizas	14
2. Actividad fotosintética	15
3. Determinación de proteínas totales y actividad peroxidasa.....	18
4. Determinación de clorofilas y carotenoides	20
5. Determinación de compuestos fenólicos.....	21
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23

RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto del producto Manvert Sulphos[®] en el cultivo de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Manvert Sulphos[®] es una solución nitrogenada con un alto contenido en azufre, cuya acción principal consiste en nutrir y fortalecer la planta, aunque de forma secundaria también puede mejorar la defensa de la planta ante patógenos e inducir la resistencia de la planta mediante la activación de sus defensas naturales.

Para determinar los efectos y la eficacia del producto se estudiaron los siguientes parámetros en plantas tratadas y control: peso fresco, peso seco y peso de cenizas, actividad fotosintética, contenido de proteínas totales y medida de la actividad peroxidasa y concentración de pigmentos fotosintéticos y compuestos fenólicos.

Una vez estudiados estos parámetros se pudo observar que existían diferencias significativas en el peso fresco y peso seco de las plantas y en algunos parámetros de la actividad fotosintética. Estos resultados sugieren que el producto Manvert Sulphos[®] tuvo efectos en procesos del metabolismo primario de la planta.

Palabras clave: azufre, fitofortificante, fotosíntesis, peroxidasa, clorofila, *Lactuca*.

RESUMO

Neste estudo evaluouse o efecto do produto Manvert Sulphos[®] no cultivo de plantas de leituga (*Lactuca sativa* L.). Manvert Sulphos[®] é una solución nitrogenada cun alto contido de xofre, cuxo principal efecto é nutrir e fortalecer a planta, aínda que de maneira secundaria tamén pode mellorar a defensa da planta ante patóxenos e inducir a resistencia da planta mediante a activación das súas defensas naturais.

Para determinar os efectos e a eficacia do produto estudiáronse os seguintes parámetros en plantas tratadas e control: peso fresco, peso seco e peso de cenizas, actividade fotosintética, contido de proteínas totales e medida da actividade peroxidasa e concentración de pigmentos fotosintéticos e compostos fenólicos.

Unha vez estudados estes parámetros púidose observar que existían diferenzas significativas no peso fresco e seco das plantas e nalgúns parámetros da actividade fotosintética. Istos resultados suxiren que o produto Manvert Sulphos[®] tivo efectos en procesos do metabolismo primario da planta.

Palabras clave: xofre, fitofortificante, fotosíntese, peroxidasa, clorofila, *Lactuca*.

SUMMARY

In this study it has been evaluated the effect of the product Manvert Sulphos[®] on lettuce (*Lactuca sativa* L.). The product Manvert Sulphos[®] is a nitrogenous solution with a high content of sulfur, whose main action is nourishing and strengthening the plant, although secondarily it can also improve the defense of the plant against pathogens and induce the resistance of the plant through the activation of their natural defenses.

To determine the effects and efficacy of the product the following parameters were studied in treated and control plants: fresh weight, dry weight and ash weight, photosynthetic activity, total protein content and measurement of peroxidase activity and concentration of photosynthetic pigments and phenolic compounds.

Once these parameters were studied, it was observed that there were significant differences in the fresh weight and dry weight of the plants and in some parameters of the photosynthetic activity. These results suggest that the product Manvert Sulphos[®] had effects on the processes of the primary metabolism of the plant.

Key words: sulfur, phytofortifier, photosynthesis, peroxidase, chlorophyll, *Lactuca*.

INTRODUCCIÓN

1. Los fitofortificantes

1.1. Concepto

Los fitofortificantes son sustancias no fitosanitarias o microorganismos que pueden promover el crecimiento vegetal o la floración y realzar la salud de las plantas, protegiéndolas contra organismos nocivos mediante la activación de las propias defensas de la planta.

Además de la protección a través de la estimulación de las resistencias o los mecanismos de defensa propios de las plantas, también se puede activar la competencia con los organismos nocivos por el espacio o las sustancias nutrientes en la filosfera (parte aérea) o en la rizosfera (raíz) de la planta (AEFISA, 2012).

1.2. Mecanismos de acción

Para lograr buenos resultados al usar un fitofortificante es muy importante conocer cómo actúan en la planta y entender su ciclo de vida para poder aplicarlo en la etapa correcta en los sistemas de producción.

Los fitofortificantes tienen diversos mecanismos de acción:

- Pueden competir con los patógenos por el espacio radicular y por los nutrientes: algunos lo hacen favoreciendo el desarrollo del sistema radicular creando una barrera física frente a otros organismos no deseables, otros regeneran la flora microbiana del suelo, evitando el crecimiento de organismos perjudiciales.
- Pueden inducir la resistencia en la planta activando sus defensas naturales y fortaleciendo su sistema inmune frente al ataque de patógenos o en condiciones de estrés, lo que conlleva a que las plantas sean más resistentes en condiciones desfavorables.
- Pueden inducir la síntesis de proteínas y pigmentos fotosintéticos aumentando la capacidad fotosintética de las plantas y mejorando su desarrollo vegetativo.

Una característica fundamental de los fitofortificantes es que solo son efectivos al ser utilizados como tratamiento preventivo, es decir, si son aplicados antes de que se haya producido la infección en la planta. Acorde con esta característica, ningún fitofortificante puede tener un efecto directo sobre un organismo patógeno ya que pasaría a ser un producto fitosanitario, y de ser así, debe ser autorizado como tal (AEFISA, 2012).

1.3. Fitofortificante utilizado: Manvert Sulphos ®

El producto Manvert Sulphos ® es una solución nitrogenada con un alto contenido de azufre, procedente de azufre reducido. Es una excelente fuente de nitrógeno amoniacal, fácilmente absorbible por la planta y que contribuye a la formación de aminoácidos, ácidos nucleicos, clorofila y hormonas del desarrollo. Por otra parte, este producto facilita la síntesis de aminoácidos, especialmente aquellos que contienen grupos funcionales tipo tiol, como metionina y cisteína, facilita también la biosíntesis del ácido glutámico y mejora la absorción del manganeso disponible en el suelo (Manvert, 2017).

Manvert Sulphos[®] es un producto de fácil y rápida asimilación y con una doble acción: nutrir y fortalecer. Suele emplearse tanto en cultivos frutales como en cultivos industriales y hortícolas. Este se puede aplicar tanto por vía foliar como radicular, en cualquier momento del ciclo del cultivo y especialmente en épocas de crecimiento activo y períodos de estrés.

Una característica distinguible de este producto es que es compatible con la mayoría de productos fitosanitarios utilizados habitualmente (Manvert, 2017).

2. El azufre como nutriente

El azufre es uno de los elementos esenciales en plantas superiores, quienes lo obtienen principalmente del suelo en forma de sulfato, aunque también son capaces de captarlo de la atmósfera, como dióxido de azufre (SO₂) (Till, 2010).

El azufre puede encontrarse en estados de oxidación que van desde +6 hasta -2 (Tabla 1), siendo el estado más oxidado, es decir el anión sulfato, el generalmente utilizado por las plantas como fuente de azufre en el suelo.

Tabla 1: Estados de oxidación del azufre (Benavides, 1998).

Estado de oxidación	Ejemplo	Fórmula	Δ G (kJ mol ⁻¹) *
+6	Sulfato	SO ₄ ²⁻	0
+5	Ditionato	S ₂ O ₆ ²⁻	139
+4	Sulfito	SO ₃ ²⁻	200
+4	Disulfito	S ₂ O ₅ ²⁻	-
+3	Ditionito	S ₂ O ₄ ²⁻	327
+2	Tiosulfato	S ₂ O ₃ ²⁻	497
0	Azufre elemental	S	502
-2	Sulfuro	S ⁻	715

*Energía liberada al oxidarse el compuesto formando 1 mol de sulfato.

Se ha comprobado que el rendimiento de ciertas especies como la colza (*Brassica napus* L.) se ve incrementado por la acción del azufre junto a otros nutrientes como el nitrógeno, ya que esta especie tiene una alta demanda de azufre para la síntesis de proteínas y glucosinolatos, obteniendo como resultado un incremento en la biomasa total (Rubio *et al.*, 2007).

De la misma manera se ha demostrado que el azufre y el nitrógeno incrementan el rendimiento en grano del trigo y su concentración de proteína en grano, por lo que es esencial el estudio de nutrientes como el azufre a la hora de buscar una mejor calidad de producto y una fertilización óptima (Reussi-Calvo *et al.*, 2006).

3. El azufre en la planta

3.1. Captación de azufre en la planta

Para que el azufre esté disponible para las plantas, sus formas reducidas deben ser oxidadas. Este cambio en su estado de oxidación es posible gracias a la actividad de algunos microorganismos del suelo, que pueden ser especialistas o no. Sin embargo, las plantas son incapaces de usarlo en la forma iónica (sulfato) en la que es absorbido del suelo, de donde es transportado hasta las hojas y reducido a sulfito (Corrales-Maldonado *et al.*, 2014).

Para la reducción del sulfato a sulfito necesaria para poder usar el azufre como nutriente, las plantas poseen un sistema de transporte y reducción de azufre muy eficiente localizado en las hojas, concretamente en los cloroplastos, donde se realiza la reducción del sulfato a sulfuro, para posteriormente ser incorporado al aminoácido cisteína a partir del cual se forma otro importante aminoácido, la metionina (Buchner *et al.*, 2004). Ambos juegan un papel muy importante en el metabolismo de las plantas siendo la cisteína, por ejemplo, responsable de la formación de puentes disulfuro.

3.2. Deficiencia de azufre en la planta

La falta de azufre en las plantas, ocasiona un desequilibrio a nivel fisiológico y de productividad, ya que al estar directamente implicado en la eficiencia de otros nutrientes esenciales como el nitrógeno, fósforo y potasio (Amâncio *et al.*, 2009; Messick *et al.*, 2005), puede verse afectada la defensa contra el ataque de patógenos (Kruse *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2002) y la calidad de los cultivos (Till, 2010; Malhi *et al.*, 2005).

La deficiencia de azufre es común en suelos con bajo nivel de materia orgánica (menos del 2%), y en ocasiones aunque el nivel de materia orgánica sea mayor puede ocurrir que la descomposición de la materia orgánica y el proceso de mineralización no sean lo suficientemente rápidos para cumplir con el requerimiento de azufre del cultivo. Esta deficiencia de azufre puede derivar en clorosis (Fig. 1), condición fisiológica en la que las hojas no producen suficiente clorofila y se tornan de un color amarillo o verde pálido conllevando a la planta a la muerte si esta insuficiencia de clorofila no es tratada (Alcalá *et al.*, 2008)



Figura 1: Hojas de membrillo, *Cydonia oblonga* M., en estado de clorosis.

Fuente: www.AgroEs.es

3.3. El azufre en el metabolismo secundario

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una gran cantidad del carbono y de la energía asimilados a la síntesis de determinadas moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en el metabolismo primario, es decir, procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, etc. Estos se denominan metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios, además de no presentar una función definida en los anteriores procesos mencionados, difieren también de los primarios en que no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Estos metabolitos secundarios se dividen en cuatro clases principales:

- Terpenos: entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinatos.
- Alcaloides.

El azufre además de estar directamente implicado en procesos del metabolismo primario como la fotosíntesis, también interviene en procesos del metabolismo secundario.

En muchas especies el azufre es básico para la síntesis de compuestos fenólicos, que tienen diferentes funciones: soporte mecánico de la planta, absorción de la radiación ultravioleta, productos de defensa ante herbívoros y patógenos, entre otros...

Por otra parte, el azufre es de gran interés para los mecanismos de síntesis de fitoalexinas, compuestos que ante infecciones bacterianas o fúngicas ayudan a limitar la dispersión del patógeno, por lo que una mayor presencia de azufre en la planta puede favorecer y aumentar la resistencia ante patógenos.

OBJETIVOS

Este estudio pretende comprobar y evaluar los efectos y la eficacia de la aplicación del producto Manvert Sulphos® como fitofortificante para la especie *Lactuca Sativa* L., variedad *Batavia*, mediante el estudio de los siguientes parámetros:

- Crecimiento vegetativo: peso fresco, peso seco y peso de cenizas.
- Tasa fotosintética.
- Contenido en proteínas: determinación de proteínas totales y actividad peroxidasa.
- Contenido en clorofilas y carotenoides.
- Contenido en fenoles.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material de laboratorio

Los reactivos y tampones que se han utilizado para realizar los diferentes ensayos en el laboratorio son los siguientes:

- Tampón Tris HCL 50 mM pH 7,5.
- BSA (Seroalbúmina bovina).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR).
- Reactivo de Bradford: colorante *coomassie brilliant blue G-250*
- Acetona 80% C₃H₆O.
- Carbonato de Sodio 20% Na₂CO₃.
- Ácido Ferúlico C₁₀H₁₀O₄.
- Nitrógeno líquido N₂.
- Peróxido de Hidrógeno H₂O₂.
- 4-Metoxi-1-Naftol C₁₁H₁₀O₂.
- Manvert Sulphos® (Fig. 2), a partir del cual prepararemos una disolución [3mL/L].



Figura 2: envase comercial del producto Manvert Sulphos®. Fuente: www.manvert.com

2. Material vegetal

Para realizar los ensayos en laboratorio se utilizaron plántulas de la especie *L. sativa*, variedad *Batavia*, las cuales se dividieron en dos grupos (Control y Sulphos) de 20 plántulas y se trasplantaron a pocillos con una mezcla de turba (mezcla de turbas de diferentes grados de descomposición y fertilizante NPK) y Vermiculita Projar nº2 (SiO₂ 39,5%, Al₂O₃ 12%, Fe₂O₃ y FeO 7%, TiO₂ 1%, MgO 23%, CaO 1,5%, K₂O 2%, agua libre o combinada 12%) en una proporción 2:1 (turba:vermiculita).

Se usó la vermiculita ya que se ha demostrado que es un buen sustrato para muchos tipos de cultivos debido a su buena aireación, alta capacidad de retención de agua y porosidad.

Estas plantas fueron regadas con agua del grifo y examinadas diariamente asegurando un estado vital e hídrico óptimo. Para favorecer su desarrollo, las plantas estuvieron toda su etapa de crecimiento en una cámara con 16 horas de luz y 8 de oscuridad, manteniéndolas a una temperatura de 25°C durante la fase diurna y a 22°C durante la fase nocturna.

3. Aplicación Manvert Sulphos®

Con las plantas ya divididas en dos grupos de 20 en sus correspondientes pocillos, se aplicó Manvert Sulphos®. Para ello preparamos una solución del producto a una concentración de 3 mL/L.

Uno de los grupos (Control) se trató mediante pulverización con 100 mL de agua destilada y el otro grupo (Sulphos), con 100 mL de esta solución previamente preparada. Esta aplicación se realizó vía foliar una sola vez durante todo el ensayo.

Manvert Sulphos® está compuesto por nitrógeno y potasio, pero el elemento más abundante y que caracteriza este producto es el azufre (Tabla 2).

Tabla 2: Composición del producto Manvert Sulphos®. Fuente: www.hortus.com

	%p/p	%p/v
Nitrógeno total (N)	9	12,6
Nitrógeno amoniacal (N)	9	12,6
Azufre (SO ₃)	48	67
Óxido de potasio (K ₂ O) soluble en agua	5	7

4. Determinación del crecimiento vegetativo

Transcurridos doce días desde la pulverización con Manvert Sulphos® se pasó a medir el crecimiento vegetativo de las plantas. Para ello cortamos 10 plantas de cada uno de los grupos (Control y Sulphos) y se determinó su peso fresco (PF) pesando individualmente cada planta en una balanza de precisión. A continuación se introdujeron en una estufa a 65°C durante 48h para eliminar todo el agua de las hojas y así poder determinar el peso seco (PS).

Por último, las hojas secas se introdujeron en la mufla a 550°C durante 48h, haciendo que desaparezcan los componentes orgánicos que puedan contener las muestras y así obtener las cenizas. Para facilitar este proceso, previamente trituramos las hojas en un mortero, y finalmente pesamos las cenizas resultantes en una balanza de precisión.

5. Determinación de la actividad fotosintética

Para determinar cómo afectó la aplicación del producto al comportamiento fotosintético de las plantas se estudiaron diferentes parámetros mediante la técnica de fluorescencia de clorofilas. Para ello se utilizó el fluorímetro PAM-210 Walz (Fig. 3), este tipo de fluorímetros denominados PAM (*Pulse Amplitude Modulation*) se basan en una modulación de señal básica en la cual la luz es liberada en series de varios pulsos de señal (Coad, 2013).



Figura 3: fluorímetro PAM-210 (Walz), utilizado en los ensayos de fluorescencia.

Fuente: www.walz.com

Para el análisis de fluorescencia se adaptaron las plantas a oscuridad durante un día, esto se hizo porque cuando una hoja se transfiere desde la oscuridad a la luz, los centros de reacción del fotosistema II (PSII) se van cerrando progresivamente y esto da lugar a un aumento en el rendimiento de la fluorescencia de clorofilas. A partir de este momento, los niveles de fluorescencia disminuyen de nuevo, fenómeno que se denomina quenching o apagamiento (Genty *et al.*, 1989).

Una vez que las plantas se adaptaron a la oscuridad, pasamos a introducir las hojas en el fluorímetro de forma que el haz de la hoja mire hacia abajo ya que es la parte de la hoja donde va a incidir la luz y la parte de la hoja que más capacidad fotosintética posee debido a que bajo la epidermis del haz, el parénquima está más compacto para aumentar la actividad fotosintética. A continuación se expusieron a diferentes intensidades de radiación incidente (PAR), de acuerdo con el siguiente esquema (Fig. 4).

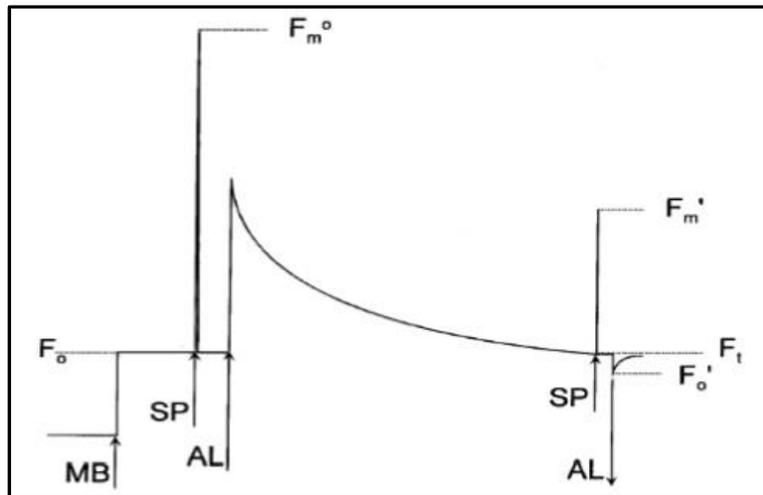


Figura 4: esquema del ciclo de intensidades aplicadas en el ensayo y sus parámetros fotosintéticos. Fuente: Fisiología Vegetal aplicada, Curso 2014/15.

- Inicialmente se encendió una luz de medida (MB), que permite medir el nivel mínimo de fluorescencia en hojas adaptadas a la oscuridad (F_0).
- A continuación se aplicó un pulso de saturación (SP) el cual hace que los fotosistemas devuelvan la fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la oscuridad (F_m^0), pudiendo así medir este nivel fluorescencia máxima.
- Seguidamente se aplicó una luz actínica (AL) para impulsar la fotosíntesis. Como podemos ver el valor de fluorescencia va disminuyendo a medida que los fotosistemas se van adaptando.
- Después de un periodo de tiempo (15 s.), se aplicó otro pulso de saturación (SP) que nos permitió obtener y medir la fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz (F_m'). El nivel de fluorescencia inmediatamente anterior al pulso de saturación es denominado F_t .
- Finalmente se apagó la luz actínica y se aplicó luz roja lejana, lo que permitió obtener el nivel mínimo de fluorescencia en hojas adaptadas a la luz (F_0').

Con los valores obtenidos en este ciclo a diferentes PAR se pudieron calcular los siguientes parámetros permitiéndonos conocer mejor la capacidad fotosintética de estas plantas (George *et al.*, 2010):

- Rendimiento cuántico del fotosistema II ($\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$): indica la cantidad de luz absorbida que es utilizado para fotoquímica, causando "quenching fotoquímico".
- Tasa de transporte de electrones ($ETR = \Phi_{PSII} \times PAR \times F \times A$), siendo F el porcentaje para cada fotosistema y A el porcentaje de luz absorbida por la hoja: nos indica el número de electrones por unidad de tiempo que se incorporan al NADP al final de la cadena de transporte electrónico.
- Apagamiento no fotoquímico ($qN = (F_m^0 - F_m') / (F_m^0 - F_0)$): indica la cantidad de energía no radiativa que se disipa en forma de calor.

6. Determinación de proteínas totales y actividad peroxidasa

Para determinar el contenido proteico se realizó una extracción de proteínas y una posterior medida de las mismas.

Para la extracción, transcurridos doce días desde el tratamiento, se recogieron las hojas de tres plantas de cada grupo, haciendo tres réplicas para cada tratamiento, y se congelaron mediante inmersión directa en nitrógeno líquido. Estas hojas homogeneizaron con tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5 en una proporción 1:4 (peso:volumen), manteniendo las muestras refrigeradas en todo momento.

A continuación se centrifugaron las muestras en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5810 R a 15300 g y 4°C durante 30 minutos.

Tras finalizar el tiempo de centrifugación se recogió el sobrenadante de cada una de las muestras y se midió su volumen.

Cuantificación de proteínas totales

Para realizar la cuantificación de proteínas se utilizó el método Bradford, basado en el cambio de color del colorante *coomassie brilliant blue* G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas.

Para esta cuantificación se comenzó determinando la absorbancia de las muestras, para ello se prepararon los tubos de reacción de la siguiente manera: se añadieron 50 µL del sobrenadante previamente almacenado, 450 µL de agua destilada y 500 µL de reactivo de Bradford. Para el blanco se añadieron 500 µL tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5 y 500 µL de reactivo de Bradford. Estos tubos se prepararon por triplicado para cada muestra.

Tras incubar las muestras en oscuridad durante 30 minutos se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm usando un espectrofotómetro Thermo Helios.

Para poder calcular el contenido de proteínas elaboramos una recta de calibrado con diferentes concentraciones de BSA (0 mg, 0,0025 mg, 0,0075 mg, 0,01 mg, 0,0125 mg, 0,015 mg, 0,0175 mg, 0,02 mg y 0,0225 mg), que se ajustó a la siguiente ecuación:

$$y = 38,609x + 0,0546$$
$$R^2 = 0,9824$$

Donde “y” corresponde a la absorbancia y “X” a los mg. de proteína.

Medida de la actividad enzimática peroxidasa

A partir de la misma extracción de proteínas obtenida anteriormente, se pasó a determinar la actividad enzimática peroxidasa. Para ello se utilizó tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5, H₂O₂ 10 mM y 4-Metoxi - α - naftol 100mM ϵ_{593} 21 mM⁻¹ y se hizo una medida continua con un espectrofotómetro Thermo Helios a una longitud de onda de 590 nm durante un minuto a temperatura ambiente.

7. Determinación de clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos

Para esta cuantificación, transcurridos doce días desde el tratamiento, se cortaron tres plantas de cada tratamiento y a continuación se pesaron. Seguidamente, se homogeneizaron en un mortero con acetona al 80% en una proporción 1:5 (peso:volumen) y se filtraron a través de un embudo Büchner con papel de filtro colocado sobre un matraz Kitasato, que se conectó a una bomba de vacío para facilitar el filtrado.

Al filtrado resultante, que se traspasó a un tubo de ensayo, se le llamó extracto A, que se utilizó para la cuantificación de compuestos fenólicos. A partir de este extracto A se obtuvo un extracto B, que se utilizó para la cuantificación de clorofilas y carotenoides.

Cuantificación de compuestos fenólicos

El extracto A se volvió a diluir con acetona al 80% en proporción 1:3 (volumen de la muestra:volumen de acetona).

Para determinar los fenoles se empleó el método Folin-Ciocalteu de la siguiente forma: se añadieron en un tubo eppendorf 50 μ L de muestra, 750 μ L de agua destilada y 50 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y se incubó durante tres minutos a temperatura ambiente. Transcurridos estos tres minutos, se añadieron 150 μ L de carbonato de sodio al 20% y se incubó en oscuridad durante 2 horas. Finalmente, tras pasar este periodo de incubación se midió la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm usando un espectrofotómetro Thermo Helios. El blanco se hizo añadiendo 50 μ L de acetona al 80 % en lugar de la muestra.

Para calcular el contenido en compuestos fenólicos elaboramos una recta de calibrado con distintas concentraciones de ácido ferúlico disuelto en acetona al 80% (0 mg/L, 2mg/L, 5mg/L, 7,5 mg/L, 10 mg/L y 12 mg/L), que se ajustó a la siguiente ecuación:

$$y = 0,1056x - 0,0324$$
$$R^2 = 0,9788$$

Donde “y” corresponde a la absorbancia y “x” a los mg/L de fenoles.

Cuantificación de clorofilas y carotenoides

A partir del extracto A, se hizo un segundo extracto (extracto B) diluyendo el extracto A con acetona al 80% en una proporción 1:10 (volumen extracto B:volumen acetona al 80%).

Para la cuantificación de clorofilas y carotenoides, se determinaron las absorbancias de estos extractos a diferentes longitudes de onda (460, 645 y 663 nm) usando un espectrofotómetro Thermo Helios, y se aplicaron las siguientes ecuaciones para las concentraciones de clorofila a, clorofila b y carotenoides (Val *et al.*, 1985):

$$\text{Concentración de clorofila a (g/l)} = 0.0127 (\text{Abs}_{663}) - 0.00269 (\text{Abs}_{645})$$

$$\text{Concentración de clorofila b (g/l)} = 0.0229 (\text{Abs}_{645}) - 0.00468 (\text{Abs}_{663})$$

$$\text{Carotenoides} = (\text{Abs}_{460} [(\text{clorofila a}) \times 3.69 + (\text{clorofila b}) \times 130.3]) / 200$$

8. Análisis estadístico

Para analizar y comparar los resultados se utilizó el programa Microsoft Excel 2010, con el cual aplicamos una prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales o diferentes, en función del resultado de una prueba F para varianzas, y con el que representamos los valores obtenidos mediante gráficos. Estos valores se representaron como una media de los diferentes datos con su correspondiente desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Desarrollo vegetativo

1.1. Evaluación de las características externas

Doce días después de aplicar el tratamiento se pudo observar una diferencia notable entre las plantas control y las tratadas con este producto (Fig. 5). A simple vista se observó que las plantas tratadas mostraban un mayor tamaño de hoja y un color verde más intenso.



Figura 5: Aspecto del grupo de plantas control y del tratado con Sulphos doce días después de aplicar el tratamiento.

Fuente: Brais Castelo.

1.2. Peso fresco y peso seco

Los valores de peso fresco (PF) y peso seco (PS) obtenidos fueron mayores en el caso de las muestras tratadas que en las muestras control (Fig. 6). La prueba t de Student detectó diferencias significativas, con un límite de significación del 5%, tanto en el caso de peso fresco ($p=0,00445$, $t=-3,249$ y 18 grados de libertad [g.l.]), como en el caso de peso seco ($p=0,0498$, $t=-2,102$ y 18 g.l.)

Este resultado sugiere que la aplicación exógena del producto Manvert Sulphos® beneficia y aumenta directamente la captación de los nutrientes esenciales para el desarrollo vegetativo, mejorando el vigor, el rendimiento y la calidad de las plantas.

Esto podría deberse a que el azufre forma parte de los aminoácidos proteicos cisteína y metionina, importantes para el metabolismo de las plantas ya que intervienen en el metabolismo de los lípidos y de los hidratos de carbono. Por otra parte, el azufre es el cuarto nutriente que más consume la planta después del nitrógeno, el fósforo y el potasio, siendo esencial en el metabolismo del nitrógeno y formando parte de las proteínas formada por la planta (Aguilera y Salazar, 1996).

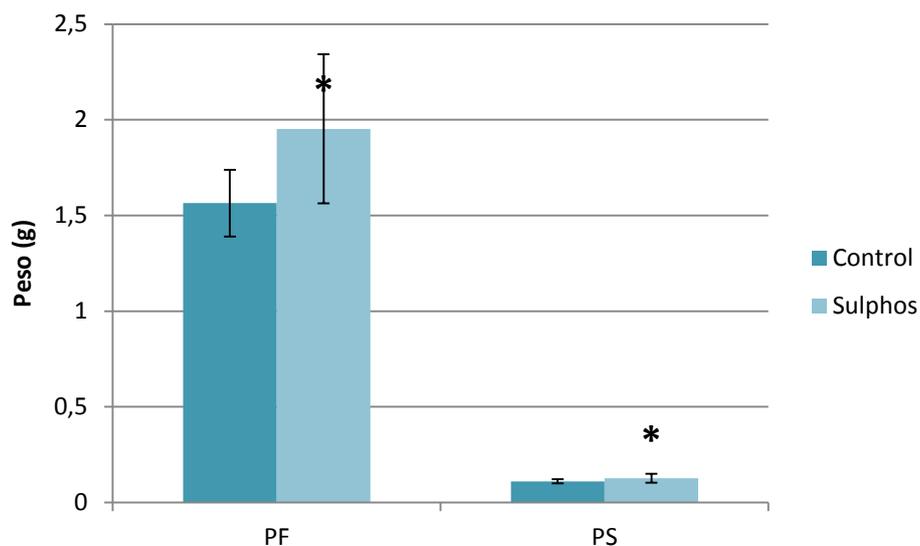


Figura 6: Determinación de peso fresco (PF) y peso seco (PS) doce días después de aplicar el tratamiento. (*) Indica diferencias significativas entre las plantas tratadas y las control.

1.3. Peso de cenizas

El peso de las cenizas se expresó en gramos de ceniza por planta (Fig. 7) y en gramos de ceniza por gramos de peso fresco (Fig. 8).

La prueba t de Student no mostró diferencias significativas entre el control y el tratamiento en el primer caso ($p=0,794$, $t=-0,277$ y 4 g.l.), ni en el segundo caso ($p=0,613$, $t=0,546$ y 4 g.l.).

Esto sugiere que la aplicación exógena del producto Manvert Sulphos® no ha sido suficiente para aumentar la fracción mineral que posee la planta.

Dado que en PS sí hay diferencias significativas pero en el peso de cenizas no, las diferencias entre Sulphos y control pueden deberse a su contenido en carbono, ya que este estaba presente en las medidas de PS, pero posteriormente se carbonizó al introducir las plantas en la mufla para medir el peso de cenizas.

Por otra parte, como se puede apreciar en los gráficos, las desviaciones estándar de estos resultados son muy altas, lo que puede llevar a error en el resultado final.

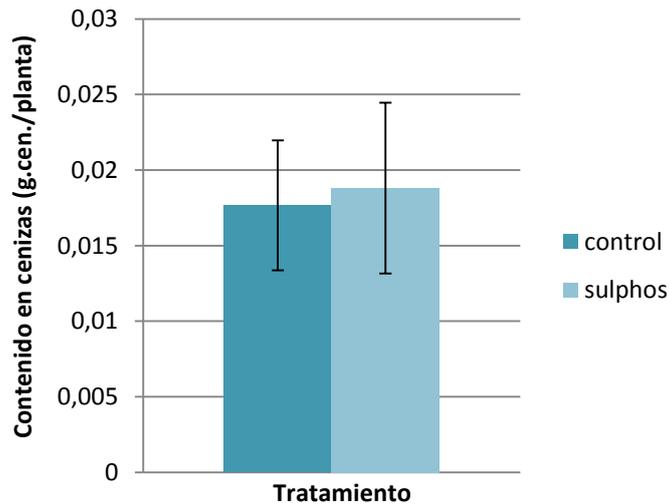


Figura 7: Determinación de los gramos de ceniza por planta para las muestras control y tratamiento (Sulphos).

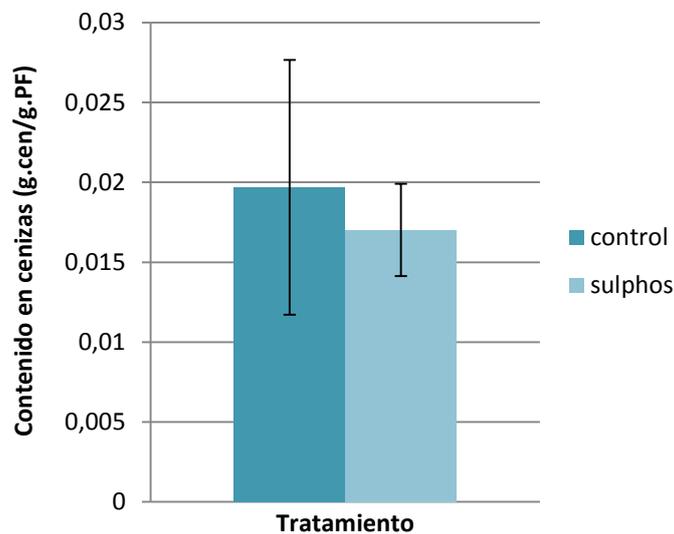


Figura 8: Determinación de los gramos de ceniza por gramo de peso fresco para las muestras control y tratamiento (Sulphos).

2. Actividad fotosintética

La energía de la luz que recibió la planta tratada durante la emisión de fluorescencia pudo seguir tres caminos: pudo ser empleada para dirigir la fotosíntesis, ser disipada en forma de calor o reemitida en pequeñas pero detectables cantidades de radiación de longitud de onda más larga (procesos no fotoquímicos), esta emisión de luz es la llamada fluorescencia de la clorofila a.

Estos tres procesos se dan en competencia, por lo que incrementando la eficiencia de alguno puede inducir el decrecimiento de los otros dos. De esta manera midiendo el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila a se proporciona información sobre cambios en la eficiencia de la fotoquímica y la disipación de calor (Maxwell y Johnson, 2000).

Al enfrentar el rendimiento cuántico del fotosistema II con las diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR) se observó que el rendimiento general es ligeramente mayor en el tratamiento que en el control, y que los valores de este parámetro, tanto en el control como en el tratamiento, siguieron tendencias paralelas entre sí e inversas a la PAR, disminuyendo estos valores al aumentar la PAR (Fig. 9). Sin embargo, la prueba t de Student no muestra diferencias significativas entre el control y el tratamiento para la mayoría de los niveles de PAR ($p= 0,935$, $t= -0,081$ y 20 g.l.). Pero individualmente se encontraron diferencias a PAR 10 $\mu\text{moles fotones}/(\text{m}^2 \text{s})$ ($p= 0,024$) y 90 $\mu\text{moles fotones}/(\text{m}^2 \text{s})$ ($p= 0,0001$).

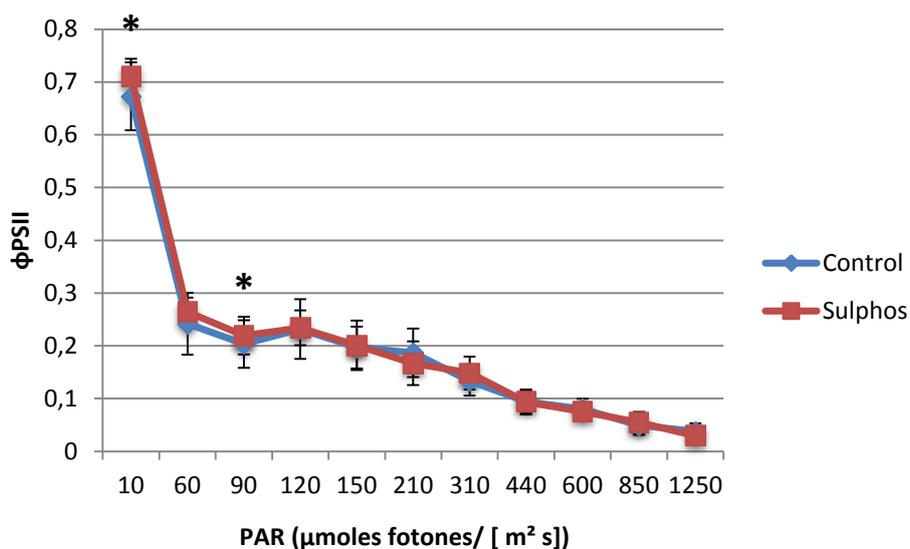


Figura 9: Valores del rendimiento cuántico del fotosistema II (ϕPSII) frente a diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en las plantas control y tratadas con Manvert Sulphos®. (*) Indica diferencias significativas entre las plantas tratadas y las control.

La medida del rendimiento cuántico del fotosistema II relaciona la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima en plantas previamente adaptadas a la oscuridad, y mide la proporción de luz absorbida por la clorofila asociada al fotosistema II que es usada para dirigir la fotosíntesis (Björkman y Deming-Adams, 1987).

Este resultado sugiere que a PAR bajas 10 y 90 $\mu\text{moles fotones}/(\text{m}^2 \text{s})$ las plantas control destinaron más energía a procesos no fotoquímicos, procesos de fotoinhibición... que las tratadas con Sulphos.

Una parte de la energía absorbida por la planta fue destinada a la transferencia de electrones, que se cuantificó determinando la tasa de transporte de electrones (ETR). Ésta fue ligeramente mayor en el tratamiento que en el control (Fig. 10).

A pesar de que la prueba t de Student no mostró diferencias significativas entre el control y el tratamiento para la mayoría de niveles de PAR ($p= 0,895$, $t=-0,132$ y 20 g.l.), se encontraron diferencias significativas a PAR 10 $\mu\text{moles fotones}/(\text{m}^2 \text{s})$ ($p= 0,036$), PAR 60 $\mu\text{moles fotones}/(\text{m}^2 \text{s})$ ($p= 0,017$), PAR 440 $\mu\text{moles fotones}/(\text{m}^2 \text{s})$ ($p= 0,047$) y PAR 600 $\mu\text{moles fotones}/(\text{m}^2 \text{s})$ ($p=0,033$).

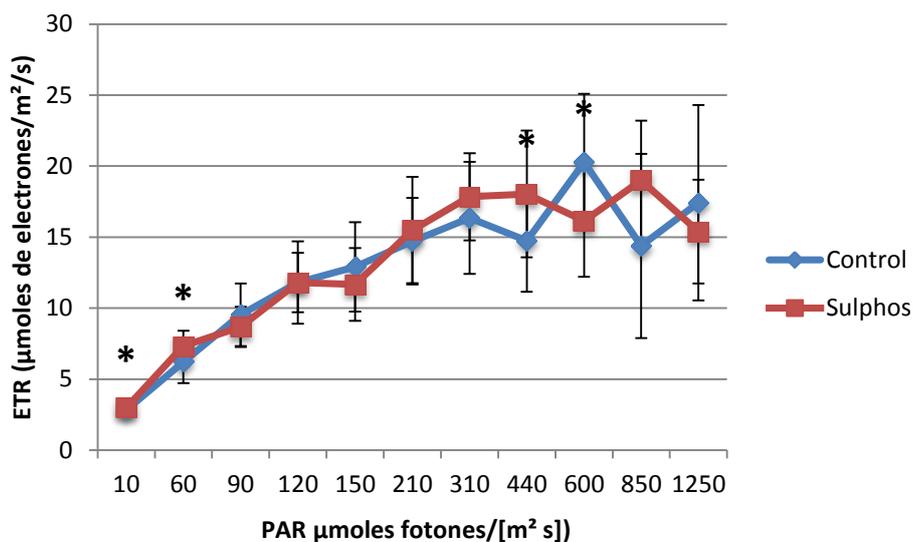


Figura 10: Valores de la tasa de transferencia de electrones (ETR) frente a frente a diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en las plantas control y tratadas con Manvert Sulphos®. (*) Indica diferencias significativas entre las plantas tratadas y las control.

Esta mayor tasa de transporte electrónico en las plantas tratadas sugiere que el producto Manvert Sulphos® favorece el aprovechamiento de energía de la cadena de transporte de electrones. Esto puede deberse a que el azufre puede aumentar la actividad de determinadas enzimas implicadas en la cadena de transporte electrónico, ya que aproximadamente un 40% de las enzimas, como puede ser la ferredoxina (implicada en la cadena de transporte electrónico) depende para su actividad catalítica de la presencia de grupos sulfhidrilo (Benavides, 1998).

Los valores de apagamiento no fotoquímico (qN) siguieron tendencias similares tanto en el control como en el tratamiento, aumentando estos a medida que aumentaba la PAR y siendo mayores en las plantas control que en las tratadas (Fig. 11). Aunque la prueba t de Student no mostró diferencias significativas para la mayoría de niveles de PAR ($p=0,471$, $t=0,734$ y 20 g.l.) se encontraron diferencias a PAR 10 μmoles fotones/(m² s) ($p=0,0008$), 90 μmoles fotones/(m² s) ($p=0,00796$), 120 μmoles fotones/(m² s) ($p=0,0117$), 150 μmoles fotones/(m² s) ($p=0,0269$) y 210 μmoles fotones/(m² s) ($p=0,046$).

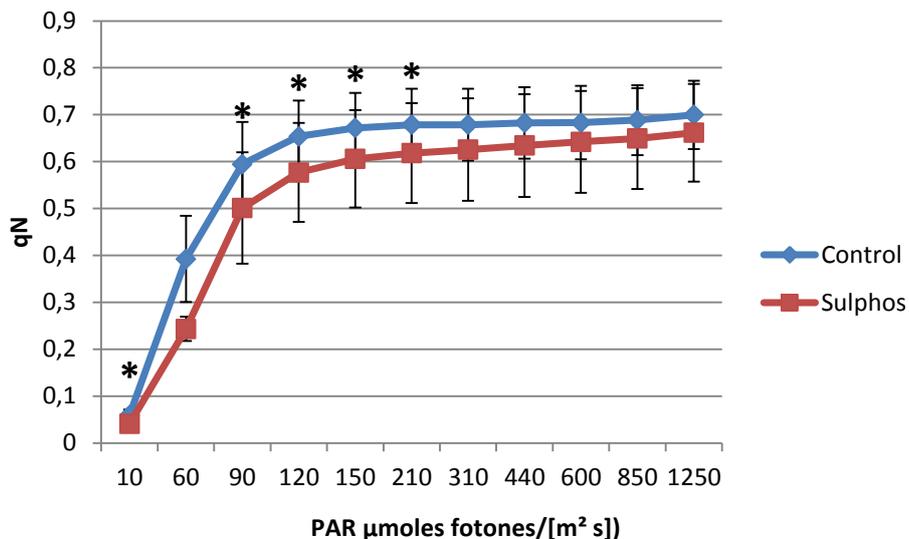


Figura 11: valores del apagamiento no fotoquímico (qN) frente a frente a diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en las plantas control y tratadas con Manvert Sulphos®. (*) Indica diferencias significativas entre las plantas tratadas y las control.

Este resultado sugiere que en las plantas control, una mayor parte de la energía absorbida fue disipada en forma de calor a diferencia de las plantas tratadas donde la mayor parte de la energía absorbida fue utilizada en procesos fotosintéticos. Estos resultados corroboran los resultados de peso fresco, peso seco y cenizas, en los cuales las plantas tratadas habían fijado más carbono que las plantas control, es decir, había aumentado su eficiencia fotosintética.

3. Determinación de proteínas totales y actividad peroxidasa

Tanto en el contenido en proteínas (Fig. 12) como el nivel de actividad peroxidasa (Fig. 13) no se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento, siendo los valores de la prueba t los siguientes: para la determinación de proteínas ($p=0,951$, $t=0,065$ y 4 g.l.) y para la actividad peroxidasa ($p=0,074$, $t=1,911$ y 16 g.l.).

Proteínas

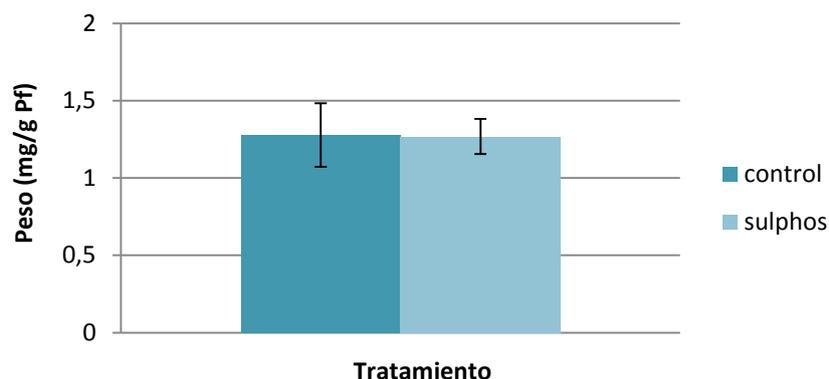


Figura 12: valores de la cuantificación de proteínas mediante el método Bradford transcurridos doce días desde la aplicación del tratamiento.

Actividad Peroxidasa

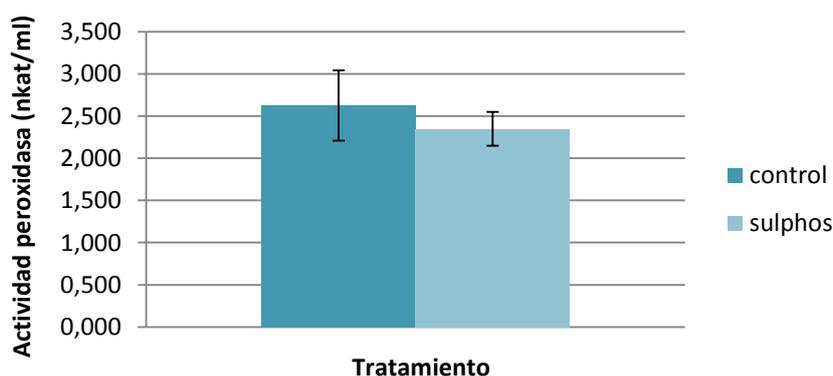


Figura 13: valores de la actividad peroxidasa transcurridos doce días desde la aplicación del tratamiento.

El sulfato presente en el producto Manvert Sulphos® se incorpora a los aminoácidos metionina y cisteína, pasando a formar parte esencial de las proteínas (Castillo *et al*, 2006). Sin embargo, el resultado de la determinación de proteínas sugiere que el producto Manvert Sulphos® puede no contener el azufre necesario o que la aplicación de forma exógena de este producto pudo no ser suficiente para aumentar el contenido proteico de la planta.

Zeng *et al.* (2016), observaron que en un cultivo de *Panax notoginseng* B. infectado con arsénico al que se le aplicaron diferentes concentraciones de azufre directamente a través del suelo, la actividad peroxidasa aumentaba, mostrando diferencias significativas sólo en las concentraciones más altas de azufre.

Según este estudio, que la actividad peroxidasa no aumentara puede deberse a que la aplicación Manvert Sulphos® no fue a través del suelo directamente, por lo que las plantas pudieron no ser capaces de captar correctamente este aporte de azufre, o que la concentración de azufre no fue lo suficientemente alta para provocar un aumento de la actividad peroxidasa.

4. Determinación de clorofilas y carotenoides

Como afirman Ventimiglia *et al.* (2007), el azufre es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas, interviniendo tanto en la formación de varias proteínas como en la síntesis de pigmentos como las clorofilas y carotenoides, participando también en la formación de aceites y en la síntesis de vitaminas. Según este hecho, los valores de la determinación de pigmentos de las plantas tratadas con Manvert Sulphos® deberían ser mayores que las plantas control, ya que se les suministró una mayor cantidad de azufre. Sin embargo, los resultados de este estudio muestran que no hay diferencias significativas en los niveles de clorofilas y carotenoides entre las plantas control y las tratadas (Fig. 14).

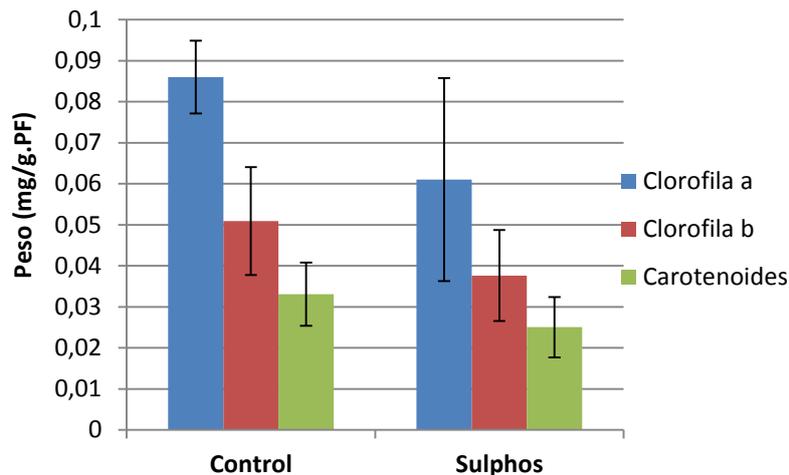


Figura 14: Valores de la determinación de los diferentes tipos de pigmentos transcurridos doce días desde la aplicación del tratamiento.

Llorens *et al.* (2016) cultivaron plantas de tomate, *Solanum lycopersicum L.*, a las que le inocularon *Oidium neolycopersici L. Kiss* causando una enfermedad fúngica en estas plantas. Para combatir esta enfermedad aplicaron óxido de azufre (SO_3) vía foliar en un grupo de plantas y a través del suelo en otro grupo, preparando previamente un grupo control que no fue tratado con óxido de azufre.

El resultado fue que los grupos de plantas tratadas mostraron una reducción de la enfermedad y un mayor contenido de clorofilas respecto a las plantas control. Especialmente, el grupo de plantas al que se le aplicó óxido de azufre a través del suelo mostró un mayor contenido en clorofilas y una mayor reducción de la enfermedad respecto al otro grupo.

En el resultado de nuestro estudio no se observaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento, esto puede ser porque la aplicación vía foliar pudo no ser la adecuada para aumentar la presencia de estos pigmentos, que el producto pueda contener algún otro componente que limite su síntesis o que las plantas pueden necesitar ser sometidas a algún tipo de estrés, como puede ser la infección de *Oidium neolycopersici*, para que aumente el contenido de clorofilas.

5. Determinación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo hidroxilo. Esta composición les proporciona a las plantas propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales (Bedascarrasbure *et al.*, 2004).

La prueba t de Student ($p=0,646$, $t=0,494$ y 4 g.l.) no mostró diferencias significativas entre las plantas control y las tratadas, presentando los dos grupos un contenido en fenoles similar (Fig. 15).

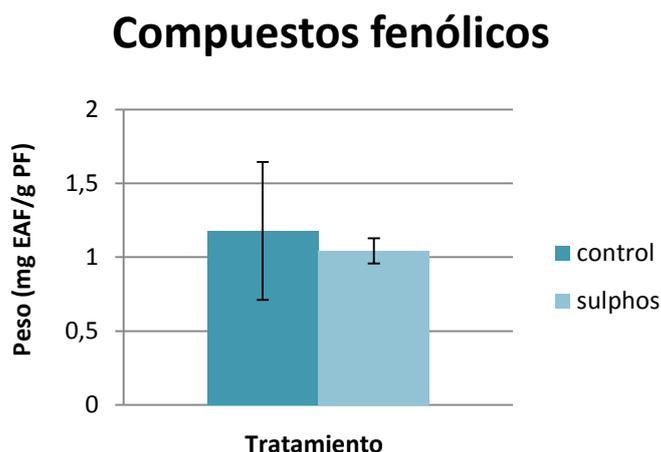


Figura 15: Valores de la cuantificación de compuestos fenólicos transcurridos doce días desde la aplicación del tratamiento.

Varios estudios como Marzo *et al.* (1997), donde fertilizaron un cultivo de *Brassica oleracea* L. con azufre, o Sousa *et al.* (2008), donde aplicaron azufre en un cultivo de *Pisum sativum* L. infectado con *Bruchus pisorum* L., han reportado que el aporte de azufre en estas especies estudiadas no afecta al contenido total de compuestos fenólicos de la planta.

Los resultados de este estudio se corresponden con los resultados de otros autores, ya que no hay diferencias significativas entre el control y el tratamiento.

Esto puede deberse a que el azufre captado por las plantas pudo ser destinado a procesos del metabolismo primario y que el aporte de azufre aplicado pudo no ser suficiente para que aumente la concentración de compuestos fenólicos.

CONCLUSIONES

La aplicación del producto Manvert Sulphos[®] favorece directamente el desarrollo vegetativo y aumenta la eficiencia fotosintética, sin embargo no se observaron cambios en la cantidad de proteínas, nivel de actividad peroxidasa, cantidad de compuestos fenólicos o en la síntesis de pigmentos fotosintéticos. Esto puede indicar que Manvert Sulphos[®] tuvo efecto en procesos del metabolismo primario de la planta, pero no en el metabolismo secundario.

Además, a la vista de los resultados obtenidos y observando la bibliografía consultada, la aplicación via foliar de Manvert Sulphos[®] no parece ser la idónea.

CONCLUSIÓNS

A aplicación do produto Manvert Sulphos[®] favorece directamente o desenvolvemento vexetativo e aumenta a eficiencia fotosintética, sen embargo non se observaron cambios na cantidade de proteínas, nivel de actividade peroxidasa, cantidade de compostos fenólicos ou na síntesis de pigmentos fotosintéticos. Isto pode indicar que Manvert Sulphos[®] tivo efecto en procesos do metabolismo primario da planta, pero non no metabolismo secundario.

Ademais, á vista dos resultados obtidos e observando a bibliografía consultada, a aplicación vía foliar de Manvert Sulphos[®] parece non ser a idónea.

CONCLUSIONS

The application of the product Manvert Sulphos[®] stimulate the vegetative development and increases the photosynthetic efficiency, however no changes were observed in the amount of proteins, level of peroxidase activity, amount of phenolic compounds or synthesis of photosynthetic pigments. This may indicate that Manvert Sulphos[®] had effect on processes of the plant's primary metabolism, but not on secondary metabolism.

In addition, in view of the results obtained and observing the bibliography consulted, the foliar application of Manvert Sulphos[®] does not seem to be the ideal one.

BIBLIOGRAFÍA

- AEFISA (Asociación Española de Fitosanitarios y Sanidad Ambiental). Recuperado el 16 de Enero de 2017, de <http://www.aefisa.es/productos/otros-medios-de-defensa-vegetal>.
- Aguilera-Montañez, J. L. y Salazar-García, S. (1996). Efecto del Nitrógeno, Fósforo y Potasio en el rendimiento y tamaño del fruto de aguacate. *INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Uruapan*.
- Alcalá, J., Sosa, M., Moreno, M., Ortega, J., Quintana, C. y Holguin, C. (2008). Especies arbóreas evaluadas como bioacumuladoras de azufre en la ciudad de Chihuahua, México. *Ecología Aplicada*, 7 (1-2):17-21.
- Amâncio, S., Tavares, S., Fernández, J. y Sousa, C. (2009). Grapevine & Sulfur: Old Partners, New Achievements. *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. A. R. Kallio (ed). Segunda edición, 2:31-52.
- Ávalos, A y Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal*, 2(3):119-145.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L. Álvarez, A. y Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del Propoleos Argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(3):369-72.
- Benavides, A. (1998). El azufre en las plantas. Recuperado el 20 de Enero de 2017, de http://www.abenmen.com/a/azufre_en_plantas.pdf.
- Björkman, O y Demming, B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and Chlorophyll Fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origin. *Planta*, 170(4): 489-504.
- Buchner P., Stuiver, E., Westerman, S., Wirtz, M., Hell, R., Hawskerford, M. y De Kok, L. (2004). Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in Brassica oleracea as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiology*, 136: 3396-3408.
- Castillo C., Esposito G. y Balboa R. 2006. Fertilización del Maíz en el Sur de Córdoba. Interacción entre Nitrógeno y Azufre. *XX Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Primera Reunión de Suelos de la Región Andina Salta Argentina*
- Coad, T. (2013). Pulse Amplitude Modulated (PAM) Fluorometry. Recuperado el 16 de Febrero de 2017, de <http://soki.aq/X/LYdw>.
- Corrales-Maldonado, C.G., Vargas-Arispuro, I., Vallejo-Cohén, S. y Martínez-Téllez, M.A. (2014). Deficiencia de azufre en suelos cultivables y su efecto en la productividad. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 16(1):38-44.
- Genty, B., Briantais, J.M. y Baker, N. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990 (1):87-92.

George, R., Egharevba, G. y Nyokong, T. (2010). Spectroscopic Studies of Nanostructures of Negatively Charged Free Base Porphyrin and Positively Charged Tin Porphyrin. *Polyhedron*, 29:1469-1474.

Kruse, C., Jost, R., Hillebrand, H. y Hell, R. (2005). Sulfur rich proteins and their agrobiotechnological potential for resistance to plant pathogens. *Proceedings of the first Sino-German workshop on aspect of sulfur nutrition of plants*. L. De Kok y E. Schnug (eds), 283: 23-27.

Llorens, E., Agustí-Brisach, C., González-Hernández, A., Trancho, P., Vicedo, B., Yuste, T., Orero, M., Ledó, C., García-Agustín, P. y Lapeña, L. (2016). Bioassimilable sulphur provides effective control of *Oidium neolycopersici* in tomato, enhancing the plant immune system. *Pest Management Science*, 73:1017-1023.

Malhi, S. S., Schoenau, J. J. y Grant, C. A. (2005). A review of sulphur fertilizer management for optimum yield and quality of canola in the Canadian Great Plains. *Canadian Journal of Plant Scienc*, 85:297-307.

Manvert croptology (BIOVERT S.A.), Productos (Bioestimulantes de azufre). Recuperado el 20 de Enero de 2017, de <http://www.manvert.com/es/productos>.

Marzo, F., Aguirre, A., Castiella, M y Alonso, R. (1997). Fertilization effects of phosphorus and sulfur on chemical composition of seeds of *Pisum sativum* L. and relative infestation by *Bruchus pisorum* L. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45:1829-1833.

Maxwell, K. y Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345):659-668.

Messick, D. L., Fan, M. X. y Brey, C. (2005). Global sulfur requirement and sulfur fertilizer. *Proceedings of the first Sino-German workshop on aspect of sulfur nutrition of plants*, 283:97-104.

Reussi-Calvo, N., Echeverria, H., Barbieri, P. y Sainz Rozas, H. (2006). Nitrógeno y azufre en trigo: ¿Rendimiento y proteína?. *Informaciones Agronómicas*, 30:7-11.

Rubio, G., Scheiner, J., Taboada, M. y Lavado, S. (2007). Distribución de nitrógeno, fósforo y azufre en un cultivo de colza: efectos sobre el ciclado de nutrientes. *Ciencia del Suelo*, 25(2):189-194.

Sousa, C., Pereira, D., Pereira, J., Bento, A., Rodrigues, M., Dopico-García, S. et al. (2008). Multivariate Analysis of Tronchuda Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *Costata DC*) Phenolics: Influence of Fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:2231-2239.

Till, A.R. (2010), Sulphur and sustainable agriculture. *Intenational Fertilizer Industry Association. First edition*.

Val, J. Heras, L. y Monge, E. (1985). Nuevas ecuaciones para la determinación de pigmentos fotosintéticos en acetona. *Aula Dei*, 17(3-4):231-238.

Ventimiglia, L., Carta, H. y Rillo, S. (2007). Necesidad de azufre en los cultivos. Recuperado el 16 de Enero de 2017, de http://www.adiveter.com/ftp_public/A11307.pdf.

Williams, J. S., Hall, S. A., Hawkesford, M. J., Beale, M. H. y Cooper, R. M. (2002). Elemental Sulfur and Thiol Accumulation in Tomato and Defense against a Fungal Vascular Pathogen. *Plant Physiology*, 128:150-159

Zeng, X., Jiang, Y., Fan, X., Chao, S, Yang, Y., Liu, J., Zhu, M. y Cao, H. (2016). Effects of sulphate application on inhibiting accumulation and alleviating toxicity of arsenic in *Panax notoginseng* grow in arsenic-polluted soil. *Water Air and Soil Pollution*, 227(5):148.