



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología Animal, Biología  
Vegetal y Ecología**

**Área de Fisiología Vegetal**

**Efecto de fitofortificantes comerciales sobre el  
crecimiento de cultivos de Alfalfa**

**Commercial phytofortificants effect on the  
growth of Alfalfa crops**

**Efecto de fitofortificantes comerciais sobre o  
crecemento de cultivos de Alfalfa**

Trabajo de fin de grado presentado por:

**Marta Vega Díaz**

Dirigido por:

**Dr. Federico Pomar Barbeito y Dra. Cristina Silvar Pereiro**

Curso Académico 2014/2015

# Índice:

Resumen.....	3
Summary (English).....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
- El azufre en el suelo.....	4
- Sistemas de captación de azufre por las plantas.....	4
- El azufre como nutriente, papel en la planta.....	4
- Deficit de azufre.....	5
- Exceso de azufre.....	7
- Los fitofortificantes.....	8
OBJETIVOS.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
- Siembra de la alfalfa.....	10
- Aplicación del Manvert Sulphos .....	10
- Crecimiento vegetativo.....	10
- Fluorescencia de clorofilas.....	11
- Cuantificación de clorofilas.....	11
- Determinación de proteínas.....	11
- Determinación del sulfuro elemental.....	13
- Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
- Determinación del peso fresco, seco, porcentaje de humedad y cenizas.....	14
- Fluorescencia.....	15
- Cuantificación de clorofilas.....	17
- Cuantificación de proteínas.....	18
- Contenido de azufre.....	18
CONCLUSIÓN.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21

### Resumen:

En este trabajo se ha evaluado el efecto del producto comercial Manvert Sulphos®, sobre el cultivo de plántulas de alfalfa (*Medicago sativa*). Manvert Sulphos®, es un producto rico en azufre que se comercializaba para favorecer el crecimiento vegetativo de las plantas y para fortalecerlas contra diversas condiciones adversas como son el estrés abiótico y el ataque de hongos. Su uso como fitofortificante podría solventar posibles carencias de azufre en los suelos ocasionadas por las bajas concentraciones de materia orgánica y el uso de otros compuestos que no llevan incorporado este elemento químico en su composición.

Después de su aplicación, para determinar su eficacia estudiamos diferentes parámetros: las variaciones en peso fresco, peso seco y cenizas, cambios en las concentraciones de clorofila y carotenoides, funcionamiento de los sistemas fotosintéticos así como las posibles variaciones en el contenido proteico y de azufre elemental en plantas. Para ello sembramos las semillas de alfalfa y las dejamos crecer en una cámara bajo unas condiciones controladas. Cuando la planta ya se ha desarrollado lo suficiente, le aplicamos el Manvert Sulphos® e hicimos una serie de ensayos para medir los parámetros anteriores empleando como referencia unas plantas control que eran tratadas con agua. Finalmente, tras comprobar si las diferencias eran significativas estadísticamente pudimos ver como la aplicación del Manvert Sulphos®, provocó en la alfalfa un aumento de peso fresco, seco y humedad, un aumento de los niveles de N y un mayor contenido de clorofila y carotenoides.

### Summary:

This work evaluated the effect of the commercial product Manvert Sulphos®, on the growing of alfalfa seedlings (*Medicago sativa*). Manvert Sulphos®, is a sulfur-rich product that was commercialized for enhancing vegetative growth and plant resistance against different adverse conditions such as stress and fungal attacks. Its use as phytostrengtheners could solve potential shortcomings of this element in soils due to low concentrations of organic matter and the use of other compounds which do not containing sulfur

After application, its efficacy was determined by different parameters: changes in fresh weight, dry weight and ashes, changes in the concentration of chlorophylls and carotenoids, operation of photosynthetic systems and possible variations in protein content and elemental sulfur in plants. The alfalfa seeds were sown and grown into a chamber under controlled conditions. When the plant was already developed enough, we applied the Manvert Sulphos® and made a series of tests to measure the above parameters by using a Control plants treated with water. Finally, after checking whether the differences were statistically significant, we could see how the application of Manvert Sulphos®, resulted in an increase of plant fresh weight, dry, humidity, increased levels of N and a higher content in chlorophylls and carotenoids.

## **INTRODUCCIÓN**

### ***El azufre en el suelo***

En los últimos años se ha detectado una deficiencia de azufre en los suelos debido a la práctica de la agricultura intensiva en la cual las aplicaciones de materia orgánica son escasas (Maldonado *et al.*, 2013). Otra razón de la escasez de azufre es el empleo de fertilizantes que contienen bajas concentraciones de este elemento por la creciente preocupación ambiental de que los compuestos azufrados como es el caso del  $\text{SO}_2$  contaminan la atmósfera. Debido a ello, las partículas que lo forman no vuelven a su lugar de partida por medio de precipitaciones (tanto sólidas como húmedas) y el suelo sufre carencias de este elemento químico. La pérdida de la materia orgánica por la erosión y mineralización contribuyen a este hecho (Sparks *et al.*, 1991)

Las fuentes principales de azufre en el suelo son el yeso, la anhidrita y algunos sulfuros como la pirita, pirotita, esfalerita y calcopirita (Abreu, 1974). A pesar de la aparente abundancia del mismo, este en muchas ocasiones se encuentra inmovilizado porque la proporción de carbono y nitrógeno con respecto a la de azufre es baja y no está disponible para los vegetales. La solubilidad de los iones de azufre también es otro de los problemas de su déficit porque se pierde por lavado y las plantas no pueden aprovecharlo en los niveles adecuados para su crecimiento y sus necesidades metabólicas.

### ***Sistemas de captación de azufre por las plantas***

Las plantas pueden incorporar el azufre en forma de  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  (Westerman *et al.*, 2001; De Kok *et al.* 2002, y Yang *et al.*, 2006). El sulfato se incorpora por vía radicular mientras que  $\text{SO}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$  se absorben por vía foliar. Su tasa de absorción está influenciada por la conductancia estomática y por la resistencia del mesófilo a su difusión en forma de gases (Kok *et al.*, 2006). Hay que tener en cuenta que la captación de  $\text{H}_2\text{S}$  limita el acceso al  $\text{SO}_4^{2-}$  (Kok y Durenkamp, 2004) provocándole un déficit de azufre.

Cuando se encuentra en una solución ácida, el  $\text{SO}_2$  favorece la formación de  $\text{H}_2\text{SO}_3$  y  $\text{HSO}_3^-$ , mientras que en una solución alcalina da lugar a  $\text{SO}_3^{2-}$ . Si se encuentra en forma oxidada, puede dar lugar a  $\text{SO}_4^{2-}$ . El dióxido de azufre es extremadamente soluble en agua y los iones  $\text{SO}_3$  y  $\text{HSO}_3^-$  entran por las aberturas de los estomas. Seguidamente se mueven a través de las células de guardia hasta que alcanzan la epidermis y la traspasan para penetrar en el interior celular. Una vez allí viajan a través del xilema hasta que alcanzan el floema (Leustek y Kazuki, 1999)

### ***El azufre como nutriente y su papel en la planta***

El azufre es indispensable para la síntesis de aminoácidos como la cisteína y la metionina (De Kok *et al.*, 2002) ya que un 90% del mismo se encuentra almacenado en ellos, para la síntesis del glutatión, grupos tiol, sulfolípidos, glucosinolatos, fitoquelatinas, alicina, aliína, péptidos glutamilo y sulfóxidos de cisteína que juegan un papel importante en la fisiología, protección y adaptación de las plantas contra el estrés y las plagas. También se requiere para la formación de vitaminas (biotina, glutamina y tiamina) y enzimas que tienen un grupo sulfidrilo ( $\text{SH}^-$ ) activo (Barrien y Wood, 2006)

Es un elemento clave para la síntesis de péptidos como el glutatión (tripéptido) que tiene como función la protección contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), toxinas y metales pesados (Leustek y Kazuki, 1999). Cuando se detectan ROS el glutatión reacciona con las toxinas en una reacción llevada a cabo por la glutatión S transferasa por lo que estas se inactivan y se marcan para su degradación (Leustek y Kazuki, 1999). En las proteínas es imprescindible para mantener los enlaces puente bisulfuro que se localizan entre los residuos cisteína y metionina que mantienen la estructura terciaria.

Se trata de un elemento químico esencial para el correcto funcionamiento de la fotosíntesis ya que forma parte de la enzima que participa en la síntesis de clorofila y también constituye la coenzima A que es el precursor de los carotenoides. Otros procesos metabólicos en los que participa es en el

transporte electrónico donde se encuentra formando parte de la ferredoxina y citocromos que son transportadores de dicha vía. Estas funciones hacen del azufre un elemento clave en la función fotosintética.

De los niveles de azufre dependen algunos procesos enzimáticos como los llevados a cabo por la enzima adenosilmetionina (SAM) que participa en las reacciones de transmetilación, transulfuración y aminopropilación. De esta enzima también dependen otros reguladores del crecimiento:

- Etileno: participa en la maduración de los frutos (Muneer *et al.*, 2014)
- Poliaminas: favorecen la división y diferenciación celular.
- Procesos de metilación: por ejemplo la metilación del DNA.

### Déficit de azufre

- **Efectos en el fenotipo**

Cuando las plantas se encuentran en una situación de estrés porque no hay suficiente cantidad de azufre disponible o este está inmovilizado, comienzan a desarrollar una serie de síntomas. En primer lugar, los cotiledones adquieren un color amarillo (clorosis) y después aparecen tonalidades beis (Figura 1). Dicha clorosis se va extendiendo hacia las partes maduras de la planta. Si el azufre a pesar de encontrarse en niveles bajos penetra dentro de la planta con mucha rapidez, esta sufre necrosis. Otros de los síntomas típicos son la caída temprana de los cotiledones y la reducción en la longitud de los tallos. Las raíces son largas pero muy finas porque no hay cambium vascular ni engrosamiento secundario. También vamos a obtener rendimientos menores (De Kok *et al.*, 2004), concentraciones bajas de azúcares (Eaton y Ergle, 1951) y de almidón. Esto ocurre porque el metabolismo de los carbohidratos se ralentiza bajo estas circunstancias (Nightingale *et al.*, 1932).



**Figura 1:** Aparición de clorosis en las hojas de las plantas privadas de azufre que se manifiesta por el paso de una tonalidad verde a un color amarillo. (Tomado de: [www.fertilizantesecoforce.es/category/vid/page/23/](http://www.fertilizantesecoforce.es/category/vid/page/23/))

- **Efecto sobre las proteínas**

Gran cantidad de enzimas importantes para el funcionamiento óptimo del metabolismo de las plantas se ven afectadas en condiciones de déficit de azufre. Por ejemplo, la ausencia de azufre provoca el descenso de la actividad de la nitrato reductasa (NR) cuya función es catalizar la reducción del nitrato a nitrito. En plantas de maíz se observa una reducción del 50% de su actividad tras transcurrir doce días de deficiencia de azufre. Si se añade sulfato, su actividad se recupera tras el transcurso de dieciséis días. Sin embargo, si se añade dicho sulfato a plantas con niveles adecuados de azufre vemos que no aumenta la actividad enzimática. Esto sugiere que la NR solo se suprime cuando hay deficiencia de azufre (Friedrich y Schrader, 1977).

Las actividades enzimáticas de la glutamina sintetasa (GS) y NAD-glutamato deshidrogenasa (NADGDH) disminuyen un 13% tras verse sometidas a doce días de deficiencia de S. La GS participa en el metabolismo del nitrógeno y cataliza la condensación del glutamato y amoníaco (producido por la reducción del nitrato, la degradación de aminoácidos o por fosforilaciones) para constituir la glutamina. Por otro lado la NAD-GDH es una proteína NAD específica que cataliza la desaminación oxidativa del glutamato. Por último La NADP- glutamato deshidrogenasa (NADPGDH), es una proteína NADP específica y ejerce la misma función que la anterior (cataliza la desaminación oxidativa del glutamato). Esta última sufre pérdidas del 10% de su actividad en deficiencia de S (Friedrich y Schrader, 1977).

También se inhibe la ácido glicólico oxidasa (Malhotra y Hocking, 1976) que es imprescindible en la ruta del ácido glicólico para la síntesis de glicina y serina (50% menos de síntesis de estos aminoácidos). Otras enzimas afectadas son las diastasas peroxidadas y catalasas (Malhotra y Hocking, 1976)

Existen también otro gran grupo de enzimas, que por el contrario no se ven afectadas por los diferentes niveles de azufre. Por ejemplo, el azufre no afecta a la ATP-sulfurilasa (ATPS), serina acetiltransferasa (SAT) y O-acetilserina tiol liasa (OEA-TL) (Friedrich y Schrader, 1977). La primera cataliza la adición del ión sulfato a un grupo fosfato del ATP formándose fosfosulfato de adenosina (APS) con la consiguiente liberación de pirofosfato (PPi). La SAT a partir de serina y Acetil-CoA cataliza la formación de O-acetil serina (OAS). Por último la OEA-TL cataliza la incorporación de azufre reducido en forma de sulfuro al esqueleto carbonado de la O-acetilserina (OAS) para formar la cisteína. Por ello, tanto la SAT como la OEATL forman un complejo de dos enzimas denominado cisteína sintasa porque la acción conjunta de las dos da como resultado final a este aminoácido.

- **Efectos en el DNA**

Cuando los niveles de azufre disponibles para la planta son bajos se produce la rotura del enlace fosfodiéster con lo cual se inactiva el DNA y el mRNA (Malhotra y Hocking, 1976).

- **Efectos en la fotosíntesis**

La deficiencia de azufre es la responsable del descenso del contenido en clorofila, con la consiguiente aparición de clorosis, porque este elemento químico forma parte una enzima clave para la síntesis de este pigmento. Por ello, si no se encuentra en las concentraciones adecuadas observaremos una disminución de esta ruta metabólica y de igual modo, detectaremos pérdidas en la eficiencia fotosintética (Terry, 1976) y (Song *et al.*, 2013). Aunque suministremos azufre de manera exógena, los daños son tan grandes que la recuperación de la actividad normal va a ocurrir de manera lentísima y solo se corregirá con la nueva síntesis de proteínas azufradas y clorofila.

Un ejemplo del descenso de la concentración de clorofila a y b lo tenemos en un ensayo con plantas de maíz donde el cese del aporte exógeno de azufre ocasionó la reducción de un 18 - 25% respectivamente de la concentración de dichos pigmentos. La carencia de azufre también es la

responsable de la disminución de la tasa de absorción de  $\text{CO}_2$  y de la difusión de este mismo porque al haber poco azufre hay un menor número de estomas y además estos suelen estar cerrados.

En ensayos realizados para medir la fluorescencia de clorofilas se observó un descenso del rendimiento fotoquímico del PSII en plantas privadas de azufre. Esta disminución se puede explicar por: fotoinhibición (Song *et al.*, 2013), aumento de la presión de excitación debido a la menor eficiencia de la ISP (proteína hierro-sulfurada del citocromo  $b_6/f$ ) y por la disminución de la fijación de  $\text{CO}_2$ .

### Exceso de azufre

- **Efecto en las enzimas**

Cuando los niveles de azufre son muy elevados, el funcionamiento del sistema enzimático tampoco es el óptimo porque se inhibe la PEP carboxilasa y la NADH malato deshidrogenasa por lo que se reduce la fijación fotosintética del  $\text{CO}_2$  en cloroplastos. La primera cataliza la  $\beta$ -carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Mg}^{2+}$  produciéndose oxalacetato, que a su vez participa en la fotosíntesis  $\text{C}_4$  y CAM y en otras funciones como la síntesis de proteínas y el mantenimiento del pH citosólico. En el caso de la NADH malato deshidrogenasa, esta cataliza la oxidación del malato a oxalacetato empleando  $\text{NAD}^+$  como aceptor de electrones. (Friedrich y Schrader, 1978).

- **Efectos en el DNA**

Cuando no hay concentraciones limitantes de azufre, este reacciona con los radicales libres (Malhotra y Hocking, 1976) provocando la rotura del enlace fosfodiéster que mantiene los vínculos de la cadena. Esto provoca la inactivación del DNA o de la molécula de mRNA.

- **Efectos en la fotosíntesis**

Si la concentración de azufre es elevada, este interfiere con la fijación del  $\text{CO}_2$  por medio de una inhibición competitiva ya que el azufre y el  $\text{CO}_2$  compiten por unirse a la RUBISCO (Malhotra y Hocking, 1976).

También provoca la descomposición de clorofila en feofitina e iones  $\text{Mg}^+$  por lo que el contenido de la misma baja. Si las concentraciones de  $\text{SO}_2$  oscilan entre (10-100ppm), este no afecta al contenido de clorofila a ni b pero si se elevan (250-500 ppm), la clorofila a sufre más daños por dicha disociación ((Malhotra y Hocking, 1976).

El  $\text{SO}_2$  provoca la reducción del contenido de  $p$ -caroteno y la inhibición de ferredoxinas y citocromos ya que se une a estos transportadores e impide que realicen su función (Malhotra y Hocking, 1976). Otro de los efectos del exceso del azufre es la reducción de la eficiencia fotosintética (García, 1977).

El  $\text{SO}_2$  también favorece la apertura estomática que conlleva a la deshidratación de la planta (Figura 2), provoca la reducción de la respiración en vegetales e induce a una mayor acumulación de glicina y serina. La mayor acumulación de estos aminoácidos ocurre porque aumentan sus niveles de transcripción en el orden de 5 a 9 veces (Malhotra y Hocking, 1976)



**Figura 2:** Apertura estomática causada por concentraciones elevadas de azufre (tomado de: <https://joakinmg.wordpress.com/2013/01/07/estomas/>)

## **Fitofortificantes**

### **Concepto**

Los fitofortificantes son compuestos elaborados a partir de sustancias naturales como bacterias, hongos, virus o minerales. Se trata de productos no fitosanitarios que ayudan a que los cultivos se vuelvan más vigorosos y posean resistencia frente a patógenos. La protección frente a los organismos nocivos la llevan a cabo mediante la activación de las defensas de la planta.

Su empleo se está extendiendo mucho en la actualidad en campos como la agricultura ecológica y en la producción agrícola convencional e industrializada ya que su empleo está sustituyendo al de los pesticidas. Los fitofortificantes deben cumplir las siguientes legislaciones:

- **Orden APA/1470/2007 de 24 de mayo** que regula la comunicación ofrecida en la comercialización del producto. Este debe contener información relativa a la identidad, características específicas del medio de defensa fitosanitaria, la etiqueta y las instrucciones de su uso.
- **Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009, relativo a su comercialización.** La venta solo se podrá llevar a cabo tras asegurarse que el producto es eficaz, se conoce su incidencia en la salud humana y en el medio ambiente, la ecotoxicología, la importancia de sus residuos. De este modo, el compuesto activo sólo se aprueba si no ha sido clasificado como mutágeno, carcinógeno o tóxico, no provoca alteraciones endocrinas y no es un contaminante orgánico persistente

### **Mecanismo de acción**

En las plantas, el uso de fitofortificantes es muy adecuado porque les proporciona protección a la vez que no suponen ningún riesgo para su supervivencia de las mismas. Son muy eficaces porque estimulan la resistencia y los mecanismos de defensa de la planta y compiten con los microorganismos por el espacio (rizosfera) y por los nutrientes. Otras funciones que desempeñan son:

- Crean barreras físicas y biológicas frente a patógenos.
- Regeneran la flora microbiana del suelo para evitar el crecimiento de organismos perjudiciales (nematodos).
- Desarrollan la resistencia inducida en los vegetales.
- Activan las defensas naturales de la planta (actúan como elicitores): interactúan con la planta, desencadenando en ella respuestas de defensa.
- Protegen a la planta frente a situaciones de estrés. Debido a esto, logramos individuos más resistentes a condiciones desfavorables.

Son efectivos si se aplican antes de que haya ocurrido la infección de la planta, es decir, se emplean como tratamientos preventivos. Por lo tanto, vemos que es muy difícil utilizar un fitofortificante como medio de control de una plaga o enfermedad cuando esta ya está afectando a la planta. Ningún fitofortificante desarrolla un efecto letal ni directo sobre un patógeno concreto.



## **OBJETIVOS**

Debido al importante papel que desempeñan los minerales en la fisiología, crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos, en el presente estudio pretendemos evaluar si el producto Manvert Sulphos® es eficaz en su papel como fitofortificante empleando como planta indicadora a la alfalfa. Este producto, en su composición posee un elevado contenido en azufre y tras su aplicación observaremos cómo le afecta a la alfalfa respecto a un grupo de plantas control. Los parámetros que vamos a evaluar son los siguientes:

- El crecimiento vegetativo: El peso fresco (PF), peso seco (PS) y las cenizas
- Efectos del compuesto sobre la fotosíntesis (fluorescencia)
- Contenido en clorofilas
- Contenido en proteínas
- Contenido total de azufre.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Material vegetal***

Para llevar a cabo los ensayos de laboratorio empleamos semillas de alfalfa que plantamos en un semillero con alveolos de 150 ml de volumen. Como sustrato utilizamos una mezcla de *Vermiculita Projar n°2* (SiO<sub>2</sub> 39,5%, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 12%, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y FeO 7%, TiO<sub>2</sub> 1%, MgO 23%, CaO 1,5%, K<sub>2</sub>O 2%, agua libre o combinada 12%) y *tierra Compo Universal* (turba, perlita, Agrosil y elementos nutrientes pH (CaCl<sub>2</sub>): 5,0 - 6,5. Contenido en sal (KCl) g/l: < 3,0 Contenido en abono: 200 - 450 mg/l Nitrógeno (N) 200 - 500 mg/l Fosfato (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 300 - 550 mg/l Óxido de potasio (K<sub>2</sub>O)). La proporción de vermiculita y tierra empleada era (2:1).

Posteriormente regábamos las plantas con agua y dejábamos que estas crecieran en una cámara cuyas condiciones son: temperatura 21°C: 12 horas, 19°C: 12 horas y fotoperíodo 12 horas: 12 horas

### ***Aplicación del Manvert Sulphos®***

Cuando la planta tenía doce días de edad aplicábamos el producto *Manvert Sulphos®* por pulverización. Se trata de un compuesto nitrogenado con un elevado contenido en azufre reducido que está indicado para favorecer el crecimiento vegetativo de la planta y posee una doble función, nutricional y fungistática.

Es una excelente fuente de nitrógeno amoniacal, que se absorbe fácilmente por los vegetales y que contribuye a la formación de aminoácidos (especialmente aquellos que contienen grupos funcionales tiol) como la metionina, cisteína y ácido glutámico.

**Tabla 1.** Composición del producto comercial Manvert Sulphos®

<b>Composición</b>	<b>%p/p</b>	<b>%p/v</b>
<b>Nitrógeno total (N)</b>	<b>9,0</b>	<b>12,6</b>
<b>Nitrógeno amoniacal (N)</b>	<b>9,0</b>	<b>12,6</b>
<b>Azufre (SO<sub>3</sub>)</b>	<b>48,0</b>	<b>67,0</b>
<b>Oxido de potasio (K<sub>2</sub>O) soluble en agua</b>	<b>5,0</b>	<b>7,0</b>

El producto puede aplicarse tanto por la vía foliar como por la radicular en cualquier momento del ciclo de la planta. A pesar de ello, su eficacia es mayor en las épocas de crecimiento activo y durante los períodos de estrés. Tiene la ventaja de que es compatible con el resto de fertilizantes y productos comerciales que se encuentran en venta en el mercado.

Siguiendo las dosis recomendadas por el fabricante aplicamos el producto por vía foliar, pulverizando una concentración de 0.3 ml/100ml de agua. En el caso de las plantas control solo se aplicaban 100 ml de agua destilada.

### ***Crecimiento vegetativo***

A los cuatro y nueve días después de la aplicación del producto se recogen tres muestras de cada semillero y se determina su peso fresco por grupos. A continuación se meten en la estufa a 50 °C durante 48 horas para poder calcular el peso seco. Cuando las muestras están secas, se pulverizan 50 mg y se calcinan en la mufla *Carbolite* a 550°C para poder calcular el contenido de cenizas.

### **Cuantificación de clorofilas**

Para la cuantificación de clorofilas, a los cuatro y nueve días después de aplicar el tratamiento se recogen entre 2 y 3 gramos de alfalfa. El tejido obtenido se homogeneiza con acetona al 80% en una proporción 1:10 (peso/volumen) y se filtra a través de un embudo Büchner provisto de papel de filtro. Seguidamente se lleva el contenido a un volumen final de 50 ml y dicho volumen se filtra a través de un filtro Millex-FH (PTFE) de 0,45 µm compatible con acetona. Finalmente se determina la absorbancia de las muestras a las longitudes de onda de 460, 645 y 663 nm usando un espectrofotómetro Thermo Helyos.

### **Determinación de proteínas**

Para la determinación de proteínas se recogen entre 1,5 y 3 gramos de tejido que se homogeneiza con tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5 en proporción (1:4) peso-volumen. A continuación las muestras se centrifugan en una centrífuga refrigerada Eppendorf 5810 R a 1854 g durante 30 minutos y tras ese tiempo se recoge el sobrenadante.

De este sobrenadante se retiran 50 µl y se deposita en tubos eppendorf. Posteriormente se añaden 450 µl de agua destilada y 500 µl de reactivo de *Bradford*. El blanco solo lleva 500 µl de agua y 500 µl de reactivo de *Bradford*. Las muestras se incuban en oscuridad durante 30 minutos y después se determina la absorbancia a 590 nm. Para calcular el contenido de proteínas nos basamos en una recta de calibrado con distintas concentraciones de BSA que se ajustó a la ecuación:  $y = -0,1425x + 0,9384$ ,  $R^2 = 0,8731$

### **Fluorescencia de clorofilas**

Con el fin de evaluar el efecto del tratamiento sobre la fotosíntesis se realizó un estudio del comportamiento de la fluorescencia de clorofilas. Debemos tener en cuenta que de la radiación que incide sobre la superficie de la hoja no toda se va a destinar a la emisión de fluorescencia. Una parte es reflejada, otra transmitida y el resto es absorbido por los pigmentos fotosintéticos (clorofilas). A su vez, no toda la energía absorbida por las clorofilas se usa para los procesos fotoquímicos sino que dichos pigmentos la pueden disipar de distintas formas:

- Pérdida de un electrón desde los centros de reacción hacia la cadena de transporte electrónico.
- Disipación de la energía por métodos no fotoquímicos como la liberación de calor. Esto representa el apagamiento no fotoquímico (qN).
- Reemisión en forma de luz (emisión de fluorescencia).

Estas tres vías son procesos competitivos lo que implica que el aumento de la energía destinada a uno de ellos lleva asociado una disminución en alguno de los otros dos. El estudio de la emisión de fluorescencia proporciona una vía indirecta y no destructiva de los otros dos parámetros. Para ello, hojas adaptadas a la oscuridad fueron sometidas a diferentes tipos e intensidades de luz registrándose la fluorescencia emitida en respuesta a la luz incidente. Los ciclos analizados se representan en la Figura 3.

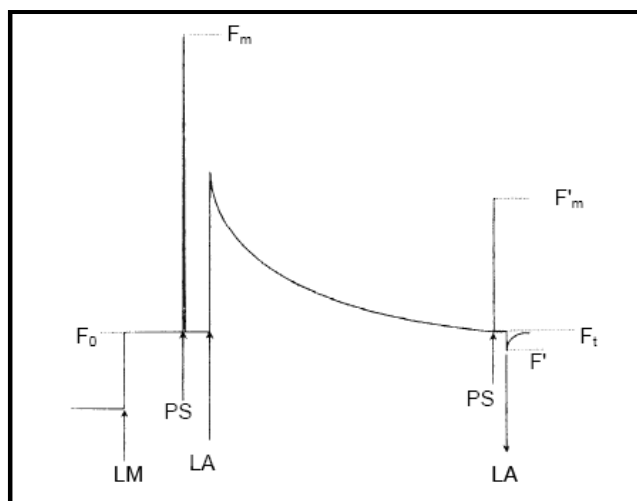


Figura 3: Ciclo de intensidades de luz y parámetros de fluorescencia que se obtienen en el fluorómetro.

Este ciclo se repite un total de 12 veces con intensidades de luz actínica (LA) desde (10 a 1869  $\mu\text{moles de fotones/m}^2/\text{s}$ ). Con los valores de fluorescencia calculados en estos ciclos de luz se pueden estimar otros parámetros relacionados directamente con la fotosíntesis.

Se parte de hojas sometidas a oscuridad durante toda la noche que se introducen en el fluorómetro *PAM-210 (Walz)* y se exponen a diferentes intensidades de radiación incidente. El funcionamiento de dicho *fluorómetro PAM-210 (Walz)* se basa en:

- Inicialmente se aplica una luz de fondo que proporciona el valor de fluorescencia mínimo en hojas adaptadas a oscuridad ( $F_0$ ).
- Luego aplicamos un pulso de saturación corto e intenso (SP) que hace que los fotosistemas devuelvan la ( $F_m^0$ ): fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la oscuridad.
- En tercer lugar se aplica una luz actínica (LA) que imita a la luz solar. Al principio la fluorescencia alcanza un pico pero a medida que los fotosistemas se adaptan, su valor disminuye.
- Seguidamente aplicamos un nuevo pulso de saturación (SP), que permite determinar la fluorescencia máxima en hojas adaptadas a la luz ( $F_m'$ ).
- Finalmente, apagamos la luz actínica y aplicamos luz roja lejana para drenar los fotosistemas. Así obtenemos la fluorescencia mínima en hojas adaptadas a la luz ( $F_0'$ ).

Los valores obtenidos con estos parámetros permiten calcular:

- El rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{PSII} = (F'm - Ft) / F'm$ ): Mide la proporción de luz absorbida por la clorofila asociada al fotosistema II que se usa en procesos fotoquímicos.

El rendimiento cuántico puede ser usado además para calcular la tasa de transferencia de electrones mediante:  $ETR = \Phi_{PSII} \times PAR \times F \times A$

- PAR = Radiación fotosintéticamente activa = 150  $\mu\text{moles fotones/m}^2/\text{s}$  que viene dada por la intensidad de luz incidente.
- A= Proporción de luz absorbida por la hoja. El valor típico en las hojas es de 0,84.
- F= Absorbancia del PII dividida por la absorbancia del PII y PI, es decir, la proporción de luz absorbida que es empleada por el PII. Los fotosistemas absorben por igual la misma cantidad de luz así que se asume que el valor de F es 0,5

$$ETR = \Phi_{PSII} \times 150 \times 0,5 \times 0,84$$

- Apagamiento no fotoquímico ( $qN = (Fm - Fm') / (Fm - F_0)$ ) que refleja la energía disipada como calor.

Se parte de hojas adaptadas a la oscuridad en las que todos los fotosistemas se encuentran disponibles. Para medir los niveles de fluorescencia se escoge la hoja de mayor tamaño de un total de 6 plantas y se coloca en un fluorómetro PAM-210 (Walz).

### Determinación del azufre elemental

El análisis del contenido de C, H, N, S se ha llevado a cabo en los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidad de A Coruña mediante un analizador elemental de combustión (FlashEA1112, ThermoFinnigan).

Previamente las muestras eran preparadas en nuestro laboratorio, lavando exhaustivamente las hojas de la alfalfa con agua destilada y empleando un agitador para favorecer el mezclado y la eliminación del azufre adherido a la superficie foliar. Posteriormente se secan las muestras en la estufa a 50°C durante 48 horas. Cuando están completamente secas se pulverizan y se retiran 100 mg para enviarlos al SAI donde continuaron con los posteriores pasos pertinentes.

En el SAI, primero se llevó a cabo un pesado de la muestra en una balanza (MX5, Mettler Toledo) en una cápsula de estaño para analizarse mediante combustión instantánea en un tubo de cuarzo relleno de WO<sub>3</sub> y cobre, mantenido a 1020° C. Tras la combustión de la muestra, los gases generados son transportados por una corriente de helio a través del WO<sub>3</sub> donde se completa la oxidación y a continuación a través del cobre donde se reducen los óxidos de nitrógeno a N<sub>2</sub>, los óxidos de azufre a SO<sub>2</sub>, y se retiene el exceso de oxígeno. Posteriormente la mezcla de gases generada (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y SO<sub>2</sub>) pasa a una columna donde sus componentes se separan cromatográficamente (columna Poropak 2 m) y finalmente se detectan en un detector de conductividad térmica. Las señales resultantes se procesarán por el software para obtener los porcentajes elementales.

### Análisis estadísticos

Para explicar los posteriores resultados que hemos obtenido aplicamos una serie de test estadísticos:

- **El test de la F:** Evalúa si se cumple la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) de que no hay diferencias significativas entre las varianzas de las muestras de estudio o si ocurre lo contrario y debemos aceptar H<sub>1</sub>.

$$F = \frac{S_{mayor}^2}{S_{menor}^2}$$

- **La prueba de la t de student:** Sirve para testar la hipótesis nula de que la diferencia entre dos medias no es mayor que la esperada para dos muestras que proceden del mismo universo. Este test requiere que las varianzas sean homogéneas (deben tener los mismos grados de variabilidad interna). Para comprobar esto se hace el test de la F (varianza mayor/varianza menor).

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_{x1-x2}} \text{ Donde } s_{x1-x2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

- En los resultados obtenidos en las prácticas explicadas posteriormente, también calculamos la **desviación típica (SD)** que nos indica la varianza obtenida en nuestros datos con respecto a la media esperada. Para eliminar el cuadrado haremos la raíz y así obtenemos el valor de SD.

$$s^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(xi - \bar{x})^2}{n - 1}$$

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN*****Determinación del peso fresco, seco, contenido de humedad y cenizas***

Los valores de peso fresco, peso seco, humedad y cenizas son mayores en las muestras tratadas a los cuatro días de edad. Esto ya se detecta fenotípicamente porque las plantas tratadas son de mayor tamaño con lo que nos proporcionarán más biomasa (Figura 4). A los nueve días obtenemos resultados opuestos. Los datos que muestran diferencias significativas son el PF, PS, % humedad en las muestras de alfalfa evaluadas a los cuatro días de aplicar el Sulphos y lo mismo ocurre en las de nueve días con la salvedad del porcentaje de humedad (Tabla 2). El hecho de que las plantas tratadas muestren un porcentaje de humedad menor puede explicarse porque el azufre favorece la apertura estomática con lo cual pierden mayor cantidad de agua.

En la planta pacana, unos investigadores encontraron un incremento del peso seco de las plantas fertilizadas (Sparks *et al.*, 1991) al igual que ocurría con la soja (Ferraris *et al.*, 1998) y en el trigo (Tysko y Rodríguez, 2006). Lo contrario ocurría en el frijol, trigo (Friedrich y Schrader, 1978), alfalfa (Wells y Dollarhide, 2000) y en fabáceas (García, 1977). Sin embargo, en la planta de alfalfa si se encontró un aumento del peso seco al fertilizar a la planta de forma conjunta con azufre, fósforo y otros micronutrientes (Dávila y Machado, 1997)

Nosotros podemos decir que a corto plazo el Manvert Sulphos® mejora el rendimiento de los cultivos pero a medida que pasa el tiempo esta cualidad se va perdiendo porque las plantas de mayor edad fertilizadas ofrecen menores biomásas que las plantas control de la misma edad.



**Figura 4:** Plantas de alfalfa control (izquierda) y tratadas con Manvert Sulphos® (derecha).

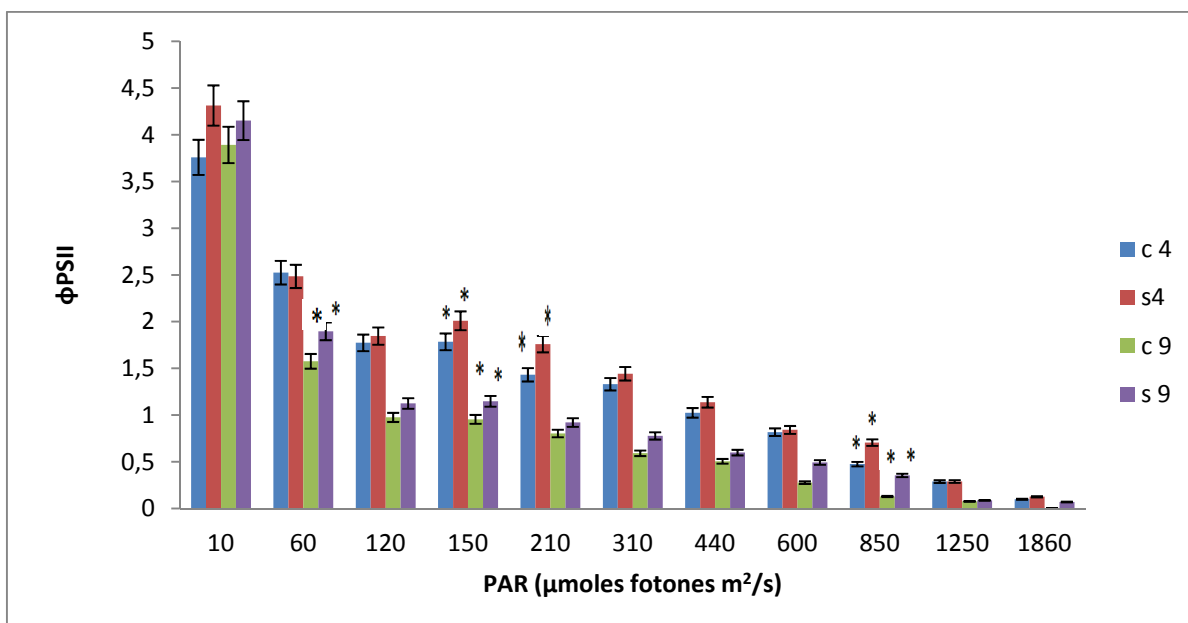
**Tabla 2:** Cuantificación de PF, PS, humedad y cenizas de alfalfa control y Sulphos de 4 y 9 días de edad. (\*) Indica que hay diferencias significativas entre la variable control y Sulphos analizada)

Variable	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	% Humedad	Cenizas (g)
Control 4 días	2,36±0,23	0,19±0,01	88,51±2,59	0,15±0,01
Sulphos 4 días	3,06±0,13*	0,31±0,02*	92,43±2,83	0,16±0,01
Control 9 días	2,94±0,41	0,29±0,04	90,15±0,07	0,12±0,02
Sulphos 9 días	2,22±0,31*	0,24±0,02*	89,32±0,57*	0,11±0,01

### Determinación de la fluorescencia

Al enfrentar el rendimiento cuántico del fotosistema II frente a PAR vemos que dicho rendimiento es menor en las plantas control que en las fertilizadas y también es más bajo en las plantas de mayor edad (destinan su energía al apagamiento no fotoquímico qN). Esta disminución se puede explicar por fotoinhibición, un aumento de la presión de excitación, a la menor eficiencia de ISP (proteína hierro sulfurada del citocromo b6f) y por la disminución de la fijación de CO<sub>2</sub> (Maxwell y Johnson 2000).

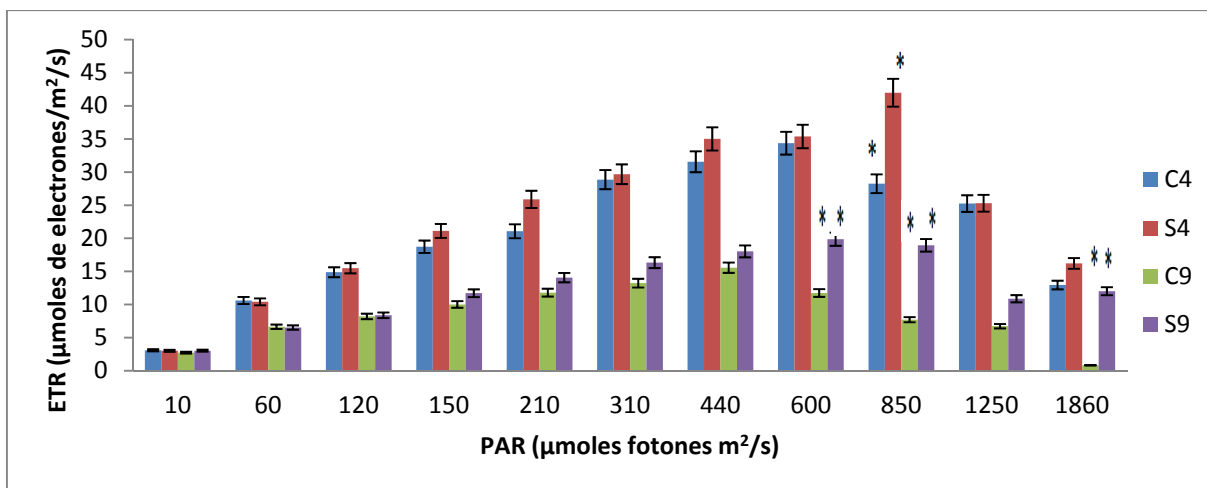
El rendimiento cuántico del fotosistema II mide la proporción de luz absorbida por la clorofila asociada al fotosistema II y que se emplea en procesos fotoquímicos. Resulta lógico que las plantas con mayor cantidad de azufre nos proporcionen mayores rendimientos porque este elemento químico ayuda a que se sintetice mayor cantidad de clorofila que captará más luz y se destinará a procesos fotosintéticos y a la emisión de fluorescencia. (Figura 5)



**Figura 5:** Valores de rendimiento cuántico del fotosistema II frente a diferentes intensidades de radiación fotosintéticamente activa en plantas control y tratadas con Sulphos, 4 y 9 días después de aplicar el tratamiento. Con (\*) se representan las muestras que estadísticamente tienen diferencias significativas.

Debemos tener en cuenta que de la energía recibida, no toda se emplea en la emisión de fluorescencia sino que una parte es reflejada, otra transmitida y otra absorbida. De la absorbida el porcentaje destinado a la tasa de transferencia de electrones es mayor en las plantas jóvenes porque después la energía se utiliza en el apagamiento no fotoquímico con lo cual este último valor sube y el de ETR baja (Figura 6).

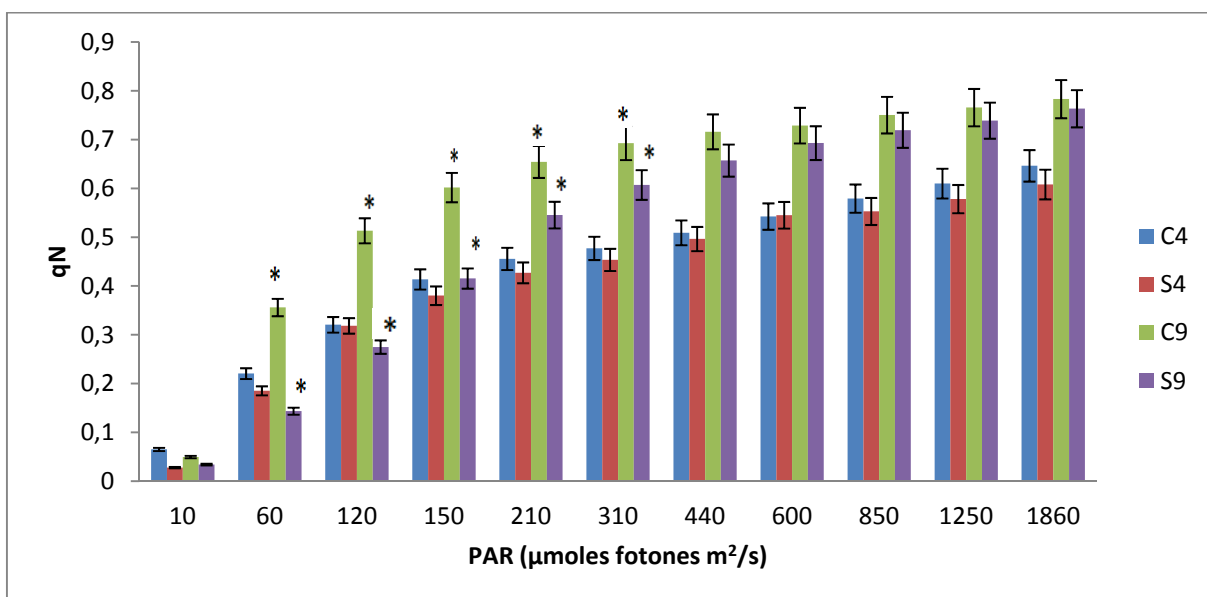
A su vez nos encontramos con que la ETR aumenta en las plantas fertilizadas con respecto a las control. Esto se puede explicar porque el azufre forma parte de la estructura de los transportadores que participan en esta vía como es el caso de la ferredoxina. Por ello, en las plantas control al tener menos concentraciones de azufre también vamos a tener menores niveles de transportadores y la eficacia de la vía disminuye.



**Figura 6:** Valores de transferencia de electrones frente a diferentes intensidades de PAR (radiación fotosintéticamente activa) de plantas control y tratadas con Sulphos tras 4 y 9 días de aplicar el tratamiento. Con (\*) se representan las muestras que estadísticamente tienen diferencias significativas.

Al enfrentar qN frente a PAR vemos que el apagamiento no fotoquímico es mayor en las plantas control que en las fertilizadas y que este se hace mayor al aumentar la radiación fotosintéticamente activa. Que las plantas control tengan un apagamiento fotoquímico más elevado se puede explicar porque no tienen tanto azufre que es necesario para la síntesis de los pigmentos fotosintéticos (carotenoides y clorofilas) que destinan su energía a la ETR y a la emisión de fluorescencia respectivamente. (Figura 7).

Las plantas más jóvenes destinan menos energía al apagamiento no fotoquímico que las de mayor edad porque las primeras siempre van a tener mayor proporción de clorofilas que se observa fenotípicamente en un color verde intenso que se va sustituyendo por las tonalidades amarillas en las plantas de mayor edad. Estas últimas destinan su energía a la liberación por calor.



**Figura 7:** Valores qN frente a diferentes intensidades de PAR en plantas control y sulphos después del transcurso de 4 y 9 días de aplica el tratamiento. Con (\*) se representan las muestras que estadísticamente tienen diferencias significativas.



Tras realizar los test estadísticos correspondientes comprobamos que hay diferencias significativas en las intensidades de luz de 150, 210 y 850 a los cuatro días y en las de 60, 120 y 850 a los nueve días al enfrentar el rendimiento cuántico del fotosistema II frente a la radiación fotosintéticamente activa. Las diferencias se hacen mayores al avanzar la edad de la planta porque la síntesis de clorofila aumenta con la adicción del azufre con lo que, la cantidad de luz absorbida por las clorofilas asociadas al fotosistema II aumentará.

Al enfrentar la tasa de transferencia de electrones frente a la radiación fotosintéticamente activa vemos que hay diferencias significativas en las intensidades de luz de 850 a los cuatro días y a las de 600, 850 y 1860 a los nueve días. En este caso las diferencias ocurren porque la clorofila ha provocado una mayor síntesis de ferredoxinas y citocromos con lo cual estos transportadores llevan a cabo su función de transporte de forma óptima.

Por último, al enfrentar el apagamiento no fotoquímico frente a la radiación fotosintéticamente activa observamos que hay diferencias significativas en las intensidades de luz de 60, 120, 150, 210 y 310 a los nueve días. Podemos comprobar que las plantas de mayor edad disipan su energía por medio del apagamiento no fotoquímico mientras que las más jóvenes destinan su energía a la emisión de fluorescencia y al transporte electrónico.

### **Determinación del contenido de clorofilas**

Sí comparamos los valores de las plantas control con las fertilizadas vemos que estas últimas contienen mayor cantidad de clorofila a, b y carotenoides. A su vez, la alfalfa control de 4 días de edad contiene mayor contenido de clorofila a que de b; situación que cambia al realizar el aporte exógeno de azufre. En la alfalfa de 4 días encontramos diferencias significativas en el contenido de clorofila B y en el de carotenoides (Tabla 3).

Con la alfalfa de 9 días, obtenemos resultados similares al anterior. La clorofila es más abundante en las plantas fertilizadas y las plantas con Sulphos contienen mayor concentración de clorofila b. En este caso también encontramos diferencias significativas en el contenido de clorofila B y carotenoides.

**Tabla 3:** Contenido de clorofilas de alfalfa control y sulphos 4 y 9 días después de aplicar el tratamiento. (\*) Indica que hay diferencias significativas entre la variable control y Sulphos analizada).

Variable	Clorofila A (g/gPF)	Clorofila B (g/gPF)	Carotenoides (g/gPF)
Control 4 días	0,035±0,01	0,044±0,001	0,030±0,004
Sulphos 4 días	0,031±0,002	0,054±0,002*	0,045±0,002*
Control 9 días	0,049±0,016	0,036±0,004	0,037±0,004
Sulphos 9 días	0,053±0,015	0,065±0,003*	0,06±0,002*

En plantas con exceso de azufre hay un descenso de la tasa fotosintética porque este elemento químico se une con el hierro del cloroplasto en forma de ferredoxinas y citocromos e inactiva a estos transportadores inhibiendo la fotosíntesis (Malhotra y Hocking, 1976). La clorofila a se disocia en Mg<sup>+</sup> y feofitina y reduce sus niveles Malhotra y Hocking, 1976). Esto es común a nuestros resultados y explicaría porque la clorofila a pasa de ser más abundante en las plantas control que la b a una situación opuesta con el aporte de azufre.

En vegetales con deficiencia de azufre hay menos síntesis de clorofila y de carotenoides. La deficiencia de clorofila en condiciones de escasez de azufre fue detectada en plantas de espinaca y

oleaginosas, (Kok *et al.*, 2006 ). En el maíz también se encontró una reducción del 18 y 25% de clorofila a y b en condiciones de poco azufre (Terry, 1976). Esto ocurre porque el azufre es necesario para la síntesis de clorofila ya que forma parte de la enzima que sintetiza a ese pigmento y también se requiere para la formación de Coenzima a que es un precursor de los carotenoides.

La deficiencia de azufre afecta tanto a la fotosíntesis que aunque lo añadamos de manera exógena, la eficiencia fotosintética solo se recupera y de forma muy lenta cuando se sintetizan nuevas proteínas y clorofila (Terry, 1976). Esto explicaría porque los niveles de dicho pigmento suben de forma mucho más acusada a los nueve días porque la recuperación de la capacidad de su síntesis es lenta.

### Cuantificación de proteínas

El azufre es un elemento químico imprescindible para la biosíntesis de proteínas y para el mantenimiento de su estructura terciaria ya que fortalece el enlace peptídico constituido entre sus residuos metionina y cisteína. En este caso observamos que las plantas control poseen menor contenido proteico tanto a los cuatro como a los nueve días después de aplicar el tratamiento. Como vemos, el azufre sí se necesita para las funciones mencionadas anteriormente porque en las plantas control hay menor cantidad de este elemento químico por la rotura del enlace con la consiguiente liberación de aminoácidos. A pesar de ello, en ninguno de los casos evaluados encontramos diferencias significativas entre las plantas tratadas con Sulphos y las control (Tabla 4).

**Tabla 4:** Cuantificación de proteínas en muestras de alfalfa control y tratadas con Sulphos.

Muestra	Proteínas ( $\mu\text{g}$ proteína/ gPF)
Control 4 días	3,04 $\pm$ 0,36
Sulphos 4 días	3,60 $\pm$ 0,63
Control 9 días	3,28 $\pm$ 0,60
Sulphos 9 días	3,35 $\pm$ 0,51

### Contenido de azufre y otros elementos

El contenido en N es mayor en las muestras control de 4 y 9 días que en las tratadas con sulphos. Esto también ocurre con el contenido de C e H. La única excepción la tenemos en las de azufre en donde sus niveles aumentan en las plantas fertilizadas con el Manvert Sulphos® ya que este tiene un elevado contenido en azufre. A pesar de ello, el único dato que nos proporciona una diferencia significativa es el correspondiente a las plantas analizadas después de nueve días de aplicar el Sulphos. En este caso vemos que las plantas control poseen mayores niveles de N (Tabla 5).

**Tabla 5:** Contenido de C, H, S y N en plantas de alfalfa control y tratadas con Sulphos a los 4 y 9 días después de aplicar el tratamiento. (\*) Indica que hay diferencias significativas entre la variable control y Sulphos analizada.

Muestra	peso (mg)	%N	% C	% H	%S
Control 4 días	3,38 $\pm$ 0,05	5,28 $\pm$ 0,33	42,27 $\pm$ 0,51	5,88 $\pm$ 0,12	0,34 $\pm$ 0,01
Sulphos 4 días	2,13 $\pm$ 0,10	3,87 $\pm$ 0,26	41,63 $\pm$ 0,88	5,71 $\pm$ 0,23	0,39 $\pm$ 0,03
Control 9 días	2,37 $\pm$ 0,09	3,02 $\pm$ 0,29	42,34 $\pm$ 0,13	5,92 $\pm$ 0,15	0,26 $\pm$ 0,02
Sulphos 9 días	2,29 $\pm$ 0,11	2,36 $\pm$ 0,40*	41,89 $\pm$ 0,36	6,00 $\pm$ 0,09	0,21 $\pm$ 0,04

Muchos investigadores que estudiaron el papel del azufre en el metabolismo del nitrógeno se dieron cuenta de que cuando la concentración de azufre es baja, el enlace peptídico de las proteínas se

rompe y se liberan gran cantidad de aminoácidos. Esto provoca el incremento de la concentración de nitrógeno. En la planta sulphos este enlace permanece intacto, las proteínas mantienen su estructura y no se liberarán aminoácidos con lo que el nitrógeno desciende (Friedrich y Schrader, 1977). Esto explica el motivo de que en nuestros resultados detectásemos un incremento del contenido del mismo en las muestras control (porque aumenta la cantidad de aminoácidos libres por la rotura del enlace peptídico).

## **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos indican que el azufre es un elemento químico clave para el funcionamiento óptimo de los procesos metabólicos que ocurren en la planta además de que, a corto plazo, ayuda a mejorar el rendimiento proporcionado por la misma.

Con respecto a la determinación del peso fresco (PF), peso seco (PS), % humedad y cenizas, veíamos que a los cuatro días después de aplicar el tratamiento se incrementaban el PF y PS de las plantas tratadas con respecto a las control. A los nueve días obteníamos resultados opuestos. Esto nos permite concluir que el azufre, cuanto menos a corto plazo proporciona mayores rendimientos.

En los ensayos realizados para medir la influencia del azufre en la actividad fotosintética observábamos que este elemento químico ayuda a incrementar el rendimiento cuántico del fotosistema II y la tasa de transferencia de electrones. Las plantas más jóvenes destinan más energía a la emisión de fluorescencia y a la ETR situación opuesta a las de mayor edad que va dirigida hacia el apagamiento no fotoquímico.

En el caso del contenido de clorofilas y carotenoides podemos decir que el azufre es el responsable del aumento del contenido de ambos (en el caso de la clorofila solo hay diferencias significativas en la B y en los carotenoides hay diferencias tanto a los cuatro como a los nueve días).

Finalmente al estudiar la influencia del azufre en el carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre vemos que no ejerce ninguna influencia en los tres primeros. En el caso del nitrógeno las plantas tratadas poseen niveles inferiores del mismo y aquí si detectamos diferencias significativas con respecto a las control.

## **CONCLUSION**

The results indicate that sulfur is a key for optimal functioning of metabolic processes occurring in the plant. Additionally, in the short term, it helps to improve the plant performance.

Regarding the determination of the fresh weight (FW), dry weight (DW), % moisture and ashes, we observed that at four days after applying the treatment, the FW and DW of treated compared to the control plants increased. On the ninth day we obtained opposite results. This allows us to conclude that sulfur, at least in the short term provides higher yields.

In tests conducted to measure the influence of sulfur photosynthetic activity we observed that this chemical element helps to increase the quantum efficiency of photosystem II and the electron transfer rate. Younger plants devote more energy to the fluorescence emission and ETR. On the contrary, in older plants it is directed towards non photochemical quenching.

In the case of the contents of chlorophylls and carotenoids we can say that sulfur is responsible for the increase in the content of the latter because it is the only pigment that displayed significant differences between the control and the Sulphos treated plants.

Finally, to study the influence of sulfur in the carbon, nitrogen, hydrogen and sulfur we did not see any influence in the first three. In the case of nitrogen treated plants have lower levels of their compound, the differences with control being significant.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abreu, P, A. (1974), Evaluación del azufre disponible en algunos suelos agrícolas de Costa Rica. Tesis de Grado de magister Scientiae: 1-68

Barrien, S.B., & Wood, G.J. (2006) Studies on the sulphur metabolism of plants. Preliminary investigations on the effects of different external concentrations of sulphate, ammonia and cystine on the amounts of sulphur containing compounds in leaves. *New Phytologist*: 125-149.

Dávila, C., & Machado, D. (1997), Efectos de la fertilización con N, P, K, micronutrientes y gallinazo en el establecimiento de la asociación de alfalfa (*Medicago sativa*) y kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), University of Agriculture 14: 111-128.

Eaton, M. F., & Ergle, R.D. (1951), Sulphur nutrition of cotton. *Plant physiology* 26: 639-654.

Ferraris, G., Boem, G. F., & Echevarría, H. (1998), Respuesta a la fertilización en el cultivo de soja de Primera. Proyecto Fertilizar-INTA de investigación, desarrollo e innovación de Aragón (IDIA). (21) 52-58.

Friedrich, W, J., & Schrader, L, E. (1977), Sulfur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings. Department of Agronomy, University of Wisconsin. *Plant physiology*. 61: 900-903

García, V. J. (1977), Efecto del SO<sub>2</sub> sobre plantas jóvenes de *Phaseolus vulgaris* L. Revista de la facultad de agronomía de la Universidad de Zulia (Venezuela). 4: 39-52

Kalaji, H. M., Oukarroum A., Alexandrov, V., Kouzmanova, M., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, A.I., Cetner, D.M., Allakhverdiew, S.I., & Goltsev, V. (2014), Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescent measurements, *Plant Physiology and Biochemistry*, 81:16-25.

Kok, J. L. & Durenkamp, M. (2004). Impact of pedospheric and atmospheric sulphur nutrition on sulphur metabolism of *Allium cepa* L., a species with a potential sink capacity for secondary sulphur compounds. *Journal of Experimental Botany*. 55:1821-1830.

Kok, J.L., & Hawkesford, J. M. (2006), Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell and Environment* 29: 382–395.

Maldonado, C.G., Arispuro, I.V, Cohén, S.V., Téllez, M. (2013). Deficiencia de azufre en suelos cultivables y su efecto en la productividad. Universidad de Sonora. *Revista de Ciencias Biológicas de la Salud*.21(1): 38-44

Malhotra, S. S & Hockin, D. (1976). Biochemical and cytological effects of sulphur dioxide on plant metabolism. *New Phytologist*, 76: 227-237.

Muneer, S., Lee, R. B., Kim, K.Y., Park, H. S., Zhang, Q., & Kim, H.T. (2014), Involvement of sulphur nutrition in modulating iron deficiency responses in photosynthetic organelles of oilseed rape (*Brassica napus* L.), *Photosynthesis Research journal*, 119:319–329

Nightingale, T.G, Schermerhorn, L.G., & Robbins, R.W. (1932). Effects of sulphur deficiency on metabolism in tomato. *Plant physiology* 7: 565-595.

Nikiforova, J.V., Kopka, J., Tolstikov, V., Fiehn, Oliver., Hopkins, L., Hawkesford, J.M., Hesse, H., & Hoefgen, R. (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of Arabidopsis Plants. *Plant Physiology*. 138: 304–318.

Rodríguez, B.M., & Tysko, B.M. (2006), Respuesta del trigo-soja en doble cultivo a la fertilización con azufre elemental pretratado. Cátedra de fertilidad y fertilizantes, facultad de Agronomía de Buenos Aires 24 (2):139-146

Saito, K., & Leustek, T. (1999). Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* 120: 637–643.

Song, R., Zhao, Y. C., Liu, J., Zhang, J., Du, X. Y., Li, Z. J., Sun, Z.H., Zhao, B.H., & Zhao, Z.Q. (2013), Effect of sulphate nutrition on arsenic translocation and photosynthesis of rice seedlings, *Plant Physiology* 35: 3237–3243

Sparks, D., Hu, H., & Evans, J. J (1991), Sulfur deficiency influences vegetative growth, chlorophyll and element concentrations, and amino acids of pecan. *Department of Horticulture, University of Georgia*. 116 (6): 974-980.

Terry, N. (1976). Effects of sulfur on the photosynthesis of intact leaves and isolated chloroplasts of sugar beets. University of California, Berkeley. *Plant physiology*. 57: 477- 479.

Tysko, B.M. & Rodriguez, B. M. (2006), Respuesta de trigo soja en doble cultivo a la fertilización con azufre elemental pretratado. Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes, Facultad de Agronomía de Buenos Aires. 24: 139-146

Wang, J., Solomon, D., Lehmann, J., Zhang, X., Amelung, W. (2006). Soil organic sulfur forms and dynamics in the great Plains of north America as influenced by long term cultivation and climate. *Geoderma* 133: 160 - 172.

Wells, K.L. & Dollarhide, J.E. (2000). Effect of magnesium and sulfur fertilization of alfalfa. *Soil Science News-letter*. 21: 2

Westerman, S., Stulen, Ineke., Suter, M., Brunold, C.& Kok, J.L (2001), Atmospheric H<sub>2</sub>S as sulphur source for *Brassica oleracea*: Consequences for the activity of the enzymes of the assimilatory sulphate reduction pathway, *Plant Physiology* 39: 425–432.

#### Recursos de la web:

Hortus, Ficha técnica Manvert Sulphos. Acceso en:  
<http://www.hortus.com.pe/Hortus/nutricion/fichatec/sulphos.pdf>

Manvert Croptology. Indicadores de autodefensa. Acceso en:  
<http://www.manvert.com/web.asp?mod=catalogo&attr=Elementos&col=attr6#BA2AFF2A-75C3-4960-BB52-96384286351E>

Manvert Sulphos fitofortificantes. Acceso en <http://www.myagrocampo.com/manvert/sulphos.pdf>