

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y  
DESARROLLO, A.C.**

**Evaluación de la aplicación de compuestos azufrados en la  
síntesis de aminoácidos de reserva en vid (*Vitis vinifera* L) cv.  
'Superior'**

Por

**Gabriel Iván Romero Villegas**

Tesis aprobada por la

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL**

Como requisito para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Hermosillo, Sonora.**

**Enero 2012**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis del **Ing. Gabriel Iván Romero Villegas**, le han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en fisiología vegetal molecular.



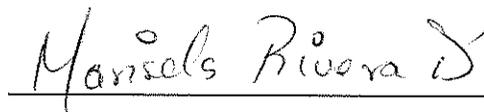
Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez

Director de tesis



Dra. Irasema Vargas Arispuro

Comité



Dra. Marisela Rivera Domínguez

Comité



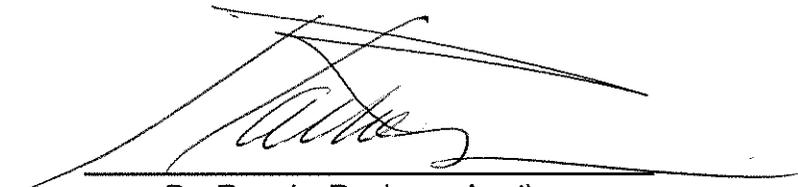
M.C. Jesús Antonio Orozco Avitia

Comité

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en ésta tesis sin el permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá de contar con la declaración escrita del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en ésta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación por escrito del Director de la tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ramón Pacheco Aguilar', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por servir como intermediario, entre los ciudadanos mexicanos y yo, para poder brindarme el apoyo económico durante la Maestría.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A. C.), por permitirme llevar a cabo los estudios de Maestría en sus instalaciones.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez, por su paciencia, dedicación, por el apoyo incondicional, por los consejos, por la disponibilidad y por todo lo que me ayudó durante el desarrollo de todo el trabajo.

Agradezco a la Dra. Irasema Vargas Arispuro, a la Dra. Marisela Rivera Domínguez y al M.C. Jesús Antonio Orozco Avitia por formar parte en el comité de tesis y por el tiempo brindado en la revisión de la tesis así como también sus consejos, tiempo, apoyo y sabiduría brindada durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

Agradezco a mis padres por tener la confianza y darme el apoyo incondicional a pesar de las molestias y desaires que les di durante un largo periodo de mi vida.

Agradezco a mis tíos Alfredo y Aida por ser uno de los pilares en mi vida. Así también agradezco los valiosos consejos Y su gran apoyo y cariño que me brindaron.

Agradezco a mi familia en general por sus palabras de aliento y apoyo brindadas durante todo este tiempo de vida.

A los técnicos del laboratorio de fisiología vegetal molecular, la M.C. Marisol Ochoa Villarreal, el M.C. Emmanuel Aispuro Hernández y al Q.B. Francisco

Soto Córdova, primeramente por el apoyo técnico brindado durante estos dos años de trabajo, y segundo por brindarme su amistad, comprensión, aguante y paciencia.

A Olivia Briceño por hacerme reír a todo momento que me ponía a platicar con ella.

A la M.C. Consuelo Guadalupe Corrales Maldonado por el apoyo técnico y tiempo brindado.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, la M.C. Claudia Vanessa García Baldenegro por su apoyo y asesorías en el análisis estadístico y al Ing. Juan Manuel Díaz Martínez por el apoyo técnico brindado en las aplicaciones y muestreos, así mismo a los dos por su compañerismo, su amistad incondicional y su gran apoyo.

Agradezco a mis amigos y compañeros de maestría, Elí, Gabriel José, Fabiola, Violeta, Oliviert, Alex y Jorge por ser cómplices en esta aventura durante estos dos años.

Agradezco al M.C. Javier Ojeda Contreras y al M.C. Alberto Sánchez Estrada por su amistad brindada, así como sus consejos, ayuda y asesorías impartidas a lo largo de estos dos años.

Agradezco a Minas de Oro Nacional S.A. de C.V. por apoyarnos en el análisis de muestras para determinar azufre.

Agradezco a fundación TELMEX por el apoyo económico brindado.

Agradezco a las Dras. María Islas y Carmen Contreras por las asesorías y por permitirme trabajar en su laboratorio.

A los señores Patricia Alcántara y Clift Turner porque acogerme en los momentos más amargos de mi vida.

Y por último agradezco a la vida porque siempre me pone en el lugar y tiempo adecuado para aprender y superarme día tras día.

## DEDICATORIA

A mis padres por su amor y apoyo

A mis hermanos Víctor Hugo, Ángel Alberto y Adán Ernesto, ya que espero ser su ejemplo y contribuir a que siempre insistan en salir adelante y superarse durante su crecimiento intelectual.

<b>CONTENIDO</b>	
<b>APROBACIÓN</b> .....	<b>ii</b>
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FÓRMULAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>Vid en Sonora</b> .....	<b>3</b>
<b>Nitrógeno</b> .....	<b>3</b>
Asimilación de Nitrógeno en Vegetales .....	4
Reducción de nitrato a amonio .....	4
<b>Asimilación del Amonio</b> .....	<b>5</b>
Incorporación del amonio .....	6
<b>Azufre</b> .....	<b>6</b>
Interacción de la ruta metabólica del azufre y nitrógeno .....	9
<b>Biosíntesis de aminoácidos en la Vid</b> .....	<b>13</b>
<b>Fuentes de azufre para la agricultura</b> .....	<b>14</b>
Ajo ( <i>Allium Sativum</i> , L.): Composición general.....	14
Compuestos azufrados en el ajo .....	14
<b>Sulfato de amonio</b> .....	<b>15</b>

<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>18</b>
<b>Objetivos particulares .....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>Área de realización del trabajo .....</b>	<b>19</b>
<b>Etapa 1 .....</b>	<b>20</b>
Material vegetal: .....	20
Muestreo .....	20
<b>Etapa 2 .....</b>	<b>21</b>
Material vegetal: .....	21
Tratamientos .....	21
<b>Aplicación de tratamientos .....</b>	<b>22</b>
<b>Muestreo .....</b>	<b>23</b>
<b>Evaluación de la productividad .....</b>	<b>23</b>
<b>Análisis de las muestras .....</b>	<b>24</b>
Determinación de nitrógeno total.....	24
Determinación de azufre total.....	26
Determinación de aminoácidos .....	27
Hidrólisis de la muestra.....	27
Análisis de aminoácidos .....	27
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>29</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>

Contenido de nitrógeno total en plantas de vid cv. 'Superior' de alta, media y baja productividad.....	30
Contenido de nitrógeno total (NT) en vides de cv. 'Superior' de baja productividad tratadas con extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio. ....	34
Contenido de azufre total (AT) en vid cv. 'Superior' de baja productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio .....	38
Contenido de arginina total (ArgT) en vid cv. 'Superior' de baja productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio .....	43
Contenido de cisteína total (CT) en vid cv. 'Superior' de baja productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio .....	46
Contenido de asparagina total (AspT) en vid cv. 'Superior' de baja productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio .....	49
Contenido de metionina total (MT) en vid cv. 'Superior' de baja productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio .....	52
Producción total de plantas de vid de cv. Superior tratadas con extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio .....	56
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE FÓRMULAS

Fórmula	Pag
1 Reducción del nitrato.....	5
2 Reducción del nitrito.....	5

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág
1 Interacción primaria entre las rutas metabólicas de la asimilación del nitrato y sulfato.....	8
2 Localización de los viñedos La Perla y La meza.....	17
3 Muestras de raíz y pecíolo de vid.....	19
4 Aplicación de los extractos de ajo.....	20
5 Racimos de cultivar 'Superior'.....	21
6 Equipo LECO Analizador de nitrógeno orgánico total.....	22
7 Cápsula de taza pequeña de aluminio marca LECO usada para el análisis de nitrógeno.....	22
8 Equipo de determinación de azufre orgánico total.....	23
9 Cápsula de taza pequeña de aluminio marca LECO usada para el análisis de azufre.....	23
10 Cromatograma de estándar de aminoácidos utilizado para la cuantificación de las muestras de raíz y pecíolo de vid cv. Superior.....	28
11 Niveles de nitrógeno de raíces de plantas de vid de  alta,  media y  baja productividad analizados las etapas de letargo y poscosecha.....	32
12 Niveles de nitrógeno de tallos/pecíolos de plantas de vid de  alta,  media y  baja productividad analizados en los meses de Diciembre de 2008 y Julio de 2009.....	33
13 Niveles de nitrógeno (mg/g ps) en raíces y tallo/pecíolo de plantas de vid del cultivar Sugraone ('Superior') en letargo, crecimiento vegetativo, precosecha y poscosecha después de la aplicación de los tratamientos azufrados.....	36
14 Niveles de nitrógeno (mg/g ps) en raíces y tallo/pecíolos de vid de cv. 'Superior'.....	37
15 Niveles de azufre (mg/g ) raíz de plantas de vid del cultivar Sugraone ('Superior') en diferentes estados fenológicos (expresado en meses) después de la aplicación de los tratamientos azufrados.....	40
16 Niveles de azufre total (mg/g ps) en raíces y tallo/pecíolos de vid de cv. 'Superior' .....	41

17	Niveles de arginina (mg/g ps) en raíz de plantas de vid del cultivar Sugraone ('Superior') en diferentes estados fenológicos (expresado en meses) después de la aplicación de los tratamientos azufrados.....	45
18	Niveles de cisteína (mg/g ps) en raíz de plantas de vid del cultivar Sugraone ('Superior') en letargo, crecimiento vegetativo, precosecha y poscosecha después de la aplicación de los tratamientos azufrados.....	48
19	Niveles de asparagina (mg/g ps) en raíz de plantas de vid del cultivar Sugraone ('Superior') en letargo, crecimiento vegetativo, precosecha y poscosecha después de la aplicación de los tratamientos azufrados.....	51
20	Niveles de metionina (mg/g ps) en raíz de plantas de vid del cultivar Sugraone ('Superior') en diferentes estados fenológicos (expresado en meses) después de la aplicación de los tratamientos azufrados.....	55
21	Productividad mostrada por plantas de vid del cultivar Sugraone ('Superior') con diferentes tratamientos azufrados. ....	57

## RESUMEN

La uva de mesa (*Vitis vinifera* L) es uno de los frutos de mayor exportación en México y tiene gran importancia en el noroeste del país desde el punto de vista económico. Sin embargo, viñedos sin deficiencias nutricionales aparentes presentan problemas de productividad, atribuyéndose en algunos casos al excesivo uso de fertilizantes nitrogenados y a deficiencias recurrentes de azufre en los tejidos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de reservas nitrogenadas, el contenido de azufre y la relación que guardan con la productividad de viñedos de uva de mesa, así como determinar el efecto de la aplicación de azufre en la acumulación de aminoácidos de reserva en tejidos de raíz y tallo de vid. Se determinó el contenido de nitrógeno en plantas de vid de baja, media y alta productividad del cv. 'Superior' y se evaluó el efecto del uso de extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio en cuatro estados vegetativos de la planta, en los niveles de nitrógeno, azufre, arginina, cisteína, asparagina y metionina, en plantas de baja productividad. En las plantas con índices de alta, media y baja productividad se observó que el contenido de nitrógeno total se encuentra por arriba de los niveles críticos descritos para otras regiones productoras. Por otra parte, se observó que el tratamiento con sulfato de amonio incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de nitrógeno total, arginina, asparagina, cisteína y metionina, en las plantas de vid de baja productividad. Así mismo, la producción de vid se incrementó por efecto de los tratamientos de sulfato de amonio y extracto acuoso de ajo. Este incremento posiblemente se debe a la estrecha relación entre las rutas metabólicas de asimilación de nitrógeno y azufre en plantas. La aplicación de compuestos azufrados a plantas de vid favorece la síntesis de aminoácidos requeridos en las funciones de crecimiento, desarrollo y productividad de las vides, lo cual se refleja en el contenido de aminoácidos y

en los niveles de reservas nitrogenadas y azufradas; que propicia una mayor producción de vid de mesa. Por lo tanto el sulfato de amonio puede ser considerada una opción para incrementar los niveles de azufre en los viñedos.

## **INTRODUCCIÓN**

La vid (*Vitis vinífera L.*) es uno de los frutos más importantes y más ampliamente distribuidos en todo el mundo (Vivier y col., 2002). Sin embargo su producción ha sido limitada en los últimos años principalmente por el exceso o escasez de nutrientes en las reservas de la planta y/o en el suelo en donde se encuentran. Lo que causa una disminución en la producción que se traduce en pérdidas económicas millonarias para los productores sonorenses. Por ello se ha propuesto la búsqueda de nuevos productos que permitan la nutrición adecuada de las plantas y por ende, la recuperación de los cultivares envueltos en este problema y con ello aumentar la productividad de los viñedos.

El sistema de producción agrícola en el mundo se ha caracterizado por un excesivo laboreo y una escasa utilización de fertilizantes, desequilibrando las proporciones de elementos nutricionales de los suelos. De esta manera, el suministro de elementos indispensables en el suelo, como el azufre, depende en gran medida de la mineralización de la tierra (Endlicher, 1988; Silva y col., 1998). Sin embargo, con el uso sistemático de fertilizantes se han logrado largos periodos de productividad en suelos degradados (Cordone y col., 2000).

Entre los problemas que enfrenta la viticultura en el noroeste del país, se encuentra la baja producción, debido a la falta de temporadas con temperaturas bajas (Vargas-Arispuro y col., 2005). Así mismo en la actualidad se ha visto que los cultivos a nivel mundial muestran carencias de minerales importantes como el azufre (Alfaro y col., 2006). La importancia del azufre como nutrimento para las plantas se ha hecho inminente debido a sus efectos en el crecimiento, productividad y calidad de todos los vegetales (Abrol y col., 2003). La vid tiene un requerimiento alto de azufre, una producción de 20 toneladas absorberá aproximadamente 30 kg de azufre. Es por eso que la carencia de este

compuesto se ve reflejada en una baja producción de racimos (Martínez-Téllez y col., 2010).

Los productores de los alrededores de Hermosillo, Sonora han categorizado sus viñedos en tres categorías según su productividad, teniendo plantaciones de alta, media y baja producción, con cifras que oscilan de 2300 a 2500, 1700 a 1900 y < a 1500 cajas  $h^{-1}$ , respectivamente (Martínez-Téllez y col., 2010). Estas diferencias en producción, han sido atribuidas a deficiencias nutricionales, específicamente a la falta de reservas nitrogenadas en la planta o también a la aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados en los programas de fertilización.

El desgrane de racimos, es un desorden fisiológico que se presenta con frecuencia en los parrales de la región, y esto se atribuye, entre varios factores, al exceso de nitrógeno en las reservas nutricionales que son metabolizadas por la planta y son almacenadas en formas de nitratos o amonio en las células (Kohli y col., 2012). En estudios publicados en Hungría por Balasubrahmanyam (1978) estableció los rangos de nitrógeno, para esa región, en cultivares de plantas de vid variedad 'Superior, los cuales marcan niveles de 6.5 mg/g de peso seco y 10 mg/g en peso seco, como niveles mínimos críticos, para tallo y raíz, respectivamente. En Sonora no existen registros publicados de los niveles de reservas nitrogenadas de plantas de vid, y a pesar de que Sonora tiene una baja producción en vid, los rangos de reservas nitrogenadas mostrados por la plantas superan los rangos mínimos reportados en Hungría, lo que hace necesario el estudio de los niveles de las reservas nitrogenadas en viñedos de alta, media y baja producción para determinar la relación entre estos dos parámetros, que impactan en la producción de uva de mesa en la región.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Vid en Sonora

La viticultura es uno de las actividades más importantes en el noroeste del país. A nivel mundial, México se encuentra en el quinto lugar de los países exportadores de uva de mesa, con remesas de hasta 129 millones de dólares anuales, de los cuales Sonora es responsable de aportar el 67 % por este concepto (Mexico, 2009). En el 2008 la producción de Sonora superó las 201 mil toneladas en una superficie de 18,598 hectáreas, obteniendo un rendimiento promedio mayor a 10 Ton Ha<sup>-1</sup>. Esta cifra contribuye al total de la producción nacional de uva de mesa (SIAP, 2010). Pese a esto, el cultivo de uva de mesa en el estado se enfrenta a problemas climatológicos como el periodo de frío insuficiente, repercutiendo en una menor brotación y por lo tanto una menor producción (Vargas-Arispuro y col., 2005). Así mismo, la baja productividad de algunos viñedos y el desgrane de racimos por exceso de fertilización nitrogenada, han generado pérdidas millonarias sobre el monto de su producción.

### Nitrógeno

En la base de materia seca de las plantas superiores, los principales elementos que las componen son el carbón, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno, potasio, azufre y fosforo; de entre estos nutrientes el nitrógeno es el que tiene mayor importancia para las plantas (Azcón-Bieto y col., 2000).

El nitrógeno (N), es un macronutriente esencial para que las plantas lleven a cabo sus procesos bioquímicos (Vidal y col., 2010). Forma parte de la composición de proteínas, ácidos nucleídos y otros componentes celulares,

siendo así elemento esencial para el crecimiento de todos los organismos (Mayz-Figueroa, 2004).

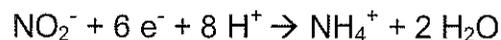
Este elemento es absorbido por las raíces de las plantas en una variedad de fuentes de N, predominantemente en forma de  $\text{NO}_3^-$ , sin embargo, también existen otras fuentes como el  $\text{NH}_4^+$ , la urea, los aminoácidos y los péptidos (Gojon y col., 2009). Para que el N inorgánico pueda ser utilizado por las plantas, primero debe ser absorbido en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), reducido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), y en un segundo paso a ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) que posteriormente será incorporado a los aminoácidos (Vance y col., 2002).

### **Asimilación de Nitrógeno en Vegetales**

El primer paso en la asimilación del N consiste en la entrada del compuesto nitrogenado al interior de la célula (Vega y col., 1990). Para su absorción, es necesario un complejo proteico llamado NarK, el cual es capaz de transportar y translocar los iones de  $\text{NO}_3^-$  al interior del citoplasma. Sin embargo, el ion  $\text{NO}_3^-$  tiene que ser transformado a su forma orgánica mediante su reducción a  $\text{NH}_4^+$  (DeMoss y col., 1991).

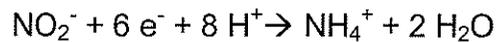
### **Reducción de nitrato a amonio**

El  $\text{NO}_3^-$ -absorbido debe ser reducido a  $\text{NH}_4^+$  en las células para ser asimilado. La enzima nitrato reductasa (NR) reduce  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  y la enzima nitrito reductasa (NiR) reduce el  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$  (Kredich, 1993). La secuencia de reacciones es:



### **Fórmula 1. Reducción del nitrato (Azcón-Bieto y col., 2000)**

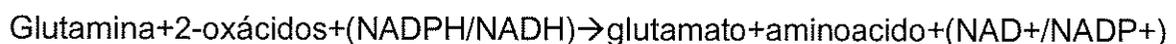
La cantidad de nitrito reductasa presente en la planta es muy superior a la de la nitrato reductasa, esto se debe a la toxicidad del nitrito. Si este se acumulara en la planta, tendría consecuencias fatales en la misma.



**Fórmula 2. Reducción del nitrito (Azcón-Bieto y col., 2000)**

Asimilación del Amonio

El amonio ( $\text{NH}_4^-$ ) formado en la reacción de reducción es fácilmente asimilado por el complejo enzimático glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT) (Beevers y col., 1969) o bien por la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Pire y col., 2001). Sin embargo, Tempest y col. (1970), en sus trabajos con la bacteria *Klebsiella aerogenes*, cultivada en condiciones limitantes de  $\text{NH}_4^+$ , ponen en duda el papel de la GDH; describen que cuando existe ausencia de amonio, el nitrógeno sigue una ruta paralela en la cual se necesita un mayor gasto de energía, siendo esta ruta la siguiente:



Diversas investigaciones posteriores han corroborado esta teoría y ahora parece poco probable que la GDH juegue un papel importante en la asimilación del nitrógeno en bacterias o plantas superiores. La excepción sería en circunstancias relativamente inusuales de altas concentraciones externas de  $\text{NH}_4^+$  (Sawada y col., 1978) en las cuales la GS-GOGAT es la enzima más activa en plantas superiores (Reitzer y col., 1996).

## **Incorporación del amonio**

Las células de los vegetales incorporan rápidamente al  $\text{NH}_4^+$  dentro de esqueletos carbonatados con el fin de evitar la toxicidad del mismo (Vance y col., 2006). En leguminosas, el  $\text{NH}_4^+$  puede ser directamente tomado por la fijación del nitrógeno atmosférico en los nódulos de las raíces (Burris, 1966; Brill, 1980). Mientras que en otras plantas, el  $\text{NH}_4^+$  se genera por reacciones catalizadas por la nitrato reductasa (Nr) y la nitrito reductasa (Nir) (Crawford y col., 1993).

En la mayoría de las especies tropicales y subtropicales, el  $\text{NO}_3^-$  absorbido por las raíces es transportado hasta las hojas, donde se reduce a amoníaco en los plastidios; posteriormente, es incorporado por las enzimas GS y GOGAT a moléculas orgánicas (Andrews, 2006). Diferentes trabajos han demostrado que las enzimas GS2 y ferredoxina-GOGAT (Fd-GOGAT) participan en la primera etapa de incorporación del nitrógeno en glutamina (Gln) y glutamato (Glu) en hojas (Mifflin y col., 1980). Por otra parte las enzimas GS1 y NADH-GOGAT forman parte de la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  en la raíz (Mifflin y col., 1980).

## Azufre

El azufre es uno de los elementos más abundantes en la tierra y es un elemento esencial para los seres vivos. Sin embargo podría decirse que este era un elemento olvidado, a pesar de ser requerido por las plantas en cantidades parecidas a las del fósforo (Tisdale y col., 1966). En la actualidad se le considera un macroelemento debido a la importancia que ha tomado en los cultivos, ya que en los últimos años, al igual que el nitrógeno, es usado para determinar la cantidad y calidad de la biomasa de un cultivo (Rendig y col., 1976).

El sistema agrícola en todo el mundo se enfrenta a cambios severos, esto es porque en los países con mayor población existe una necesidad por incrementar la productividad de sus cultivos, mientras que en los países industrializados existe el interés de tener alimentos de calidad. La nutrición vegetal es esencial para el mantenimiento, productividad y buena calidad de los cultivos. Junto con el nitrógeno, el azufre juega un rol vital para la regulación del crecimiento y desarrollo de los mismos (Beffa, 1993). Giovanelli y col. (1980) mencionan que el 90% del azufre contenido en las plantas se encuentra en los aminoácidos cisteína, cistina y metionina.

El azufre fue considerado mucho tiempo como una sustancia amarillosa y venosa, rápidamente asociado con la lluvia acida hasta la década de los 80's (Schnug, 1998). Este elemento no era tomado en cuenta, debido a que la atmosfera tenía la capacidad para proveer el azufre necesario a los cultivos. Con el creciente uso de combustibles fósiles, por parte de las industrias y de los suburbios urbanos, las emisiones de azufre alcanzaron valores máximos de hasta 40-50 kg/ha (Schnug y col., 1993). Por lo tanto, rápidamente los sistemas políticos de todo el mundo empezaron a crear leyes en pro de la ecología y poder limpiar y desulfurizar el medio ambiente (Schnug, 1998), así con esto también hubo cambios en las prácticas de fertilización, las cuales consistieron en crear fertilizantes libres de azufre (Haneklaus y col., 2003), posteriormente empezó el rápido decremento en los niveles de azufre en los cultivos de todo el mundo, los cuales se redujeron de 40 Kg/ha a 14 kg/ha en solamente una década y media, lo cual significó el desorden nutricional más extendido en el planeta (Haneklaus y col., 2003). A pesar de contar con esta información todavía se presentan desordenes en las plantas, los cuales no se han catalogado como consecuencia de la falta de azufre. además han sido los países más desarrollados los que han logrado reconocer el problema y han

buscado la manera de darle solución fertilizando con azufre, muchos países en vías de desarrollo todavía no manejan al azufre como un elemento que hay que suplementar en los programas de fertilización (García, 2005).

Debido a lo anterior, la deficiencia de azufre ha tenido severas consecuencias en cosechas de todos los vegetales, afectando la calidad, y cantidad de todo tipo de frutos y hortalizas (Schnug y col., 1982), así también la resistencia natural de los cultivos sobre algunas enfermedades y plagas, comenzó a disminuir (Hammerschmidt y col., 1999).

Las plantas superiores dependen del azufre inorgánico, en forma de sulfato, para satisfacer sus requerimientos nutricionales de este elemento (Marschner, 2012). Su metabolismo en las plantas, inicia con la incorporación del macronutriente del ambiente, la asimilación de compuestos inorgánicos a orgánicos, hasta su canalización hacia la síntesis de aminoácidos metionina y cisteína, así como también forma parte de todas las proteínas. La actividad catalítica de alrededor del 40% de las enzimas depende de la presencia de grupos sulfidrilos (Hell, 1997).

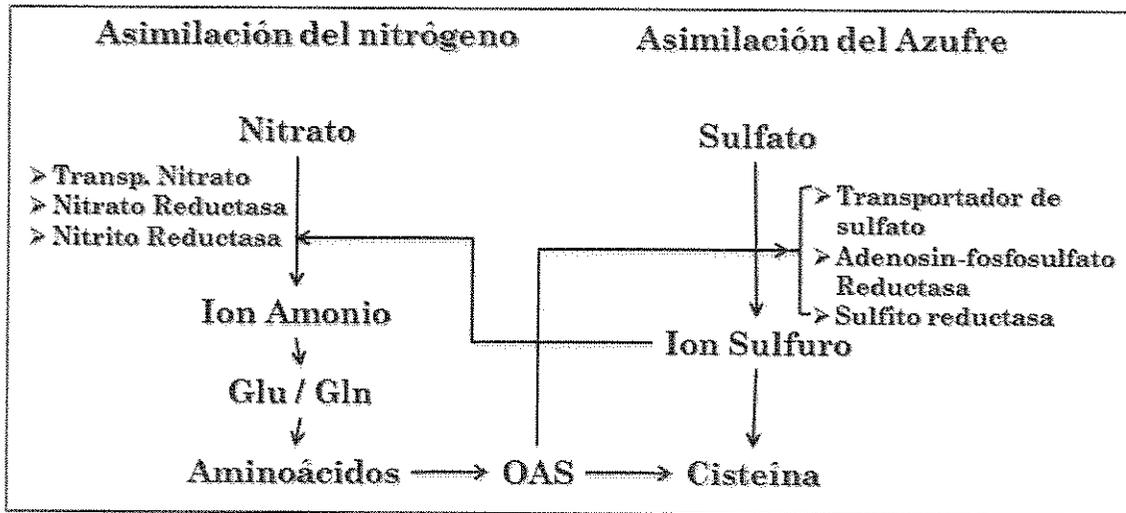
El azufre también es precursor de varias biomoléculas necesarias para la vida, entre ellas están, el glutatión, co-factores como los grupos hierro-azufre, hemo, sirohemo, vitaminas esenciales como biotina y tiamina y sulfurésteres, como la vitamina A (Hell, 1997; Droux, 2004). La estructura terciaria y cuaternaria de muchas proteínas es resultado de la presencia de puentes disulfuro (-S-S-) formados por la oxidación de grupos SH de la cisteína, junto con la metionina, factor clave en determinar el valor nutricional de las plantas (Huxtable y col., 1986).

## **Interacción de la ruta metabólica del azufre y nitrógeno**

La asimilación de azufre en las plantas se resume en cuatro pasos: absorción del sulfato, activación del sulfato, reducción del sulfato y síntesis de cisteína (Saito, 2000). Este último paso, constituye la única forma de entrada de sulfato reducido al metabolismo de las plantas.

El mecanismo encargado de la incorporación del N al metabolismo vegetal incluye un complejo enzimático, formado en un 50 % del contenido de nitrógeno y 25 % en contenido de azufre (Oaks y col., 1985). Entre estas enzimas está la enzima nitrato reductasa, en la que el azufre es uno de los componentes principales (Azcón-Bieto y col., 2000).

Se ha observado que la O-acetilserina (OAS) es un intermediario común entre las vías metabólicas del azufre y nitrógeno, siendo el único precursor directo de la cisteína. Éste se forma a partir de serina por la acción de la serina acetiltransferasa, y su reacción con el sulfuro es catalizada por la O-acetilserina-(tiol)-liasa. La disposición de la OAS exógena en diversas plantas superiores, ha demostrado tener un efecto limitante en la síntesis de cisteína (Brunold, 1993), y puede causar la represión de la vía de reducción de sulfato (Giovanelli, 1990).



**Figura 1.** Interacción primaria entre las rutas metabólicas de la asimilación del nitrato y sulfato (Azcón-Bieto y col., 2000)

La actividad de la nitrato reductasa y la acumulación de aminoácidos se ve fácilmente disminuida por la deficiencia de S, debido a la interacción que existe entre las rutas metabólicas del azufre y nitrógeno (Prosser y col., 2001). Se ha demostrado la regulación tanto de la transcripción de los genes de los transportadores de sulfato como de sus actividades de transporte (Hawkesford y col., 1995), donde se demostró que el transporte y asimilación de nitrógeno y azufre es similar en bacterias, hongos y plantas (Kredich, 1993; Marzluf, 1997).

La regla principal para el transporte del azufre por la membrana plasmática de la raíz es la tasa de transcripción de los genes que codifican las proteínas necesarias para el transporte de los nutrientes. La represión rápida y expresión de la transcripción se han observado cuando el suministro de  $\text{SO}_4^{2-}$  cambia de ser suficientes a deficientes y viceversa (Smith y col., 1995; Takahashi y col., 1997).

En las plantas, el azufre está implicado en numerosas actividades metabólicas, especialmente en la síntesis de aminoácidos y proteínas (Schnug y col., 1995). Las plantas asimilan sulfato inorgánico para formar cisteína, la cual es subsecuentemente convertida en metionina (Nikiforova y col., 2003), que está directamente regulada por el contenido de nitrógeno (Koprivova y col., 2000). Las plantas deficientes de azufre contienen mayores cantidades de nitrógeno no proteico debido a que la síntesis de proteínas es inhibida en ausencia del mismo (Rendig y col., 1976).

Algunos autores como Martínez (2001), han observado que existe una interacción positiva entre nitrógeno y azufre en trigo; ya que existe una mayor respuesta por parte del metabolismo encargado de asimilar el nitrógeno cuando la presencia de azufre es mayor. Por otra parte, la respuesta del metabolismo de asimilación del azufre en plantas de trigo fue mayor en presencia de altas concentraciones de nitrógeno y muy leve en bajas o nulas concentraciones de nitrógeno.

Salvagiotti y col. (2008), determinaron que los efectos del azufre presentan mayor relevancia, tanto en la producción de biomasa como en el rendimiento de cultivos de trigo. A medida que se incrementa la disponibilidad de nitrógeno, se manifiesta la interacción positiva entre estos dos nutrientes. Dichos resultados les permitieron concluir que cuando se tiene un decremento en la disponibilidad de nitrógeno, existirá una limitante en la expresión de las enzimas que participan en la asimilación del azufre. Sin embargo, mencionan que la respuesta a la fertilización con nitrógeno y azufre puede ser diferente entre distintos genotipos de una misma especie vegetal (Martínez y col., 1998). Ferraris y col. (2004), Observaron que la soya presenta un rendimiento de hasta un 90% cuando se usan fertilizantes azufrados de  $11 \text{ Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de azufre neto. Sin

embargo, no lograron explicar satisfactoriamente la respuesta del cultivo a la fertilización azufrada.

La información experimental existente sobre la soya indica que al aplicar azufre en edades tempranas de las plantas se producen más nodulaciones, y por ende, se obtiene un mejor rendimiento de los cultivos (Martínez y col., 1998). También Tysko y col. (2006) mencionan que al suministrar azufre al inicio del crecimiento de las plántulas se mejora la nodulación.

Kruse y col.(2007) demostraron el incremento del aprovechamiento del nitrógeno en tabaco con la aplicación de tratamientos con compuestos azufrados, donde se obtuvieron resultados positivos en plantas expuestas al tratamiento. Contrastando con los estudios realizados en *Arabidopsis* (Koprivova y col., 2000), donde demostraron que una deficiencia de azufre en la planta conlleva a un lento aprovechamiento del nitrógeno aplicado como fertilizante.

Lam y col. (1996) lograron proveer una información valiosa para comprender y expandir información acerca de la asimilación del nitrógeno y la necesidad de una fuente de azufre para mantener el adecuado equilibrio en la concentración de aminoácidos en las plantas superiores. En trabajos realizados con *Arabidopsis* muestra claramente que la ausencia de azufre durante el crecimiento vegetal provoca un desequilibrio en la síntesis tanto de aminoácidos como de moléculas necesarias para el crecimiento vegetativo. Fernandes (2009) logró demostrar, *in vitro*, que el azufre afecta de manera positiva el rendimiento en la obtención de biomasa en vid, así mismo comprobó que la cantidad de yemas producidas en un solo nodo son mayores cuando la planta es proveída de una fuente de azufre.

## Biosíntesis de aminoácidos en la Vid

A pesar de que existen alrededor de 300 aminoácidos, las plantas y bacterias, solamente pueden sintetizar 20 aminoácidos codificados por el ADN, los cuales son necesarios para la formación de proteínas en todos los organismos. Sin embargo, estos se sintetizan a partir de diferentes compuestos formados a lo largo del camino metabólico de la degradación del azúcar los cuales donan sus esqueletos carbonatados para una posterior amidación y así formar toda la batería de aminoácidos (Davies, 1995).

La disponibilidad de nitrógeno en el suelo frecuentemente limita el crecimiento y desarrollo vegetal. Sin embargo cuando es absorbido, este no es acumulado en las células vegetales en forma de ión amonio, sino que rápidamente es incorporado a compuestos orgánicos. Su asimilación se resume en unos pocos pasos: la absorción, reducción de nitrito, reducción de amonio y posteriormente la incorporación del nitrógeno a los aminoácidos. Los aminoácidos que contienen azufre (cisteína y metionina) son esenciales para todo reino biológico debido a su importante papel en los metabolismos primario y secundario (Ravanel y col., 1998).

Por otra parte, la deficiencia de azufre disminuye el rendimiento de los cultivos y afecta la eficiencia de absorción de nitrógeno, así también disminuye los niveles en la concentración de aminoácidos azufrados (y por lo tanto, afecta a las proteínas) (Leustek, 1996; Zhao y col., 1999). Es por esto que las plantas necesitan una adecuada provisión de azufre para optimizar el crecimiento vegetativo y, por lo tanto, aumentar el potencial reproductivo y así también la planta pueda proveer de azufre a los frutos y semillas para maximizar la fecundidad (Hawkesford y col., 2006).

## Fuentes de azufre para la agricultura

Una fuente natural de azufre orgánico es el ajo, en México es un cultivo importante, anualmente se cosechan 42,076 toneladas de ajo en el periodo de Enero-Septiembre, pero solo se obtiene de esta cosecha 32,535 toneladas, el 30% de la cosecha se pierde en el almacenamiento (SIAP, 2010), y probablemente debido a que cierta parte de la producción del ajo no es de buena calidad, no es aceptada en el mercado (Gómez, 2008), lo que lo hace un buena fuente de azufre orgánico para su uso en viñedos de la región.

### **Ajo (*Allium Sativum*, L.): Composición general**

Los principales componentes del ajo son: agua, 56-68 %, seguido por los carbohidratos (26-30%). Los componentes azufrados presentes en el ajo, son los compuestos órgano-sulfuros (11-35 mg/ g peso fresco). Otros componentes presentes son las vitaminas (ácido ascórbico 30 mg/100 g peso fresco, vitamina E 9.4 g/g) y minerales (selenio 0.014 mg/100 g) (Lawson Larry, 1993).

### **Compuestos azufrados en el ajo**

Los principales compuestos órgano-sulfuros (orgánicos de azufre) del ajo fresco son las cisteínas sulfóxidos, como la aliina, metiina e isoalina. Estas cisteínas sulfóxidos se forman del  $\gamma$ -glutamyl-cisteína durante la maduración, que es cuando aumentan los niveles de la enzima  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidasa durante el almacenamiento. Las cisteínas sulfóxidos y los  $\gamma$ -glutamyl-cisteínas, representan aproximadamente el 82% del total de los sulfuros en el ajo fresco. Cuando el ajo se corta, machaca o tritura, las cisteínas-sulfóxidos se transforman en tiosulfatos por la acción de la enzima alinasa. Convirtiéndose en aproximadamente el 1.0% de su peso seco ó 0.35% de peso fresco del ajo (Lawson Larry, 1993). Estos compuestos han sido utilizados experimentalmente

para su aplicación en vides como inductores de brotación (Kubota y col., 2000; Vargas-Arispuro y col., 2005).

### Sulfato de amonio

El sulfato de amonio es un fertilizante químico ampliamente utilizado en la agricultura. Es una de las fuentes de azufre usadas en las fórmulas de fertilización, teniendo al azufre en su forma de ión sulfato. Es un producto de pH ácido y se recomienda su uso en suelos alcalinos. Es un producto muy útil como fertilizante, esto debido que la necesidad de azufre está muy relacionada con la cantidad de Nitrógeno disponible para la planta, por lo que el sulfato de amonio hace un aporte balanceado de ambos nutrientes (Isquisa, 2007).

El sulfato de amonio contiene 21% de nitrógeno y 24% de azufre (72% de sulfatos), es la única forma de azufre inmediatamente disponible para las plantas, por ser la única forma en que las raíces pueden absorber dicho nutriente (Hawkesford y col., 2006).

El uso creciente de fertilizantes con alto contenido de nitrógeno pero carentes de azufre y el empleo de variedades e híbridos de mayores rendimientos y demanda de nutrientes son dos razones por las cuales las deficiencias de azufre son mayores que en décadas pasadas. La presencia de azufre se hace cada vez más imprescindible en un programa de fertilización balanceada, como una manera de reponer el nutriente extraído con los cultivos. El sulfato de amonio tiene la ventaja adicional de presentar la totalidad del azufre en forma de sulfato (Fersan, 2005).

## **JUSTIFICACIÓN**

Las reservas nitrogenadas en la planta han sido un indicador de productividad de la uva de mesa y la baja concentración de azufre se ha relacionado con una deficiente asimilación del nitrógeno y una consecuente baja productividad. Actualmente en viñedos sonorenses se ha detectado deficiencias de azufre en los tejidos, desconociendo los niveles adecuados de nitrógeno total / azufre total en la planta que definan una buena productividad, por lo que este trabajo se enfoca a la búsqueda de tratamientos azufrados que mejoren la productividad en uva de mesa del cultivar 'Superior', lo que ayudará a definir la estrategia de fertilización con un balance correcto entre el nitrógeno y el azufre.

## **HIPÓTESIS**

La aplicación de compuestos azufrados a plantas de vid favorece la síntesis de aminoácidos requeridos en las funciones de crecimiento, desarrollo y productividad de las vides, lo cual se refleja en los niveles de reservas nitrogenadas y azufradas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar los niveles de reservas nitrogenadas, el contenido de azufre y la relación que guardan con la productividad de viñedos de uva de mesa, así como determinar el efecto de la aplicación de azufre en la acumulación de aminoácidos de reserva en tejidos de raíz y tallo de vid.

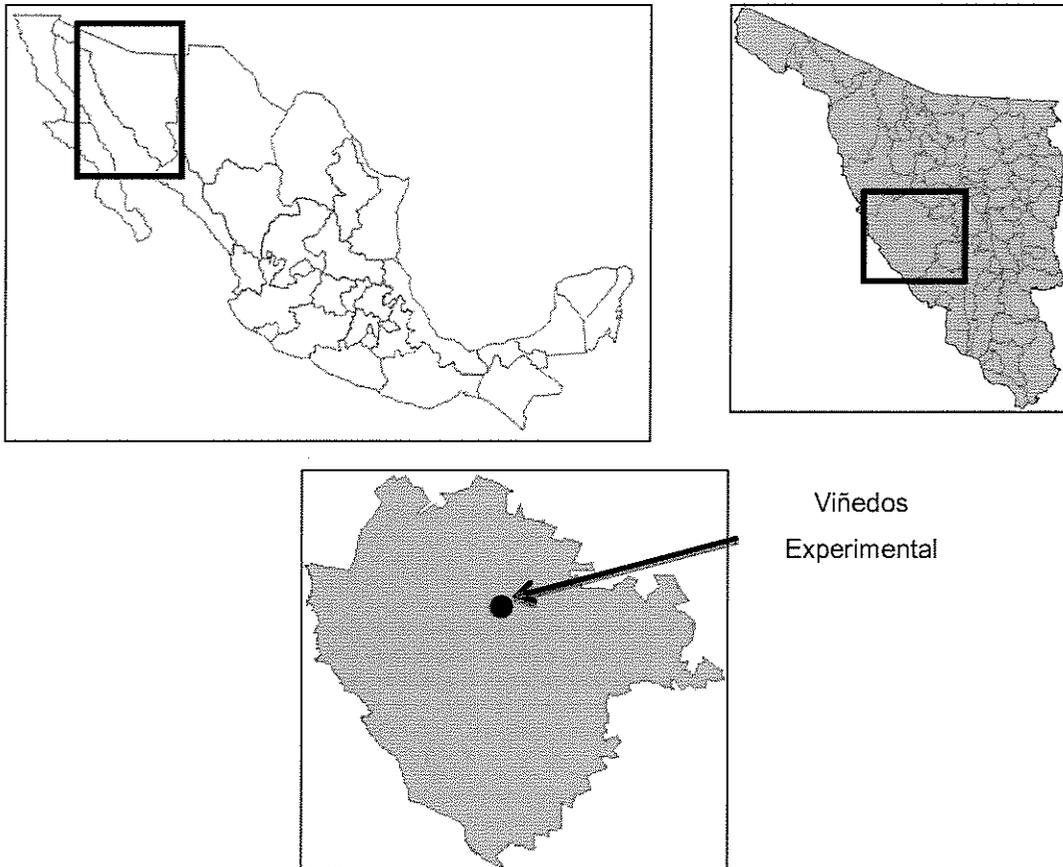
### **Objetivos particulares**

- a) Determinar los niveles de nitrógeno total y arginina en tejidos de raíz y tallo de vid cv. 'Superior' de alta, media y baja productividad.
- b) Evaluar los cambios en el contenido de arginina y cisteína en raíz y pecíolo de vid cv. 'Superior' por efecto de la aplicación de extractos de ajo y sulfato de amonio.
- c) Evaluar el efecto de la aplicación de extractos de ajo y sulfato de amonio en la producción de uva de mesa cv. 'Superior'.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de realización del trabajo**

El muestreo de raíz y pecíolo de vid y la aplicación de extractos de ajo y sulfato de amonio se efectuaron en un viñedo comercial, ubicado en Villa Pesqueira, (coordenadas 29.37157,-110.874775), al norte del municipio de Hermosillo en el estado de Sonora.



**Figura2.** Localización del viñedo experimental

## Etapa 1

Esta etapa consistió en la determinación de los niveles de reservas nitrogenadas (nitrógeno total) en raíz y tallo/pecíolo de vid cv. 'Superior' de baja (menos de 1000 cajas/ha), media (de 1000 a 1400 cajas/ha) y alta (más de 1400 cajas/ha) productividad.

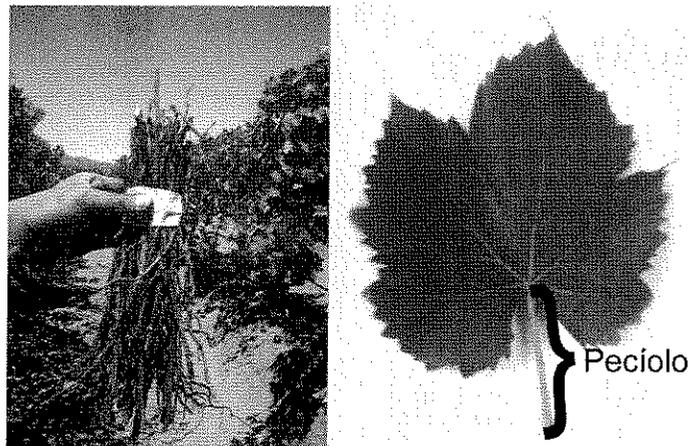
### **Material vegetal:**

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron raíces y pecíolos del cv. 'Superior' de alta, media y baja productividad.

### **Muestreo**

Se muestrearon raíces (aproximadamente 150g, con un grosor aproximado de no más de 1cm de diámetro) de una profundidad de 40 cm y pecíolos (50 piezas) de plantas de vid cv. 'Superior' (Figura 2). En el período de letargo se muestrearon tallos de 1 cm de diámetro (aproximadamente el grosor de un lápiz); cabe mencionar que se muestreó tallo en vez de pecíolo debido a que estos muestran niveles de nitrógeno similares a los del pecíolo.

Los muestreos fueron realizados en 3 etapas fisiológicas de la planta de vid, correspondientes a letargo, en el mes de diciembre, en pre cosecha, en el mes de mayo y un último muestreo en pos cosecha en el mes de julio.



**Figura3.**Muestras de raíz y pecíolo de vid

## Etapa 2

Esta segunda etapa consistió en la evaluación de los niveles de nitrógeno total, azufre total, arginina, asparagina, cisteína y metionina después de la aplicación de extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio en etapas de letargo, desarrollo, precosecha y poscosecha de plantas de vid cv. 'Superior' de baja productividad (menos de 1000 cajas por hectárea).

### **Material vegetal:**

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron raíces y pecíolos del cv. 'Superior' de baja productividad (menos de 1000 cajas por hectárea).

### **Tratamientos**

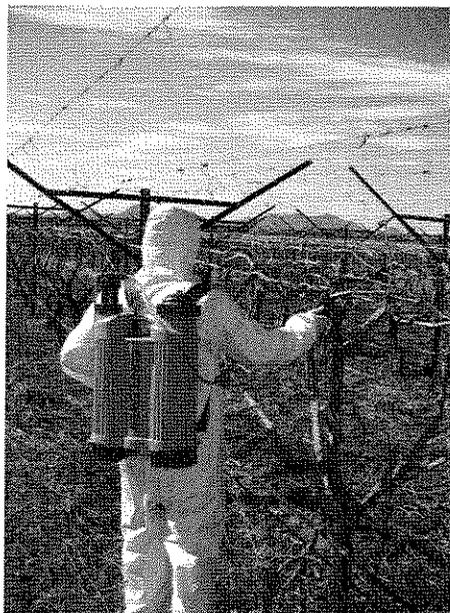
Los tratamientos consistieron en extracto comercial de ajo (*Alium Sativum*) en una dosis de 950 L/ha en solución al 10 %, Extracto comercial

hidroalcohólico de ajo (*Alium Sativum*) en dosis de 950 L/ha en solución al 10%. Estos extractos comerciales son producidos por la compañía TaAli (Tecnología y Asesorías Alimentarias, S.A. de C.V.) y fertilizante sulfato de amonio en dosis de 400 Kg/ha.

### Aplicación de tratamientos

Los extractos de ajo se aplicaron por aspersión con mochila a la parte foliar de las parras (Figura 4). El sulfato de amonio fue aplicado 130 g por planta, directamente al suelo para su disolución por el agua aplicada mediante el sistema de riego. Se aplicó agua como testigo.

La aplicación de los extractos se realizó en cuatro etapas de estado de la planta de vid, los cuales corresponden a letargo, desarrollo, pre cosecha y pos cosecha. La primera aplicación se realizó 24 h después de la aplicación de cianamida en las parras el 13 de enero, la segunda aplicación se realizó el 26 de enero, durante el desarrollo de los nuevos brotes. La tercera aplicación se realizó el 15 de abril de 2010, antes de la cosecha de la vid. Finalmente se realizó una última aplicación posterior a la cosecha del fruto, el 16 de julio de 2010.



**Figura4.**Aplicación de los extractos de ajo

### Muestreo

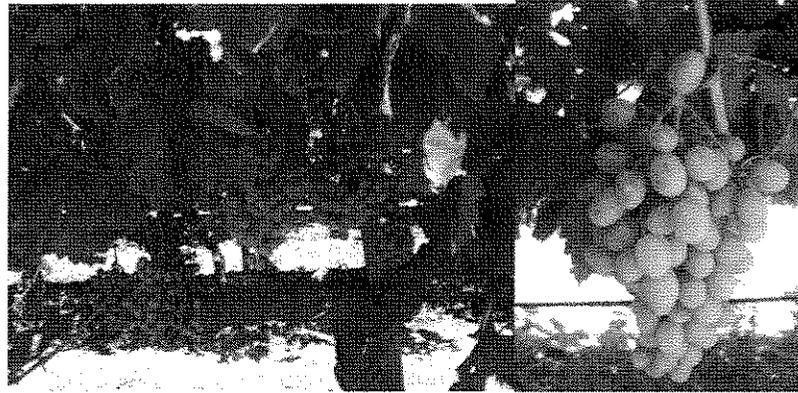
Se muestrearon raíces (aproximadamente 150g, con un grosor aproximado de 1cm de diámetro) y pecíolos (50 piezas) de plantas de baja productividad de vid cv. 'Superior'.

Los muestreos fueron quince días después de la aplicación en las cuatro etapas de estado de la planta de vid, como se señaló en el apartado anterior.

### Evaluación de la productividad

Para llevar a cabo el conteo y determinar la productividad de los tratamientos se llevaron a cabo conteos de racimos que alcanzaron la calidad

de cosecha, posteriormente se pesaron todos los racimos por plantas y se determinó el peso y cajas por hectárea de la producción total



**Figura5.**Racimos de cultivar 'Superior'

### Análisis de las muestras

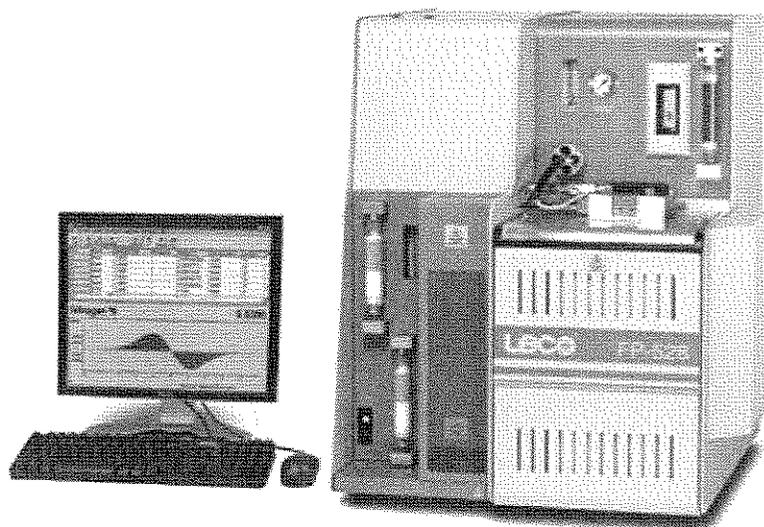
Los siguientes análisis corresponden a las muestras (raíz y peciolo) recolectadas en las etapas 1 y 2.

#### **Determinación de nitrógeno total**

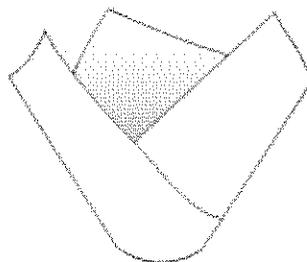
La determinación de nitrógeno se realizó basándose en el método de Dumas (Dumas, 1831) en un horno de combustión (equipo LECO modelo FP-528) (Figura6). Para la calibración del equipo se utilizó EDTA, marca LECO, como estándar, posteriormente se pesó 0.10 g de cada muestra y se encapsularon en tazas pequeñas de papel aluminio (Figura 7), marca LECO, la cual se depositó directamente en el horno de combustión y posteriormente analizado en base al método de Dumas (LECO, 2004).

Para el análisis de las muestras primeramente se liberó la alícuota dentro del horno de combustión a 950 °C. Una vez que la muestra es incinerada y los gases son oxidados por completo y el nitrógeno contenido en ellos se

transforma en dinitrógeno y posteriormente arrastrado a una celda de medición que utiliza celdas de termo conductividad para la posterior determinación del contenido total del nitrógeno en la muestra.



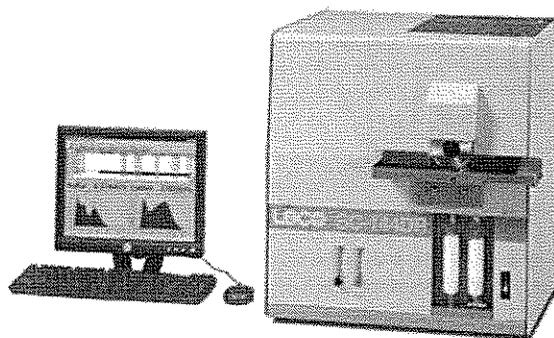
**Figura 6.** Equipo LECO Analizador de nitrógeno orgánico total



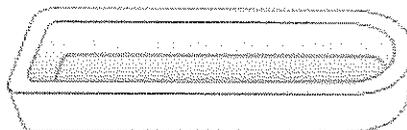
**Figura 7.** Capsula de taza pequeña de aluminio marca LECO usada para el análisis de nitrógeno

## Determinación de azufre total

La determinación de azufre total en las muestras se realizó en un horno de combustión (Marca LECO, Modelo SC-144DR) (Figura 8). Para la calibración del equipo se utiliza como estándar una solución de carbón (Marca LECO). Las capsulas usadas para el análisis de azufre fueron cápsulas de cerámica tipo bote (Figura 9). El equipo de análisis de azufre marca LECO analiza la muestra por pirólisis, la muestra se introduce en una cámara de combustión a 1300 °C, logrando que el azufre contenido en las muestras sea oxidado y convertido a dióxido de azufre que es absorbido y posteriormente detectado por detectores infrarrojos (LECO, 2004).



**Figura 8.** Equipo de determinación de azufre orgánico total



**Figura 9.** Capsula de taza pequeña de aluminio marca LECO usada para el análisis de azufre.

## **Determinación de aminoácidos**

La determinación de aminoácidos se realizó por el método o-phthalaldehyde (OPA) por cromatografía de líquidos de alta presión. Este método se basa en la técnica modificada descrita por Vázquez (1995).

### Hidrólisis de la muestra

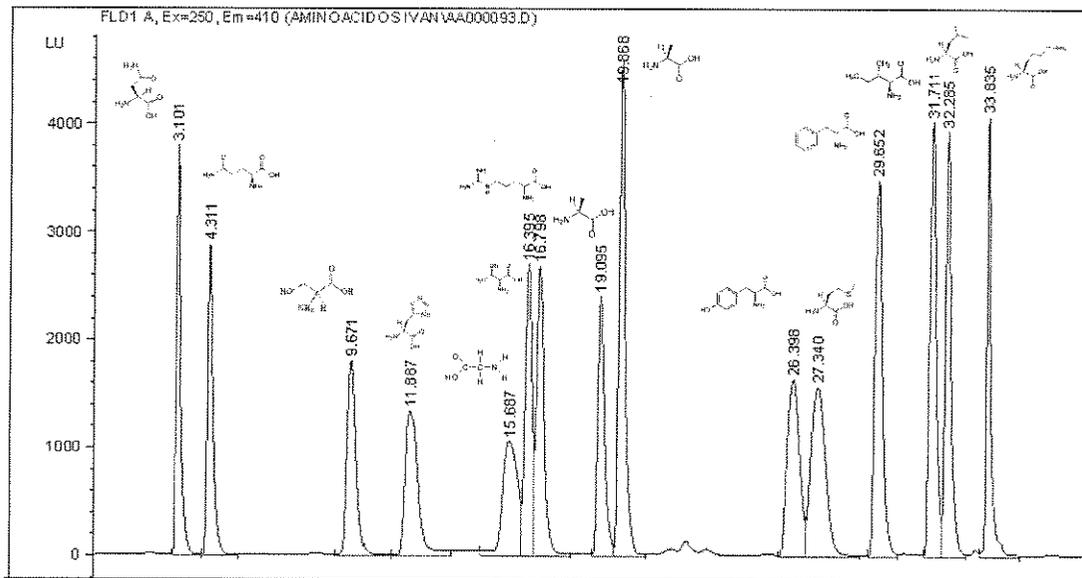
Para la hidrólisis se tomó 0.1 g de muestra y se mezcló con 2 mg de ácido de sodio tioglicólico grado V (Sigma) en tubos de ensayo con rosca 10x150. Se agregaron 2 mL de HCl 4 M y se calentaron por 4 h a 100 °C. Se secaron los tubos conteniendo el hidrolizado, en baño María a 50°C con flujo de aire y posteriormente se le hicieron dos lavados con agua-metanol (1:1).

### Análisis de aminoácidos

Se agregó a la muestra, 2mL de búfer de citrato de sodio 0.2 M pH 2.2, se agitó y posteriormente se tomó 10 µL de muestra, se colocó en un microtubo y se agregó 150 µL de búfer de citrato de sodio pH 2.2, mas 250 µL de OPA. Se dejó reaccionar por 2 minutos y se filtró con una jeringa con filtro acrodisc 4, 0.45 µm). Los aminoácidos se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) Hewlett Packard acoplado a un detector de fluorescencia (Hewlett-Packard). La separación de aminoácidos se llevó a cabo en una columna Microsorb 150 mm x 4.6 mm diámetro interno, 3 micras de partícula, liofilica f18 marca Varian, 100-3 C18 de 10 cm x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 3 µm conectada a una pre-columna Supelco C18 de 1 cm x 4.6 mm D.I. con un tamaño de 5 µm. En la separación cromatográfica se utilizó un gradiente escalonado, con un flujo de 1.3 mL/min de 2 eluyentes (A: metanol; B: acetato de sodio-metanol-tetrahidrofurano, pH 7.2). El gradiente partió de 0% del solvente B para llegar a 10% a medio minuto, se mantuvo en 10% hasta el minuto 3 y posteriormente se incrementó a 11% hasta el minuto 7, del minuto 7

al minuto 7.5 se mantuvo en 15% de B, posteriormente se incrementó a 30 % manteniéndose hasta el minuto 15.2, posteriormente se incrementó el flujo a 40% manteniéndose hasta el minuto 26.5, de minuto 26.5 al 27.5 se incrementó el porcentaje a 50% y se mantuvo hasta el min 29. Posteriormente el 100% de B se alcanzó en el minuto 35 y finalmente en el minuto 37 se regresó a las condiciones iniciales de 0% en B. El área producida por la fluorescencia de los aminoácidos se registró e integró por el programa ChemStation (Agilent Technologies Inc). Los aminoácidos se identificaron y cuantificaron de acuerdo al tiempo de retención y áreas comparadas con un estándar de aminoácidos (Figura 10). El contenido de cisteína se cuantificó por estequiometría.

La muestra se derivatizó utilizando el OPA (O-Phtaldialdehído). Para ello se reconstituyó la muestra hidrolizada con 500  $\mu\text{L}$  del búfer de acetato de sodio y se filtró con una membrana Acrodisc 4 mm con 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Se tomó 20  $\mu\text{L}$  de esta solución y se le adicionó 330  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio y 350  $\mu\text{L}$  de OPA y se filtró en una membrana PTFE de 0.45  $\mu\text{m}$  (Acrodisc® Life Sciences). Después de transcurridos 2 min se inyectó 100 $\mu\text{L}$  al HPLC.



**Figura 10.** Cromatograma de estándar de aminoácidos utilizado para la cuantificación de las muestras de raíz y pecíolo de vid cv. 'Superior'. Los números de los picos indican los tiempos de retención. El orden de elución de los aminoácidos es el siguiente: Asparagina, glutamina, serina, histidina, glicina, treonina, arginina, alanina, tirosina, metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con un análisis de varianza completamente al azar para cada tratamiento, se hizo una comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ) utilizando el paquete estadístico NCSS (2007).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Contenido de nitrógeno total en plantas de vid cv. 'Superior' de alta, media y baja productividad**

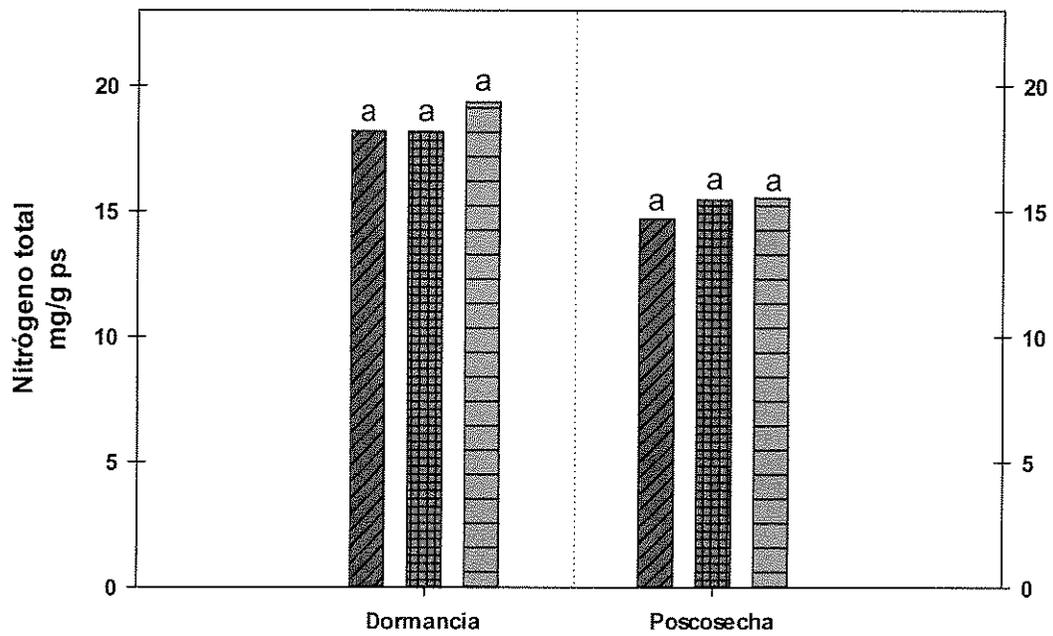
El nitrógeno tiene el papel más importante en la nutrición, desarrollo y crecimiento vegetal, ya que es requerido para la síntesis de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. El nitrógeno es el componente más aplicado a las plantas para el incremento de la producción (Keller y col., 1998), así mismo influye en la composición química y el sabor del fruto (Christensen y col., 1994), al igual que incrementa los niveles de aminoácidos azufrados (Chone y col., 2006).

Los resultados del análisis de nitrógeno total en raíces de plantas de vid de alta, media y baja productividad (Figura 11 y Figura 12) señalan que no existen diferencias significativas entre las tres clasificaciones de productividad de los parrales, observándose también que los niveles de nitrógeno se presentaron por arriba de los rangos marcados por Silva (1995) como niveles mínimos críticos de nitrógeno total para plantas de uva, con un valor de 6.5 mg/g ps en tallo/pecíolo y de 10 mg/g ps para raíces. Así mismo existen diferencias significativas entre épocas de muestreo, con 9.02 y 18.60 mg/g ps en tallo y raíz respectivamente. En el mes de diciembre cuando las parras se encontraban en letargo y 10.22 y 15.23 mg/g ps en tallo y raíz respectivamente, en el mes de junio, posterior a la cosecha.

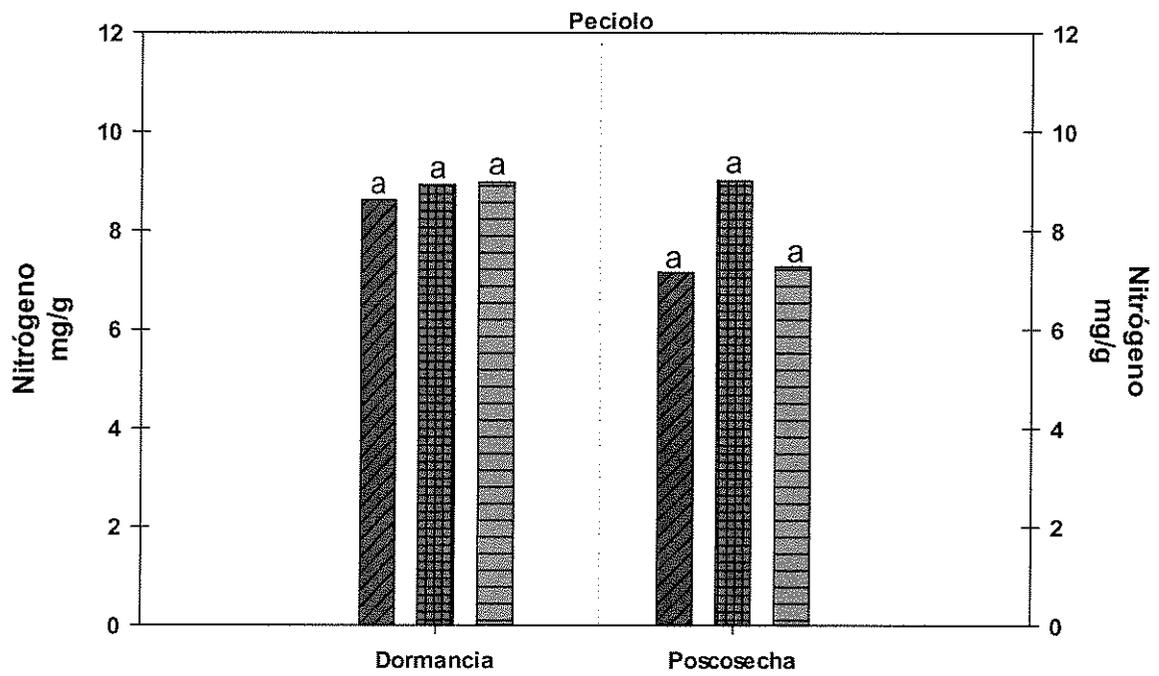
La concentración de nitrógeno cuantificada en plantas de vid de los campos de California, E.U., mostraron rangos que van desde los 3 mg/g ps hasta los 7 mg/g ps y de 4 mg/g ps a 17 mg/g ps en tallos y raíces respectivamente, lo que evidencia que las plantas de vid de la región contienen

cantidades superiores a las parras de California, al igual que otros autores, en este trabajo observamos que no existe insuficiencia en la nutrición nitrogenada de las plantas de la región. Sin embargo no existe evidencia que muestre que la diferencia en la clasificación de productividad de las plantas radique en las concentraciones de nitrógeno en el tejido, dado que los niveles de nitrógeno de las plantas analizadas se encuentran dentro de los rangos aceptables e incluso algunas plantas superaron a estos valores.

Las plantas caducifolias, en la cual se encuentra clasificada la vid, poseen la capacidad de almacenar nutrientes en temporadas invernales, entre ellos el nitrógeno, el cual usan posteriormente a finales de invierno durante la etapa de brotación. En esta etapa la planta incrementa la demanda de nitrógeno disponible en la raíz y el tronco de la misma, manteniendo la demanda de nitrógeno hasta finales del ciclo vegetativo, en el cual la planta absorbe los nutrientes de las hojas en senescencia para almacenarlo de nuevo (Tolsma y col., 1987). Lo anterior hace que las plantas de vid tengan fluctuación en los niveles de nitrógeno durante los ciclos anuales (Wermelinger, 1991). Tal como se presentó en los meses de diciembre y junio en nuestro trabajo.



**Figura 11.** Contenido de nitrógeno de raíces de plantas de vid de alta, media y baja productividad analizados en las etapas de letargo (diciembre 2008) y poscosecha (Junio 2009).



**Figura 12.** Contenido de nitrógeno de tallos/pecíolos de plantas de vid de alta, media y baja productividad analizados en las etapas de letargo (diciembre 2008) y poscosecha (Junio 2009).

Contenido de nitrógeno total (NT) en vides de cv. 'Superior' de baja  
productividad tratadas con extracto acuoso de ajo, extracto  
hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio.

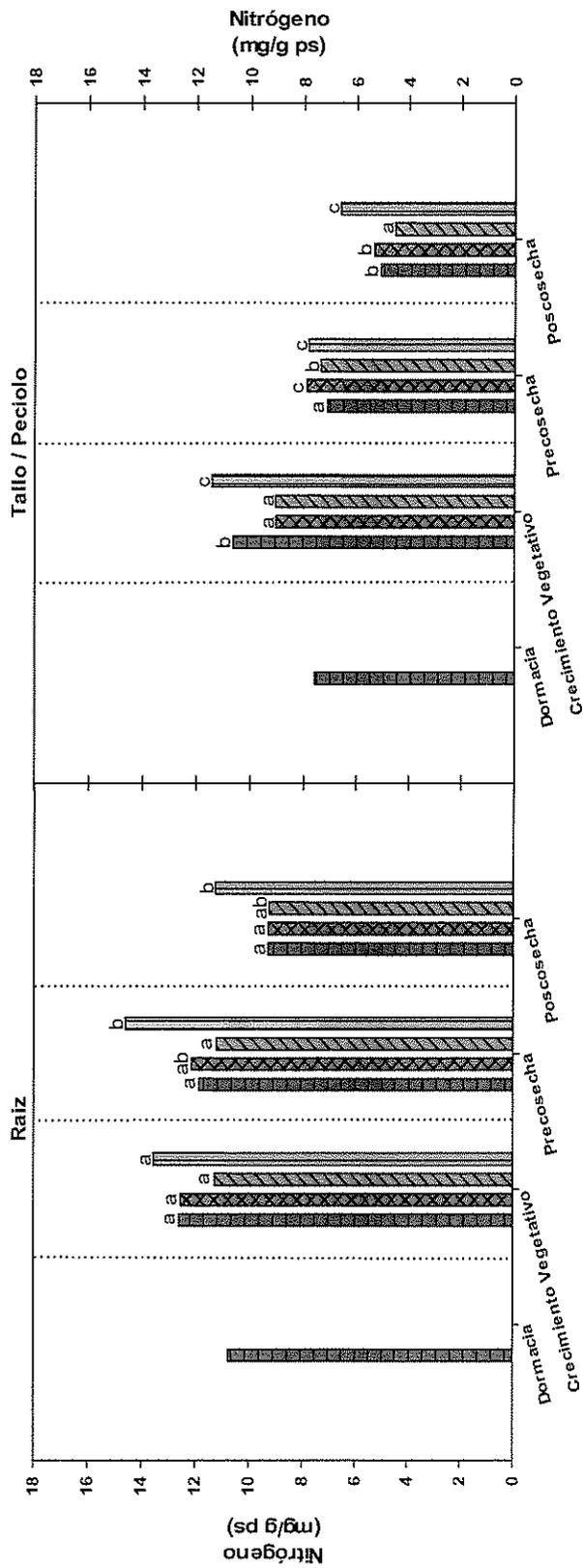
Los niveles de NT en raíces de vid del cv. 'Superior' (Figura 13), bajo un régimen de fertilización con extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio, mostraron que en la etapa de crecimiento rápido vegetativo no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, en los cuales se obtuvieron rangos de NT en raíz que van desde 9.26 a 13.56 mg/g ps.

Por otro lado, se observó que durante de las etapas de crecimiento rápido vegetativo y precosecha, hay una tendencia a incrementar significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de nitrógeno total en las plantas tratadas con sulfato de amonio con valores de 14.6 mg/g ps y 11.26 mg/g ps con respecto a 11.20 mg/g ps y 9.26 mg/g ps del tratamiento de extracto hidroalcohólico de ajo, 12.13 mg/g ps y 9.29 mg/g ps del extracto acuoso de ajo y 11.86 mg/g ps y 9.31 mg/g ps del testigo. La misma tendencia se observó en los pecíolos de las hojas tratadas con sulfato de amonio, que incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de NT en los pecíolos en precosecha y poscosecha, presentando valores de 7.83 y 6.61 mg/g ps, con respecto a los valores de 7.37 y 4.51 mg/g ps de extracto hidroalcohólico de ajo, 7.90 y 5.34 mg/g ps del extracto acuoso de ajo y 7.10 y 5.07 mg/g ps de las plantas testigo. Esto se debió posiblemente a que el azufre potencia el metabolismo del nitrógeno, así como también potencia los sistemas de alta y baja afinidad encargadas de la absorción y transporte de amonio y nitrato desde la raíz a la parte aérea de la planta (Vidmar y col., 2000; Loulakakis y col., 2009).

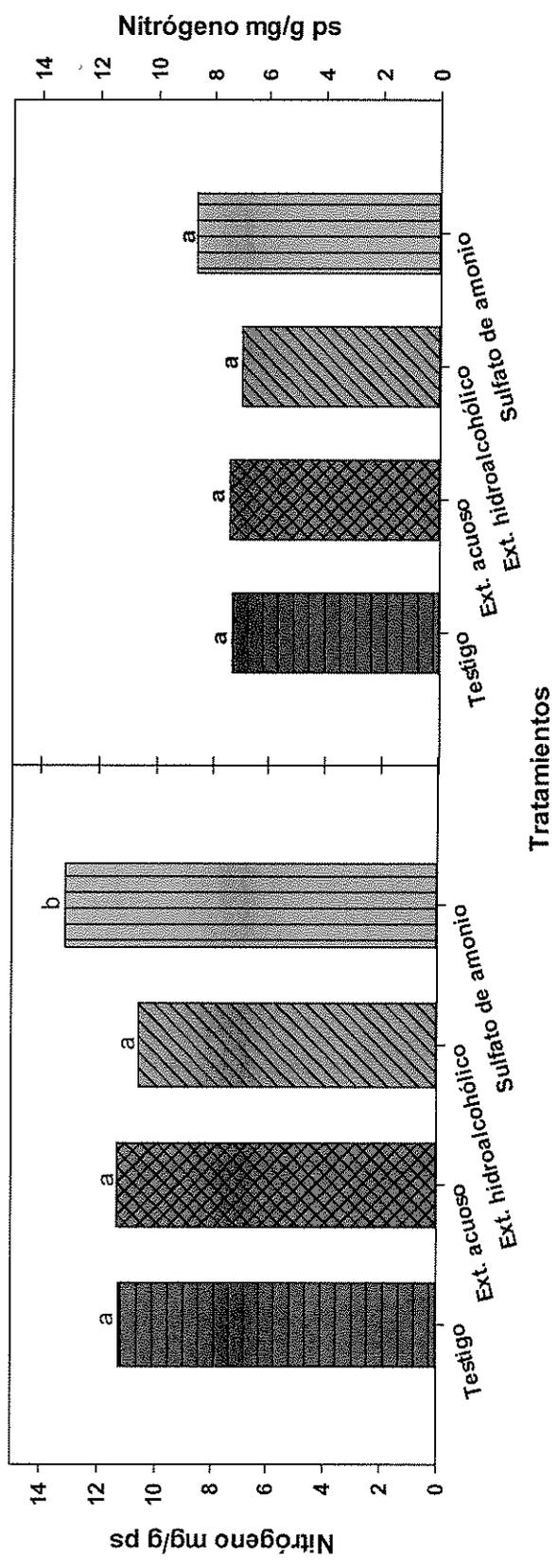
El sulfato de amonio contiene 21% de nitrógeno y 24% de azufre (72% de sulfatos), es la única forma de azufre inmediatamente disponible para las plantas, por ser la más afín a los receptores de las raíces (Azcón-Bieto y col., 2000). Por otra parte, los compuestos de los extractos de ajo contienen cisteínas-sulfóxidos que se transforman en tiosulfatos, los cuales, a pesar de tener compuestos azufrados, no se ha comprobado su afinidad para ser metabolizadas por las plantas.

En investigaciones realizadas en trigo, se demostró que el uso de azufre en los cultivos provocó un mejor aprovechamiento del nitrógeno, traducido en un incremento de biomasa en los granos (Howarth y col., 2008).

El sulfato de amonio mostró mejores resultados, tanto en raíz como en peciolo para la absorción de nitrógeno por parte de las plantas (Fig. 14). Se ha demostrado que el metabolismo del nitrógeno se incrementa al tratar a las plantas superiores con una fertilización con sulfato de amonio o aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) (Brunold y col., 1984); así mismo en plantas de maíz se han tenido los mismo resultados, sin embargo estos estudios se han llevado a cabo a nivel *in vitro* y este trabajo demuestra que las plantas de vid en condiciones comerciales también presentan incremento en la actividad del metabolismo de nitrógeno (Castellarin y col., 2009). Sin embargo en trabajos realizados en plantas de trigo por Ferraris (2004) se demostró que las plantas tienen suficiente fuente de nitrógeno, y a pesar de proveer a la planta de cantidades significativas de azufre, el metabolismo del nitrógeno permanece sin cambios.



**Figura 13.** Contenido de nitrógeno (mg/g ps) en raíces y tallo/peciolo de plantas de vid del cultivar Sugaone ('Superior') en letargo, crecimiento vegetativo, precosecha y poscosecha después de la aplicación de los tratamientos azufrados: con testigo, extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio. Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$ .



**Figura 14.** Contenido de nitrógeno (mg/g ps) en raíces y tallo/pecíolos de vid de cv. 'Superior' tratadas con extracto acucoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo, sulfato de amonio y plantas testigo. Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$ .

Contenido de azufre total (AT) en vid cv. 'Superior' de baja  
productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto  
hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio

El azufre es un componente esencial en las plantas debido a que combinado con la fertilización nitrogenada influyen de manera positiva en la cantidad y calidad de todos los cultivos, principalmente debido a que la combinación de estos dos compuestos son necesarios para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas (García, 2005). En este trabajo se realizó el análisis de AT en raíz, tallo y peciolo de plantas de vid de baja productividad en cuatro estados fenológicos diferentes correspondientes a las etapas de letargo, desarrollo, precosecha y poscosecha posterior a la aplicación de extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio.

Los niveles de AT en raíz y tallo/peciolo de plantas de vid cultivar Sugaone ('Superior') tratadas con compuestos azufrados se presentan en la Figura 16, donde se observó que no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos, mostrando también que los niveles de azufre en las plantas de vid en su estado basal se encuentran por debajo de los rangos mostrados por Sotomayor (2000) los cuales marcan niveles mínimos críticos de 2.1 a 5 mg/g ps para peciolo, sin embargo, no se cuenta con datos que nos indiquen los niveles mínimos críticos en raíz.

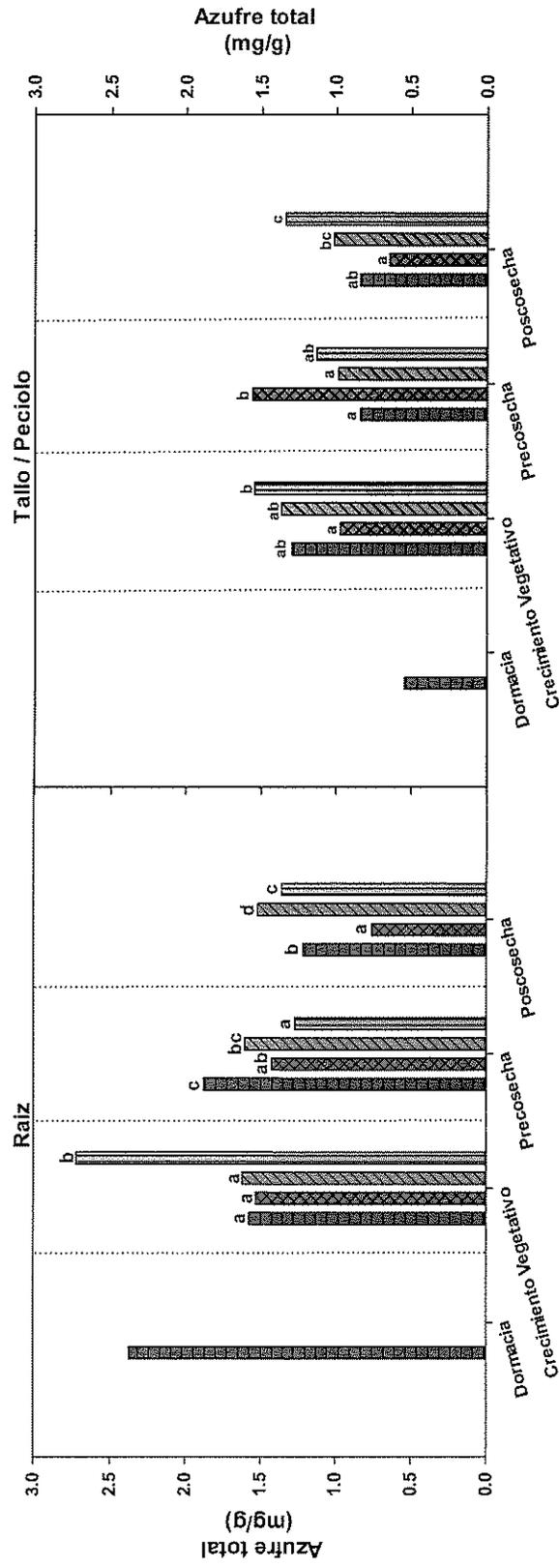
Los análisis de la etapa de letargo mostrados en la figura 15 presentaron valores de 2.37 mg/g ps y de 0.54 mg/g ps para raíz y tallo, respectivamente. Por otro lado, en la etapa de crecimiento vegetativo, se observó un incremento en los niveles de AT en las raíces y pecíolos de plantas tratadas con sulfato de amonio con valores respectivos de 2.71 y 1.54 mg/g ps en comparación a 1.61

y 1.36 mg/g ps del tratamiento de extracto hidroalcohólico de ajo, 1.53 y 0.97 mg/g ps del extracto acuoso de ajo y 1.57 y 1.29 mg/g ps del testigo para raíz y peciolo, respectivamente, sin embargo, en la etapa de poscosecha se observa un mayor incremento del contenido de AT en peciolo que en raíz los cuales mostraron valores de 1.33 y 1.35 mg/g ps, respectivamente en plantas tratadas con sulfato de amonio con respecto a 1.01 y 1.51 mg/g ps del extracto hidroalcohólico de ajo, 0.84 y 1.21 y mg/g ps del testigo y 0.64 y 0.75 mg/g ps del extracto acuoso de ajo para, respectivamente.

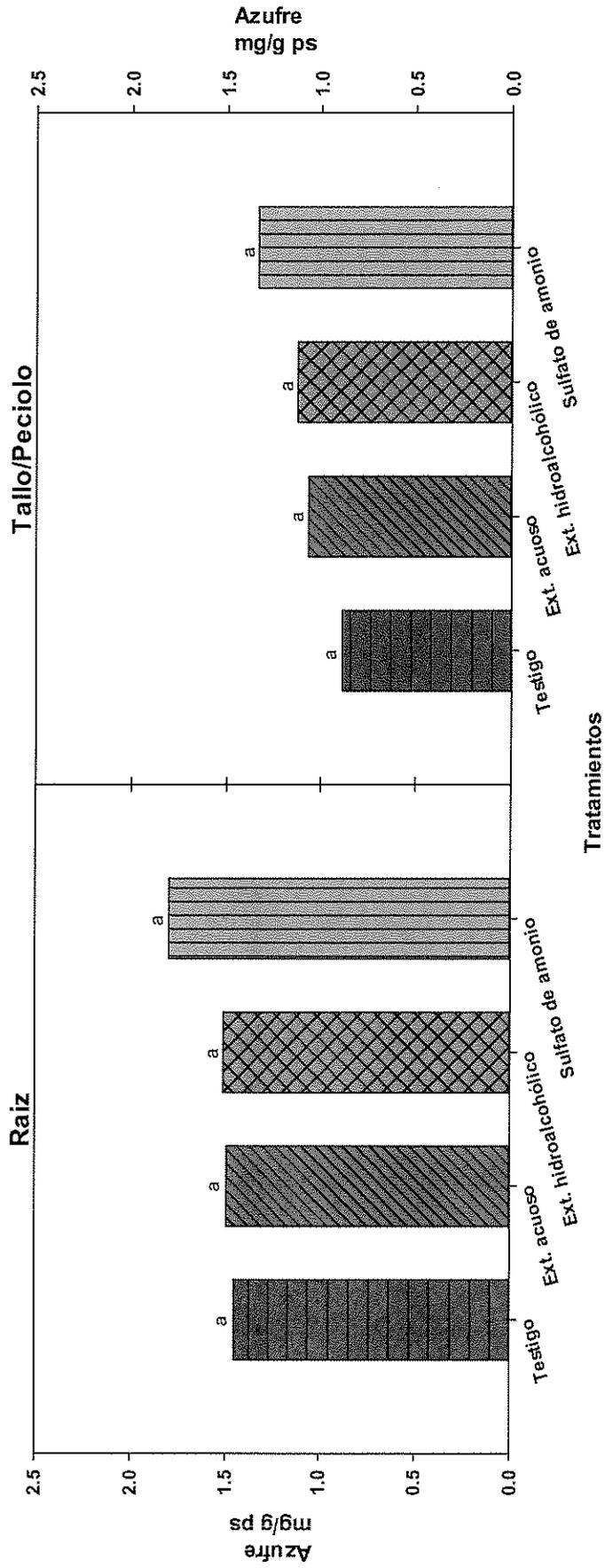
El contenido de azufre total aumentó significativamente con el sulfato de amonio debido a que este compuesto está más disponible para la planta (Huxtable y col., 1986), sin embargo, a pesar de que los extractos de ajo tienen gran cantidad de compuestos azufrados no se ha demostrado que los productos resultantes de su fermentación sean afines con los receptores de membrana. En estudios realizados con plantas a las que se le aplicaron diferentes fuentes de azufre, muestran que es mayor la afinidad de los receptores de las raíces y las hojas a los compuestos sulfato de amonio (Vidmar y col., 2000) y ácido sulfhídrico (Herschbach y col., 2000).

Es claro que aunque los tejidos no fotosintéticos asimilan sulfato estos lo almacenan, sin embargo se sabe ahora que los cloroplastos de las células fotosintéticas constituyen el sitio más importante para la asimilación reductiva del sulfato en cisteína, el cual es el intermediario principal para la síntesis de otros metabolitos que contienen azufre (Abrol y col., 2003). En relación a ello fue demostrado (Anderson y col., 1979) que los cloroplastos aislados de frijol catalizan la reducción de sulfito dependiente de la luz y que, en presencia de O-acetilserina (OAS), el sulfuro producido en esta reacción es rápidamente asimilado en las hojas, lo que concuerda con los análisis en el peciolo (tejido más cercano a la hoja), en donde se ve un incremento mayor de AT en las

plantas tratadas con sulfato de amonio que en las raíces tratadas. Siendo el sulfato de amonio el tratamiento con mejores resultados.



**Figura 15.** Contenido de azufre (mg/g) raíz de plantas de vid del cultivar Sagraone ('Superior') en diferentes estados fenológicos (expresado en meses) después de la aplicación de los tratamientos azufrados: con testigo, extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio. Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$ .



**Figura 16.** Contenido de azufre total (mg/g ps) de la temporada 2010 en raíces y tallo/pecíolos de vid de cv. Superior tratado con: ■■ testigo, ■■ extracto acuoso de ajo, ■■ extracto hidroalcohólico de ajo y ■■ sulfato de amonio. Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$ .

Contenido de arginina total (ArgT) en vid cv. 'Superior' de baja  
productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto  
hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio

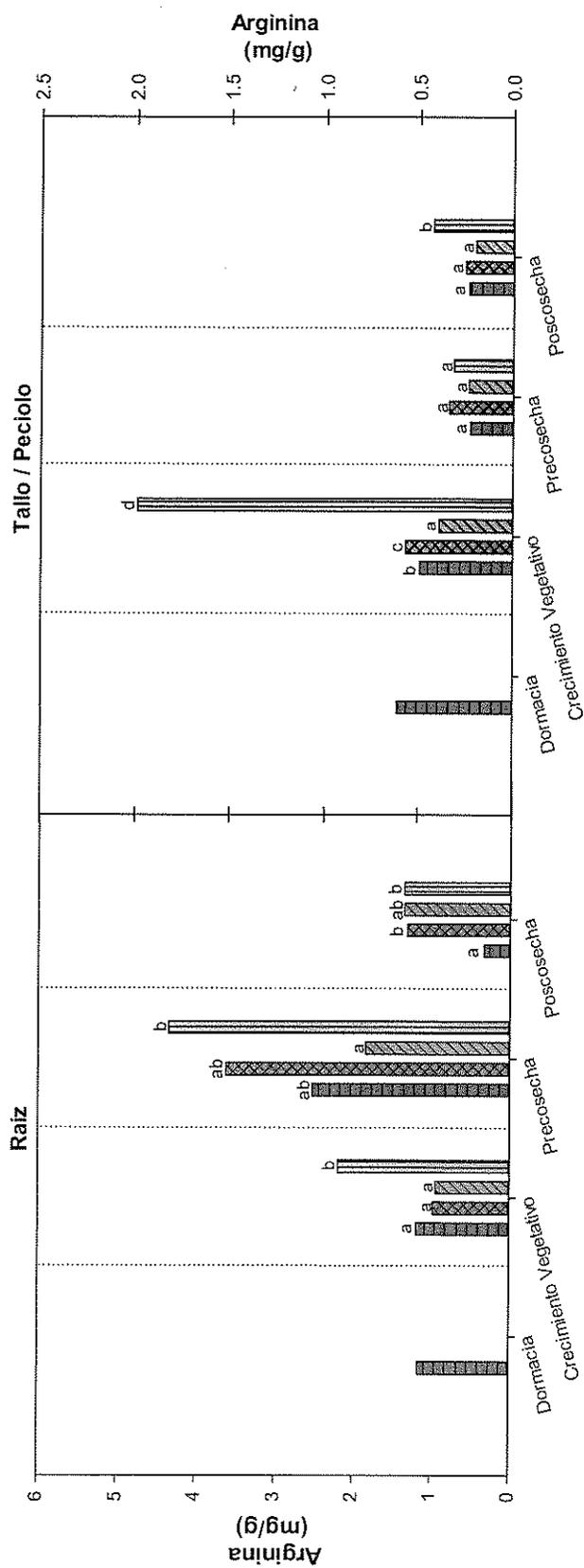
La arginina es la forma más importante de reserva de nitrógeno en plantas de vid, representando de 50 a 90% del nitrógeno soluble en las raíces, tronco y tallos durante el otoño e invierno (Kliewer y col., 1974). La fertilización nitrogenada y la absorción del nitrógeno atmosférico incrementa en gran medida el contenido de arginina en todo el tejido vegetal (Schneider y col., 1996) y se ha propuesto que los aminoácidos ricos en nitrógeno (Arginina, asparagina y glutamato) pueden reflejar el estado de las plantas leñosas mucho mejor que otros parámetros usados en plantas herbáceas (Edfast y col., 1996).

El contenido de ArgT en plantas de vid mostrados en la Figura 17 señala los niveles de arginina que se encontraron por debajo de los rangos de ArgT presentados por Silva y col.(1995), los cuales establecen valores de 15 mg/g en raíz y de 4 a 6 mg/g ps para tallo. En la etapa de letargo se observaron valores de 1.15 y 0.61 mg/g ps en raíz y pecíolo, respectivamente. Así mismo en la etapa de crecimiento vegetativo se ve un incremento en las plantas tratadas con sulfato de amonio, las cuales mostraron valores de 2.19 y 1.99 mg/g ps, con respecto a 0.93 y 0.38 mg/g ps de extracto hidroalcohólico de ajo, 0.97 y 0.56 mg/g ps de extracto acuoso de ajo y 1.18 y 0.49 mg/g ps en testigo para raíz y pecíolo, respectivamente. En la etapa de precosecha se observó también, un incremento en la concentración de ArgT en plantas tratadas con sulfato de amonio, las cuales muestran valores de 4.34 y 0.31 mg/g ps en raíz y pecíolo respectivamente, en comparación a 3.61 y 0.33 mg/g ps para extracto acuoso de ajo, 2.52 y 0.22 mg/g ps para testigo y 1.84 y 0.23 mg/g ps para extracto hidroalcohólico de ajo en raíz y pecíolo, respectivamente. Por otra parte, en la

etapa de poscosecha se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los valores de ArgT en pecíolos de plantas tratadas con respecto a las testigo, pero no en raíces, mostrando valores respectivos de 0.42 y 1.35 mg/g ps para sulfato de amonio, 0.19 y 1.35 mg/g ps para extracto hidroalcohólico de ajo, 0.25 y 1.31 mg/g ps para extracto acuoso de ajo y 0.23 y 0.33 mg/g ps para testigo.

El contenido de arginina en el tejido leñoso como la raíz decrece rápidamente cuando la planta se encuentra en la etapa de crecimiento vegetativo rápido (Wermelinger, 1991). Sin embargo, en este trabajo se observó que el contenido de arginina en raíz se incrementó en cada etapa fenológica por efecto de la aplicación de sulfato de amonio, esto debido a que este aminoácido es uno de los principales transportadores de nitrógeno ya que el 60 % del nitrógeno asimilado es incorporado a la arginina y está localizado en las raíces y el tronco (Roubelakis Angelakis y col., 1992). Así mismo las hojas sirven como reservorios intermediarios entre la raíz y el fruto (Peacock y col., 1989).

Esos resultados explican la problemática de aborción, dado que las plantas no están aprovechando las reservas de nitrógeno existentes en las mismas. Sin embargo, el azufre proveído con el tratamiento de sulfato de amonio permite que este nitrógeno sea metabolizado y convertido rápidamente a aminoácidos. Dado que la arginina es el mejor indicador de la asimilación de nitrógeno en vid, los resultados indican que el azufre contenido en el sulfato de amonio está contribuyendo a su asimilación.



**Figura 17.** Contenido de arginina (mg/g) en raíz de plantas de vid del cultivar Sagraone ('Superior') en diferentes estados fenológicos (expresado en meses) después de la aplicación de los tratamientos azufrados: con  testigo,  extracto acuoso de ajo,  sulfato de amonio. Barras con literales diferentes indican diferencias significativas  $p \leq 0.05$ .

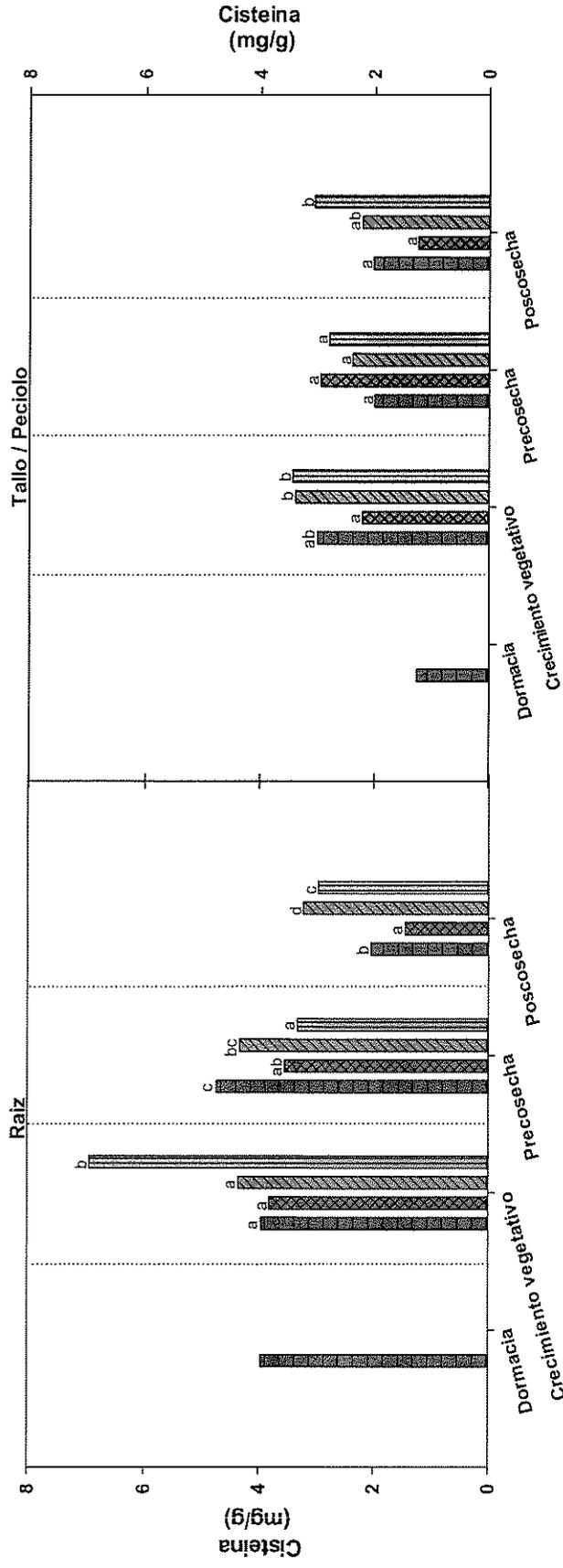
Contenido de cisteína total (CT) en vid cv. 'Superior' de baja  
productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto  
hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio

La asimilación del sulfato representa una de los caminos de la incorporación de macronutrientes dentro metabolismo celular (Hell, 1997). El último paso de la asimilación y fijación del azufre es la formación de cisteína a partir del ion sulfuro y la serina. La importancia de la cisteína radica en que ésta dona el único ion sulfuro necesario para la generación de metionina, glutatión, fitoquelatinas, cluster Fe-S, cofactores de vitaminas y múltiples metabolitos secundarios (Giovanelli y col., 1980; Bonner y col., 2005).

En la Figura 18 se muestra el contenido de CT presentes en las plantas de vid cv. 'Superior', en la etapa de letargo fueron de 3.96 y 1.25 mg/g ps para raíz y pecíolo, respectivamente. Así mismo se observa un incremento con el tratamiento de sulfato de amonio en la etapa de crecimiento vegetativo mostrando valores de 6.93y 3.43 mg/g ps para raíz y pecíolo, respectivamente con respecto a 4.36y 3.38 mg/g ps para el tratamiento de extracto hidroalcohólico de ajo, 3.82 y 2.20 mg/g ps para el extracto acuoso de ajo y 3.95 y 2.99 mg/g ps para el testigo. Así mismo, en la etapa de poscosecha se presentó un incremento en el contenido de CT del tratamiento de sulfato de amonio y extracto hidroalcohólico de ajo con respecto al testigo y el extracto acuoso de ajo. Mostrando valores de 2.96 y 3.06 mg/g ps para sulfato de amonio, 3.21 y 2.21 mg/g ps para el extracto hidroalcohólico de ajo, 1.43 y 1.24 mg/g ps para extracto acuoso de ajo y 2.04 y 2.02 mg/g ps para el testigo en raíz y pecíolo, respectivamente.

La diferencia en el contenido de cisteína que se presentó, posiblemente se debió a que al tener una fuente suficiente de azufre, la planta pudo metabolizar el azufre rápidamente y por lo tanto incrementar los niveles de este aminoácido, ya que este es la primer forma orgánica de azufre en las plantas (Hesse y col., 2004). Sin embargo se observa también que el contenido de cisteína decrece en raíz en las etapas de precosecha y poscosecha, esto posiblemente es debido a que este aminoácido es sintetizado en las hojas con ayuda de la energía de la fotosíntesis (Herschbach y col., 2001) y posteriormente es traslocado a las raíces por conductos del floema, lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Nikiforova y col. (2005) en los cuales muestra que cuando se suministra una fuente de azufre a las plantas esta rápidamente incrementa los niveles de cisteína.

En trabajos realizados en *Arabidopsis* (Hirai y col., 2003) revelaron que una planta sometida a una fuente de azufre, ésta rápidamente activa el sistema enzimático relacionado a la reducción del sulfato para posteriormente sintetizar las cantidades de cisteína necesaria para la planta. En brócoli también se ha demostrado la influencia del azufre en la activación de las enzimas relacionadas a la reducción del azufre inorgánico para su incorporación a diferentes compuestos azufrados, especialmente en cisteína y metionina (Schonhof y col., 2007).



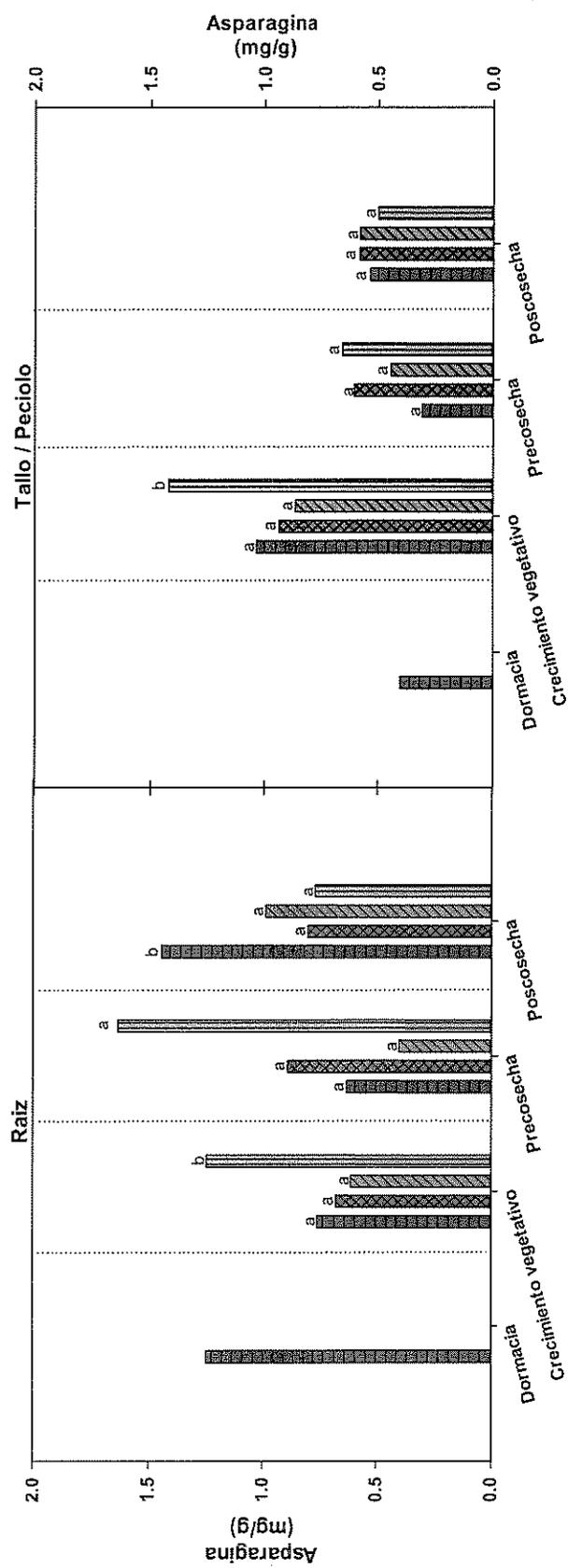
**Figura 18.** Contenido de cisteína (mg/g ps) en raíz de plantas de vid del cultivar Sugaone ('Superior') en letargo, crecimiento vegetativo, pocosecha y poscosecha después de la aplicación de los tratamientos azufrados: con testigo, extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio. Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$ .

Contenido de asparagina total (AspT) en vid cv. 'Superior' de baja  
productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto  
hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio

En las plantas, el aminoácido asparagina sirve como un importante transportador de nitrógeno a través del floema, representando alrededor de 50 a 70% del nitrógeno translocado en toda la planta, esto aplica para muchas especies incluyendo maíz, chicharos y espárragos, incluso en la planta usada como modelo genético (*Arabidopsis*). Siendo así, al igual que la arginina, un aminoácido de reserva y/o transporte de nitrógeno

Los resultados de contenido de asparagina (Figura 19) muestran que en la etapa de letargo se tuvieron valores de 1.24 y 0.40 mg/g ps para raíz y tallo, respectivamente. En la etapa de crecimiento vegetal se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. Los cuales presentaron un incremento en las plantas tratadas con sulfato de amonio, en concentraciones de 1.24 y 1.42 mg/g ps para raíz y tallo respectivamente con respecto a 0.75 y 1.03 mg/g ps para el testigo, 0.67 y 0.93 mg/g ps para extracto acuoso de ajo, y 0.61 y 0.86 mg/g ps para extracto hidroalcohólico de ajo. Sin embargo, en la etapa de precosecha no se observaron diferencias ( $p < 0.05$ ), los valores encontrados para arginina con el tratamiento de sulfato de amonio con valores de 1.63 y 0.65 mg/g ps, 0.88 y 0.60 mg/g ps para el extracto acuoso de ajo, 0.62 y 0.30 mg/g ps para el testigo y 0.40 y 0.44 mg/g ps para el tratamiento de extracto hidroalcohólico de ajo. Igualmente en la etapa de poscosecha no se observaron diferencias ( $p < 0.05$ ) en la concentración de asparagina entre tratamientos en pecíolos.

En trabajos realizados en *Arabidopsis* donde la planta fue sometida a estrés por efecto de deficiencia de azufre, se mostró que hubo un decremento en los niveles de asparagina, sin embargo, cuando se le aplicó azufre de manera controlada, los niveles de este aminoácido incrementaron considerablemente, demostrando que el azufre es necesario para un mejor funcionamiento del metabolismo del nitrógeno (Nikiforova y col., 2005). En este trabajo se puede resaltar que en postcosecha hubo una disminución del aminoácido en todos los tratamientos azufrados en raíz, no siendo así en el control, lo cual indica que las aplicaciones de azufre ayudaron a la utilización de asparagina para el funcionamiento de la planta, con esta evidencia podemos afirmar que nuestra hipótesis se cumple, la suplementación con azufre ayuda a que la planta utilice las reservas de nitrógeno.



**Figura 19.** Niveles de asparagina (mg/g) en raíz de plantas de vid del cultivar Sugaone ('Superior') en letargo, crecimiento vegetativo, precosecha y poscosecha después de la aplicación de los tratamientos azufrados: con  testigo,  extracto acuoso de ajo,  extracto hidroalcohólico de ajo y  sulfato de amonio. Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$

Contenido de metionina total (MT) en vid cv. 'Superior' de baja  
productividad tratada con extracto acuoso de ajo, extracto  
hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio

La metionina es usada en múltiples niveles del metabolismo a nivel celular, ya sea como un constituyente de las proteínas, en la iniciación del mRNA o como una molécula de control regulatorio en la forma de S-adenosilmetionina (SAM); así también es precursor de diferentes metabolitos como lo son el etileno, poliamidas, vitamina B1, 3-dimetilsulfoniopropionato (un osmoprotector) y como una fuente de azufre atmosférico (dimetildisulfuro) (Hesse y col., 2004).

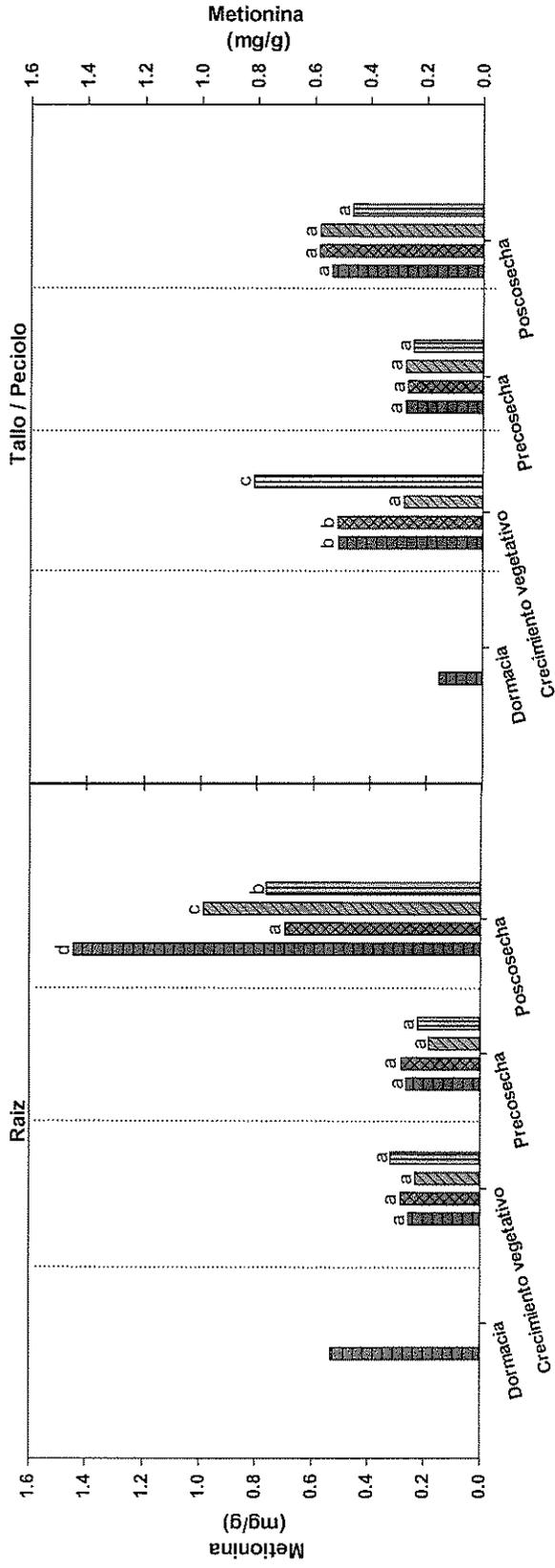
La Figura 20 muestra el contenido de metionina total, donde se observa que en la etapa de letargo muestran valores de 0.52 y 0.15 mg/g ps para raíz y pecíolo, respectivamente. Mientras tanto en la etapa de crecimiento vegetativo no se observan diferencias ( $p < 0.05$ ) en tejido de raíz. Se encontraron valores de 0.25 mg/g ps para testigo, 0.28 mg/g ps para extracto acuoso de ajo, 0.22 mg/g ps para extracto hidroalcohólico de ajo y 0.31 mg/g ps Para sulfato de amonio, por otra parte en el pecíolo se observó una mayor concentración de MT en plantas tratadas con sulfato de amonio, donde los valores encontrados fueron de 0.81 mg/g ps con respecto a 0.51 mg/g ps para testigo, 0.51 mg/g ps para extracto acuoso de ajo y 0.27 mg/g ps para extracto hidroalcohólico de ajo. Así mismo, no se observaron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos, tanto en raíz como en pecíolo, con valores de 0.26 y 0.27 mg/g ps para testigo, 0.28 y 0.26 mg/g ps para extracto acuoso de ajo, 0.18 y 0.27 mg/g ps para extracto hidroalcohólico de ajo y 0.22 y 0.24 mg/g ps para sulfato de amonio, en raíz y pecíolo, respectivamente. Por otra parte, se observó un mayor incremento en la concentración de metionina en las plantas testigo teniendo valores de 1.44 mg/g

ps para testigo, 0.69 mg/g ps para extracto acuoso de ajo, 0.98 mg/g ps para extracto hidroalcohólico de ajo y 0.76 mg/g ps para sulfato de amonio, en raíz, mientras en el pecíolo no se observaron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos, los valores encontrados fueron de 0.53 mg/g ps para testigo, 0.58 mg/g ps para extracto de acuoso de ajo, 0.57 mg/g ps para extracto hidroalcohólico de ajo y 0.46 mg/g ps para sulfato de amonio.

Es muy poca la información sobre la regulación del metabolismo de metionina en vid. Sin embargo el comportamiento de este aminoácido en este trabajo concuerda con la bibliografía citada (Ravanel y col., 2004). Las raíces de las plantas tratadas presentan niveles de metionina muy bajos, lo cual se debe a que ésta es sintetizada en las hojas y no en la raíz debido a que los cloroplastos son los organelos que contienen el mecanismo enzimático necesario para llevar a cabo esa reacción. Sin embargo en el muestreo del mes de julio este aminoácido no está siendo metabolizado por las plantas no tratadas, y como resultado lo acumula en las raíces. Esto concuerda con estudios realizados por Nikiforova (2005) los cuales mostraron que cuando la planta se encuentra en deficiencia de azufre la metionina no es metabolizada y es rápidamente hidrolizada para incorporar el átomo de azufre en otros procesos de la planta.

Por otra parte, el comportamiento en el contenido de azufre en pecíolo nos muestra que en el estado fenológico de rápido crecimiento vegetativo (Marzo) los niveles de metionina posiblemente se disparan en las plantas tratadas con sulfato de amonio, dado que la raíz posiblemente está proporcionando el azufre necesario para la síntesis de metionina, cabe recalcar que la metionina es sintetizada en los cloroplastos. Sin embargo los resultados muestran que los niveles de metionina decrecen, esto es debido a que el 80 % de la metionina es rápidamente convertida a S-adenosilmetionina (Adams y col.,

1977); proceso llevado a cabo en las hojas de la planta. Es por eso que en la raíz el contenido de MT fue igual entre los tratamientos, sin embargo en el mes de julio se presentó un decremento en el nivel de metionina en las plantas tratadas con sulfato de amonio, esto puede ser debido que las plantas testigo, al presentar deficiencias en azufre no son capaces de sintetizar metabolitos necesarios para la transformación del azufre en otros compuestos (Nikiforova y col., 2005).



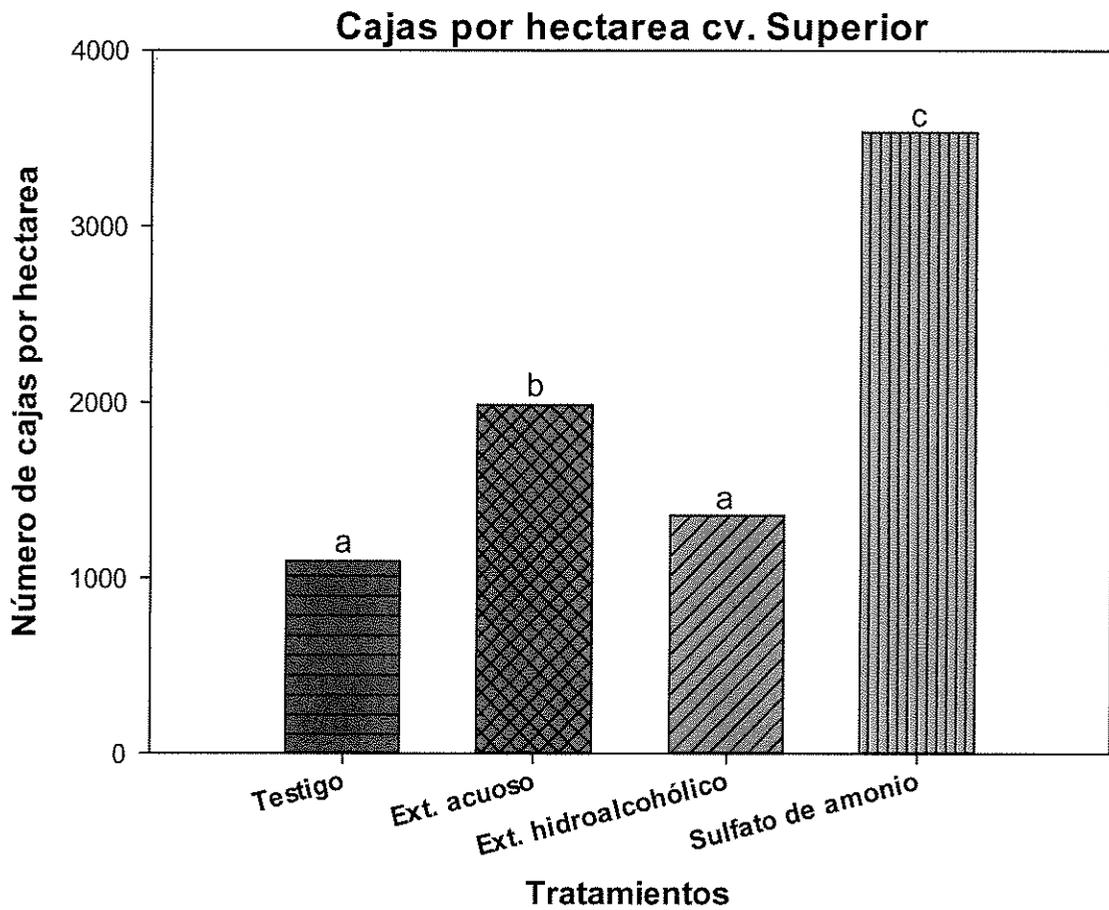
**Figura 20.** Niveles de metionina (mg/g) en raíz de plantas de vid del cultivar Sugaone ('Superior') en diferentes estados fenológicos (expresado en meses) después de la aplicación de los tratamientos azufrados: Testigo, Extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de amonio. Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$ .

Producción total de plantas de vid de cv. Superior tratadas con  
extracto acuoso de ajo, extracto hidroalcohólico de ajo y sulfato de  
amonio

El efecto de los distintos tratamientos azufrados en la producción total, expresada en cajas por hectárea se presenta en la Figura 21. La producción total de las plantas tratadas con sulfato de amonio y con extracto acuoso de ajo fue estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) de las plantas testigo y las tratadas con el extracto hidroalcohólico de ajo. Se observó que las plantas tratadas con el sulfato de amonio lograron triplicar la producción con 3537 cajas/ha con respecto al extracto acuoso de ajo con 1986 cajas/ha, 1359 cajas/ha de extracto hidroalcohólico de ajo y 1097 cajas/ha de las plantas testigo. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos para los demás parámetros donde se muestra un mayor incremento en las plantas tratadas con sulfato de amonio con respecto a los tratamientos de extracto hidroalcohólico y acuoso de ajo y el testigo. El hecho de que los tratamientos azufrados con extractos de ajo hidroalcohólico y acuoso no hayan funcionado de la misma manera que el sulfato de amonio puede deberse a las cantidades de azufre presentes en los extractos que es posible sea mucho menor a la cantidad aplicada de sulfato de amonio. En general se observó una tendencia positiva de incremento de los aminoácidos con los extractos de ajo pero no lo suficiente como el sulfato de amonio. El sulfato de amonio no solo logró que se incrementara la producción de uva si no que rebasó en gran medida a la producción marcada para campos de alta productividad siendo 1000 cajas más para un campo de alta productividad

Este comportamiento ha sido observado en plantas de trigo (Salvagiotti y col., 2009), maíz (Friedrich y col., 1978; Clarkson y col., 1999), brócoli

(Schonhof y col., 2007) y de soya (Gentiletti y col., 2004), las cuales han incrementado los niveles de biomasa y proteínas en sus tejidos debido a la aplicación de tratamientos azufrados, aunque los resultados no son tan marcados como los del presente trabajo, el resultado es el incremento en su producción.



**Figura21.** Productividad (cajas/ha de 8.2 kg) mostrada por las plantas sometidas a tratamientos de  testigo,  extracto acuoso de ajo,  extracto Hidroalcohólico de ajo y  sulfato de amonio de plantas de vid del cultivar Sugaone ('Superior'). Barras con literales diferentes indican diferencias significativas a  $p \leq 0.05$

## **CONCLUSIÓN**

La aplicación de compuestos azufrados a plantas de vid favorece la síntesis de aminoácidos requeridos en las funciones de crecimiento, desarrollo y productividad de las vides, lo cual se refleja en los niveles de reservas nitrogenadas y azufradas, así como también en el contenido de aminoácidos, reflejándose en una mayor producción de vid. Así también se concluye que el sulfato de amonio podría ser integrado a los programas de fertilización.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abrol, Y. P. y A. Ahmad (2003). Sulphur in plants. 1-4020-1247-0 Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 401, 45-70.

Adams, D. O. y S. F. Yang (1977). "Methionine Metabolism in Apple Tissue: Implication of S-Adenosylmethionine as an Intermediate in the Conversion of Methionine to Ethylene 1." Plant Physiology **60** (6): 892.

Alfaro, M., R. Bernier y S. Iraira (2006). "Efecto de Fuentes de Azufre Sobre el Rendimiento y Calidad de Trigo y Pradera en Dos Andisoles." Agricultura Técnica **66** (3): 283-294.

Anderson, J. W. y B. H. Ng (1979). "Light-dependent incorporation of selenite and sulphite into selenocysteine and cysteine by isolated pea chloroplasts." Phytochemistry **18** (4): 573-580.

Andrews, M. (2006). "The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants." Plant, Cell & Environment **9** (7): 511-519.

Azcón-Bieto, J. y M. Talón (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. 84-486-0258-7 España, Ediciones McGraw-Hill Interamericana, 645, 261-283.

Balasubrahmanyam, V., J. Eifert y L. Diofasi (1978). "Nutrient reserves in grapevine canes as influenced by cropping levels." Vitis **17**: 23-29.

Beevers, L. y R. Hageman (1969). "Nitrate reduction in higher plants." Annual review of plant physiology **20** (1): 495-522.

Beffa, T. (1993). "Inhibitory action of elemental sulphur (S) on fungal spores." Canadian journal of microbiology **39** (8): 731-735.

Bonner, E. R., R. E. Cahoon, S. M. Knapke y J. M. Jez (2005). "Molecular Basis of Cysteine Biosynthesis in Plants." Journal of Biological Chemistry **280** (46): 38-43.

Brill, W. (1980). "Biochemical genetics of nitrogen fixation." Microbiology and Molecular Biology Reviews **44** (3): 449.

Brunold, C. (1993). "Regulatory interactions between sulfate and nitrate assimilation." Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands: 61–75.

Brunold, C. y M. Suter (1984). "Regulation of sulfate assimilation by nitrogen nutrition in the duckweed *Lemna minor* L." Plant Physiology **76** (3): 579.

Burris, R. (1966). "Biological nitrogen fixation." Annual review of plant physiology **17** (1): 155-184.

Castellarin, J. M., H. M. Pedrol, D. Dignani, F. Ferraguti y F. Salvagiotti (2009). "Interacción del nitrógeno con el azufre y sus efectos sobre la producción de biomasa y el rendimiento en diferentes genotipos de trigo." Para mejorar la producción **40** (40): 8.

Clarkson, D. T., E. Diogo y S. Amancio (1999). "Uptake and assimilation of sulphate by sulphur deficient *Zea mays* cells: the role of O-acetyl-L-serine in the interaction between nitrogen and sulphur assimilatory pathways." Plant Physiology and Biochemistry **37** (4): 283-290.

Cordone, G., F. Martínez y U. I. Casilda (2000). "El azufre en el sistema productivo agrícola del Centro-Sur de Santa Fe." Informaciones agronómicas del Cono Sur **5**: 13–14.

Crawford, N. y H. Arst Jr (1993). "The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants." Annual review of genetics **27** (1): 115-146.

Chone, X., V. Lavigne-Cruegue, T. Tominaga, C. V. Leeuwen, C. Castagnede, C. Saucier y D. Dubourdieu (2006). "Effect of vine nitrogen status on grape aromatic potential: flavor precursors (S-cysteine conjugates), glutathione and phenolic content in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grape juice." J. Int. Sci. Vigne Vin **40** (1): 1-6.

Christensen, L. P., M. L. Bianchi, W. L. Peacock y D. J. Hirschfeld (1994). "Effect of nitrogen fertilizer timing and rate on inorganic nitrogen status, fruit composition, and yield of grapevines." American Journal of Enology and Viticulture **45** (4): 377.

Davies, P. J. (1995). "Plant hormones." Dordrecht, etc.: Kluwer Academic Publishers: 486-508.

DeMoss, J. A. y P. Y. Hsu (1991). "NarK enhances nitrate uptake and nitrite excretion in *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **173** (11): 33-43.

Droux, M. (2004). "Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey." Photosynthesis Research **79** (3): 331-348.

Dumas, J. (1831). "Procédés de l'analyse organique." Ann. Chim. Phys **2** (47): 198-213.

Edfast, A. B., T. Näsholm, A. Aronsson y A. Ericsson (1996). "Applications of mineral nutrients to heavily N-fertilized Scots pine trees: Effects on arginine and mineral nutrient concentrations." Plant and Soil **184** (1): 57-65.

Endlicher, W. (1988). "El problema de la erosión del suelo en la Cordillera de la Costa de la Octava Región." Revista de Geografía Norte Grande **15**: 11-27.

Fernandes, J. C. M. (2009). Characterization and expression of cytokinin signalling genes in sulfur deficient grapevine (*Vitis vinifera* L.). Agronomía. Lisboa, Instituto Superior de Agronomía, Universidad Técnica de Lisboa. **Tesis de: Maestría** (10).

Ferraris, G., F. Salvagiotti, P. Prystupa y F. G. Boem (2004). Disponibilidad de azufre y respuesta de la soja de primera a la fertilización. Congreso de la ciencia del suelo, Paraná.

Fersan (2005, 2008). "Fersanito." Boletín informativo. Última consulta: Enero de 2012, en la dirección: [http://fersan.com.do/pdf/FERSANITO-tabaco\(peq4\).pdf](http://fersan.com.do/pdf/FERSANITO-tabaco(peq4).pdf).

Friedrich, J. W. y L. E. Schrader (1978). "Sulfur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings." Plant Physiology **61** (6): 900.

García, F. O. (2005). Avances en el manejo nutricional de los cultivos de trigo. Congreso de Especialización en siembra directa. Buenos Aires, INPOFOS. 37-43.

Gentiletti, A. y F. H. G. Boem (2004). "Fertilización azufrada del cultivo de soja en el centro-sur de Santa Fe." Informaciones Agronómicas de INPOFOS: 12-16.

Giovanelli, J. (1990). "Regulatory aspects of cysteine and methionine biosynthesis." Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants: fundamental, environmental and agricultural aspects. The Hague: SPB Academic Publishing by: 33-48.

Giovanelli, J., S. H. Mudd, A. H. Datko y B. Mifflin (1980). "Sulfur amino acids in plants." The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Volume 5. Amino acids and derivatives.: 453-505.

Gojon, A., P. Nacry y J. C. Davidian (2009). "Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants." Current Opinion in Plant Biology **12** (3): 328.

Gómez, N. G. (2008). Cinética del ácido pirúvico durante el proceso de secado constante y variable del ajo. Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. **Tesis de Maestría** (6-7).

Hammerschmidt, R., R. L. Nicholson, A. Agrawal, S. Tuzun y E. Bent (1999). "A survey of plant defense responses to pathogens." Induced plant defenses

against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology, and agriculture.: 55-71.

Haneklaus, S., E. Bloem y E. Schnug (2003). "The global sulphur cycle and its links to plant environment." Sulphur in plants: 1-28.

Hawkesford, M. J., K. DE y J. LUIT (2006). "Managing sulphur metabolism in plants." Plant, Cell & Environment **29** (3): 382-395.

Hawkesford, M. J., A. Schneider, A. R. Belcher y D. T. Clarkson (1995). "Regulation of enzymes involved in the sulphur-assimilatory pathway." Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde **158** (1).

Hell, R. (1997). "Molecular physiology of plant sulfur metabolism." Planta **202** (2): 138-148.

Herschbach, C. y H. Rennenberg (2001). "Sulfur nutrition of deciduous trees." Naturwissenschaften **88** (1): 25-36.

Herschbach, C., E. Van Der Zalm, A. Schneider, L. Jouanin, L. J. De Kok y H. Rennenberg (2000). "Regulation of sulfur nutrition in wild-type and transgenic poplar over-expressing -glutamylcysteine synthetase in the cytosol as affected by atmospheric H<sub>2</sub>S." Plant Physiology **124** (1): 461.

Hesse, H., V. Nikiforova, B. Gakière y R. Hoefgen (2004). "Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism." Journal of experimental botany **55** (401): 1283.

Hirai, M. Y., T. Fujiwara, M. Awazuhara, T. Kimura, M. Noji y K. Saito (2003). "Global expression profiling of sulfur starved Arabidopsis by DNA macroarray reveals the role of O acetyl l serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition." The Plant Journal **33** (4): 651-663.

Howarth, J. R., S. Parmar, J. Jones, C. E. Shepherd, D. I. Corol, A. M. Galster, N. D. Hawkins, S. J. Miller, J. M. Baker y P. J. Verrier (2008). "Co-ordinated

expression of amino acid metabolism in response to N and S deficiency during wheat grain filling." Journal of experimental botany **59** (13): 36-45.

Huxtable, R. J. y W. M. LaFranconi (1986). Biochemistry of sulfur. United States, Plenum Press, Medium: X; Size: Pages: 445, 59 - 63.

Isquisa (2007). "Sulfato de amonio." Última consulta: Enero de 2012, en la direccion: <http://www.isquisa.com/site/files/productos/Sulfato de Amonio.pdf>.

Keller, M. y G. Hrazdina (1998). "Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening." American Journal of Enology and Viticulture **49** (3): 341.

Kliewer, W. M. y J. A. Cook (1974). "Arginine levels in grape canes and fruits as indicators of nitrogen status of vineyards." American Journal of Enology and Viticulture **25** (2): 111.

Kohli, A., J. O. Narciso, B. Miro y M. Raorane (2012). "Root proteases: reinforced links between nitrogen uptake and mobilization and drought tolerance." Physiologia Plantarum: 14-16.

Koprivova, A., M. Suter, R. O. den Camp, C. Brunold y S. Kopriva (2000). "Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in Arabidopsis." Plant Physiology **122** (3): 737.

Kredich, N. M. (1993). "Gene regulation of sulfur assimilation." Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands: 37-47.

Kruse, J., S. Kopriva, R. Hänsch, G. J. Krauss, R. R. Mendel y H. Rennenberg (2007). "Interaction of Sulfur and Nitrogen Nutrition in Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Plants: Significance of Nitrogen Source and Root Nitrate Reductase." Plant Biol (Stuttg) **9**: 638-646.

Kruse, J., S. Kopriva, G. Krauss, R. Mendel y H. Rennenberg "Interaction of sulfur and nitrogen nutrition in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants: significance of nitrogen source and root nitrate reductase." Plant Biology **9** (5): 638-646.

Kubota, N., M. Matthews, T. Takahagi y W. Kliewer (2000). "Budbreak with garlic preparations: Effects of garlic preparations and of calcium and hydrogen cyanamides on budbreak of grapevines grown in greenhouses." American Journal of Enology and Viticulture **51** (4): 409.

Lam, H., K. Coschigano, I. Oliveira, R. Melo-Oliveira y G. Coruzzi (1996). "The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants." Annual Review of Plant Biology **47** (1): 569-593.

Lawson Larry, D. (1993). Bioactive Organosulfur Compounds of Garlic and Garlic Products. Human Medicinal Agents from Plants. 0-8412-2705-5. American Chemical Society. **534**: 306-330.

LECO (2004). "Nitrogen/Protein in organic samples." Última consulta: Enero de 2012, en la direccion: [http://leco.com/products/organic/fp528/fp\\_528.html](http://leco.com/products/organic/fp528/fp_528.html).

LECO (2004). "Sulfur and carbon in organic samples." Última consulta: Enero de 2012, en la direccion: <http://leco.com/products/organic/sc144/SC144DR.html>.

Leustek, T. (1996). "Molecular genetics of sulfate assimilation in plants." Physiologia Plantarum **97** (2): 411-419.

Loulakakis, K., J. Morot-Gaudry, C. Velanis, D. Skopelitis, P. Moschou, B. Hirel y K. Roubelakis-Angelakis (2009). "Advancements in Nitrogen Metabolism in Grapevine." Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology: 161-205.

Marschner, H. (2012). Mineral nutrition of higher plants. 978-0-12-384905-2 United States, Elsevier, 650, 151-157.

Martínez-Téllez, M. A. y I. Vargas-Arispuro (2010). Informe del proyecto "Tecnologías para reducir la aborción de racimos en uva de mesa superior y

análisis de reservas para mejorar productividad". Fundación Sonora Produce, A.C.

Martínez, F. y G. Cordone (1998). "Resultados de ensayos de fertilización azufrada en soja." Soja, campaña **97** (98): 53-57.

Martínez, F., G. Cordone y F. García (2001). "Azufre y otros nutrientes." Trigo. Cuaderno de actualización técnica (63): 46-51.

Marzluf, G. A. (1997). "Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast." Annual Reviews in Microbiology **51** (1): 73-96.

Mayz-Figueroa, J. (2004). "Fijación biológica de nitrógeno Biological Nitrogen Fixation." Revista Científica UDO Agrícola **4** (1): 1-20.

Mifflin, B. y P. Lea (1980). "Ammonia assimilation." The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise **5**: 169-202.

Nikiforova, V., J. Freitag, S. Kempa, M. Adamik, H. Hesse y R. Hoefgen (2003). "Transcriptome analysis of sulfur depletion in Arabidopsis thaliana: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity." The Plant Journal **33** (4): 633-650.

Nikiforova, V., J. Kopka, V. Tolstikov, O. Fiehn, L. Hopkins, M. Hawkesford, H. Hesse y R. Hoefgen (2005). "Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of Arabidopsis plants." Plant Physiology **138** (1): 304.

Oaks, A. y B. Hirel (1985). "Nitrogen metabolism in roots." Annual review of plant physiology **36** (1): 345-365.

Peacock, W., L. Christensen y F. Broadbent (1989). "Uptake, storage, and utilization of soil-applied nitrogen by Thompson Seedless as affected by time of application." American Journal of Enology and Viticulture **40** (1): 16.

Pire, C., J. Esclapez, J. Ferrer y M. J. Bonete (2001). "Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family." FEMS microbiology letters **200** (2): 221-227.

Prosser, I., J. Purves, L. Saker y D. Clarkson (2001). "Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate." Journal of experimental botany **52** (354): 113.

Ravanel, S., M. A. Block, P. Rippert, S. Jabrin, G. Curien, F. Rébeillé y R. Douce (2004). "Methionine metabolism in plants." Journal of Biological Chemistry **279** (21): 225-248.

Ravanel, S., B. Gakière, D. Job y R. Douce (1998). "The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95** (13): 78-95.

Reitzer, L. J. y B. Magasanik (1996). "Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine." Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC: 391-407.

Rendig, V. V., C. Oputa y E. A. McComb (1976). "Effects of sulfur deficiency on non-protein nitrogen, soluble sugars, and N/S ratios in young corn (*Zea mays* L.) plants." Plant and Soil **44** (2): 423-437.

Roubelakis Angelakis, K. A. y W. M. Kliewer (1992). "Nitrogen metabolism in grapevine." Horticultural Reviews: 407-452.

Saito, K. (2000). "Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids." Current Opinion in Plant Biology **3** (3): 188-195.

Salvagiotti, F., J. M. Castellarín, D. J. Miralles y H. M. Pedrol (2009). "Sulfur fertilization improves nitrogen use efficiency in wheat by increasing nitrogen uptake." Field crops research **113** (2): 170-177.

Salvagiotti, F. y D. J. Miralles (2008). "Radiation interception, biomass production and grain yield as affected by the interaction of nitrogen and sulfur fertilization in wheat." European Journal of Agronomy **28** (3): 282-290.

Sawada, E., T. Satoh y H. Kitamura (1978). "Purification and properties of a dissimilatory nitrite reductase of a denitrifying phototrophic bacterium." Plant and Cell Physiology **19** (8): 13-29.

Schneider, S., A. Gebler, P. Weber, D. von Sengbusch, U. Hanemann y H. Rennenberg (1996). "Soluble N compounds in trees exposed to high loads of N: a comparison of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) grown under field conditions." New phytologist **134** (1): 103-114.

Schnug, E. (1998). "Response of plant metabolism to air pollution and global change-impact on agriculture." Responses of plant metabolism to air pollution and global change.-Leiden, The Netherlands, Backhuys Publishers: 15-22.

Schnug, E. y S. Haneklaus (1993). "Physiological backgrounds of different sulphur utilisation in *Brassica napus* varieties." Aspects of Applied Biology **34**: 235-235.

Schnug, E., S. Haneklaus, A. Borchers y A. Polle (1995). "Relations between sulphur supply and glutathione and ascorbate concentrations in *Brassica napus*." Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde **158** (1).

Schnug, E. y H. Pissarek (1982). "Kalium und Schwefel, Minimumfaktoren des schleswig-holsteinischen Rapsanbaus." Kali-Briefe (Büntehof) **16**: 77-84.

Schonhof, I., D. Blankenburg, S. Müller y A. Krumbein (2007). "Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli." Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde-Journal of Plant Nutrition and Soil Science **170** (1): 65-72.

SIAP (2010). "Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera." Última consulta: Enero, 2012, en la dirección:

[http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Agricola/Estacionalidades/Perennes/uva.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Agricola/Estacionalidades/Perennes/uva.pdf).

Silva, E. H., J. S. Rodríguez y J. A. S. Rodríguez (1995). Fertilización de plantaciones frutales. Santiago, Pontificia Universidad Católica de Chile, 18, 397-405.

Silva, R., L. Longeri, I. Vidal y M. Sandoval (1998). "Incidencia de la temperatura y humedad sobre la oxidación de azufre elemental en un suelo derivado de cenizas volcánicas." Agricultura técnica **58** (3): 213-220.

Smith, F. W., P. M. Ealing, M. J. Hawkesford y D. T. Clarkson (1995). "Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes." Proceedings of the National Academy of Sciences **92** (20): 73-93.

Sotomayor, J. P. y C. Ruiz S (2000). "Establecimiento y manejo de vides en el secano interior centro sur de Chile." Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias (43).

Takahashi, H., M. Yamazaki, N. Sasakura, A. Watanabe, T. Leustek, J. A. Engler, G. Engler, M. Van Montagu y K. Saito (1997). "Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in Arabidopsis thaliana." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94** (20): 101-102.

Tempest, D. W., J. L. Meers y C. M. Brown (1970). "Synthesis of glutamate in Aerobacter aerogenes by a hitherto unknown route." Biochemical Journal **117** (2): 405.

Tisdale, S. L. y W. L. Nelson (1966). "Soil fertility and fertilizers." Soil Science **101** (4): 346.

Tolsma, D., W. Ernst, R. Verweij y R. Vooijs (1987). "Seasonal variation of nutrient concentrations in a semi-arid savanna ecosystem in Botswana." The Journal of Ecology: 755-770.

Tysko, M. B. y M. B. Rodríguez (2006). "Respuesta de trigo-soja en doble cultivo a la fertilización con azufre elemental pretratado." Ciencia del suelo **24** (2): 139-146.

Vance, C. y J. Gantt (2006). "Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules." Physiologia Plantarum **85** (2): 266-274.

Vance, C. P., P. H. Graham y D. L. Allan (2002). "Biological Nitrogen Fixation: Phosphorus-A Critical Future Need?" Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity: 509-514.

Vargas-Arispuro, I., C. Corrales-Maldonado y M. Martínez-Téllez (2005). "Compuestos Derivados de Ajo como Agentes Inductores de Brotación en Cultivo Orgánico de Uva de Mesa." Chilean J. Agric. Res: 94-101.

Vázquez-Ortiz, F., G. Caire, I. Higuera-Chiapara y G. Hernández (1995). "High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp." Journal of liquid chromatography **18**: 2059-2059.

Vega, J. M. y A. Menacho (1990). "Regulation of inorganic nitrogen metabolism in *Chlamydomonas Reinhardtii*." Inorganic nitrogen in plants and microorganisms: uptake and metabolism: 73.

Vidal, E., K. Tamayo y R. Gutierrez (2010). "Gene networks for nitrogen sensing, signaling, and response in *Arabidopsis thaliana*." Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine **2** (6): 683-693.

Vidmar, J. J., A. Tagmount, N. Cathala, B. Touraine y J. C. E. Davidian (2000). "Cloning and characterization of a root specific high-affinity sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*1." FEBS letters **475** (1): 65-69.

Vidmar, J. J., D. Zhuo, M. Y. Siddiqi, J. K. Schjoerring, B. Touraine y A. D. M. Glass (2000). "Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley." Plant Physiology **123** (1): 307.

Vivier, M. A. y I. S. Pretorius (2002). "Genetically tailored grapevines for the wine industry." TRENDS in Biotechnology **20** (11): 472-478.

Wermelinger, B. (1991). Nitrogen dynamics in grapevine: Physiology and modeling. International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine. Seattle, Wa, USA, American Society for Enology and Viticulture. 26-31.

Zhao, F., M. Hawkesford y S. McGrath (1999). "Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat." Journal of Cereal Science **30** (1): 1-17.