



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

EFFECTO DE LA FERTILIZACIÓN AMONICAL EN PRESENCIA DE UN INHIBIDOR NATURAL DE LA NITRIFICACIÓN, SOBRE LA LIXIVIACIÓN DE NITRÓGENO, SU DINÁMICA DE ABSORCIÓN Y REPARTO EN PLANTAS DE VID

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias.

NOELIA ALEJANDRA TORRES ANDRADE

Director de Tesis

JOSÉ IGNACIO COVARRUBIAS PEÑA
MARCO GARRIDO SALINAS

Profesores consejeros

CECILIA BAGINSKY GUERRERO
PAOLA SILVA CANDIA

SANTIAGO - CHILE

2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DE LA FERTILIZACIÓN AMONÍACAL EN PRESENCIA DE UN
INHIBIDOR NATURAL DE LA NITRIFICACIÓN, SOBRE LA LIXIVIACIÓN DE
NITRÓGENO, SU DINÁMICA DE ABSORCIÓN Y REPARTO EN PLANTAS DE VID**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de
Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias

NOELIA ALEJANDRA TORRES ANDRADE

Calificaciones	Calificaciones
(Memoria de Título)	(Tesis de Grado)

DIRECTOR DE TESIS

José Ignacio Covarrubias Peña
Ingeniero Agrónomo, MS, Dr.

Marco Garrido Salinas
Ingeniero Agrónomo, MS, Dr.

PROFESORES CONSEJEROS

Cecilia Baginsky Guerrero
Ingeniero Agrónomo, MS, Dr.

Paola Silva Candia
Ingeniero Agrónomo, MS, Dr.

Santiago, Chile
2022

AGRADECIMIENTOS

Estando a puertas de concluir esta importante etapa, el sentimiento que hoy predomina es por sobre todo la gratitud. Quiero partir expresando mis agradecimientos a mis profesores guías José Ignacio Covarrubias y Marco Garrido, quienes me apoyaron y motivaron a seguir adelante en este proceso, siempre con la mejor disposición, me dieron las herramientas para tallar este trabajo. Gracias a ustedes y a los demás docentes que fueron determinantes y referentes en mi formación, entre ellos a mis profesores de octavo, Marcelo Arenas, Marcelo Soto, Lidia y Luis, gracias por su gran preocupación, incentivos y consejos para seguir adelante.

Hago un especial agradecimiento a mi familia, a mi papá y a mi mamá Juan Torres e Inés Andrade por enseñarme el sacrificio, la constancia y el valor del trabajo. Gracias por apoyarme y darme todo lo que estuvo a su alcance, en especial a ti mamá, admiro tu tremenda fortaleza, y la capacidad que tienes para seguir siempre adelante. A mi hermana Roxana y hermanos Juan Manuel y Beto, gracias por la compañía de todos estos años, por las historias compartidas, el apoyo y la motivación. A mi sobrina Sofía, desde el primer día que supe de ti, te convertiste en un sol para mí, tu sonrisita es capaz de iluminarlo todo, eres un personita realmente especial, te admiro mucho a tus cortos diez añitos de vida.

Agradezco a mis dogitas regalonas Bombón, Lolita, Bebé y Mía, por el cariño tan especial que entregan, siempre me pregunté si yo las sacaba a pasear a ustedes o ustedes a mí.

A mis amigas Rosita, Dani y Javi, por compartir esas tardes en la U, esas jornadas de estudio acompañadas de galletitas y risas, gracias por su amistad, los consejos, las conversaciones y por estar ahí cuando lo necesité.

Quiero realizar una especial mención y agradecimiento a mi compañero de vida Gustavo. Desde que te conocí, tomo el pasado y donde sea que mire ahí te encuentras, apoyándome, entendiéndome, escuchando y compartiendo mis alegrías, tristezas y anhelos. Gracias por convertir los momentos más sencillos en recuerdos tan especiales y únicos. Siempre traigo a mi memoria cuando me ibas a buscar los viernes, después del liceo, íbamos en el camino hablando, riendo, reflexionando y compartiendo una que otra chatarrita para dos, que parecían banquetes al lado de tu gran compañía. Gracias por estar a mi lado en los momentos más adversos, por quererme tanto de esa forma tan bonita y especial que tienes. Gracias también a tu familia por los momentos gratos y acogedores.

Por último, gracias a todas las personas que han formado y forman parte de mi vida. Doy gracias a cada momento vivido, incluso a aquellas experiencias que fueron difíciles de superar y que finalmente determinaron a la persona que soy hoy, guardo y atesoro las enseñanzas que me dejaron, para así continuar mi camino en este gran viaje de vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Ubicación del estudio.....	6
Material biológico	6
Tratamientos y diseño experimental	6
Manejo del experimento.....	8
Variables medidas	9
Crecimiento vegetativo	9
Longitud de brotes.....	9
Biomasa.....	10
Clorofila foliar.....	10
Estado nutricional.....	10
Análisis foliar de macro y micronutrientes.	10
Nitrógeno en las plantas de vid	10
Concentración de N.....	10
N total.....	11
Absorción y distribución de N desde el fertilizante	11
Eficiencia de uso del fertilizante	11
Lixiviación de nitrógeno	11
Análisis estadístico.....	11
RESULTADOS.....	13
Crecimiento vegetativo	13
Longitud de brotes.....	13
Biomasa.....	13
Contenido relativo de clorofila foliar	15
Estado nutricional.....	16

Análisis foliar de macro y micronutrientes	16
Nitrógeno en las plantas de vid	18
Nitrógeno total y concentración de N	18
Absorción y distribución del N desde el fertilizante.....	19
Eficiencia del uso del fertilizante nitrogenado.....	19
Lixiviación de nitrógeno	19
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	25
LITERATURA CITADA.....	26
APÉNDICES.....	31
ANEXOS	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados en el estudio para vides cv Cabernet Sauvignon.....	7
Cuadro 2. Análisis del sustrato previo a la aplicación de los tratamientos.....	8
Cuadro 3. Caracterización química del extracto de orujo de uva proveniente de vides cv Cabernet Sauvignon.	9
Cuadro 4. Tasa de crecimiento de brotes relativa (cm d^{-1}) en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.....	13
Cuadro 5. Biomasa (g) de vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.....	14
Cuadro 6. Contenido relativo de clorofila foliar en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.	15
Cuadro 7. Concentración foliar (%) de macronutrientes (P, K, Ca, Si y Mg) en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.	16
Cuadro 8. Concentración foliar (mg kg^{-1}) de micronutrientes (Zn, Cu, Fe, B y Mn) en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.	17
Cuadro 9. N total (mg) y concentración de N (%) en órganos de vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.	18
Cuadro 10. Eficiencia del uso del fertilizante de N (%) de vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las unidades experimentales.....	7
Figura 2. Longitud de brotes (cm) a lo largo de la temporada en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN..	13
Figura 3. Distribución de biomasa seca en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.	14
Figura 4. Contenido relativo de clorofila foliar a lo largo de la temporada en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.	15
Figura 5. N recuperado (mg) en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.....	19
Figura 6. Concentración de NO_3^- (mg L^{-1}) proveniente del lixiviado del sustrato tratado con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.	20

RESUMEN

La fertilización amoniacal ha demostrado presentar algunas ventajas medioambientales y productivas en ciertas especies, en comparación con la fertilización nítrica. Particularmente en vid, ha sido poco estudiado el impacto de fuentes de nitrógeno en el crecimiento, sin existir claridad sobre el efecto de la fertilización amoniacal en la absorción y reparto de este mineral. El objetivo del presente estudio fue evaluar variables de crecimiento, absorción, distribución y lixiviación de nitrógeno en vides de variedad Cabernet Sauvignon fertilizadas con fuentes nitrogenadas marcadas (^{15}N) en base a nitrato o amonio con y sin la presencia de inhibidores de la nitrificación de origen sintético y natural (DMPP y extracto de orujo de uva respectivamente). Los resultados evidenciaron que la fertilización amoniacal aumentó la concentración foliar de nitrógeno en vides con respecto a la fertilización nítrica, sin observar mejoras en el crecimiento vegetativo ni variación en la distribución de nitrógeno en las plantas, asociado a restricciones en el manejo del riego. Por otro lado, los resultados indicaron que la lixiviación de nitrato disminuyó significativamente con la adición de inhibidores de la nitrificación, sugiriendo al extracto de orujo de uva como una potencial herramienta igual de eficaz que el inhibidor de la nitrificación sintético (DMPP) en reducir la lixiviación de nitrato en la producción agrícola.

Palabras clave: Amonio, orujo de uva, DMPP, ^{15}N , *Vitis vinifera* L.

ABSTRACT

Ammoniacal fertilization has been shown to present some environmental and productive advantages in certain species, compared to nitric fertilization. Particularly in grapevines, the impact of nitrogen sources on growth has been little studied, without clarity on the effect of ammoniacal fertilization on the absorption and distribution of this mineral. The objective of this study was to evaluate variables of growth, absorption, distribution and leaching of nitrogen in vines of the Cabernet Sauvignon variety fertilized with labeled nitrogen sources (^{15}N) based on nitrate or ammonium with and without the presence of nitrification inhibitors of origin synthetic and natural (DMPP and grape pomace extract respectively). The results showed that ammoniacal fertilization increased the foliar nitrogen concentration in vines with respect to nitric fertilization, without observing improvements in vegetative growth or variation in the distribution of nitrogen in plants, associated with restrictions in irrigation management. On the other hand, the results indicated that nitrate leaching decreased significantly with the addition of nitrification inhibitors, suggesting grape pomace extract as a potential tool as effective as the synthetic nitrification inhibitor (DMPP) in reducing the nitrate leaching in agricultural production.

Key words: Ammonium, grape pomace, DMPP, ^{15}N , *Vitis vinifera* L.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es un elemento determinante para el crecimiento de las plantas, por lo que frecuentemente es aplicado en altas dosis en frutales y viñas. Sin embargo, la eficiencia de absorción de los fertilizantes nitrogenados suele ser muy baja (cercana a un 40%), principalmente debido a procesos de pérdida como la desnitrificación y la lixiviación (Yu *et al.*, 2015). Las plantas absorben el N desde el suelo principalmente en sus formas inorgánicas como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). Aunque el NH_4^+ es la primera fuente de N mineral proveniente de la materia orgánica y de la atmósfera (Xu *et al.*, 2012), su concentración en el suelo disminuye rápidamente por la actividad de microorganismos arqueas, bacterias oxidantes del NH_4^+ , bacterias oxidantes de NO_2^- y bacterias Comammox (Beeckman *et al.*, 2018). Estos microorganismos catalizan el proceso de la nitrificación, en donde el NH_4^+ es oxidado a NO_2^- y luego a NO_3^- . Mayores concentraciones de NO_3^- en los suelos favorecen la desnitrificación donde se libera N_2O al ambiente, un importante gas de efecto invernadero (Canfield *et al.*, 2010). Además, el NO_3^- es altamente inestable en el suelo y propenso a la lixiviación, lo que genera contaminación en fuentes de agua, derivando en problemas potenciales en la salud humana y eutrofización en el ambiente acuático (Boeykens *et al.*, 2017).

Si bien las plantas pueden absorber el N en forma de NH_4^+ o NO_3^- , se ha demostrado que el NH_4^+ puede ser absorbido a una alta tasa y que su presencia puede generar inhibición en la absorción de NO_3^- , lo que sugiere una cierta preferencia de las plantas por la absorción de NH_4^+ como fuente de N (von Wieren *et al.*, 1997). Estudios de campo realizados en palto (Granja y Covarrubias, 2018) y en condiciones controladas en arándano (Osorio *et al.*, 2020), han evidenciado beneficios de la fertilización amoniacal respecto a la nitrata en el crecimiento de brotes, concentración de clorofila en hojas, estado nutricional e intercambio gaseoso foliar. Esto podría estar asociado a las propiedades químicas del NH_4^+ , ya que al ser un catión es más estable en el suelo y puede permanecer disponible por más tiempo para ser absorbido. En este sentido, Xiong *et al.* (2010) demostraron que el NH_4^+ es hasta nueve veces menos susceptible a la lixiviación que el NO_3^- . Además, en suelos alcalinos ($\text{pH} > 7,0$), metales como Fe, Zn y Mn están menos disponibles para las plantas y la absorción de NH_4^+ genera excreción de H^+ acidificando la rizosfera, lo cual facilita la absorción de dichos minerales y favorece su disponibilidad y solubilización en el suelo (Granja y Covarrubias, 2018).

Por otro lado, el NH_4^+ en los tejidos vegetales es rápidamente convertido a aminoácido (Keller, 2020), cuyo costo energético es de 2 a 5% de la energía total producida por la planta. Por su parte, el NO_3^- debe ser reducido a NH_4^+ antes de ser asimilado, lo que eleva el costo energético de asimilación (12 a 26%). Por esto, el NH_4^+ podría considerarse como una fuente de N cuyo uso requiere un menor gasto energético para las plantas en comparación con el NO_3^- (Patterson *et al.*, 2010). En la vid, bajas concentraciones de NO_3^- en el suelo estimulan la reducción de este ion en las raíces, para su posterior translocación a los brotes como aminoácido. En contraste, a altas concentraciones de NO_3^- en el suelo este ion puede ser transportado hacia las hojas para su posterior reducción y asimilación en tal órgano, generando una acumulación en la parte aérea (Loulakakis *et al.*, 2009).

En cuanto a la fertilización amoniacal, es de amplio conocimiento que un exceso de NH_4^+ puede ser tóxico para las plantas, y también se ha visto que estas presentan un distinto grado de tolerancia a dicha toxicidad. En este sentido, en un estudio realizado por Cruz *et al.* (2006) se observó que, en especies sensibles, la aplicación de NH_4^+ afectó negativamente la biomasa y produjo altas concentraciones de N en las hojas, mientras que, en especies tolerantes, la fertilización amoniacal no afectó la biomasa en plantas de arveja y lupino, además la asimilación y acumulación de N se produjo principalmente en las raíces. En vid cultivada en hidroponía se demostró que la fertilización amoniacal no afectó el crecimiento de las plantas (Molina y Covarrubias, 2019) y, por otra parte, Lang *et al.* (2018) evidenciaron también en vid, que la forma de N preferida para el crecimiento óptimo de las plantas depende del portainjerto, por lo que no existe claridad sobre el efecto de la fertilización amoniacal en la absorción y reparto de este mineral.

Por otro lado, los fertilizantes enriquecidos artificialmente con ^{15}N , han sido utilizados para estudiar la dinámica del N mediante la cuantificación y localización del ^{15}N en sistemas compuestos por suelo y plantas (Quan, 2020). De esta forma, estudios conducidos en vid indican que la movilización del N almacenado en órganos de reserva ocurre en paralelo con la absorción de N, la cual comienza a partir de la brotación, y aumenta con el desarrollo de la vid. Además, estos estudios han confirmado que el transporte de N absorbido desde el suelo hacia la parte aérea predomina sobre aquel proveniente de la movilización de reservas solo después del inicio de la floración (Zapata *et al.*, 2004a). Por otro lado, Conradie (1992) y Zapata *et al.* (2004b) determinaron que la concentración de N es aproximadamente dos veces mayor en raíces que en tallos y que después de la primera hoja el contenido de N disminuyó en un 30% en las raíces producto de la translocación hacia las hojas en crecimiento. Sin embargo, estos estudios se realizaron con NO_3^- como fuente de N, lo que pone en evidencia la importancia de conocer la dinámica de absorción y transporte del N cuando las plantas son fertilizadas con NH_4^+ .

Para evitar la rápida conversión de NH_4^+ a NO_3^- en el suelo, y mantener así concentraciones mayores de NH_4^+ con sus consecuentes beneficios sobre los cultivos, existen en el mercado productos inhibidores de la nitrificación (IN). Entre ellos destaca el DMPP (3,4-dimetilpirazol fosfato) por su alta efectividad a bajas dosis de aplicación (Abalos *et al.*, 2014) y sus efectos en el tamaño de fruta, absorción de N, biomasa y rendimiento, asociado a una menor pérdida de N por lixiviación y desnitrificación (Vilarrasa-Nogué *et al.*, 2020). Sin embargo, el DMPP ha sido cuestionado porque su eficacia y persistencia en el suelo varían en función de la temperatura, contenido de agua del suelo, pH y textura de suelo (Gilsanz *et al.*, 2016). Por esto, surge la necesidad de desarrollar opciones más estables, económicas y sustentables. En tal contexto, existen IN sintetizados a partir de extractos vegetales (NNI), cuya eficacia está dada por el efecto de algunos metabolitos secundarios como las catequinas en la inhibición de la actividad de algunas bacterias nitrificantes como *Nitrosomonas europaea* (Erickson *et al.*, 2000; Castaldi *et al.*, 2009; Subbarao *et al.*, 2009). En base a lo anterior, en este trabajo se prueba la aplicación de un extracto de orujo de uva tinta, ya que es uno de los principales desechos de la industria vitivinícola y cuenta con una composición muy rica en polifenoles. En efecto, es posible extraer desde el orujo de Cabernet Sauvignon 125 mg g^{-1} de proantocianidinas, oligómeros de catequina, epicatequina y ésteres de ácido gálico (González-Centeno *et al.*, 2012). Tales evidencias, sugieren al orujo de uva como una opción para optimizar la nutrición de N en la vid.

HIPÓTESIS

La aplicación al suelo de sulfato de amonio con un inhibidor de la nitrificación de origen natural reduce la lixiviación de nitrógeno, incrementa su absorción y modifica su reparto en la vid.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar variables de crecimiento, absorción, reparto y lixiviación de nitrógeno en vides fertilizadas con fuentes nitrogenadas nítricas y amoniales con y sin la presencia de inhibidores de la nitrificación.

Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento vegetativo de plantas de vid fertilizadas con fuentes nítricas y amoniales marcadas con ^{15}N , con y sin inhibidores de la nitrificación.
2. Evaluar el estado nutricional en plantas de vid fertilizadas con fuentes nítricas y amoniales marcadas con ^{15}N , con y sin inhibidores de la nitrificación.
3. Determinar la absorción y el reparto de N en los órganos de las plantas fertilizadas con fuentes nítricas y amoniales marcadas con ^{15}N , con y sin inhibidores de la nitrificación.
4. Determinar la concentración de N proveniente del lixiviado de plantas fertilizadas con fuentes nítricas y amoniales marcadas con ^{15}N , con y sin inhibidores de la nitrificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

El presente estudio, fue realizado entre enero y abril del 2021 en el sector de invernaderos perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la Comuna de La Pintana, Provincia de Santiago, Región Metropolitana de Santiago (33°34'13" S, 70°38'5" W), a una altitud de 625 msnm.

El lugar pertenece al distrito agroclimático Santiago, el cual se caracteriza por presentar un clima cálido supratermal con régimen de humedad semi árido, alcanzando las temperaturas máximas de 30 °C durante el mes de enero y las mínimas de 4 °C en el mes de junio. La precipitación anual es de 372 mm y la evapotranspiración potencial anual alcanza los 1.474 mm, con una estación seca de 8 meses de duración y un periodo de húmedo de 2 meses (Santibáñez *et al.*, 2017).

Las mediciones fueron realizadas en las dependencias de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, en el Laboratorio de Nutrición Vegetal se evaluó el peso de los órganos de las plantas de vid, la concentración foliar de macro y micronutrientes y el pH de los lixiviados colectados desde las macetas. Mientras que, la concentración de N de los lixiviados fue medida en el Laboratorio de Química de Suelos y Aguas. Además, para la determinación de la composición isotópica de las plantas, se realizó el procesamiento de muestras en el Laboratorio de Isótopos Estables de dicha Facultad y la medición se realizó posteriormente en la Instalación de Isótopos Estables (SIF) de la Universidad de California, en Davis, Estados Unidos.

Material biológico

Se utilizaron plantas micropropagadas de vid pertenecientes a la variedad Cabernet Sauvignon de 10 meses de edad producidas en el Laboratorio de Fitovirología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Por otro lado, se utilizó orujo de uvas perteneciente a la variedad Cabernet Sauvignon proveniente de la viña de la Estación Experimental Antumapu, para la elaboración del inhibidor natural de la nitrificación utilizado en el estudio.

Tratamientos y diseño experimental

Para estudiar la distribución de N en las plantas se evaluaron cinco tratamientos (Cuadro 1), los cuales consistieron en la aplicación de dos fertilizantes nitrogenados, el nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y el sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, con y sin la presencia de inhibidores de la

nitrificación (IN). En cuanto a los fertilizantes nitrogenados, se utilizaron fertilizantes marcados enriquecidos artificialmente con el isótopo estable ^{15}N al 10% de abundancia de átomos. Por otra parte, como IN sintético se utilizó 3,4 dimetil pirazol fosfato (DMPP) y como IN natural se utilizó un extracto de orujo de uva. Además, entre los tratamientos se incluyó un control absoluto sin aplicación de N.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados en el estudio para vides cv Cabernet Sauvignon.

Tratamiento	Descripción	
	Fuente de N	Inhibidor de nitrificación
Control absoluto	-	-
Control positivo	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + DMPP	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	IN sintético (DMPP)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + orujo	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	IN natural (extracto de orujo de uva)

En el experimento se implementó un diseño en bloques completamente aleatorizados (Figura 1). La unidad experimental fue una maceta con una planta de vid y se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento, obteniéndose de este modo 20 unidades experimentales.

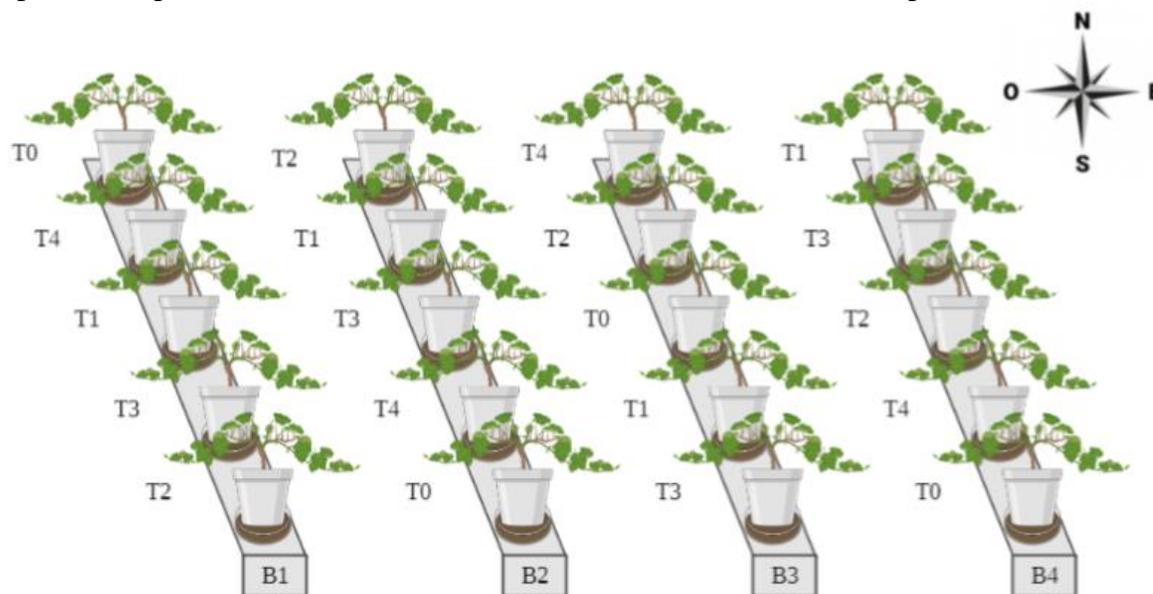


Figura 1. Distribución de las unidades experimentales. T0: Control absoluto, T1: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, T2: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, T3: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + DMPP y T4: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + orujo.

Manejo del experimento

Antes de iniciar el ensayo, en el mes de enero, cada planta de vid fue trasplantada a una maceta de 20 L y fueron aclimatadas durante tres semanas mediante la exposición a la radiación solar bajo una malla blanca con un sombreado de un 40%. Las macetas se llenaron hasta los 18 L con un sustrato compuesto por turba (30%), fibra de coco (30%) y un suelo agrícola (40%), el cual fue colectado en un viñedo ubicado en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Previo al ensayo, el sustrato fue analizado y caracterizado en cuanto a sus propiedades químicas (pH, fuentes de N, macro y micronutrientes) por el laboratorio Agrolab (Cuadro 2). Para uniformizar el vigor de las plantas, se mantuvo un brote principal y un brote secundario.

Cuadro 2. Análisis del sustrato previo a la aplicación de los tratamientos

Fertilidad	Unidad	Valor	Interpretación
pH (suspensión 1:5)	1:5	7,7	Ligeramente alcalino
CE (suspensión 1:5)	dS/m	0,29	Sin problema
Materia Orgánica	%	12,5	Alto
Nitrógeno total (N)	%	0,32	
Amonio disponible (NH ₄ ⁺)	mg/kg	927	
Nitrato disponible (NO ₃ ⁻)	mg/kg	418	
Relación NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻		2,2	
Cationes Intercambiables			
Calcio (Ca ²⁺)	meq/100g	20,9	Muy alto
Magnesio (Mg ²⁺)	meq/100g	4,2	Muy alto
Potasio (K ⁺)	meq/100g	0,59	Alto
Sodio (Na ⁺)	meq/100g	0,16	Bajo
CIC	meq/100g	25,1	

Análisis realizado por el laboratorio Agrolab.

En cuanto a la fertilización de las plantas, los nutrientes fueron suministrados a través de un fertirriego semanal con una solución ½ Hoagland según Molina y Covarrubias (2019) a excepción del N. Los fertilizantes enriquecidos con ¹⁵N (Sigma Aldrich Co, St Louis, MO, USA) fueron aplicados a una dosis de 1,7 g de N por planta repartida en siete aplicaciones durante el experimento. Por otro lado, los IN se aplicaron junto con los fertilizantes nitrogenados marcados. En el tratamiento con inhibidor sintético, el DMPP se aplicó a una dosis de 1% del N total aplicado disuelto en 500 mL de agua (Martínez-Alcántara *et al.*, 2013) mientras que, en el tratamiento con inhibidor natural, la dosis fue de 500 mL del extracto de orujo de uva a una concentración del 1,25% p/v. La dosis del inhibidor natural fue establecida en base a estudios preliminares realizados por el Laboratorio de Nutrición Vegetal durante el 2018, donde además se analizó la composición química del extracto de orujo de uva utilizado en este experimento (Cuadro 3). Para la elaboración del extracto, se recolectó orujo de uva (epicarpio, raquis y semilla) después del proceso de vinificación, el cual fue secado en una estufa a 70°C durante siete días. Posteriormente el orujo fue molido y tamizado a 2 mm, se pesaron 12,5 g del orujo seco y

molido y se agregaron a 500 mL de agua destilada, la solución se agitó mediante un agitador magnético y se calentó durante una hora manteniendo la temperatura entre 70 y 80°C. Transcurrido el tiempo, la solución se enfrió durante una hora, luego fue filtrada y aforada hasta 1.000 mL con agua destilada.

Cuadro 3. Caracterización química del extracto de orujo de uva proveniente de vides cv Cabernet Sauvignon.

Análisis	Unidad	Valor
NH ₄ ⁺	mg L ⁻¹	42
NO ₃ ⁻	mg L ⁻¹	11
pH		3,7
Galato de metilo	mg L ⁻¹	224,1
Galato de procianidina	mg L ⁻¹	205,5
Ácido gálico	mg L ⁻¹	192,6
Ácido siríngico	mg L ⁻¹	52,2
Epicatequina	mg L ⁻¹	36,3
Rutina	mg L ⁻¹	17
Catequina	mg L ⁻¹	0,41

Análisis realizado por el laboratorio de Nutrición Vegetal. La medición de concentración de NH₄⁺, NO₃⁻ y compuestos fenólicos se midieron en un extracto de orujo de uva con concentración de 2,5% p/v, mientras que el pH se midió con concentración de 1,25% p/v.

Para el riego, se instaló un sistema por goteo y se posicionaron dos emisores por maceta con un caudal de 2 L h⁻¹. Para determinar la capacidad de campo del sustrato, se saturaron dos macetas y al día siguiente se comenzó a medir diariamente el peso de las macetas, las cuales se mantuvieron tapadas. Las mediciones se realizaron durante nueve días hasta que se alcanzó un peso constante y las macetas dejaron de drenar agua. Los datos se consideraron como valores del contenido de agua referenciales a la capacidad de campo. A lo largo del ensayo se midió la humedad de las macetas mediante un sensor TDR-150 y además se midió el peso, para estimar la reposición del volumen de agua y tiempo de riego para mantener las macetas a capacidad de campo (Mulidzi *et al.*, 2016). Sin embargo, el tiempo de riego fue disminuido para evitar el drenaje y pérdida de N por lixiviación. El control de las malezas se realizó manualmente.

El día 14 de abril del 2021 se dio término al experimento, y cada planta fue seccionada en raíces, tallos y hojas, los que posteriormente fueron secadas a 55°C en una estufa hasta alcanzar peso constante, con la finalidad de realizar análisis posteriores.

Variables medidas

Crecimiento vegetativo

Longitud de brotes. Se midió la longitud del brote principal a través de una cinta métrica de escala decimal con frecuencia semanal durante todo el periodo experimental en cada una de las unidades experimentales. Posteriormente con los datos obtenidos mediante la Ecuación 1

se estimó la tasa de crecimiento relativa a la longitud inicial de los brotes (Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2016).

$$\text{Tasa CR (cm d}^{-1}\text{)} = \frac{\ln L_f - \ln L_i}{T_f - T_i} \quad [1]$$

Donde: L_f : largo en la última medición, L_i : largo en la primera medición, T_f : tiempo final de medición, T_i : Tiempo inicial de medición.

Biomasa. En cada planta, se separaron los órganos en raíz, tallo y hojas y se registró el peso fresco. Posteriormente los órganos fueron secados de forma independiente en una estufa hasta alcanzar un peso constante con el propósito de determinar el peso seco (Petruzzi *et al.*, 2005). Considerando el peso seco total de las plantas y el peso seco de cada órgano, se estimó el porcentaje de la biomasa total destinado a cada órgano.

Clorofila foliar. El contenido relativo de clorofila en las hojas se midió semanalmente con un medidor portátil Minolta SPAD 502 (Konica Minolta, Inc., Osaka, Japón), durante todo el ensayo en la primera hoja completamente expandida del brote principal en todas las plantas. Por cada medición, se realizaron cuatro lecturas en cada hoja, y se registró el promedio calculado de manera automática por el equipo.

Estado nutricional

Análisis foliar de macro y micronutrientes. Al finalizar el periodo experimental, las hojas fueron lavadas con una solución compuesta por Tween 20 0,1% y HCl 1% y enjuagadas con agua desionizada. Luego de ser secadas en una estufa hasta alcanzar un peso constante, fueron molidas y se pesaron 80 mg de muestra por cada repetición de los tratamientos. Posteriormente se inició el proceso de digestión, donde se agregó a cada muestra 10 mL de agua destilada, 6 mL de ácido nítrico (HNO_3) y 4 mL de peróxido (H_2O_2). Esta mezcla se agitó suavemente bajo campana y se dejó semi-tapada durante la noche. La digestión se realizó en una autoclave de $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$ a 125°C durante 50 min. Posteriormente se filtraron las muestras y el líquido resultante de la mineralización fue diluido hasta completar 20 mL con agua desionizada. Finalmente se realizó la lectura de la concentración de minerales (P, K, Ca, Mg, Si, Zn, Cu, Fe, B y Mn) mediante un espectrómetro de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES).

Nitrógeno en las plantas de vid

El análisis de la composición isotópica de N se realizó en muestras pertenecientes a los órganos de raíz, tallo y hoja para las siguientes estimaciones basadas en IAEA (2001):

Concentración de N. La concentración de N (%) se determinó mediante la Ecuación 2.

$$N (\%) = \frac{N \text{ muestra (mg)} * 100}{\text{Peso muestra (mg)}} \quad [2]$$

N total. El N total para cada órgano (Nt) se estimó a través la Ecuación 3.

$$Nt \text{ (mg)} = \frac{\text{Peso seco (mg)} * N \text{ (\%)}}{100} \quad [3]$$

Donde:

Peso seco = Peso seco del órgano (mg).

N (%) = Concentración de N del órgano.

Absorción y distribución de N desde el fertilizante. El N que fue absorbido o recuperado desde el fertilizante (Nr) a nivel de órgano se estimó mediante la Ecuación 4.

$$Nr \text{ (mg)} = Nt \text{ (mg)} * \frac{{}^{15}\text{N muestra enriquecida (\%)} - {}^{15}\text{N muestra control (\%)}}{{}^{15}\text{N de fertilizante (\%)} - {}^{15}\text{N de abundancia natural (\%)}} \quad [4]$$

Donde:

${}^{15}\text{N}$ muestra enriquecida = Concentración de ${}^{15}\text{N}$ en los órganos de plantas fertilizadas y enriquecidas en ${}^{15}\text{N}$ (%).

${}^{15}\text{N}$ muestra control = Concentración promedio de la abundancia natural de ${}^{15}\text{N}$ en los órganos de plantas no enriquecidas en ${}^{15}\text{N}$, medida en el tratamiento Control absoluto (%).

${}^{15}\text{N}$ de fertilizante = Concentración de ${}^{15}\text{N}$ de los fertilizantes nitrogenados utilizados (10%).

${}^{15}\text{N}$ de abundancia natural = Concentración referencial de la abundancia natural ${}^{15}\text{N}$ (0,3663%).

El N recuperado a nivel de planta completa (Nrp) se estimó por medio de la Ecuación 5.

$$Nrp \text{ (mg)} = Nr \text{ raíz (mg)} + Nr \text{ tallo (mg)} + Nr \text{ hoja (mg)} \quad [5]$$

Eficiencia de uso del fertilizante. El porcentaje de utilización del fertilizante nitrogenado o la eficiencia en el uso de nitrógeno (EUF) fue calculada a través de la Ecuación 6.

$$EUF \text{ (\%)} = \frac{Nrp \text{ (mg)}}{\text{Dosis de N (mg)}} * 100 \quad [6]$$

Donde:

Dosis de N = Dosis total de N aplicada por planta durante el experimento (mg).

Lixiviación de nitrógeno

Posterior al muestreo de las plantas, el sustrato fue mantenido en las macetas y a mediados de septiembre del 2021 se midió la concentración de N en forma de NO_3^- y NH_4^+ mediante colorimetría en base a la metodología del ácido cromotrópico y amonio silicato respectivamente (Hach, 2005). Para la toma de muestras, se aplicaron 500 ml de agua a cada maceta y se colectaron muestras de lixiviados de 50 ml por cada repetición de los tratamientos. Además, a partir de las muestras colectadas se midió el pH de los lixiviados de las macetas con pH-metro HANNA HI5521-02.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las evaluaciones fueron sometidos a un análisis de la varianza a través de modelos lineales mixtos (MLM). En el caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, se llevó a cabo una prueba de comparaciones múltiples LSD-Fisher para todas las variables considerando un $p < 0,05$. El análisis se realizó en el lenguaje de programación R, a través de la interfase InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Para las variables de tasa de crecimiento de brotes relativa, biomasa, distribución de biomasa, concentración foliar de macro y micronutrientes, N en las plantas y concentración de N de los lixiviados, el análisis de la varianza fue efectuado a través del siguiente modelo lineal mixto:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_{ij} + UE_{ij} + \epsilon_{ijk} \dots$$

Donde:

Y = variable respuesta; μ = media general. Efecto fijo: T = factor tratamiento. Efectos aleatorios: β = efecto bloque; UE = unidad experimental (anidada al bloque). ϵ = error

Para el análisis de la varianza de las mediciones que fueron repetidas en el tiempo correspondientes al largo de brotes y contenido relativo de clorofila foliar, se incluyó en el modelo el tratamiento, la fecha de medición y la interacción entre tratamiento y la fecha de medición.

La variable contenido de clorofila se analizó a través del siguiente modelo lineal mixto:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + t_j + (Tt)_{ij} + \beta_{ij} + UE_{ij} + \epsilon_{ijk} \dots$$

Donde:

Y = variable respuesta, μ = media general. Efectos fijos: T = factor tratamiento, t = tiempo de medición, Tt = interacción entre tratamiento y tiempo de medición. Efectos aleatorios: β = efecto bloque, UE = unidad experimental (anidada al bloque) y ϵ = error experimental.

Para el análisis de la variable largo de brotes se incluyó en el modelo el largo inicial como covariable:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + t_j + (Tt)_{ij} + C_k + \beta_{ijk} + UE_{ijk} + \epsilon_{ijkl} \dots$$

Donde:

Y = variable respuesta, μ = media general. Efectos fijos: T = factor tratamiento, t = tiempo de medición, Tt = interacción entre tratamiento y tiempo de medición, C = Covariable largo inicial. Efectos aleatorios β = efecto bloque, UE = unidad experimental (anidada al bloque) y ϵ = error experimental.

RESULTADOS

Crecimiento vegetativo

Longitud de brotes

El análisis de la longitud de brotes indicó que no hubo interacción significativa entre los factores tratamiento y tiempo ($p=0,223$). Por otra parte, en la evaluación de los factores realizada de manera independiente, para el factor tiempo, el análisis indicó que hubo un incremento significativo del largo de brotes en las plantas de vid evaluado a lo largo de la temporada (Figura 2). Por otra parte, para el factor tratamiento (Apéndice 1) no se detectaron diferencias entre los tratamientos implementados ($p=0,332$).

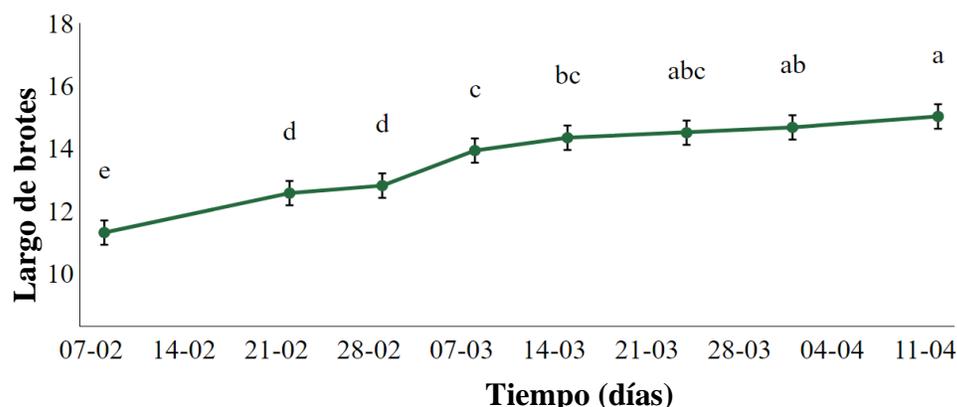


Figura 2. Longitud de brotes (cm) a lo largo de la temporada en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN. Los datos representan la media de los cinco tratamientos para cada fecha. Medias con la misma letra en sentido horizontal no fueron significativamente diferentes según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). Barras verticales indican el error estándar. $n = 20$.

En cuanto a la tasa de crecimiento de brotes relativa, el análisis no mostró diferencias entre los tratamientos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tasa de crecimiento de brotes relativa (cm d^{-1}) en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	Tasa de CR (cm d^{-1})
Control	0,0066
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,0037
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,0060
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{DMPP}$	0,0042
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{orujo}$	0,0044
Error estándar	0,0017
Significancia	ns

Los datos representan la media de cada tratamiento. ns: no significativo según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). $n = 20$.

Biomasa

En relación con la biomasa expresada en términos de peso seco, el análisis indicó que la biomasa de cada órgano y biomasa total de las plantas de vid no fueron afectadas de forma significativa por los tratamientos evaluados (Cuadro 5).

Cuadro 5. Biomasa (g) de vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	Peso seco (g)			
	Raíz	Tallo	Hoja	Total
Control	0,69	0,15	0,10	0,93
Ca(NO ₃) ₂	0,90	0,16	0,12	1,18
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,98	0,13	0,04	1,14
(NH ₄) ₂ SO ₄ + DMPP	0,47	0,15	0,11	0,73
(NH ₄) ₂ SO ₄ + orujo	1,02	0,12	0,13	1,27
Error estándar	0,20	0,05	0,04	0,26
Significancia	ns	ns	ns	ns

Los datos representan la media de cada tratamiento. ns: no significativo según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). n = 20.

Por otra parte, la distribución de la biomasa que fue asignada a cada órgano resultó ser similar entre los tratamientos, sin observar diferencias significativas (Figura 3). En promedio los tratamientos distribuyeron un 74,8% del peso seco a la raíz, un 14,8% al tallo y un 10,5% a las hojas.

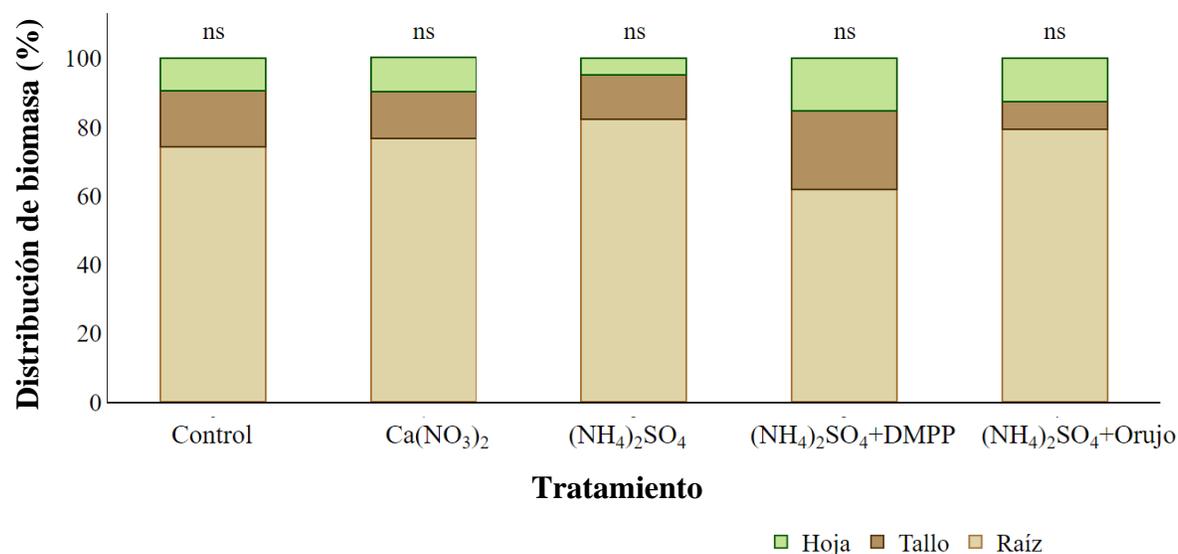


Figura 3. Distribución de biomasa seca en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN. Los datos representan la media de cada tratamiento. n = 20.

Contenido relativo de clorofila foliar

La evaluación realizada al contenido relativo de clorofila foliar indicó que no hubo interacción significativa entre los factores tratamiento y tiempo ($p=0,678$). Por otra parte, en la evaluación de los factores realizada de manera independiente, para el factor tratamiento (Cuadro 6), no se detectaron diferencias entre los tratamientos implementados ($p=0,765$).

Cuadro 6. Contenido relativo de clorofila foliar en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Contenido relativo de clorofila foliar en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	Índice SPAD
Control	30,03
Ca(NO ₃) ₂	29,68
(NH ₄) ₂ SO ₄	27,66
(NH ₄) ₂ SO ₄ + DMPP	29,28
(NH ₄) ₂ SO ₄ + orujo	30,24
Error estándar	1,71
Significancia	ns

Los datos representan la media de cada tratamiento. ns: no significativo según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). n = 20.

En cuanto al factor tiempo, el análisis indicó que hubo un incremento significativo del contenido foliar de clorofila en las plantas de vid evaluada a lo largo de la temporada (Figura 4).

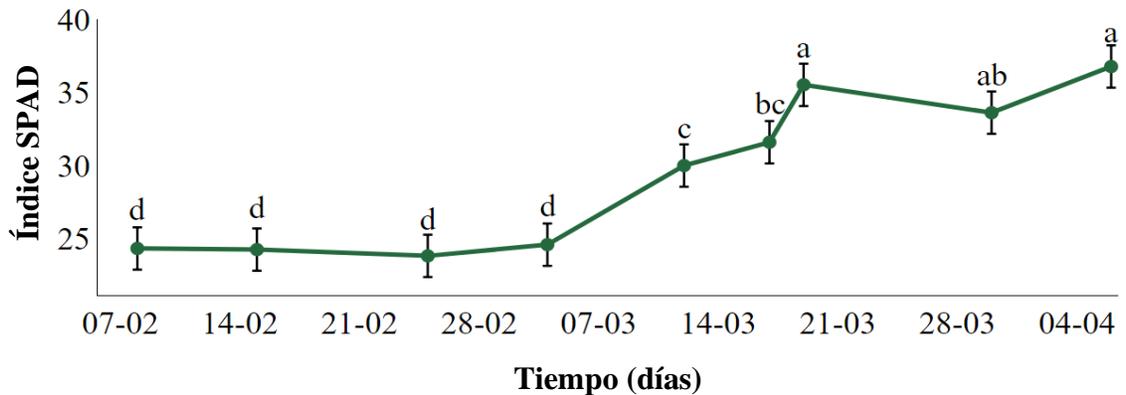


Figura 4. Contenido relativo de clorofila foliar a lo largo de la temporada en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN. Los datos representan la media de los cinco tratamientos para cada fecha. Medias con la misma letra en sentido horizontal no fueron significativamente diferentes según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). Barras verticales indican el error estándar. n = 20.

Estado nutricional

Análisis foliar de macro y micronutrientes

Los resultados obtenidos indicaron que los macronutrientes evaluados fueron influenciados de manera significativa por los tratamientos (Cuadro 7). Por un lado, en cuanto al P, los análisis mostraron que el Control absoluto obtuvo la mayor concentración mineral, la cual fue un 39% mayor respecto a los demás tratamientos, los cuales no se diferenciaron entre ellos.

Con relación al K, se observó que la aplicación $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ produjo la menor concentración mineral. Por su parte, la aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{DMPP}$ no se diferenció del Control absoluto y la concentración de K en los tratamientos mencionados fue significativamente menor a la obtenida con las aplicaciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{orujo}$.

En cuanto al Ca, la aplicación de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ presentó la mayor concentración mineral, la cual fue un 64% mayor en comparación al Control absoluto, mientras que los demás tratamientos presentaron una concentración de Ca similar al Control absoluto.

Respecto del Si se observó que las concentraciones obtenidas en los tratamientos $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ fueron equivalentes a la del Control absoluto, mientras que, las aplicaciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{orujo}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{DMPP}$ redujeron la concentración de Si en un 23% y 33% respectivamente, en comparación al Control absoluto.

En cuanto al Mg, las aplicaciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{orujo}$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{DMPP}$ presentaron una concentraciones más bajas de Mg, similar al Control Absoluto; en tanto, la concentración fue significativamente mayor en los tratamiento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en comparación al Control Absoluto.

Cuadro 7. Concentración foliar (%) de macronutrientes (P, K, Ca, Si y Mg) en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	Concentración foliar de macronutrientes (%)									
	P		K		Ca		Si		Mg	
Control	0,20	a	0,73	c	1,62	bc	0,30	a	0,42	c
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,13	b	0,60	d	2,66	a	0,28	ab	0,58	a
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,13	b	1,14	a	1,94	b	0,35	a	0,52	ab
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{DMPP}$	0,12	b	0,78	c	1,58	c	0,20	c	0,36	c
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{orujo}$	0,11	b	0,96	b	1,76	bc	0,23	bc	0,43	bc
Error estándar	0,01		0,02		0,12		0,03		0,03	
Significancia	p = 0,0002		p = <0,0001		p = 0,0001		p = 0,0097		p = 0,0007	

Los datos representan la media de cada tratamiento. Medias con distinta letra en sentido vertical fueron significativamente diferentes según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). n = 20.

Por otra parte, en el análisis de los micronutrientes (Cuadro 8), los resultados indicaron que la aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ incrementó la concentración foliar de Zn en más del doble respecto al Control absoluto, mientras que el resto de las aplicaciones presentaron valores de concentración intermedios entre estos dos tratamientos.

La concentración de B fue significativamente mayor en el tratamiento $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con respecto al Control absoluto; mientras que, con la aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + DMPP se obtuvo una concentración mineral significativamente menor al Control absoluto (33%) y las aplicaciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + orujo no se diferenciaron entre estos dos tratamientos.

En relación con el Mn, los tratamientos $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + orujo obtuvieron una concentración de Mn similar, la cual fue significativamente menor a la del Control absoluto. Mientras que, la aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + DMPP presentó una concentración intermedia entre los dos últimos los tratamientos mencionados.

Por último, las concentraciones de Cu y Fe no se vieron afectadas por los tratamientos implementados.

Cuadro 8. Concentración foliar (mg kg^{-1}) de micronutrientes (Zn, Cu, Fe, B y Mn) en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	Concentración foliar de micronutrientes (mg kg^{-1})							
	Zn		Cu	Fe	B	Mn		
Control	58,51	c	14,53	374,95	150,27	b	165,97	c
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	90,34	b	13,42	285,18	139,16	bc	247,97	a
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	127,71	a	21,82	279,08	232,40	a	245,93	a
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + DMPP	81,34	b	18,95	258,70	100,29	c	183,50	bc
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + orujo	82,61	b	12,06	255,20	114,79	bc	218,13	ab
Error estándar	7,13		5,55	40,75	22,81		18,56	
Significancia	p = 0,0001		ns	ns	p = 0,0014		p = 0,0173	

Los datos representan la media de cada tratamiento. Medias con distinta letra en sentido vertical fueron significativamente diferentes según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). ns.: no significativo. n = 20.

Nitrógeno en las plantas de vid

Nitrógeno total y concentración de N

El análisis indicó que la cantidad de N total presente en los órganos y en la planta completa no se afectó de forma significativa por los tratamientos evaluados (Cuadro 9).

En relación con la concentración de N, los resultados indicaron que los tratamientos influyeron esta variable en los órganos de raíz, tallo y hoja (Cuadro 9). Particularmente en la raíz, los tratamientos presentaron una mayor concentración de N en comparación al Control Absoluto, entre los cuales se destacó el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{DMPP}$, cuya concentración fue mayor en más del doble con respecto al Control absoluto.

En cuanto al análisis realizado en el tallo, se evidenció que los tratamientos evaluados obtuvieron una mayor concentración de N en relación con el Control absoluto, sobresaliendo la aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cuya concentración de N fue 1,7 veces mayor en comparación al Control absoluto.

A nivel foliar, los resultados indicaron que la aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{DMPP}$ aumentó la concentración de N en un 20% en relación con el Control Absoluto y se alcanzaron valores intermedios entre estos dos tratamientos con las aplicaciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{orujo}$. Por otro lado, el tratamiento $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ no se diferenció del Control Absoluto.

Cuadro 9. N total (mg) y concentración de N (%) en órganos de vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	Nt (mg)				N (%)		
	R	TL	H	T	R	TL	H
Control	1,09	0,65	2,50	10,89	1,09 c	0,65 d	2,83 bc
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,87	0,94	3,15	21,42	1,87 b	0,94 c	2,55 c
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,07	1,73	1,34	23,98	2,07 b	1,73 a	3,26 ab
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{DMPP}$	2,43	1,14	3,83	16,51	2,43 a	1,14 b	3,39 a
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{orujo}$	1,97	1,01	4,15	25,67	1,97 b	1,01 bc	3,14 ab
Error estándar	4,45	0,53	1,30	5,66	0,11	0,06	0,16
Significancia	ns	ns	ns	ns	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p = 0,008$

Los datos representan la media de cada tratamiento. Medias con distinta letra en sentido vertical fueron significativamente diferentes según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) ns: no significativo. R: raíz, TL: Tallo, H: hoja, T: total. n = 20.

Absorción y distribución del N desde el fertilizante

Los resultados de la cantidad de N que fue absorbida o recuperada por las plantas de vid proveniente desde el fertilizante (Nr) se encuentran ilustrados en la Figura 5. Los análisis efectuados indicaron que los tratamientos que fueron implementados en este estudio no influyeron en el Nr estimado a nivel de órgano ni a nivel de planta completa. En este sentido, en promedio cada planta absorbió 12,8 mg de N, de los cuales el 78% se localizó en la raíz, el 7% en el tallo y el 15% en las hojas.

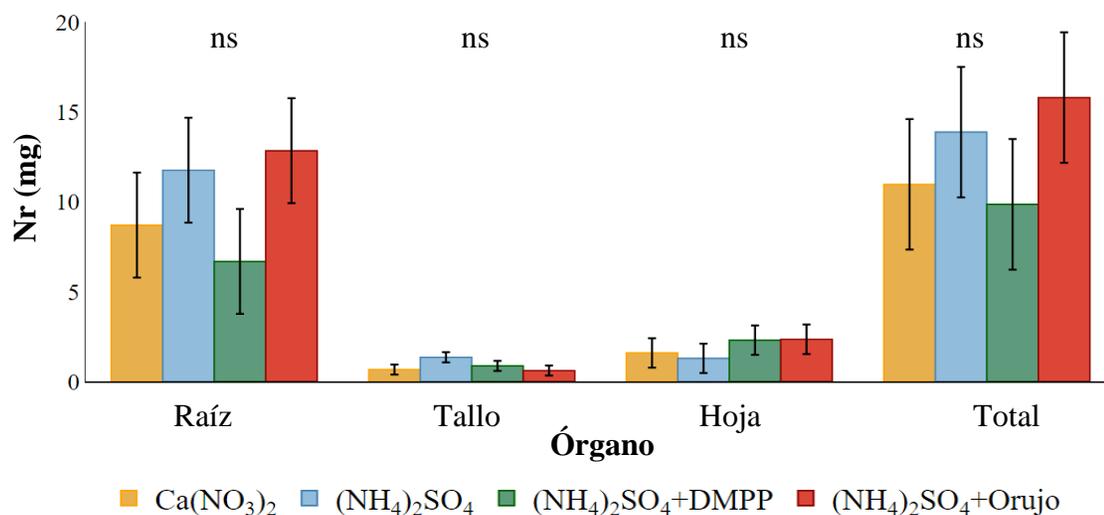


Figura 5. N recuperado (mg) en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN. Los datos representan la media de cada tratamiento. ns: no significativo según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). Barras verticales indican el error estándar. $n = 20$.

Eficiencia del uso del fertilizante nitrogenado

El análisis realizado a la eficiencia del uso del fertilizante nitrogenado (EUF), el cual se encuentra resumido en el Cuadro 10, indicó que los tratamientos aplicados no afectaron de forma significativa esta variable. En promedio se estimó que la EUF de los cuatro tratamientos fertilizados con ¹⁵N fue de 0,75%.

Cuadro 10. Eficiencia del uso del fertilizante de N (%) de vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	EUF (%)
Ca(NO ₃) ₂	0,65
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,82
(NH ₄) ₂ SO ₄ + DMPP	0,58
(NH ₄) ₂ SO ₄ + orujo	0,93
Significancia	ns
Error estándar	0,21

Los datos representan la media de cada tratamiento. ns: no significativo según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). $n = 20$.

Lixiviación de nitrógeno

En relación con los análisis realizados a los lixiviados colectados desde las macetas de las plantas de vid, en lo que respecta a la concentración de N, los resultados indicaron que todos los tratamientos presentaron la misma concentración de NH_4^+ (Apéndice 2). En tanto que, la concentración de NO_3^- fue afectada por tratamientos evaluados (Figura 6), en este sentido, el Control absoluto que no recibió aportes de N, presentó la lixiviación de NO_3^- más baja. Por su parte, la fertilización con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, produjo la mayor lixiviación de NO_3^- y en comparación a este tratamiento, las aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ redujo en un 18% esta variable, mientras que las adiciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + orujo y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + DMPP redujeron en promedio un 70% la lixiviación de NO_3^- . Además, los resultados obtenidos demostraron que los dos IN evaluados en este estudio tuvieron el mismo efecto en reducir la lixiviación de NO_3^- con la misma efectividad, ya que no se diferenciaron estadísticamente.

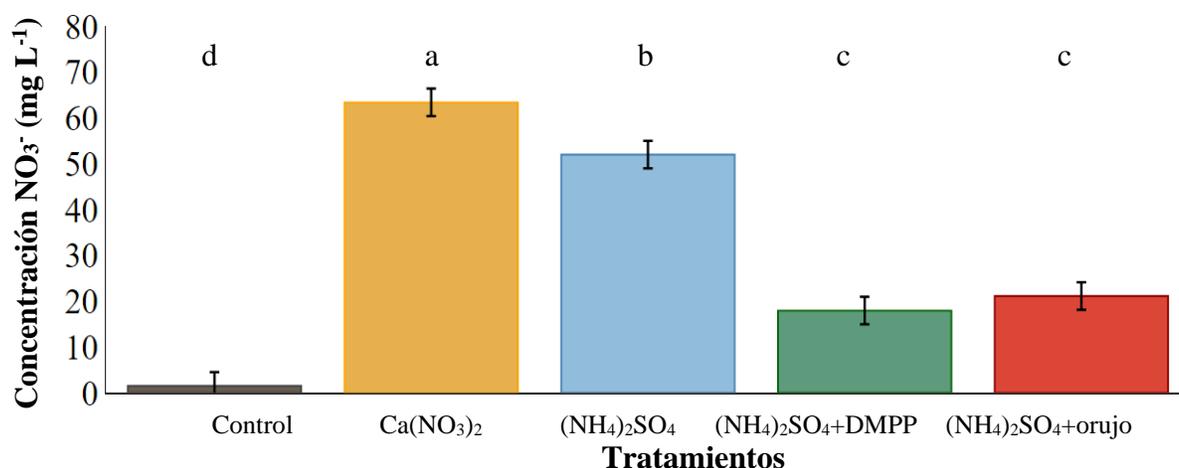


Figura 6. Concentración de NO_3^- (mg L⁻¹) proveniente del lixiviado del sustrato tratado con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN. Los datos representan la media de cada tratamiento. Medias con distinta letra en sentido horizontal fueron significativamente diferentes según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). Barras verticales indican el error estándar. n = 20.

DISCUSIÓN

Las evaluaciones relacionadas al crecimiento vegetativo indicaron que los tratamientos no afectaron el crecimiento de los brotes, la biomasa y el contenido relativo de clorofila foliar en las vides durante el periodo experimental. Resultados similares se obtuvieron en estudios realizados en vides, donde la fertilización con diferentes fuentes de N no influyó sobre el crecimiento ni en la concentración de clorofila foliar (Molina y Covarrubias, 2019; Iandolino y Williams, 2014). Considerando que el N está fuertemente asociado al crecimiento, ya que es esencial en la formación de importantes componentes celulares, incluida la clorofila (Beeckman *et al.*, 2018) y que la fertilización amoniacal en comparación a la nítrica aumentó la concentración foliar de N, se esperaba detectar mejoras en el crecimiento vegetativo como ha sido demostrado en otras especies frutales (Lorén, 2013; Martínez *et al.*, 2015; Osorio *et al.*, 2020), sin embargo, dicho efecto no fue evidenciado en el presente estudio. Teniendo en cuenta que, durante el periodo experimental el riego se redujo y que el peso de las macetas se mantuvo en promedio en 0,87 relativo al peso a capacidad de campo (Apéndice 5), la falta de expresión se atribuye a este manejo, ya que la disponibilidad de agua es la principal limitante ambiental en la productividad de las plantas (Carmo-Silva *et al.*, 2012).

Respecto a la distribución de la biomasa hacia los órganos no hubo diferencias entre los tratamientos, destinándose la mayor parte a la raíz (75%) y una menor proporción al tallo y a las hojas (Figura 3). En contraste a estos resultados, en la literatura se ha informado que, en vides de un año injertadas y mantenidas en maceta, la biomasa se distribuyó aproximadamente en un 24% a la raíz, 35% en tallo y 41% en hoja, bajo condiciones hídricas óptimas, según lo expuesto por Kizildeniz *et al.* (2021) y Savi *et al.* (2019). Además, en este último estudio informaron que cuando el riego se redujo en un 30%, la biomasa se destinó principalmente a la raíz (51%) y en menor magnitud al tallo (19%) y a las hojas (30%), lo cual se asemeja más a los resultados obtenidos en este estudio y es un antecedente adicional que indica que el riego pudo haber sido deficiente y afectar la distribución de biomasa en las plantas de vid, debido a que ante una restricción hídrica la expansión foliar es el primer proceso que es afectado (González-Dugo *et al.*, 2010).

En relación con el estado nutricional de las vides, los análisis indicaron que los tratamientos afectaron la concentración foliar de todos los minerales evaluados con excepción del Cu y Fe. En los resultados obtenidos, se observó que la aplicación $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ indujo las concentraciones más altas de K y Zn y en comparación a este tratamiento la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{IN}$ redujo la concentración de dichos minerales. Por un lado, es sabido que la presencia de NH_4^+ puede reducir la absorción de otros cationes debido a la competencia por los sitios de intercambio catiónico en la raíz (Hafeez *et al.*, 2013). Por otra parte, considerando que los microorganismos nitrificantes presentes en el suelo pueden oxidar rápidamente el NH_4^+ a NO_3^- (Beeckman *et al.*, 2018), es probable que los resultados se deban a que la adición de los IN, al mantener el N en forma de NH_4^+ por más tiempo, pudieron haber intensificado la competencia catiónica. Este efecto, fue más consistente en el tratamiento $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{DMPP}$, ya que esta aplicación también redujo la concentración de los cationes Mg y Mn en comparación a las plantas tratadas con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mientras que la aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{orujo}$ produjo una concentración intermedia de estos minerales sin diferenciarse de los tratamientos mencionados.

La aplicación de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ aumentó la concentración de Ca con respecto a los demás tratamientos, lo cual probablemente se deba a la adición de este mineral mediante el fertilizante $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Osorio *et al.*, 2020). Simultáneamente, el fertilizante nítrico produjo la menor concentración de K, donde la absorción de este mineral se pudo haber afectado negativamente por la mayor absorción de otros cationes como el Ca y Mg. Los resultados evidenciaron que en la absorción de los minerales ocurren interacciones complejas y que los tratamientos afectaron la concentración foliar de la mayoría de los minerales evaluados. Si bien no se observaron síntomas de déficit durante el periodo experimental, es necesario realizar un seguimiento a más largo plazo para evaluar los posibles efectos productivos.

En cuanto al N medido en las plantas, el N total presente a nivel de órganos y de planta completa no fue modificado por los tratamientos, sin embargo, en la concentración de N de los órganos se hallaron diferencias entre los tratamientos (Cuadro 9). Los resultados podrían deberse a que, en las variables estimadas en base al peso seco de las plantas como el contenido de N y N absorbido se observó que la magnitud del error estándar fue mayor, a diferencia de la concentración de N, lo cual dificulta la detección de diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo que, para detectar diferencias con mayor precisión, se sugiere disminuir el error estándar a través de plantas mayormente homogéneas en su biomasa, mediante una verificación previa al experimento y de manera complementaria, aumentar el número de repeticiones.

En relación con la concentración de N, las vides fertilizadas en base a NH_4^+ aumentaron la concentración foliar de N en comparación a las plantas fertilizadas con NO_3^- y en el tallo, la mayor concentración de este mineral se obtuvo con la aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Este resultado era esperable considerando que el NH_4^+ puede ser absorbido a una mayor tasa que el NO_3^- (Ludewig *et al.*, 2007; Osorio *et al.*, 2020) y que su presencia en la solución de nutrientes puede incluso inhibir la absorción de NO_3^- , ya que existe una preferencia del NH_4^+ por parte de algunas plantas como fuente de N (von Wiren *et al.*, 1997). Sin embargo, las diferencias observadas entre los tratamientos, no se reflejaron como mejoras en las variables del crecimiento vegetativo que están fuertemente asociadas a la concentración de N, lo cual se atribuye principalmente al manejo realizado en el riego, el cual fue discutido anteriormente.

En cuanto al N absorbido o recuperado desde el fertilizante (Nr), se observó que los tratamientos no modificaron esta variable. En relación con los resultados obtenidos, en la literatura se informó que, en un huerto productivo de uva de mesa, la fertilización en base a NH_4^+ o NO_3^- no modificó el Nr (Iandolino y Williams, 2014). Aunque, para esta especie también se ha evidenciado que distintos portainjertos pueden absorber de manera preferencial una forma determinada de N, ya que la actividad de los transportadores específicos de NH_4^+ y de NO_3^- , encargados de la absorción de N, puede variar entre los diferentes genotipos de vid sin existir claridad al respecto (Lang *et al.*, 2018). Por ende, teniendo en cuenta el componente estadístico presente en el análisis de este estudio, el cual fue mencionado anteriormente y la divergencia en los antecedentes, aún no existen resultados consistentes en relación a esta variable.

Por otra parte, los análisis del Nr evidenciaron que los tratamientos no modificaron el reparto de N hacia los órganos de las vides y que la mayor parte del Nr se localizó en la raíz. Estudios realizados en vid, han informado que la restricción del riego produce una mayor acumulación de N en las raíces y un menor reparto de este mineral hacia las estructuras anuales (Holzapfel *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2016), ya que bajo estas condiciones el crecimiento aéreo disminuye y con ello se reduce la demanda de N, lo que genera un cambio de ruta en la asignación de este mineral, favoreciendo su acumulación en las raíces (Wery, 2005; Gonzalez-Dugo *et al.*, 2010). Por otro lado, también es importante tener en cuenta que las plantas fueron muestreadas al finalizar la temporada de crecimiento, donde el N se distribuye principalmente a órganos de almacenamiento (Zapata *et al.*, 2004b; Holzapfel *et al.*, 2015).

La EUF estimada en las plantas que recibieron la fertilización nitrogenada, fue similar entre los tratamientos, cuyo promedio fue de 0,75%. En vides injertadas, menores a un año Walker *et al.* (2022) informaron que en plantas con una biomasa seca inicial de 106 g y fertilizadas durante toda la temporada de crecimiento la EUF fue de 11,8%. Mientras que Brunetto *et al.* (2006) indicaron que, en plantas con una biomasa seca inicial de 7 g, la EUF fue de 7,62% a los 42 después del trasplante y esta aumentó de forma progresiva hasta 35,14% luego de 63 días, ya que la capacidad de absorción de las plantas aumenta con su crecimiento. Considerando que en este estudio la biomasa de las plantas en promedio fue de 1,05 g y que el suministro de N fue de 1,7 g por planta, la baja EUF se explica por la capacidad de absorción de las plantas relativa a su peso. Lo anterior, da cuenta de que solo una pequeña parte del fertilizante nitrogenado fue absorbida, y en este sentido, hubiera sido interesante utilizar plantas con mayor crecimiento para evaluar posibles efectos considerando que la absorción es mayor. Por otra parte, los resultados corroboran como ya se ha informado ampliamente que para maximizar la EUF, independiente de la fuente de N utilizada, es importante ajustar la dosis de N en base a la demanda, la cual está dada por el crecimiento.

En relación con la lixiviación de N, los resultados demostraron que la adición del extracto de orujo de uva en el fertilizante amoniacal redujo la lixiviación de NO_3^- con igual eficacia que el DMPP, la cual fue un 70% menor en comparación a la fertilización nítrica. Un efecto semejante se evidenció con la aplicación de extracto de orujo de aceituna, el cual disminuyó la lixiviación del NO_3^- con igual eficacia que un IN sintético (DCD) (Di Martino *et al.*, 2021). Por otro lado, se ha identificado que compuestos fenólicos pertenecientes a las catequinas redujeron la tasa de nitrificación con una efectividad similar a la de un IN sintético (nitrapyrin) (Erickson *et al.*, 2000) por lo que el efecto del extracto de orujo de uva estaría dado por su composición química, específicamente por presencia de estos compuestos fenólicos. Los resultados sugieren la aplicación de N en forma de NH_4^+ junto con el extracto de orujo de uva como un potencial manejo de fertilización, capaz de reducir la lixiviación de NO_3^- en la producción agrícola.

Por último, si bien los resultados de este estudio evidenciaron que los IN pueden reducir la pérdida de N por lixiviación en forma de NO_3^- , como ya ha sido ampliamente demostrado (Martínez-Alcántara *et al.*, 2013; De Paulo *et al.*, 2021; Qiao *et al.*, 2021), con ello se esperaba mejorar los niveles de N en las plantas, sin embargo, a pesar de que la fertilización amoniacal aumentó la concentración foliar de N, no se detectaron diferencias en variables que están fuertemente asociadas al N como en el crecimiento vegetativo y en el contenido relativo de clorofila foliar. Por otra parte, es importante considerar el contexto del

experimento, donde el establecimiento del estudio se realizó a mediados de verano donde las plantas estuvieron expuestas a la temperatura y humedad relativa ambiental (Apéndice 9 y 10) junto con un manejo de riego limitado. Dichas condiciones son desfavorables en el crecimiento de las plantas que provienen de la micropropagación teniendo en cuenta que son producidas bajo condiciones controladas en cámaras de crecimiento (Bigger, 2010; Gago *et al.*, 2010), por lo que los resultados obtenidos se enmarcan bajo las mencionadas circunstancias.

Por otra parte, nuevos hallazgos e implicancias pueden ser encontrados mediante uso de plantas con mayor crecimiento y desarrollo como material biológico junto con un seguimiento de mayor duración experimental.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las cuales se realizó este estudio, es posible concluir que:

Durante el periodo experimental, la fertilización amoniacal aumenta la concentración foliar de N en comparación a la fertilización nítrica, sin embargo, la aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ junto con el extracto de orujo de uva no afecta el crecimiento vegetativo de vides de la variedad Cabernet Sauvignon.

La fertilización en base a NH_4^+ reduce la lixiviación de NO_3^- en comparación a la fertilización nítrica. Este efecto es potenciado con la aplicación conjunta de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e inhibidores de la nitrificación, donde el extracto de orujo de uva es capaz de disminuir la concentración de nitrato de forma análoga al DMPP.

LITERATURA CITADA

- Abalos, D., S. Jeffery, A. Sanz-Cobena, G. Guardia, and A. Vallejo. 2014. Meta-analysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 189: 136–144.
- Beeckman, F., H. Motte, and T. Beeckman. 2018. Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. *Current Opinion in Biotechnology* 50: 166–173.
- Bigger, B.B. 2010. Micropropagation and acclimatization of “Norton” grapevine (*Vitis aestivalis*). 35. Degree of Master of Science. University of Nebraska, EEUU, Nebraska, Lincoln.
- Boeykens, S.P., M.N. Piol, L. Samudio, A.B. Saralegui, and C. Vázquez. 2017. Eutrophication decrease: Phosphate adsorption processes in presence of nitrates. *Journal of Environmental Management* 203: 888–895.
- Brunetto, G., J. Kaminski, G.W. de Melo, and D.R. dos Santos. 2006. Recovery and distribution of supplied nitrogen to young grapevines. *Brazilian Agricultural Research's* 41(8): 1299–1304.
- Canfield, D.E., A.N. Glazer, and P.G. Falkowski. 2010. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science* 330(6001): 192–196.
- Carmo-Silva, A.E., M.A. Gore, P. Andrade-Sanchez, A.N. French, D.J. Hunsaker and M.E., Salvucci. 2012. Decreased CO₂ availability and inactivation of Rubisco limit photosynthesis in cotton plants under heat and drought stress in the field. *Environmental and Experimental Botany* 83: 1–11.
- Castaldi, S., A. Carfora, A. Fiorentino, A. Natale, A. Messere, F. Miglietta, and M. Cotrufo. 2009. Inhibition of net nitrification activity in a Mediterranean woodland: possible role of chemicals produced by *Arbutus unedo*. *Plant and Soil* 315(1): 273–283.
- Conradie, W.J. 1992. Partitioning of Nitrogen in Grapevines during Autumn and the Utilisation of Nitrogen Reserves during the Following Growing Season. *South African Journal of Enology and Viticulture* 13(1): 45–51.
- Cruz, C., A.F.M. Bio, M.D. Domínguez-Valdivia, P.M. Aparicio-Tejo, C. Lamsfus, and M.A. Martins-Louçao. 2006. How does glutamine synthetase activity determine plant tolerance to ammonium? *Planta* 223(5): 1068–1080.
- De Paulo, E.N. de, E.N. de Paulo, F.S. Galindo, F.H.S. Rabêlo and J.J. Frazão. 2021. Nitrification inhibitor 3,4-Dimethylpyrazole phosphate improves nitrogen recovery and accumulation in cotton plants by reducing NO₃⁻ leaching under ¹⁵N-urea fertilization. *Plant and Soil* 1: 1-4.

- Di Martino, C., G. Palumbo, E. Di Iorio, C. Colombo, and T.W. Crawford. 2021. Effects of olive mill wastewater and two natural extracts as nitrification inhibitors on activity of nitrifying bacteria, soil nitrate leaching loss, and nitrogen metabolism of celery (*Apium graveolens* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* 40(5): 1922–1938.
- Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada y C.W. Robledo. 2018. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencias InfoStat, FCA, Universidad de Córdoba, Argentina. 336 p.
- Erickson, A.J., R.S. Ramsewak, A.J. Smucker, and M.G. Nair. 2000. Nitrification inhibitors from the roots of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(12): 6174–6177.
- Gago, J., M. Landín, and P.P. Gallego. 2010. A neurofuzzy logic approach for modeling plant processes: A practical case of in vitro direct rooting and acclimatization of *Vitis vinifera* L. *Plant Science* 179(3): 241–249.
- Gilsanz, C., D. Báez, T.H. Misselbrook, M.S. Dhanoa, and L.M. Cárdenas. 2016. Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 216: 1–8.
- González-Centeno, M.R., M. Jourdes, A. Femenia, S. Simal, and C. Rosselló. 2012. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking by products from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(48): 11850–11858.
- Gonzalez-Dugo, V., J.L. Durand, and F. Gastal. 2010. Water deficit and nitrogen nutrition of crops. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30(3): 529–544.
- Granja, F. and J.I. Covarrubias. 2018. Evaluation of acidifying nitrogen fertilizers in avocado trees with iron deficiency symptoms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 18(1): 157–172.
- Hach, D.R. 2005. DR5000 Spectrophotometer procedures manual. 2nd Edition. Hach Company. Germany. 846 p.
- Hafeez, B., Y.M. Khanif, and M. Saleem. 2013. Role of zinc in plant nutrition: A review. *Journal of Experimental Agriculture International*: 374–391.
- Holzappel, B.P., J. Watt, J.P. Smith, and K. Suklje. 2015. Effects of timing of N application and water constraints on N accumulation and juice amino N concentration in 'Chardonnay' grapevines. *Vitis* 54: 203–211.
- IAEA (International Atomic Energy Agency). 2001. Applications of nuclear techniques in soil fertility and plant nutrition studies. Training Course Series N°14. Viena, Austria.

- Iandolino, A.B., and L.E. Williams. 2014. Recovery of ^{15}N labeled fertilizer by *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon: effects of N fertilizer rates and applied water amounts. *American Journal of Enology and Viticulture* 65(2): 189–196.
- Ibacache, G., C. Balbontín, C. González, J. Puelles, P. Abarca y J. Riquelme. 2017. Manual de Producción de Vides Pisqueras. Boletín INIA N°14. Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP) e Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Santiago, Chile
- Keller, M. 2020. Partitioning of assimilates. *The Science of Grapevines*: 149–198.
- Kizildeniz, T., I. Pascual, J.J. Irigoyen, and F. Morales. 2021. Future CO_2 , warming and water deficit impact white and red Tempranillo grapevine: Photosynthetic acclimation to elevated CO_2 and biomass allocation. *Physiologia Plantarum* 172(3): 1779–1794.
- Lang, C.P., N. Merkt, and C. Zörb. 2018. Different nitrogen (N) forms affect responses to N form and N supply of rootstocks and grafted grapevines. *Plant Science* 277: 311–321.
- Lorén F. 2013. Estudio de la fertirrigación nitrogenada con el inhibidor de la nitrificación 3,4 Dimetilpirazol fosfato (DMPP) en melocotonero ‘Miraflores’. 266 p. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza, Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Zaragoza, España.
- Loulakakis, K.A., J.F. Morot-Gaudry, C.N. Velanis, D.S. Skopelitis, P.N. Moschou, B. Hirel, and K.A. Roubelakis-Angelakis. 2009. Advancements in nitrogen metabolism in grapevine. *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology*. Springer. 161–205.
- Ludewig, U., B. Neuhäuser, and M. Dynowski. 2007. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters* 581(12): 2301–2308.
- Martínez, F., P. Palencia, C.M. Weiland, D. Alonso, and J.A. Oliveira. 2015. Influence of nitrification inhibitor DMPP on yield, fruit quality and SPAD values of strawberry plants. *Scientia Horticulturae* 185: 233–239.
- Martínez-Alcántara, B., A. Quiñones, C. Polo, E. Primo-Millo, and F. Legaz. 2013. Use of nitrification inhibitor DMPP to improve nitrogen uptake efficiency in citrus trees. *Journal of Agriculture Science* 5(2): 1.
- Molina, J., and J.I. Covarrubias. 2019. Influence of nitrogen on physiological responses to bicarbonate in a grapevine rootstock. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 19(2): 305–312.
- Mulidzi, A.R., C.E. Clarke, and P.A. Myburgh. 2016. Design of a pot experiment to study the effect of irrigation with diluted winery wastewater on four differently textured soils. *Water SA* 42(1): 20–25.
- Müller, M.C., J.P. Smith, A.C. Clark, and B.P. Holzappel. 2016. Effect of N and water supply on xylem composition in “Semillon” and “Riesling”. *Acta Horticulturae* 1136: 185–192.

- Osorio, R., C. Cáceres, and J.I. Covarrubias. 2020. Vegetative and Physiological Responses of “Emerald” Blueberry to Ammoniacal Sources with a Nitrification Inhibitor. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 20(2): 507–515.
- Patterson, K., T. Cakmak, A. Cooper, I. Lager, A.G. Rasmusson, and M.A. Escobar. 2010. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant, Cell and Environment* 33(9): 1486–1501.
- Pérez-Harguindeguy, N., S. Díaz, E. Garnier, S. Lavorel, H. Poorter, et al. 2016. Corrigendum to: New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 64(8): 715.
- Petruzzi, H.J., N.P. Stritzler, C.M. Ferri, J.H. Pagella, and C.M. Rabotnikof. 2005. Determinación de materia seca por métodos indirectos: utilización del horno a microondas. *Boletín de divulgación Técnica* 88: 1–11.
- Qiao, C., S. Mia, Y. Wang, J. Hou, and B. Xu. 2021. Assessing the Effects of Nitrification Inhibitor DMPP on Acidification and Inorganic N Leaching Loss from Tea (*Camellia sinensis* L.) Cultivated Soils with Increasing Urea–N Rates. *Sustainability* 13(2): 2-8.
- Quan, Z., S. Li, X. Zhang, F. Zhu, P. Li, R. Sheng, X. Chen, LM. Zhang, JZ. He, W. Wei, and Y. Fang. 2020. Fertilizer nitrogen use efficiency and fates in maize cropping systems across China: Field ¹⁵N tracer studies. *Soil and Tillage Research*. 197: 104498
- Santibañez, F., P. Santibañez, C. Caroca y P. González. 2017. Atlas agroclimático de Chile. Estado actual y tendencias del clima. Tomo III: Regiones de Valparaíso, Metropolitana, O’Higgins y Maule. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas: FIA, Santiago, Chile.
- Savi, T., A. García González, J.C. Herrera, and A. Forneck. 2019. Gas exchange, biomass and non-structural carbohydrates dynamics in vines under combined drought and biotic stress. *BMC Plant Biology* 19(1): 408.
- Subbarao, G.V., K. Nakahara, M.P. Hurtado, H. Ono, D.E. Moreta, A.F. Salcedo, A.T. Yoshihashi, T. Ishikawa, M. Ishitani, M. Ohnishi-Kameyama, and M. Yoshida. 2009. Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(41): 17302–17307.
- Vilarrasa-Nogué, M., M.R. Teira-Esmatges, M. Pascual, J.M. Villar, and J. Rufat. 2020. Effect of N dose, fertilisation duration and application of a nitrification inhibitor on GHG emissions from a peach orchard. *The Science of the Total Environment*. 699: 134042.
- von Wirén, N., S. Gazzarrini, and W.B. Frommer. 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant Soil* 196(2): 191–199.

- Walker, H.V., N.D. Swarts, J.E. Jones, and F. Kerslake. 2022. Nitrogen use efficiency, partitioning, and storage in cool climate potted Pinot Noir vines. *Scientia Horticultura* 291: 110603.
- Wery, J. 2005. Differential effects of soil water deficit on the basic plant functions and their significance to analyze crop responses to water deficit in indeterminate plants. *Australian Journal of Agricultural Research* 56(11): 1201–1209.
- Xiong, Z.Q., T.Q. Huang, Y.C. Ma, G.X. Xing, and Z.L. Zhu. 2010. Nitrate and ammonium leaching in variable and permanent charge paddy soils. *Pedosphere* 20(2): 209–216.
- Xu, G., X. Fan, and A.J. Miller. 2012. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 63: 153–182.
- Yu, Q., J. Ma, P. Zou, H. Lin, W. Sun, J. Yin, and J. Fu. 2015. Effects of combined application of organic and inorganic fertilizers plus nitrification inhibitor DMPP on nitrogen runoff loss in vegetable soils. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1): 472–481.
- Zapata, C., E. Deléens, S. Chaillou, and C. Magné. 2004a. Mobilization and distribution of starch and total N in two grapevine cultivars differing in their susceptibility to shedding. *Functional Plant Biology* 31(11): 1127–1135.
- Zapata, C., E. Deléens, S. Chaillou, and C. Magné. 2004b. Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology* 161(9):1031-40.

APÉNDICES

Apéndice 1. Análisis de los factores tratamiento y tiempo para la variable largo de brotes en vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Factor Tiempo			Factor Tratamiento	
Fecha	Largo de brote (cm)		Tratamiento	Largo de brote (cm)
08-02-21	11,31	e	Control	14,62
22-02-21	12,57	d	Ca(NO ₃) ₂	13,65
01-03-21	12,81	d	(NH ₄) ₂ SO ₄	13,53
08-03-21	13,93	c	(NH ₄) ₂ SO ₄ + DMPP	13,24
15-03-21	14,34	bc	(NH ₄) ₂ SO ₄ + orujo	13,19
24-03-21	14,50	abc		
01-04-21	15,67	ab		
12-04-21	15,02	a		
Error estándar	0,39			0,81
Significancia	p < 0,0001			ns
Tiempo*Tratamiento			ns	

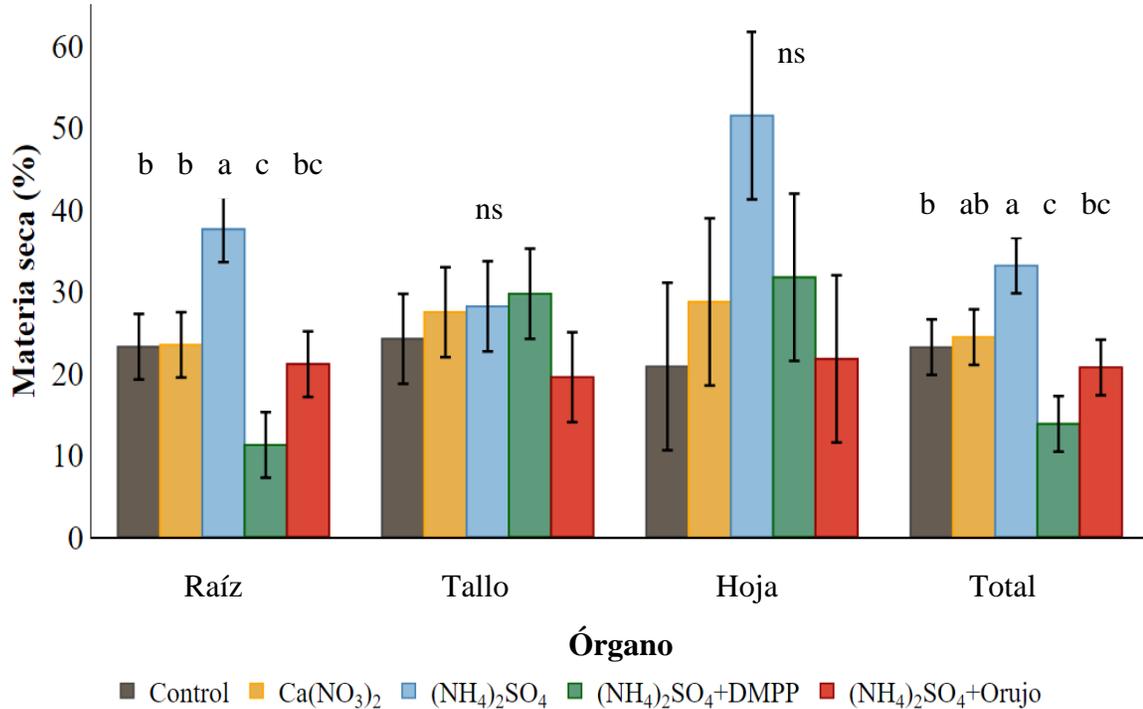
Los datos representan la media de cada repetición. Medias con la misma letra verticalmente no fueron significativamente diferentes según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). Ns: no significativo.

Apéndice 2. Peso fresco de plantas de vid cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	Peso fresco (g)			
	Raíz	Tallo	Hoja	Total
Control	3,42	0,65	0,48	4,55
Ca(NO ₃) ₂	3,85	0,55	0,42	4,81
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,80	0,42	0,15	3,37
(NH ₄) ₂ SO ₄ + DMPP	4,49	0,51	0,52	5,52
(NH ₄) ₂ SO ₄ + orujo	4,38	0,50	0,62	5,51
Error estándar	0,72	0,08	0,16	0,92
Significancia	ns	ns	ns	ns

Los datos representan la media de cada tratamiento. ns: no significativo según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$).

Apéndice 3. Porcentaje de materia seca en plantas de vid cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.



Medias con distinta letra en sentido horizontal fueron significativamente diferentes según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$). ns.: no significativo.

Apéndice 4. N derivado del fertilizante (%) y concentración de N (%) en órganos de vides cv Cabernet Sauvignon con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	Ndf (%)			Nds (%)		
	Raíz	Tallo	Hoja	Raíz	Tallo	Hoja
Ca(NO ₃) ₂	50,05	45,16 d	45,79	49,96	54,85 a	54,21
(NH ₄) ₂ SO ₄	56,37	63,12 a	57,51	43,63	36,89 d	42,49
(NH ₄) ₂ SO ₄ +DMPP	61,19	52,52 c	60,17	38,81	47,48 b	39,83
(NH ₄) ₂ SO ₄ +orujo	62,82	55,13 b	56,56	37,18	44,87 c	43,44
Error estándar	4,35	0,87	3,39	4,35	0,87	3,89
Significancia	ns	p<0,0001	ns	ns	p<0,0001	ns

Los datos representan la media de cada tratamiento. Medias con distinta letra en sentido vertical fueron significativamente diferentes según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$) ns: no significativo.

Apéndice 5. Concentración de NH_4^+ (mg L^{-1}) proveniente del lixiviado del sustrato tratado con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

Tratamiento	NH_4^+ (mg L^{-1})
Control	0,10
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,23
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,13
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + DMPP	0,20
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + orujo	0,33
Error estándar	0,08
Significancia	ns

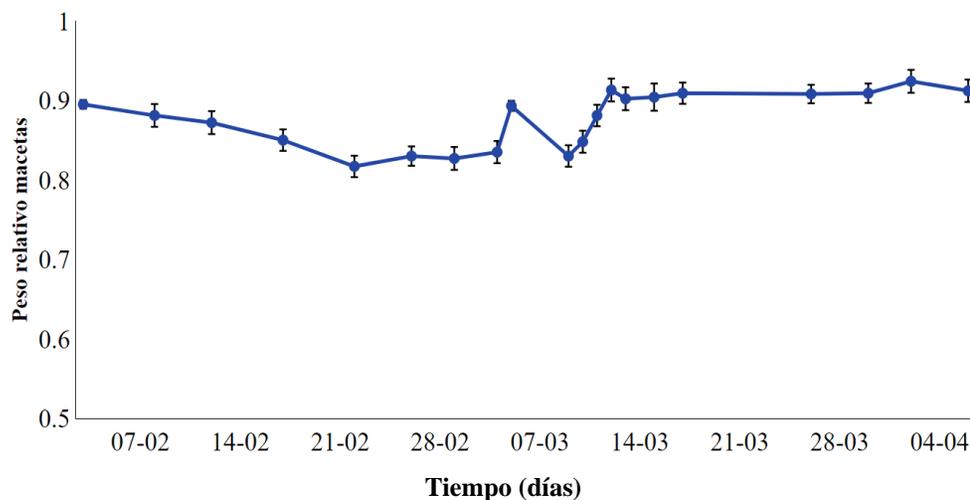
Los datos representan la media de cada tratamiento. ns: no significativo según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$).

Apéndice 6. pH proveniente del lixiviado del sustrato tratado con aplicaciones de diferentes fuentes de N, con y sin aplicación de IN.

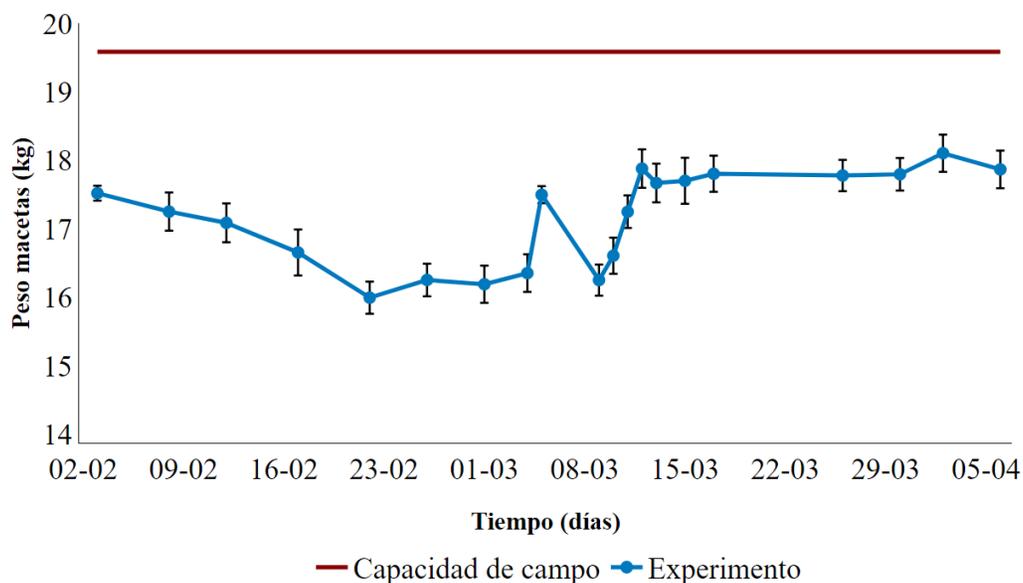
Tratamiento	pH
Control	8,09 a
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	7,91 b
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7,79 c
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + DMPP	7,69 cd
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + orujo	7,62 d
Error estándar	0,05
Significancia	$p < 0,0001$

Los datos representan la media de cada tratamiento. ns: no significativo según la Prueba LSD Fisher ($\alpha = 0,05$).

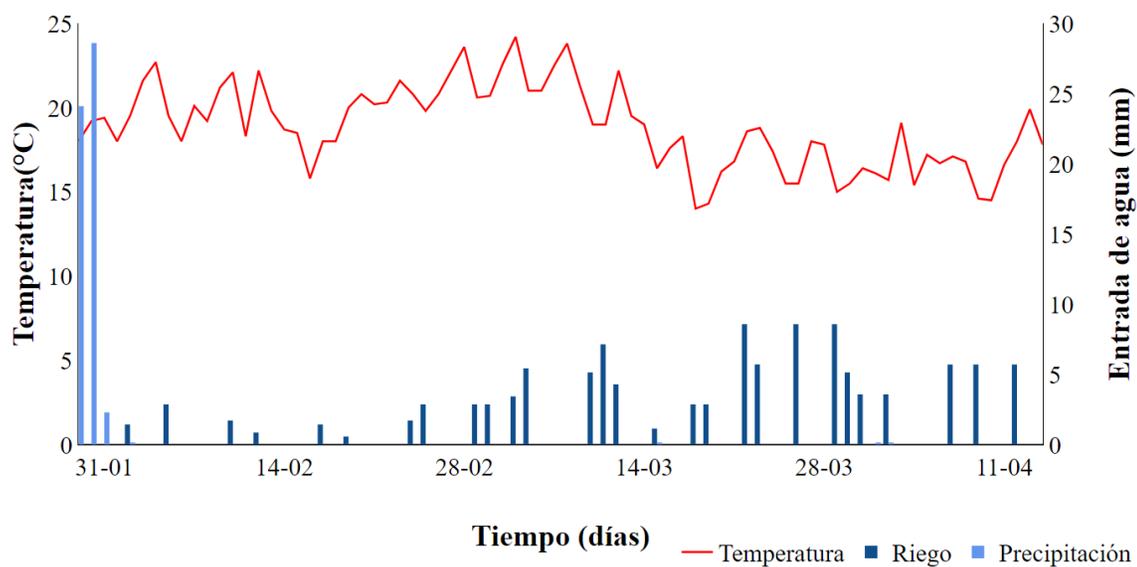
Apéndice 7. Peso de las macetas relativo a la capacidad de campo



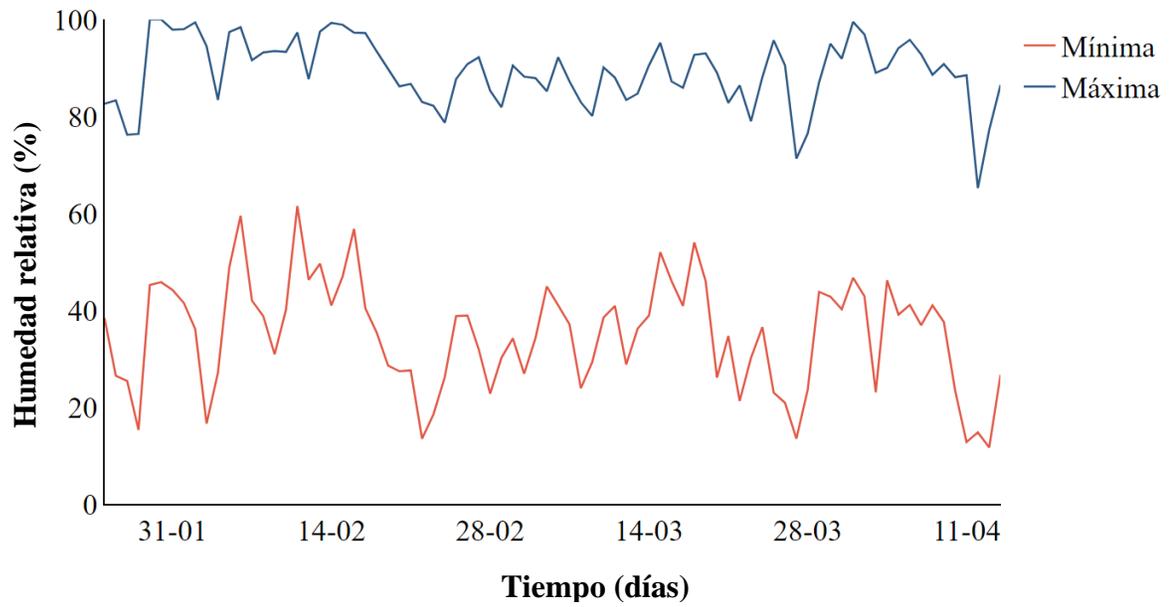
Apéndice 8. Peso determinado de las macetas a capacidad de campo y peso de las macetas mantenido durante el experimento.



Apéndice 9. Media diaria de los datos de temperatura (°C), riego (mm) y precipitación (mm) registrados durante el periodo experimental (2021).



Apéndice 10. Porcentaje de humedad relativa mínima y máxima registrados durante el periodo experimental (2021).



ANEXOS

Anexo 1. Niveles nutricionales foliares para vid en estado de envero.

Nutriente	Robinson, 2006			INIA-INDAP, 2017		
	Bajo	Normal	Alto	Bajo	Normal	Alto
Macronutrientes						
(%)						
N	<2,1	2,2-4,0	<5	<0,8	1,0-1,5	<2,0
P	<0,12	0,15-0,40	<0,30	<0,08	0,12-0,30	<0,4
K	<0,7	0,8-1,6	<1,8	<0,8	1,2-1,5	<1,8
Ca		1,8-3,2		<1,2	1,5-2,5	<3,0
Mg	<0,3	0,3-0,6		<0,14	0,25-0,60	<0,8
Micronutrientes						
(mg kg ⁻¹)						
B	<29	30-100	<200	<25	30,0-60,0	<300
Fe				<40	50-150	<200
Zn	<35	30-60		<20	25,0-50,0	<100
Mn	<25	30-200		<20	25,0-50,0	<250
Cu	<10	10-300		<4	5,0-20,0	<25

Elaboración propia a partir de Robinson, 2006 e Ibacache *et al.*, 2017.