



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**ESTIMACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE
NITRÓGENO MEDIANTE MÉTODOS
NO DESTRUCTIVOS EN LECHUGA,
ALBAHACA Y ARÚGULA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**

**PRESENTA:
M.C. Rodrigo Omar Mendoza Tafolla**

**CODIRECTORES DE TESIS:
Dr. Porfirio Juárez López
Dr. Ronald Ernesto Ontiveros Capurata**



Cuernavaca, Morelos

Noviembre de 2021

ESTIMACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE NITRÓGENO MEDIANTE MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS EN LECHUGA, ALBAHACA Y ARÚGULA

Tesis realizada por **M.C. Rodrigo Omar Mendoza Tafolla** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL

COMITÉ REVISOR

Codirector: _____
Dr. Porfirio Juárez López

Codirector: _____
Dr. Ronald Ernesto Ontiveros Capurata

Revisor: _____
Dr. Irán Alia Tejacal

Revisor: _____
Dr. Víctor López Martínez

Revisor: _____
Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Revisor: _____
Dr. Manuel Sandoval Villa

Revisor: _____
Dr. Gelacio Alejo Santiago

Revisor: _____
Dr. Dagoberto Guillén Sánchez

Cuernavaca, Morelos, noviembre de 2021

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

A la beca otorgada (473176) por **CONACyT** para la realización del Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos incluida en el padrón Nacional de Posgrado



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) por permitirme estudiar en sus instalaciones y crecer de forma personal y profesional.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) por darme la oportunidad de estar en ella y brindarme los conocimientos para mi formación.

Al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua por abrirme las puertas y permitirme estudiar y tomar clases de percepción remota.

Al Dr. Porfirio Juárez López y al Dr. Ronald Ernesto Ontiveros Capurata por confiar en mí para la realización de este proyecto y permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A mis revisores, el Dr. Irán Alía Tejacal, el Dr. Víctor López Martínez, el Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres, el Dr. Dagoberto Guillén Sánchez, el Dr. Manuel Sandoval Villa y el Dr. Gelacio Alejo Santiago quienes con sus acertadas observaciones y valiosas sugerencias enriquecieron este trabajo de tesis.

A la M.C. Elizabeth Calixtro López por apoyarme en todo momento y darme ánimos para concluir mis estudios.

Al Ing. Luis Ángel Hernández Cruz por creer en mí, a veces más que yo mismo.

Agradezco a TODOS y TODAS las personas que (son demasiadas y espero no haber omitido a nadie) contribuyeron moral, económico, social, cultural, médica y científicamente durante esta TAFO-AVENTURA llamada doctorado, sin su apoyo tal vez no se hubiese logrado esto, ¡¡¡por lo cual MUCHAS GRACIAS y que el poder de la fuerza los acompañe siempre!!!

DEDICATORIAS

A MI FAMILIA

A mi madre: Gracias por todo tu esfuerzo que a lo largo de toda mi vida siempre me has apoyado y estado conmigo

A mi esposa: Por tu amor, amistad y complicidad en los momentos buenos y no tan buenos, y siempre creer en mí.

A amor de mi vida... Diego Rajesh Mendoza Calixtro

A todas las personas y amigos que han estado durante todo el camino a mi lado

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
INTRODUCCIÓN GENERAL	11
OBJETIVO	14
HIPÓTESIS	15
REFERENCIAS GENERALES	16
CAPÍTULO I. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CLOROFILA DE LECHUGA ROMANA CON LECTURAS SPAD Y atLEAF	
Resumen	22
Introducción	23
Materiales y métodos	25
Resultados y discusión	27
Conclusiones	31
Referencias	32
CAPÍTULO II. CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CLOROFILA EN LECHUGA ROMANA UTILIZANDO ÍNDICES ESPECTRALES DE IMÁGENES DIGITALES RGB	
Resumen	37
Introducción	38
Materiales y métodos	40
Resultados y discusión	45
Conclusiones	54
Referencias	55
CAPÍTULO III. RELACIONES ENTRE LAS LECTURAS DE MEDIDORES PORTÁTILES DE CLOROFILA Y LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA, NITRÓGENO Y MATERIA AÉREA FRESCA EN ALBAHACA 'NUFAR'	
Resumen	61
Introducción	62
Materiales y métodos	64

Resultados y discusión	66
Conclusiones	74
Referencias	75
CAPÍTULO IV. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y CLOROFILA EN ALBAHACA 'NUFAR' MEDIANTE ÍNDICES ESPECTRALES RGB	
Resumen	79
Introducción	80
Materiales y métodos	81
Resultados y discusión	86
Conclusiones	98
Referencias	99
CAPÍTULO V. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y NITRÓGENO MEDIANTE MEDIDORES PORTÁTILES NO DESTRUCTIVOS EN ARÚGULA (<i>Eruca sativa</i> Mill.)	
Resumen	108
Introducción	108
Materiales y métodos	110
Resultados y discusión	112
Conclusiones	119
Referencias	119
CAPÍTULO VI. ESTIMACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y NITRÓGENO EN ARÚGULA (<i>Eruca vesicaria</i> L.) MEDIANTE TÉCNICAS NO DESTRUCTIVAS	
Resumen	124
Introducción	124
Materiales y métodos	127
Resultados y discusión	131
Conclusiones	145
Referencias	146

CAPÍTULO VII. ANÁLISIS COMPARATIVO DE MÉTODOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO EN CULTIVOS HORTÍCOLAS

Introducción	154
Métodos destructivos	156
Métodos no destructivos	156
Comparación de métodos	162
Conclusiones	168
Referencias	169
CONCLUSIONES GENERALES	174
ANEXOS	175

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO II. CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CLOROFILA EN LECHUGA ROMANA UTILIZANDO ÍNDICES ESPECTRALES DE IMÁGENES DIGITALES RGB

Cuadro 1. Índices espectrales calculados a partir de imágenes digitales RGB (rojo, verde y azul)	43
Cuadro 2. Respuesta a diferentes niveles de $\text{NO}_3\text{-N}$ a los 42 días después del trasplante (ddt) en lechuga romana	45
Cuadro 3. Matriz de correlación entre índices espectrales y valores de datos de referencia	46
Cuadro 4. Coeficientes de regresión lineal y error estándar para la relación entre la concentración de clorofila y los índices espectrales	48
Cuadro 5. Coeficientes de regresión lineal para la relación entre la concentración de nitrógeno y los índices espectrales	50
Cuadro 6. Coeficientes de regresión exponencial para la relación entre el área foliar y los índices espectrales	52

CAPÍTULO III. RELACIONES ENTRE LAS LECTURAS DE MEDIDORES PORTÁTILES DE CLOROFILA Y LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA, NITRÓGENO Y MATERIA AÉREA FRESCA EN ALBAHACA 'NUFAR'

Cuadro 1. Lecturas de SPAD, atLEAF, MC 100, materia aérea fresca y concentraciones de nitrógeno y clorofila en albahaca 'Nufar' a los 42 ddt (días después del trasplante)	67
Cuadro 2. Correlaciones, ecuaciones de regresión y coeficientes para lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 con la concentración de clorofila en albahaca 'Nufar'	68
Cuadro 3. Correlaciones, ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación para lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 con la concentración de nitrógeno en albahaca 'Nufar'	69

Cuadro 4. Correlaciones, ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación para las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 con la materia aérea fresca en albahaca 'Nufar' 71

Cuadro 5. Correlaciones, ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación para la relación entre las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 en albahaca 'Nufar' 72

CAPÍTULO IV. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y CLOROFILA EN ALBAHACA 'NUFAR' MEDIANTE ÍNDICES ESPECTRALES RGB

Cuadro 1. Índices espectrales calculados a partir de imágenes RGB 85

Cuadro 2. Matriz de correlación entre índices espectrales y valores de datos de referencia en albahaca 'Nufar'. 88

Cuadro 3. Índices espectrales utilizados para estimar N, clorofila y área foliar de los tratamientos de NO_3^- aplicados a las plantas de albahaca 'Nufar' 90

CAPÍTULO V. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y NITRÓGENO MEDIANTE MEDIDORES PORTÁTILES NO DESTRUCTIVOS EN ARÚGULA (*Eruca sativa* Mill.)

Cuadro 1. Lecturas SPAD, atLEAF, MC-100 biomasa fresca y concentraciones de N y clorofila en arúgula a los 42 ddt 113

Cuadro 2. Correlaciones, ecuaciones de regresión, y coeficientes de correlación para lecturas SPAD, atLEAF, MC-100 biomasa fresca, concentraciones de N y clorofila en arúgula 114

CAPÍTULO VI. ESTIMACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y NITRÓGENO EN ARÚGULA (*Eruca vesicaria* L.) MEDIANTE TÉCNICAS NO DESTRUCTIVAS

Cuadro 1. Índices espectrales calculados a partir de imágenes RGB 130

Cuadro 2. Lecturas SPAD, atLEAF, MC-100, cantidad de materia fresca y concentraciones de N y clorofila en arúgula a los 42 ddt	133
Cuadro 3. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de la concentración de clorofila y las lecturas de los medidores portátiles e índices espectrales en plantas de arúgula 'Wild rocket'.	135
Cuadro 4. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de la concentración de N y los índices espectrales en plantas de arúgula 'Wild rocket'	138
Cuadro 5. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de área foliar y los índices espectrales en plantas de arúgula 'Wild rocket'	140
Cuadro 6. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de materia fresca y los índices espectrales en plantas de arúgula 'Wild rocket'	142
Cuadro 7. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de materia seca y los índices espectrales en plantas de arúgula 'Wild rocket'	144

CAPÍTULO VII. ANÁLISIS COMPARATIVO DE MÉTODOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO EN CULTIVOS HORTÍCOLAS

Cuadro 1 distintas técnicas, métodos y/o análisis para la determinación de la concentración de N en el tejido vegetal	167
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CLOROFILA DE LECHUGA ROMANA CON LECTURAS SPAD Y atLEAF

Figura 1. Uso de SPAD (a) y atLEAF (b) para medir la concentración relativa de clorofila en la lechuga romana	26
Figura 2. Vista frontal y vista superior del crecimiento de lechuga romana en función del nivel de N-NO ₃ a 42 DAT	27
Figura 3. Relación entre las lecturas de concentración de nitrógeno y lecturas SPAD y atLEAF en lechuga romana	28
Figura 4. Relación entre la concentración de clorofila y las lecturas SPAD y atLEAF en lechuga romana	29
Figura 5. Relación entre la materia fresca y las lecturas SPAD y atLEAF en lechuga romana	30
Figura 6. Correlación entre las lecturas SPAD y atLEAF en lechuga romana	31

CAPÍTULO II. CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CLOROFILA EN LECHUGA ROMANA UTILIZANDO ÍNDICES ESPECTRALES DE IMÁGENES DIGITALES RGB

Figura 1. Proceso para generar ortomosaicos a escala y modelos 3D	42
Figura 2. Proceso de análisis espectral de ortomosaicos escalados	44
Figura 3. Correlación entre la concentración de clorofila y los índices espectrales (NGRDI, ExG y <i>g</i>) a 42 ddt (A) y los últimos 21 ddt (B)	48
Figura 4. Correlación entre la concentración de nitrógeno (N) y los índices espectrales (NGRDI, ExG y <i>g</i>) a 42 DAT (A) y los últimos 21 DAT (B)	51
Figura 5. Correlación entre la concentración de área foliar y los índices espectrales (NGRDI, ExG y <i>g</i>) a 42 ddt (A) y los últimos 21 ddt (B)	53

CAPÍTULO III. RELACIONES ENTRE LAS LECTURAS DE MEDIDORES PORTÁTILES DE CLOROFILA Y LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA, NITRÓGENO Y MATERIA AÉREA FRESCA EN ALBAHACA 'NUFAR'

- Figura 1. Uso de SPAD (a), atLEAF (b) y MC-100 (c) para medir la concentración relativa de clorofila en albahaca 'Nufar' 65
- Figura 2. Vista frontal del crecimiento de albahaca 'Nufar' en función del nivel de $\text{NO}_3\text{-N}$ a los 42 días después del trasplante 66
- Figura 3. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 con la concentración de clorofila en albahaca 'Nufar' 69
- Figura 4. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 con la concentración de nitrógeno en albahaca 'Nufar' 70
- Figura 5. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 con la materia aérea fresca en albahaca 'Nufar' 71
- Figura 6. Correlación entre los medidores portátiles SPAD, atLEAF y MC 100 en albahaca 'Nufar'. a) relación entre lecturas SPAD con atLEAF y MC 100; y b) relación entre lecturas atLEAF y MC-100 73

CAPÍTULO IV. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y CLOROFILA EN ALBAHACA 'NUFAR' MEDIANTE ÍNDICES ESPECTRALES RGB

- Figura 1. Etapas del proceso de adquisición y procesamiento de imágenes de albahaca 'Nufar' 83
- Figura 2. Relaciones entre la concentración de N, concentración de clorofila y área foliar con los índices espectrales NGRDI, RI y CIVE calculados a partir de imágenes RGB de albahaca 'Nufar' 93
- Figura 3. Relación entre el N de la muestra obtenido en laboratorio y el N estimado a partir de los índices NGRDI, RI y CIVE en albahaca 'Nufar' 95
- Figura 4. Relación entre la clorofila de la muestra obtenida en laboratorio y el N estimado a partir de los índices NGRDI, RI y CIVE en albahaca 'Nufar' 96
- Figura 5. Relación entre el área foliar de la muestra obtenida en laboratorio y el N estimado a partir de los índices NGRDI, RI y CIVE en albahaca 'Nufar' 97

Figura 6. Relación entre los índices NGRDI, RI y CIVE obtenidos de imágenes RGB de albahaca 'Nufar'. A) correlación entre el índice NGRDI con los índices RI y CIVE; B) correlación entre el índice RI con el índice CIVE 98

CAPÍTULO V. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y NITRÓGENO MEDIANTE MEDIDORES PORTÁTILES NO DESTRUCTIVOS EN ARÚGULA (*Eruca sativa* Mill.)

Figura 1. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 vs. la concentración de clorofila en arúgula 115

Figura 2. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 con la concentración de nitrógeno en arúgula 116

Figura 3. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 con la materia aérea fresca en arúgula. 117

Figura 4. Correlación entre los medidores portátiles SPAD, atLEAF y MC-100 en arúgula. a) relación entre lecturas SPAD con atLEAF y MC-100 y b) relación entre lecturas atLEAF y MC-100. 118

CAPÍTULO VI. ESTIMACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y NITRÓGENO EN ARÚGULA (*Eruca vesicaria* L.) MEDIANTE TÉCNICAS NO DESTRUCTIVAS

Figura 1. Proceso para determinar las correlaciones entre las variables evaluadas y los índices espectrales RGB en arúgula 'Wild rocket' 131

Figura 2. Relación entre la clorofila estimada por los métodos no destructivos con la clorofila de la muestra obtenida en laboratorio de plantas de arúgula 'Wild rocket'. A) correlación con los medidores portátiles SPAD, atLEAF y MC-100; B) correlación con los índices espectrales NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G 136

Figura 3. Relación entre el N estimado por los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G con el N de la muestra obtenido en laboratorio de plantas de arúgula 'Wild rocket' 138

Figura 4. Relación entre el área foliar estimada por los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G con el área foliar de la muestra obtenida en laboratorio de plantas de arúgula 'Wild rocket' 140

Figura 5. Relación entre la materia fresca estimada por los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G con la materia fresca de la muestra obtenida en laboratorio de plantas de arúgula 'Wild rocket' 142

Figura 6. Relación entre la materia seca estimada por los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G con la materia seca de la muestra obtenida en laboratorio de plantas de arúgula 'Wild rocket' 144

INTRODUCCIÓN GENERAL

Existen dos técnicas comúnmente utilizadas para estimar la concentración de nutrientes en los tejidos, siendo conocidas como: destructivas y no destructivas. Si bien, Ramírez (2010) mostró que el estado del nitrógeno de la planta puede ser estimado con precisión usando una técnica destructiva; en el que las muestras foliares se analizan mediante procedimientos de laboratorio, esta técnica es generalmente laboriosa, costosa y consume mucho tiempo (Sui *et al.*, 2005). Por el contrario, los métodos no destructivos son rápidos y menos costosos, que varían en complejidad y optimización, pero generalmente son menos precisos. Los métodos no destructivos se basan en análisis de las características espectrales de los tejidos vegetales. Los cloroplastos contienen 70 % del nitrógeno de la hoja (Madakadze y Madakadze, 1999), por lo que la clorofila domina las propiedades de reflectancia y transmitancia de la radiación del espectro visible (Ritchie, 2003). Por lo tanto, el color que refleja la hoja tiene una estrecha relación con el contenido de nitrógeno y el crecimiento vegetativo vigoroso y el color verde oscuro de las hojas son característicos de plantas con un nivel óptimo o excesivo de nitrógeno (Khavari-Nejad *et al.*, 2013).

La cantidad de radiación solar absorbida por una hoja es en función del contenido de pigmentos fotosintéticos. El contenido de clorofila foliar es un indicador del estado fisiológico de las plantas (Filella *et al.*, 1995). La deficiencia de nitrógeno es la falta de clorofila y una baja densidad de clorofila en las hojas de las plantas, esta deficiencia reduce notablemente la clorofila y la concentración de carotenoides en las hojas y cambios de su color (Khavari-Nejad *et al.*, 2013; Boussadia *et al.*, 2010). El contenido de clorofila foliar, que se correlaciona con concentración de nitrógeno foliar, puede servir para predecir los requerimientos de nitrógeno de las plantas (Ali *et al.*, 2012), y una de las herramientas más utilizadas es el estimador de clorofila (SPAD-502, Minolta®). Este dispositivo portátil estima el contenido de clorofila de las hojas y por lo tanto da una indicación de los contenidos de nitrógeno en hojas, ya que el nivel de clorofila foliar está estrechamente correlacionado con la concentración de nitrógeno foliar.

En los últimos años, se ha estado investigando la imagen digital en la industria de la agricultura para el análisis del color de la planta. Las cámaras digitales o escáneres en combinación con computadoras y programas de cómputo apropiados pueden recolectar imágenes de hojas y evaluar su color con relativa facilidad y a un costo razonable. Dispositivos portátiles son adecuados para superficies pequeñas. En general, en la agricultura se han usado poco las cámaras fotográficas, a pesar de que éstas permiten capturar imágenes con resolución razonable en cualquier lugar y que para el análisis de sus imágenes existen plataformas de software (Rasband, 2007), que permiten determinar el área de objetos gráficos en los que se introduce una referencia de tamaño conocido (Motomiya *et al.*, 2009), por lo cual, si se acoplan estos elementos para la medición del área u otros parámetros de crecimiento foliar, se tendrá un sistema portátil, económico y preciso que apoyaría la toma de decisiones, aún en lugares con recursos tecnológicos relativamente limitados.

El análisis de imágenes comprende la generación de estas, la eliminación posterior de elementos indeseables para mejorar la calidad, y finalmente el uso de algoritmos para análisis computarizado (Hansen *et al.*, 2003) por lo que, el diagnóstico por imágenes supone utilizar la imagen para determinar índices (ejemplo: NDVI, IAF, etc.) y correlacionarlos con ciertos factores (ejemplo: nutrición, temperatura, etc.) (Rasband, 2007). Este método de diagnóstico nutricional con fotografías, al igual que para los demás índices espectrales requiere de la evaluación con abundancia o exceso del nutrimento de interés para determinar algunos índices que sirvan como patrón de concentraciones conocidas (Motomiya *et al.*, 2009; Madeira *et al.*, 2003). En años recientes, se ha utilizado la fotografía digital para detectar el nivel de fertilización nitrogenada (Jia *et al.*, 2004). Estos autores emplearon fotografías aéreas con el fin de estimar el nivel de fertilización nitrogenada en un campo de trigo. Encontraron una correlación positiva entre el análisis de la imagen y la concentración de N en el campo. Wiwart *et al.* (2009), analizaron los cambios en el color de tres especies diferentes de plantas que fueron sometidas a nitrógeno, fósforo, potasio y deficiencias de magnesio.

Esto se hizo mediante análisis de imagen digitales en color utilizando el modelo de tono, saturación e intensidad para el procesamiento de imágenes en color. En la presente investigación se pretende estimar el estado nutrimental en pepino, albahaca y lechuga, mediante métodos no destructivos que proporcione información de manera rápida y precisa.

OBJETIVO

Estimar el estado nutrimental de nitrógeno en lechuga, albahaca y arúgula mediante métodos no destructivos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el nivel óptimo de nitrato que favorezca el crecimiento y rendimiento de lechuga, albahaca y arúgula.
- 2) Estimar el crecimiento en lechuga, albahaca y arúgula, mediante el análisis de imágenes.
- 3) Determinar el estado nutrimental de nitrógeno mediante técnicas destructivas y no destructivas en lechuga, albahaca y arúgula.

HIPÓTESIS

Al menos un método no destructivo permitirá estimar el estado nutrimental de nitrógeno en lechuga, albahaca y arúgula, en forma rápida y precisa.

HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- 1) El nivel de nitrato de $12 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ en la solución nutritiva favorecerá el crecimiento y rendimiento en lechuga, albahaca y arúgula.
- 2) El análisis de imágenes permitirá estimar el crecimiento con una precisión superior a 90 % en lechuga, albahaca y arúgula.
- 3) Las técnicas no destructivas permitirán estimar el estado nutrimental de nitrógeno con una precisión superior a 90 %.

REFERENCIAS

- Adamchuk, V. I.; Viscarra-Rossel, R. A.; Sudduth, K. A. y Lammers, P. S. 2011. Sensor fusion for precision agriculture. En: Thomas C. Editorial Sensor fusion—foundation and applications. *InTech*. ISBN:978-953307-446-7
- Agati, G.; Foschi, L.; Grossi, N.; Guglielminetti, L.; Cerovic, Z. G. y Volterrani, M. 2013. Fluorescence-based versus reflectance proximal sensing of nitrogen content in *Paspalum vaginatum* and *Zoysia matrella* turfgrasses. *European Journal Agronomy*. 45: 39-51.
- Alcántar-González, G.; M. Sandoval-Villa. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Chapingo, México. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Publicación Especial 10. pp
- Ali, M. M.; Al-Ani, A.; Eamus, D. y Tan, D. K. Y. 2012. A new image processing-based technique to determine chlorophyll in plants. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. 12: 1323–1328.
- Boussadia, O.; Steppe, K.; Zgallai, H.; Ben El Hadj, S.; Braham, M.; Lemeur, R. y Van Labeke, M. C. 2010. Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars ‘Meski’ and ‘Koroneiki’. *Scientia Horticulturae*. 123: 336–342.
- Cabangon, R. J.; Castillo, E. G. y Tuong, T. P. 2011. Chlorophyll meter-based nitrogen management of rice grown under alternate wetting and drying irrigation. *Field Crops Research*. 121: 136-146.
- Confalonieri, R.; Stroppiana, D.; Boschetti, M.; Gusberti, D.; Bocchi, S. y Acutis, M. 2006. Analysis of rice sample size variability due to development stage, nitrogen fertilization, sowing technique and variety using the visual jackknife. *Field Crops Research*. 97:135-141.
- De la Cruz-Durán, J.; Sánchez-García, P.; Galvis-Spínola, A. y Carrillo-Salazar, J. 2011. Índices espectrales en pimiento para el diagnóstico nutrimental de nitrógeno. *Terra Latinoamericana*. 29(3): 259-265.

- Demotes-Mainard, S.; Boumaza, R.; Meyer, S.; Cerovic, Z.G. Indicators of nitrogen status for ornamental woody plants based on optical measurements of leaf epidermal polyphenol and chlorophyll contents. *Sci. Hort.* 2008, 115, 377–385.
- Eitel, J. U. H.; Long, D. S.; Gessler, P. E. y Smith, A. M. S. 2007. Using *in-situ* measurements to evaluate the new RapidEye™ satellite series for prediction of wheat nitrogen status. *International Journal Remote Sensors*. 28: 4183-4190.
- Fernandez-Jaramillo, A. A.; Duarte-Galvan, C.; Contreras-Medina, L. M.; Torres-Pacheco, I.; Romero-Troncoso, R. D. J.; Guevara-Gonzalez, R. G. y Millan-Almaraz, J. R. 2012. Instrumentation in developing chlorophyll fluorescence biosensing: A review. *Sensors* 12: 11853-11869.
- Filella, I.; L. Serrano; J. Serra y J. Penuelas. 1995. Evaluating wheat nitrogen status with canopy reflectance indices and discriminate analysis. *Crop Science*. 35: 1400-1405.
- Geipel, J.; Link, J.; Wirwahn, J. and Claupein, W. 2016. A Programmable Aerial Multispectral Camera System for In-Season Crop Biomass and Nitrogen Content Estimation. *Agriculture*. 6(1): 4. <https://doi.org/10.3390/agriculture6010004>
- Goffart, J. P.; Olivier, M. y Frankinet, M. 2008. Potato crop nitrogen status assessment to improve nitrogen fertilization management and efficiency: Past-present-future. *Potato Research*. 51: 355-383.
- Graeff, S.; Pfenning, J.; Claupein, W. y Liebig, H. P. 2008. Evaluation of image analysis to determine the nitrogen-fertilizer demand of broccoli plants (*Brassica oleracea* convar. botrytis var. italica). *Advance Optical Technology*. 20: 1-8.
- Grenzdörffer, G. J. 2014. Crop height determination with UAS point clouds. *ISPRS - International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*. 40: 135–140. <https://doi.org/10.5194/isprsarchives-XL-1-135-2014>

- Hansen, M. C.; DeFries, R. S.; Townshend, J. R. G.; Carroll, M.; Dimiceli, C. y Sohlberg, R. A. 2003. Global percent tree cover at a spatial resolution of 500 meters: first results of the MODIS vegetation continuous fields algorithm. *Earth Interactions*. 7: 1–15.
- Jia, L.; X. Chen.; F. Zhang.; Buerkert, A. y Romheld, V. 2004. Use of digital camera to assess nitrogen status of winter wheat in the Northern China plain. *Journal of Plant Nutrition*. 27(3): 441-450.
- Khavari-Nejad, R. A.; Najafi, F. y Tofighi, C. 2013. The effects of nitrate and phosphate deficiencies on certain biochemical metabolites in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. c.v. Urbana V.F.). *Plant. Journal of Stress Physiology and Biochemistry*. 9(2): 64–73.
- Kim, Y.; Reid, J. F. y Zhang, Q. 2008. Fuzzy logic control of a multispectral imaging sensor for in-field plant sensing. *Computers and Electronics in Agriculture*. 60: 279-288.
- Lamb, D. W. y Brown, R. B. 2001. Remote sensing and mapping of weeds in crops. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 78(2): 117-125.
- Li, Y.; Chen, D.; Walker, C. N. y Angus, J. F. 2010. Estimating the nitrogen status of crops using a digital camera. *Field Crops Research*. 118: 221-227.
- Lin, F. F.; Qiu, L. F.; Deng, J. S.; Shi, Y. Y.; Chen, L. S. y Wang, K. 2010. Investigation of SPAD meter-based indices for estimating rice nitrogen status. *Computers and Electronics in Agriculture*. 71: S60-S65.
- Liu, X. Electrical impedance spectroscopy applied in plant physiology studies. 2006. Tesis de maestría. RMIT University. Melbourne, Australia.
- Lobell, D. B.; Asner, G. P.; Ortiz-Monasterio, J. I. y Benning, T. L. 2003. Remote sensing of regional crop production in the Yaqui Valley, Mexico: estimates and uncertainties. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 94: 205-220.
- Madakadze, I. C. y Madakadze R. M. 1999. Field evaluation of the chlorophyll meter to predict yield and nitrogen concentration of switchgrass. *Journal Plant Nutrition*. 22: 1001–1010.

- Madeira, A.C., Ferreira, A., Varennes, A. y Vieira, M. I. 2003. SPAD meter versus tristimulus colorimeter to estimate chlorophyll content and leaf color in sweet pepper. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 34: 2461-2470.
- Mercado-Luna, A.; Rico-García, E.; Lara-Herrera, A.; Soto-Zarazúa, G.; Ocampo-Velázquez, R.; Guevara-González, R.; Herrera-Ruiz, G. y Torres-Pacheco, I. 2010. Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Biotechnology*. 9: 5326-5332.
- Motomiya, A. V. A., Molin, J. P. y Chiavegato, E. J. (2009). Utilização de sensor óptico ativo para detectar deficiência foliar de nitrogênio em algodoeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 13(2): 137-145.
- Navarro-Cerrillo, R. M.; Trujillo, J.; de la Orden, M. S. y Hernández-Clemente, R. 2014. Hyperspectral and multispectral satellite sensors for mapping chlorophyll content in a Mediterranean *Pinus sylvestris* L. plantation. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*. 26: 88-96.
- Perry, E. M. y Davenport, J. R. 2007. Spectral and spatial differences in response of vegetation indices to nitrogen treatments on apple. *Computers and Electronics in Agriculture*. 59: 56-65.
- Rasband, W. S. (2007). ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 32 pp.
- Ritchie, L. G. 2003. Use of ground-based canopy reflectance to determine ground cover, nitrogen and water status and final yield in wheat. Utah State University Press.
- Rubio-Covarrubias, O. A.; Brown, P. H.; Weinbaum, S. A.; Johnson, R. S. y Cabrera, R. I. 2009. Evaluating foliar nitrogen compounds as indicators of nitrogen status in *Prunus persica* trees. *Science Horticulture*. 120: 27-33.
- Saberioon, M. A.; Wayayok, M.; Aimrun, A. R. y Gholizadeh, A. A. 2013. Multispectral images tetra cam agriculture digital to estimate nitrogen and grain yield of rice at different growth stages. *The Philippine agriculturist*. 96: 108-112.

- SAS Institute. 2009. SAS software release 9.0. SAS institute Inc. Cary, N. C., USA. 830 p.
- Shaver, T. M.; Khosla, R. y Westfall, D. G. 2011. Evaluation of two crop canopy sensors for nitrogen variability determination in irrigated maize. *Precision Agriculture*. 12, 892-904.
- Sims, N. C.; Culvenor, D.; Newnham, G.; Coops, N. C.; Hopmans, P. 2013. Towards the operational use of satellite hyperspectral image data for mapping nutrient status and fertilizer requirements in australian plantation forests. *IEEE Journal of Selected Topics in Applied Earth Observations and Remote Sensing*. 6: 320-328.
- Steiner, A. A. 1984. The universal solution. Proceedings of 6th International Congress on Soiless Culture. ISOSC. Lunteren, The Netherlands. pp. 633-649.
- Sui, R.; J. B. Wilkerson; W. E. Hart; L. R. Wilhelm y D. D. Howard. 2005. Multi-Spectral Sensor for Detection of Nitrogen Status in cotton. *Applied Engineering in Agriculture*. 21: 167-172.
- Taiz L.; E. Zeige; I. M. Møller y A. Murphy. 2015. Plant physiology and development. Sixth edition. 761 p.
- Thoren, D. y Schmidhalter, U. 2009. Nitrogen status and biomass determination of oilseed rape by laser-induced chlorophyll fluorescence. *European Journal Agronomy*. 30: 238-242.
- Tremblay, N.; Fallon, E. y Ziadi, N. Sensing of crop nitrogen status: Opportunities, tools, limitations, and supporting information requirements. 2011. *Horticultural Technology*. 21: 274-281.
- Tremblay, N.; Wang, Z. y Cerovic, Z. G. 2012. Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review. *Agronomy Sustainable Developed*. 32: 451-464.
- Tremblay, N.; Wang, Z.; Ma, B. L.; Belec, C. y Vigneault, P. 2009. A comparison of crop data measured by two commercial sensors for variable-rate nitrogen application. *Precision Agriculture*. 10: 145-161.

- Vigneau, N.; Ecartot, M.; Rabatel, G.; Roumet, P. 2011. Potential of field hyperspectral imaging as a non-destructive method to assess leaf nitrogen content in Wheat. *Field Crops Research*. 122: 25-31.
- Wiwart, M.; Fordonski, G.; Zuk-Golaszewska, K. y Suchowiska, E. 2009. Early diagnostics of macronutrient deficiencies in three legume species by color image analysis. *Computers and Electronics in Agriculture*. 65: 125-132.
- Wong M. T. F. y Asseng, S. 2006. Determining the causes of spatial and temporal variability of wheat yields at sub-field scale using a new 240 Diacono *et al.* method of upscaling a crop model. *Plant Soil*. 283: 203–215. doi:10.1007/s11104-006-0012-5
- Wu, J.; Wang, D.; Rosen, C. J. y Bauer, M. E. 2007. Comparison of petiole nitrate concentrations, SPAD chlorophyll readings, and QuickBird satellite imagery in detecting nitrogen status of potato canopies. *Field Crops Research*. 101: 96-103.
- Zebarth, B. J.; Drury, C. F.; Tremblay, N. y Cambouris, A. N. 2009. Opportunities for improved fertilizer nitrogen management in production of arable crops in eastern Canada: A review. *Canadian Journal Soil Science*. 89: 113-132.
- Zhu, J.; Tremblay, N. y Liang, Y. 2011. A corn nitrogen status indicator less affected by soil water content. *Agronomy Journal*. 103: 890-898.

CAPÍTULO I

ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CLOROFILA DE LECHUGA ROMANA CON LECTURAS SPAD Y atLEAF

RESUMEN

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas y es especialmente importante en la producción de hortalizas de hoja verde de alta calidad. En este experimento, la concentración de N en las hojas, la concentración de clorofila y el peso sobre la materia fresca de lechuga romana (*Lactuca sativa* L. var longifolia) se estimaron mediante correlaciones entre las lecturas *in situ* de SPAD y atLEAF. La lechuga se cultivó en invernadero durante 42 días y se regó a cinco niveles de N: 0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ de NO₃⁻, basado en la solución nutritiva Steiner. La concentración de N, la concentración de clorofila y la materia fresca se determinaron en el laboratorio, mientras que las lecturas de SPAD y atLEAF se midieron *in situ* semanalmente. Las lecturas SPAD tuvieron correlaciones lineales altas, positivas y significativas con N ($R^2 = 0.90$), clorofila ($R^2 = 0.97$) y materia fresca ($R^2 = 0.98$); Las lecturas de atLEAF tuvieron una correlación lineal similar con N ($R^2 = 0.91$), clorofila ($R^2 = 0.92$) y materia fresca ($R^2 = 0.97$). Además, las lecturas de SPAD y atLEAF tenían una correlación lineal alta, positiva y significativa ($R^2 = 0.96$). Por lo tanto, los medidores SPAD y atLEAF se pueden usar para estimar de manera no destructiva y precisa la concentración de N en lechuga, de una manera confiable y rápida durante el ciclo de producción del cultivo. Además, atLEAF es actualmente más asequible que el equipo SPAD.

PALABRAS CLAVES: materia fresca; nutrición de cultivos; *Lactuca sativa*; mediciones no destructivas; cultivo sin suelo

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Se encuentra en aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y en clorofila. La concentración de clorofila de la hoja está estrechamente relacionada con la concentración de nitrógeno en la planta (Zebarth *et al.*, 2002), por lo tanto, el monitoreo de las concentraciones de clorofila y N de la planta durante la producción podría usarse como una estrategia de manejo para mejorar el crecimiento, rendimiento y comercialización de la planta (Gitelson *et al.*, 2003; Peng y Yuan, 2017).

Los métodos destructivos actuales para la determinación de N y clorofila son precisos, pero requieren mucho tiempo y son relativamente costosos (Kalaji *et al.* 2017); por el contrario, se ha utilizado con éxito equipo portátil no destructivo con algunas especies de plantas para estimar *in situ* y rápidamente las concentraciones de clorofila o N en las hojas (Abdelhamidg *et al.*, 2003; Loh *et al.*, 2002; Padilla *et al.*, 2018a) y permitir mediciones repetidas de la misma hoja durante un ciclo de producción (Kalaji *et al.*, 2017; Yamamoto *et al.*, 2002).

El medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Konica Minolta®, Japón) se utiliza para la determinación rápida y no destructiva de la concentración relativa de clorofila en las hojas (Gianquinto *et al.*, 2004). La transmisión de luz a través de la hoja se mide a 650 y 940 nm; la longitud de onda de 650 nm coincide con la región espectral con máxima actividad de clorofila, mientras que la transmitancia a 940 nm se utiliza para compensar factores, incluido el contenido de humedad y el grosor de las hojas (Zhu *et al.*, 2012). Se ha informado que las lecturas SPAD están relacionadas con la concentración de clorofila foliar (Basyouni y Dunn, 2017; Basyouni *et al.*, 2015; Uddling *et al.*, 2007).

El medidor de clorofila atLEAF CHL (FT Green LLC®, EE. UU.) funciona de manera similar al medidor SPAD, pero utiliza una longitud de onda de 660 nm en lugar de 650 nm (Zhu *et al.*, 2012). Las lecturas obtenidas con un medidor de clorofila atLEAF CHL PLUS son similares a las obtenidas con el medidor SPAD (Basyouni *et al.*, 2015), pero el medidor atLEAF es actualmente más asequible en comparación con el medidor SPAD (Basyouni y Dunn, 2017; Zhu *et al.*, 2012).

Se ha informado que las concentraciones de clorofila y N determinadas en laboratorio tienen altas correlaciones con las lecturas SPAD en: maíz (Hurtado *et al.*, 2010), tomate (Ferreira *et al.*, 2006), repollo (Westerveld *et al.*, 2003), arroz (Huang *et al.*, 2016) y manglares (Dou *et al.*, 2018). También se han reportado altas correlaciones con el medidor atLEAF en maíz, trigo (Zhu *et al.*, 2012) y salvia (Dunn *et al.*, 2018a).

Padilla *et al.* (2018b) han informado de una sensibilidad relativamente menor del medidor atLEAF en pimiento dulce, pero destacan la escasa literatura relevante sobre atLEAF. Además, cabe señalar que la investigación con cultivos de hortalizas es más limitada que con cultivos de cereales especialmente trigo y maíz (Padilla *et al.*, 2018a).

La lechuga es el cultivo más importante del grupo de las hortalizas de hoja en todo el mundo, debido a su alto valor nutritivo y porque es una fuente casi total de vitaminas y contiene muchos minerales (Noumedem *et al.*, 2017). En el año 2017, la producción mundial de lechuga fue de 26,9 millones de toneladas (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1998) siendo China el primer productor mundial con 15.2 millones de toneladas. México es el décimo productor con una producción de 480.808 toneladas (SIAP, 2019) y el cuarto exportador a nivel mundial de lechuga con un valor de 268 millones de dólares (OEC, 2019).

Los experimentos realizados para estimar el estado de N y clorofila (Chl) utilizando métodos no destructivos (por ejemplo, SPAD) se limitan a la lechuga (Lucini *et al.*, 2015; Parks *et al.*, 2012). Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue estimar la concentración de N en las hojas, la concentración de Chl y el peso de la materia fresca de la lechuga romana utilizando lecturas SPAD y atLEAF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo

Este estudio se realizó en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, ubicada en Cuernavaca, Morelos, México (18° 58' 51" N, 99° 13' 55 " W, altitud de 1.866 m), de abril a mayo de 2018. La temperatura, la humedad relativa y la intensidad de la luz se registraron cada hora con el equipo de datos Hobo® U12-012 (Onset Computer Co., EE. UU.) durante la duración del experimento. Las temperaturas máxima y mínima fueron de 40 °C y 13 °C, respectivamente, con una media de 26 °C. La humedad relativa máxima y mínima fueron de 83 % y 15 %, respectivamente, con un promedio de 45 %. La intensidad de luz media durante la duración del experimento fue de 28,000 lux.

Se sembraron semillas de lechuga romana 'Green Star' (Jhonny's Seeds, EE. UU.) (13 de marzo de 2018) en bandejas de poliestireno de 200 pocillos (30 mL), previamente rellenas con sustrato comercial BM2 Berger® y se trasplantaron (13 de abril de 2018) en bolsas de polietileno de 10 L, que previamente habían sido rellenas con roca volcánica (localmente llamada tezontle) con una granulometría de 1 a 7 mm.

Las plántulas de lechuga se regaron todos los días con aproximadamente 0.5 L de solución nutritiva de Steiner, modificada para proporcionar nitrato a 0, 4, 8, 12 y 16 mEq · L⁻¹ (Mercado-Luna *et al.*, 2010) durante las primeras tres semanas, y luego con 1.5 L de solución nutritiva durante el período restante del estudio hasta completar 42 DAT (días después del trasplante). Las plantas se regaron para lograr aproximadamente un 20 % de fracción de lixiviación por volumen. Se agregaron micronutrientes como una mezcla comercial de quelatos (Microsol Rexene® Mix SQM) en dosis de 80 g·m⁻³, para lograr un aporte de 3 mg·L⁻¹ de hierro. El pH de las soluciones nutritivas se acidificó con ácido sulfúrico a valores entre 5.6 y 6.0.

Mediciones y observaciones

El muestreo *in situ* utilizando los medidores portátiles SPAD-502® Plus Minolta y atLEAF® CHL Plus (Fig. 1) se realizó semanalmente aproximadamente al mediodía solar como lo describen León **et al.** (2017). Los valores SPAD y atLEAF se obtuvieron de seis plantas por tratamiento, con diez lecturas por hoja (cinco en

cada lado de la nervadura central de la hoja), de tres hojas completamente expandidas y recientemente maduras por planta. Inmediatamente después de finalizar las mediciones *in situ*, se cosechó la biomasa aérea fresca de las plantas para determinar la materia fresca con una balanza de laboratorio OHAUS.

Las mismas hojas utilizadas en las mediciones de SPAD y atLEAF se muestrearon inmediatamente para determinar la concentración de clorofila ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) como lo describen Mackinney (1941) y Von Wettstein (1957). Posteriormente, se recogió una porción de materia fresca (1 g) de la planta, se homogeneizó con 20 mL de acetona concentrada, se filtró el homogeneizado y se ajustó a 50 mL de acetona al 80 %. Las muestras de hojas y suspensiones se mantuvieron en la oscuridad entre los pasos de procesamiento. Se tomaron lecturas de absorbancia (A) a 645 nm y 663 nm en un espectrofotómetro UV-Vis DR 5000 (HACH, Canadá). Los cálculos se realizaron con la siguiente ecuación:

$$\text{Clorofila total} = (20.2 \times A_{645\text{nm}}) + (8.02 \times A_{663\text{nm}})$$

Finalmente, las muestras se secaron en aire forzado a 70 °C durante 72 horas y luego se molieron, el N total se cuantificó mediante el método micro Kjeldahl descrito por Kalra (1997).

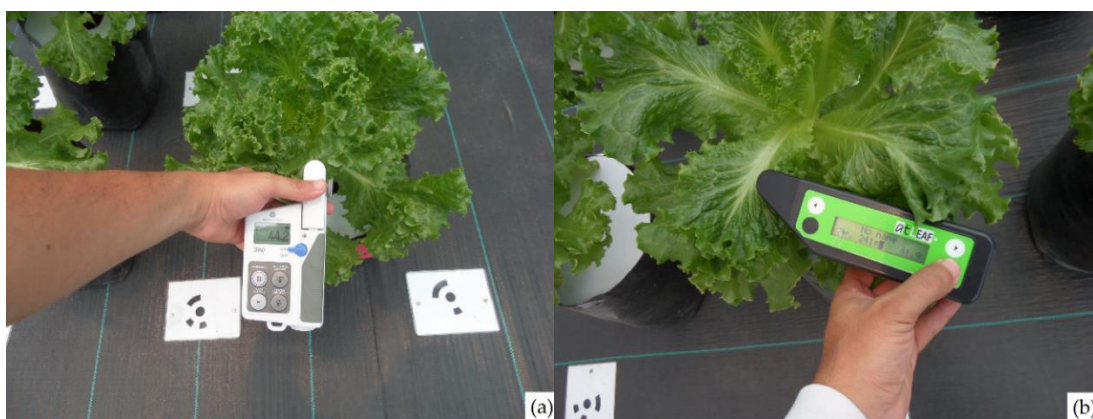


Figura 1. Uso de SPAD (a) y atLEAF (b) para medir la concentración relativa de clorofila en la lechuga romana.

Diseño y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, a cinco niveles de N como tratamientos (0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ de NO₃⁻), con seis plantas por tratamiento. Había una planta por contenedor, con cada contenedor como una única réplica (Fig. 2). Se realizaron correlaciones de las lecturas de SPAD y atLEAF frente a la concentración de N, concentración de clorofila y materia fresca usando SigmaPlot® Ver. 12.5 (SYSTAT Inc., EE. UU.).

3



Figura 2. Vista frontal y vista superior del crecimiento de lechuga romana en función del nivel de N-NO₃ a 42 DAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relaciones entre concentración de nitrógeno y lecturas SPAD y atLEAF

Las lecturas de SPAD tuvieron una alta correlación ($\alpha = 0.01$) con la concentración de N de hojas en lechuga romana. La regresión lineal simple (Fig. 3) muestra un coeficiente de correlación positivo (r) de 0.95, un coeficiente de determinación (R^2) de 0.90 y un RMSE de 0.02. Estos valores fueron superiores a los reportados en otras hortalizas como el orégano ($r = 0.80$, $R^2 = 0.64$) (Calderón-Medellín *et al.*, 2011) para la correlación de SPAD y concentración de N foliar. Los resultados del presente estudio sugieren que SPAD es un instrumento confiable para estimar la concentración de N en plantas de lechuga, como se reporta para albahaca (Ruiz-Espinoza *et al.*, 2010), espinaca (Liu *et al.*, 2006) y flor de pascua (Dunn *et al.*, 2018b).

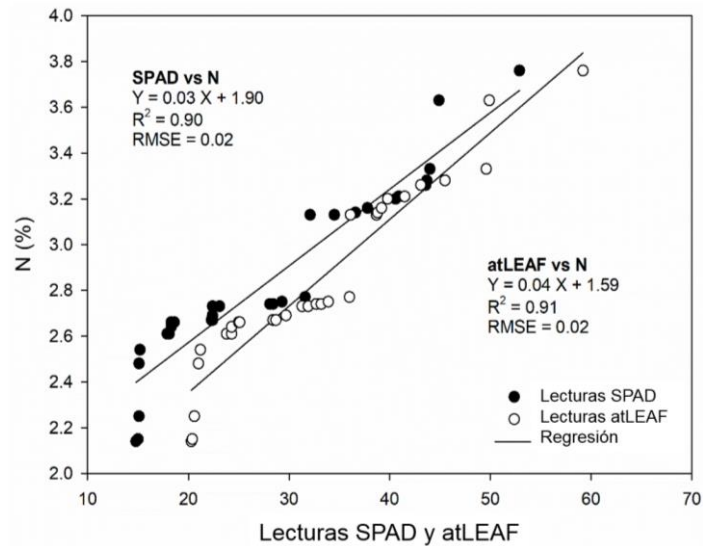


Figura 3. Relación entre las lecturas de concentración de nitrógeno y lecturas SPAD y atLEAF en lechuga romana.

La concentración de N y las lecturas de atLEAF muestran un alto coeficiente de correlación lineal ($r = 0.96$, $R^2 = 0.91$, $RMSE = 0.02$, $\alpha = 0.01$) (Fig.3), lo que indica que el medidor atLEAF se puede utilizar para una estimación rápida y fiable de la concentración de N en plantas de lechuga romana. Estos resultados son similares a los estudios realizados por Zhu *et al.* (2012) quienes informaron que el medidor atLEAF podría ser una alternativa económica y confiable ($R^2 = 0.78 - 0.92$) para la estimación de la concentración de N en maíz, trigo, cebada, papa y canola. De manera similar, Basyouni *et al.* (2015) informaron valores de correlación altos ($R^2 = 0.75 - 0.83$) entre la concentración de N y las lecturas de atLEAF al evaluar las deficiencias de N inducidas en dos variedades de flor de pascua.

Relaciones entre concentración de clorofila y lecturas SPAD y atLEAF

La correlación entre las lecturas de SPAD y la concentración de clorofila (Fig. 4) fue altamente significativa y positiva ($r = 0.99$, $R^2 = 0.97$, $RMSE = 0.03$, $\alpha = 0.01$). Estos resultados son similares a los de Fenech-Larios *et al.* (2009) quienes encontraron una alta correlación entre las lecturas de SPAD y la concentración de clorofila ($r = 0.99$) en plántulas de albahaca. Además, las correlaciones del presente estudio son más fuertes que las reportadas por Martín *et al.* (2007) quienes en laurustina, tobira y madroño encontraron coeficientes de correlación

entre 0.36 y 0.52; y los obtenidos por Ruiz-Espinoza *et al.* (2010) quienes reportaron coeficientes de correlación entre 0.57 y 0.67 en albahaca.

La concentración de clorofila y las lecturas de atLEAF muestran una alta correlación lineal ($r = 0.96$, $R^2 = 0.92$, $RMSE = 0.09$, $\alpha = 0.01$). Nuestros resultados presentaron un ajuste mayor en comparación con los descritos por Zhu *et al.* (2012) quienes reportaron coeficientes de determinación entre 0.72 - 0.88 para la concentración de clorofila y lecturas de atLEAF en maíz, trigo, cebada, papa y canola. Hebbar *et al.* (2016) reportaron coeficientes de correlación entre 0.68 - 0.95 en hojas de palma de coco.

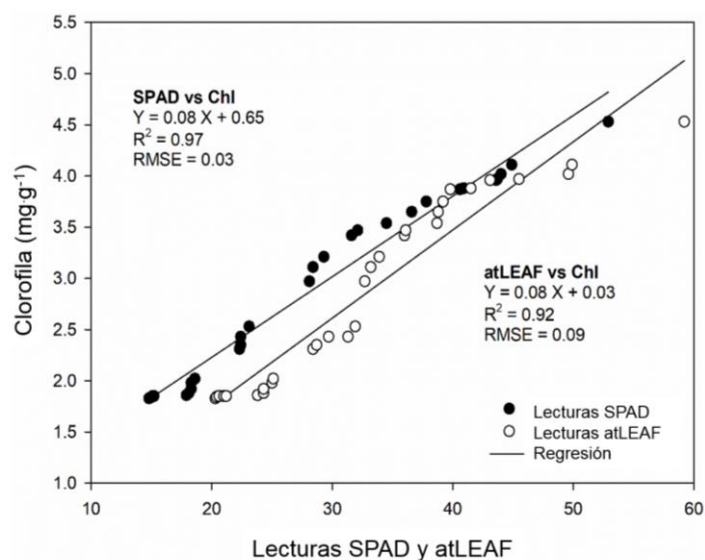


Figura 4. Relación entre la concentración de clorofila y las lecturas SPAD y atLEAF en lechuga romana.

Relaciones entre materia fresca y lecturas SPAD y atLEAF

Las lecturas de SPAD tuvieron una alta correlación ($\alpha = 0.01$) con materia fresca en lechuga romana. La regresión lineal simple (Fig. 5) muestra un coeficiente de correlación positivo (r) de 0.99 y un coeficiente de determinación (R^2) de 0.98. Estos resultados son similares a los reportados por Cunha *et al.* (2015) con coeficientes de correlación entre 0.92 - 0.98 en rúcula. Además, Cho *et al.* (2007) sugirió que las lecturas SPAD podrían usarse en el campo para estimar y proyectar tasas de crecimiento y predecir rendimientos en la cosecha de pepino. Por lo tanto, SPAD

puede considerarse como una herramienta para estimar de manera rápida y confiable la materia fresca en lechuga.

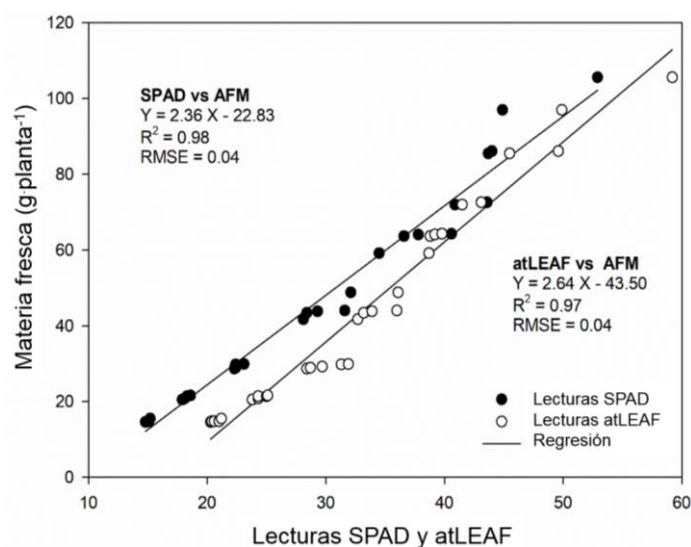


Figura 5. Relación entre la materia fresca y las lecturas SPAD y atLEAF en lechuga romana.

La correlación entre las lecturas de atLEAF y materia fresca (Fig. 5) fue altamente significativa ($\alpha = 0.01$) y presentó un fuerte ajuste a la regresión lineal ($r = 0.98$, $R^2 = 0.97$, $RMSE = 0.04$). Estos resultados son similares a los reportados por Dey *et al.* (2016) quienes obtuvieron valores de $r = 0.97$ y $R^2 = 0.95$ en *Piper betle*.

La materia fresca en la lechuga es importante porque está estrechamente relacionado con el rendimiento de este cultivo. Según nuestros resultados, el uso de medidores SPAD y atLEAF podría usarse como una herramienta para predecir el rendimiento potencial.

Relaciones entre lecturas SPAD y atLEAF

Las lecturas SPAD y atLEAF muestran un alto coeficiente de correlación lineal ($r = 0.98$, $R^2 = 0.96$, $RMSE = 0.06$, $\alpha = 0.01$) (Fig. 6). Estos resultados son similares a los informados por Dunn *et al.* (2018b) quienes obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.80 a 0.95 entre las lecturas SPAD y atLEAF en hojas de flor de

pascua. Zhu *et al.* (2012) encontraron correlaciones significativas entre las lecturas SPAD y atLEAF para maíz, cebada y papa ($R^2 = 0.90 - 0.92$). Ambos estudios concluyeron que el medidor atLEAF representaba una alternativa más económica al medidor SPAD.

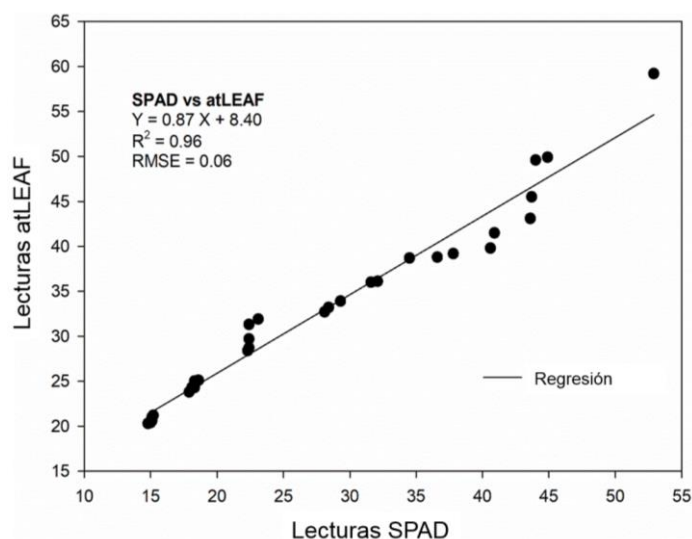


Figura 6. Correlación entre las lecturas SPAD y atLEAF en lechuga romana.

El medidor AtLEAF puede ser preferible ya que es más asequible y es un 80 % más económico que el medidor SPAD. Sin embargo, es importante mencionar que las lecturas de SPAD y atLEAF en las hojas pueden no ser representativas del dosel de la planta.

CONCLUSIONES

Este estudio muestra que ambos medidores (SPAD y atLEAF) predicen con precisión las concentraciones de nitrógeno, clorofila y materia fresca en hojas de lechuga romana a partir de ecuaciones de regresión lineal. Las lecturas SPAD tuvieron correlaciones lineales altas, positivas y significativas con la concentración de nitrógeno ($R^2 = 0.90$), concentración de clorofila ($R^2 = 0.97$) y materia fresca ($R^2 = 0.98$), las lecturas de atLEAF tuvieron una correlación lineal similar con nitrógeno ($R^2 = 0.91$), clorofila ($R^2 = 0.92$) y AFM ($R^2 = 0.97$). Tanto las lecturas SPAD como atLEAF permiten obtener estimaciones tempranas del estado de nitrógeno y clorofila que pueden usarse para corregir o programar la

fertilización de manera más eficiente durante la temporada de crecimiento sin afectar el desarrollo de las plantas. La relación entre las lecturas de SPAD y atLEAF también fue una correlación lineal alta, positiva y significativa ($R^2 = 0.96$). Tanto los medidores SPAD como atLEAF se pueden usar para estimar de manera no destructiva y precisa de la concentración de nitrógeno en lechuga, de una manera confiable y rápida durante el ciclo de producción del cultivo. Además, el medidor atLEAF es actualmente más asequible que el medidor SPAD.

REFERENCIAS

- Abdelhamid M, Horiuchi T, Oba S (2003). Evaluation of the SPAD value in faba bean (*Vicia faba* L.) leaves in relation to different fertilizer applications. *Plant Production Science* 6(3):185-189.
- Basyouni R, Dunn B (2017). Use of reflectance sensors to monitor plant nitrogen status in horticultural plants. Retrieved 2019 March 2 from <http://factsheets.okstate.edu/documents/hla-6719-use-of-optical-sensors-to-monitor-plant-nitrogen-status-in-horticultural-plants/>.
- Basyouni R, Dunn BL, Goad C (2015). Use of nondestructive sensors to assess nitrogen status in potted poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* L. (Willd.exKlotzsch)) production. *Scientia Horticulturae* 192:47-53.
- Calderón-Medellín LA, Bernal-Rozo AM, Pérez-Trujillo MM (2011). Ensayo preliminar sobre la utilización de un medidor portátil de clorofila para estimar el nitrógeno foliar en orégano (*Origanum vulgare* L.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 7(2):150-165.
- Cho YY, Oh S, Oh MM, Son JE (2007). Estimation of individual leaf area, fresh weight, and dry weight of hydroponically grown cucumbers (*Cucumis sativus* L.) using leaf length, width, and SPAD value. *Scientia Horticulturae* 111(4):330-334.
- Cunha ARd, Katz I, Sousa ADP, Martínez RA (2015). Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de lisianthus en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido. *Idesia (Arica)* 33:97-105.
- Dey AK, Sharma M, Meshram MR (2016). An analysis of leaf chlorophyll measurement method using chlorophyll meter and image processing technique. *Procedia Computer Science* 85:286-292.

- Dou Z, Cui L, Li J, Zhu Y, Gao C, Pan X, . . . Li W (2018). Hyperspectral estimation of the chlorophyll content in short-term and long-term restorations of mangrove in Quanzhou Bay Estuary, China. *Sustainability*10(4):1127.
- Dunn BL, Singh H, Payton M, Kincheloe S (2018a). Effects of nitrogen, phosphorus, and potassium on SPAD-502 and atLEAF sensor readings of *Salvia*. *Journal of Plant Nutrition* 41(13):1674-1683.
- Dunn BL, Singh H, Goad C (2018b). Relationship between chlorophyll meter readings and nitrogen in poinsettia leaves. *Journal of Plant Nutrition* 41(12):1566-1575.
- Fenech-Larios L, Troyo-Diéguéz E, Trasiña-Castro M, Ruiz-Espinoza F, Beltrán-Morales A, Murillo-Amador B, . . . Zamora-Salgado S (2009). Relación entre un método no destructivo y uno de extracción destructivo, para medir el contenido de clorofila en hojas de plántula de albahaca (*Ocimum basilicum*L). *Universidad y Ciencia*25(1):99-102.
- Ferreira M, Ferreira G, Fontes P, Dantas J (2006). Índice SPAD e teor de clorofila no limbo foliar do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica, em duas épocas de cultivo. *Revista Ceres* 53:83- 92.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1998). FAOSTAT statistics database. Retrieved 2019 March 02 from: <https://search.library.wisc.edu/catalog/999882363002121>.
- Gianquinto G, Goffart JP, Olivier M, Guarda G, Colauzzi M, Dalla Costa L, Mackerron DKL (2004). The use of hand-held chlorophyll meters as a tool to assess the nitrogen status and to guide nitrogen fertilization of potato crop. *Potato Research*47(1-2):35-80.
- Gitelson AA, Gritz Y, Merzlyak MN (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journal of Plant Physiology*160(3):271-282.
- Hebbar KB, Subramanian P, Sheena TL, Shwetha K, Sugatha P, Arivalagan M, Varaprasad PV (2016). Chlorophyll and nitrogen determination in coconut using a non-destructive method. *Journal of Plant Nutrition* 39(11):1610-1619.
- Huang L, Yang J, Cui X, Yang H, Wang S, Zhuang H (2016). Synergy and transition of recovery efficiency of nitrogen fertilizer in various rice genotypes under organic farming. *Sustainability*8(9):854.

- Hurtado SMC, Silva CA, Resende ÁVd, Corazza EJ, Shiratsuchi LS, Higashikawa FS (2010). Sensibilidade do clorofilômetro para diagnóstico nutricional de nitrogênio no milho. *Ciência e Agrotecnologia* 34:688-697.
- Kalaji HM, Dąbrowski P, Cetner MD, Samborska IA, Łukasik I, Brestic M, Panchal BM (2017). A comparison between different chlorophyll content meters under nutrient deficiency conditions. *Journal of Plant Nutrition* 40(7):1024-1034.
- Kalra Y (1997). *Handbook of reference methods for plant analysis*. CRCpress, Boca Raton.
- León AP, Viña SZ, Frezza D, Chaves A, Chiesa A (2007). Estimation of chlorophyll contents by correlations between SPAD-502 meter and chroma meter in butterhead lettuce. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38(19-20):2877-2885.
- Liu YJ, Tong YP, Zhu YG, Ding H, Smith FA (2006). Leaf chlorophyll readings as an indicator for spinach yield and nutritional quality with different nitrogen fertilizer applications. *Journal of Plant Nutrition* 29(7):1207-1217.
- Loh FCW, Grabosky JC, Bassuk NL (2002). Using the SPAD502 meter to assess chlorophyll and nitrogen content of Benjamin fig and cotton wood leaves. *Hort Technology* 12(4):682-686.
- Lucini L, Roupheal Y, Cardarelli M, Canaguier R, Kumar P, Colla G (2015). The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae* 182:124-133.
- Mackinney G (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry* 140(2):315-322.
- Martín I, Alonso N, López MC, Prieto M, Cadahía C, Eymar E. (2007). Estimation of leaf, root, and sap nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter for ornamental shrubs. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38(13-14):1785-1803.
- Mercado-Luna A, Rico-García E, Lara-Herrera A, Soto-Zarazúa G, Ocampo-Velázquez R, Guevara-González R, ... Torres-Pacheco I (2010). Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Biotechnology* 9(33):5326-5332.

- Noumedem JAK, Djeussi DE, Hritcu L, Mihasan M, Kuete V (2017). Chapter 20 - *Lactuca sativa*. In: Kuete V (Ed). Medicinal spices and vegetables from Africa. Academic Press, London, pp437-449.
- Padilla F, Gallardo M, Peña-Fleitas M, de Souza R, Thompson R (2018a). Proximal optical sensors for nitrogen management of vegetable crops: a review. *Sensors* 18(7) 1734-1752
- Padilla F, de Souza R, Peña-Fleitas MT, Gallardo M, Giménez C, Thompson RB (2018b). Different responses of various chlorophyll meters to increasing nitrogen supply in sweet pepper. *Frontiers in Plant Science* 9:1752.
- Parks SE, Irving DE, Milham PJ (2012). A critical evaluation of on-farm rapid tests for measuring nitrate in leafy vegetables. *Scientia Horticulturae*134:1-6.
- Peng S, Yuan S (2017). Exploring the trends in nitrogen input and nitrogen use efficiency for agricultural sustainability. *Sustainability* 9(10):1905.
- Ruiz-Espinoza FH, Murillo-Amador B, García-Hernández JL, Fenech- Larios L, Rueda-Puente EO, Troyo-Diéguez E, . . . Beltrán-Morales A (2010). Field evaluation of the relationship between chlorophyll content in basil leaves and a portable chlorophyll meter (SPAD-502) readings. *Journal of Plant Nutrition* 33(3):423-438.
- SIAP (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Retrieved 2019 March 02 from <https://www.gob.mx/siap>.
- OEC (2019). The Observatory of Economic Complexity. Lechuga. Retrieved <https://atlas.media.mit.edu/es/profile/hs92/0705/>.
- Uddling J, Gelang-Alfredsson J, Piikki K, Pleijel H (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research* 91(1):37-46.
- Von Wettstein D (1957). Chlorophyll- letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research* 12(3):427-506.
- Westerveld SM, McKeown AW, McDonald MR, Scott-Dupree CD (2003). Chlorophyll and nitrate meters as nitrogen monitoring tools for selected vegetables in southern Ontario. *Acta Horticulturae* 627:259-266.

- Yamamoto A, Nakamura T, Adu-Gyamfi JJ, Saigusa M (2002). Relation between chlorophyll content in leaves of sorghum and pigeonpea determined by extraction method and by chlorophyll meter (SPAD-502). *Journal of Plant Nutrition* 25(10):2295-2301.
- Zebarth BJ, Younie M, Paul JW, Bittman S (2002). Evaluation of leaf chlorophyll index for making fertilizer nitrogen recommendations for silage corn in a high fertility environment. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 33(5-6):665-684.
- Zhu J, Tremblay N, Liang Y (2012). Comparing SPAD and atLEAF values for chlorophyll assessment in crop species. *Canadian Journal of Soil Science* 92(4):645-648.

CAPÍTULO II

CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO Y CLOROFILA EN LECHUGA ROMANA UTILIZANDO ÍNDICES ESPECTRALES DE IMÁGENES DIGITALES RGB

RESUMEN

Los métodos destructivos para la estimación de la nutrición de los cultivos son precisos y estandarizados, pero costosos y limitados por la escala espacial. Las técnicas no destructivas, como el uso de imágenes digitales, proporcionan resultados rápidos y fiables *in situ*. Durante el estudio se estimó la concentración de nitrógeno y clorofila en lechuga romana utilizando índices espectrales derivados de las imágenes digitales RGB (rojo, verde y azul). El cultivo de lechuga se cultivó en túneles plásticos y se regó con cinco niveles de N: 0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ NO₃-N (correspondientes a 0, 248, 496 y 744 mg L⁻¹, respectivamente) a base de en una solución Steiner modificada. El tratamiento de 16 mEq·L⁻¹ NO₃-N mostró el mayor crecimiento a los 42 días después del trasplante (ddt). Semanalmente se adquirieron imágenes digitales de las plantas con una cámara RGB y se procesaron para obtener mosaicos a escala y doce índices espectrales de vegetación. El análisis de correlación de los índices espectrales indicó que el índice de diferencia verde-rojo normalizado (NGRDI), el exceso de verde (ExG) y los índices de canal verde (g) mostraron una correlación lineal positiva con la concentración de nitrógeno ($r > 0.93$) y clorofila ($r > 0.93$). Además, se encontró una correlación exponencial con el área foliar ($r > 0.86$), la cual fue más fuerte en los últimos 21 ddt debido a la aceleración en el crecimiento foliar durante la etapa vegetativa del cultivo. Estos resultados muestran que las imágenes digitales RGB son un método de bajo costo, no destructivo, confiable y preciso para estimar la concentración de nitrógeno, clorofila y área foliar en lechuga romana durante la producción.

PALABRAS CLAVES: *Lactuca sativa*, área foliar, técnica no destructiva, restitución fotogramétrica

INTRODUCCIÓN

La clorofila y el nitrógeno son componentes esenciales de las plantas debido a su papel en la producción de proteínas y la fotosíntesis. Un exceso o deficiencia de estos puede causar toxicidad o bajo rendimiento (Taiz *et al.*, 2014). Se requiere una valoración y evaluación precisa del estado nutricional del cultivo *in situ* y en diferentes escalas de tiempo para optimizar el uso de fertilizantes y reducir costos (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

La concentración de nitrógeno en las plantas generalmente se determina mediante dos enfoques: los métodos destructivos o no destructivos. Los métodos destructivos como Kjeldahl y Dumas se basan en el análisis de tejidos y, aunque son precisos y estandarizados, a menudo están limitados por el tamaño de las parcelas, el alto costo y los esfuerzos necesarios para el muestreo (Paz Pellat *et al.*, 2015; Baresel *et al.*, 2017). Los métodos no destructivos permiten la recopilación de información remota en menos tiempo y no requieren personal altamente especializado (Vollmann *et al.*, 2011). Además, las mediciones se pueden aplicar frecuente y repetidamente en la misma planta; permitiendo así el monitoreo del área foliar y la concentración de nitrógeno del cultivo para ajustar de manera eficiente las tasas de fertilización durante la temporada de crecimiento (Sandmann *et al.*, 2013). Estos métodos utilizan la relación de las propiedades de reflectancia/trasmisancia de algunos pigmentos foliares como la clorofila y los polifenoles con sus características químicas (Parks *et al.*, 2012).

Es bien sabido que los cambios en las características espectrales de las plantas están estrechamente relacionados con los cambios en la concentración de nutrientes en las regiones visible (~ 550 nm) e infrarroja cercana (~ 750 nm) (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013). Si se combinan como índices espectrales, es posible obtener relaciones funcionales que estimen la concentración de nitrógeno y clorofila (Cammarano *et al.*, 2014). Los datos de teledetección de los cultivos se adquieren a nivel de hoja a partir de medidores de clorofila (ej. SPAD) o al nivel del follaje de los sensores de reflectancia (ej. cámaras digitales). En el primer caso, el enfoque es el muestreo puntual con una escala espacial limitada, mientras que en el segundo, permite monitorear la variabilidad espacial y temporal (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

El uso de cámaras digitales y procesamiento de imágenes (ej. índices espectrales visibles) es menos costoso que otras técnicas (Elsayed *et al.*, 2018) y se ha informado que es una herramienta poderosa y de bajo costo para evaluar el área foliar y el estado de los nutrientes, especialmente en cultivos de campo (Liu *et al.*, 2018; Prey *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2018). En horticultura, las imágenes de procesamiento se han utilizado para estimar la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate (Mercado-Luna *et al.*, 2010), papa (Yadav *et al.*, 2010), pimiento (Yuzhu, 2011) y pimiento dulce (Horgan *et al.*, 2015) plántulas, pero hay pocos estudios en hortalizas de hoja (Jung *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2015).

Además, aunque los estudios en sistemas de ambiente cerrado son escasos, muestran resultados prometedores que han permitido, según Jung *et al.* (2015), estimación rápida y exitosa de la concentración de nitrógeno y clorofila en lechuga. Por lo tanto, estos métodos podrían incorporarse a sistemas de producción cerrados de alta tecnología para la medición del estado nutricional en menos tiempo, permitiendo los ajustes necesarios en los esquemas de fertilización para optimizar recursos, reducción de costos de producción y aumento de rendimientos (Gruda *et al.*, 2019).

En países como México, la producción de lechuga en invernadero es un área en continuo crecimiento que podría beneficiarse de un sistema de diagnóstico y monitoreo preciso del estado nutricional del nitrógeno con alta precisión espacio-temporal, considerando que este elemento es el nutriente más limitante para el rendimiento (Zhou *et al.*, 2020).

Este artículo explora la posibilidad de estimar la concentración de nitrógeno, clorofila y área foliar de la lechuga romana utilizando un método no destructivo basado en imágenes digitales de una cámara RGB e índices espectrales, los cuales, podrían utilizarse como una alternativa práctica y de bajo costo a los métodos destructivos tradicionales y proporcionar información precisa con mayor resolución espacial que las mediciones con sensores proximales como SPAD, que sería útil para su aplicación en la industria de producción de hortalizas de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones y manejo del cultivo

Este experimento se realizó de abril a mayo de 2018 en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (18° 58' 51" N, 99° 13 '74.55 " W, altitud 1.866 m) de la Universidad Autónoma de la Estado de Morelos, México. La temperatura del aire, la humedad relativa y la intensidad de la luz se registraron cada 5 minutos con un equipo de datos Hobo® U12-012 (Onset Computer Co., EE. UU.) durante todo el experimento. Los valores medios de temperatura, humedad relativa e intensidad lumínica fueron 26 °C, 45 % y 518 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente.

El cultivo de lechuga romana (*Lactuca sativa* var. Longifolia) 'Green Star' (Johnny's Seeds, EE. UU.) se sembró el 13 de marzo de 2018, en bandejas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato comercial BM2 Berger®. Después de 30 días, las plántulas de lechuga se trasplantaron en bolsas de polietileno de 10 L que contenían roca volcánica (llamada localmente tezontle, con un tamaño de grano de 1 a 7 mm) como sustrato.

Las plantas se regaron diariamente con 0.5 L (primeros 21 días) y 1.5 L (últimos 21 días) de una solución nutritiva Steiner (1984), modificada para suministrar cinco niveles de nitrógeno nitrato (N): 0, 4, 8, 12 y 16 $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NO}_3\text{-N}$ (correspondiente a 0, 248, 496, 744 y 992 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NO}_3\text{-N}$, respectivamente), según lo recomendado por Mercado-Luna *et al.* (2010).

La composición química de la solución nutritiva Steiner original era: 1,062 Ca (NO_3)₂ (nitrato de calcio), 303 KNO_3 (nitrato de potasio), 492 MgSO_4 (sulfato de magnesio), 261 K_2SO_4 (sulfato de potasio) y 136 KH_2PO_4 (fosfato monopotásico), en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Los macronutrientes se obtuvieron a partir de fertilizantes solubles en función de los tratamientos. Cuando fue necesario, se agregaron sulfato de calcio (272.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaSO_4) y cloruro de calcio (55.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2) para mantener un equilibrio de aniones-cationes de 20 $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ en las soluciones nutritivas.

Los micronutrientes se aplicaron a través de una mezcla comercial de quelatos Ultrasol Micro Mix (SQM, Chile), en una dosis de $80 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ de solución nutritiva. Para calcular esa dosis se consideró el aporte de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Fe. La mezcla comercial de micronutrientes contenía las siguientes concentraciones en porcentaje: Fe (7.5), Mn (3.7), B (0.4), Zn (0.6), Cu (0.3) y Mo (0.2). Después de preparar las soluciones nutritivas, se ajustó el pH entre 5.6 y 6.0 con H_2SO_4 (ácido sulfúrico). Las plantas se regaron para proporcionar una fracción de lixiviado del 15 % al 20 % para evitar la acumulación de sal.

Diseño experimental y datos de referencia

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 180 macetas en total (36 macetas por tratamiento) distribuidas en cinco tratamientos de nitrógeno: 0, 4, 8, 12 y $16 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3\text{-N}$. El muestreo se realizó semanalmente de 7 a 42 días después del trasplante (DAT), para el análisis se utilizaron 6 macetas de cada tratamiento con una planta por maceta como unidad experimental. El área foliar de cada planta en cm^2 se midió con un medidor de área portátil LI-3100 (LI-COR Biosciences, EE. UU.). La concentración de clorofila ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) se cuantificó a partir de las 18 hojas recién maduras (completamente expandidas) por tratamiento (3 hojas por planta) con el método espectrofotométrico descrito por Mackinney (1941) y Wettstein (1957). Las hojas utilizadas para medir el área foliar se secaron en un horno de aire forzado a una temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 h y se utilizaron para determinar el N total mediante el método micro-Kjeldahl (Kalra, 1997).

Adquisición y procesamiento de imágenes

Los objetivos codificados se colocaron como puntos de control terrestre (GCP) a una distancia de 45 por 45 cm. Las imágenes digitales se adquirieron utilizando una cámara RGB (roja, verde y azul) WB250F de 16 Mpx (Samsung) montada en un goniómetro (Sandmeier, 2000) en un rango de inclinación de 15° a 165° cada 25° , tomando al menos 50 fotografías en cada sesión con una superposición mínima del 70 %. Se realizó un proceso de restitución fotogramétrica utilizando el software Agisoft Photoscan, versión 1.2 (Agisoft LLC, Rusia) según Grenzdörffer (2014) para generar ortomosaicos escalados y modelos digitales tridimensionales (Fig.1).

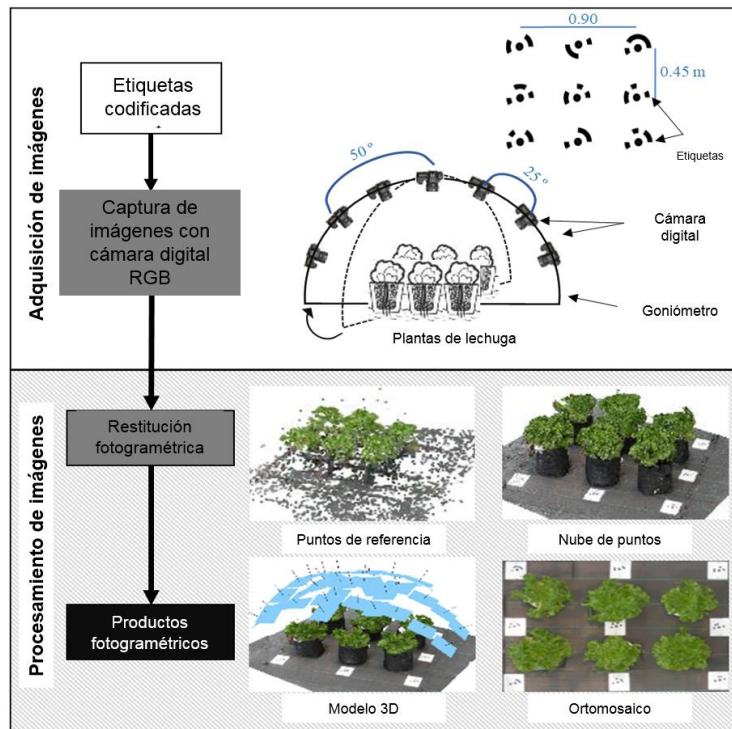


Figura 1. Proceso para generar ortomosaicos a escala y modelos 3D.

Clasificación de imágenes y cálculo de índices espectrales

Se calcularon doce índices de vegetación espectral basados en las tres bandas de región visible RGB (Cuadro 1) a partir de los ortomosaicos mediante un “script” en el software estadístico R, versión 3.5.0 (R Core Team, 2019).

Cuadro 1. Índices espectrales calculados a partir de imágenes digitales RGB (rojo, verde y azul).

Nombre del índice	Formula*	Referencias
1. Normalized green-red difference index (NGRDI)	$(G - R)/(G + R)$	Jannoura <i>et al.</i> , 2015
2. Normalized difference index (NDI)	$(R - G)/(R + G + 0.01)$	Lee & Lee, 2013
3. Intensidad (INT)	$(R + G + B)/3$	
4. Saturación (SAT)	$1 - (3 \times R \times G \times B)$	
5. Excess green index (ExG)	$((2 \times G) - (R + B))/(R + G + B)$	Baresel <i>et al.</i> , 2017
6. Índice R (<i>r</i>)	$R/(R + G + B)$	
7. índice G (<i>g</i>)	$G/(R + G + B)$	
8. Índice B (<i>b</i>)	$B/(R + G + B)$	
9. Índice binario (<i>rb</i>)	R/B	
10. Índice binario (<i>rg</i>)	R/G	Hunt <i>et al.</i> , 2013
11. índice binario (<i>bg</i>)	B/G	
12. Triangular green index (TGI)	$G - (0.39 \times R) - (0.61 \times B)$	

*Regiones de la banda espectral: R (rojo; 650–700 nm), G (verde; 500–550 nm), B (azul; 450–500 nm)

Cada imagen de índice de vegetación espectral fue sometida a un proceso de clasificación supervisado utilizando el método de máxima verosimilitud para separar los píxeles correspondientes al cultivo de lechuga, obteniendo imágenes clasificadas en tres clases: área foliar, sustrato y suelo. Los valores de píxeles del cultivo de lechuga en las imágenes clasificadas se compararon con los datos de referencia (nitrógeno, clorofila y área foliar) utilizando una matriz de coeficientes de correlación simple, según lo informado por Chung *et al.* (2017). Por lo tanto, se identificaron y seleccionaron aquellos índices espectrales que son estadísticamente diferentes y tienen el mayor coeficiente de correlación (*r*) y el menor error cuadrático medio (RMSE) (Fig. 2).

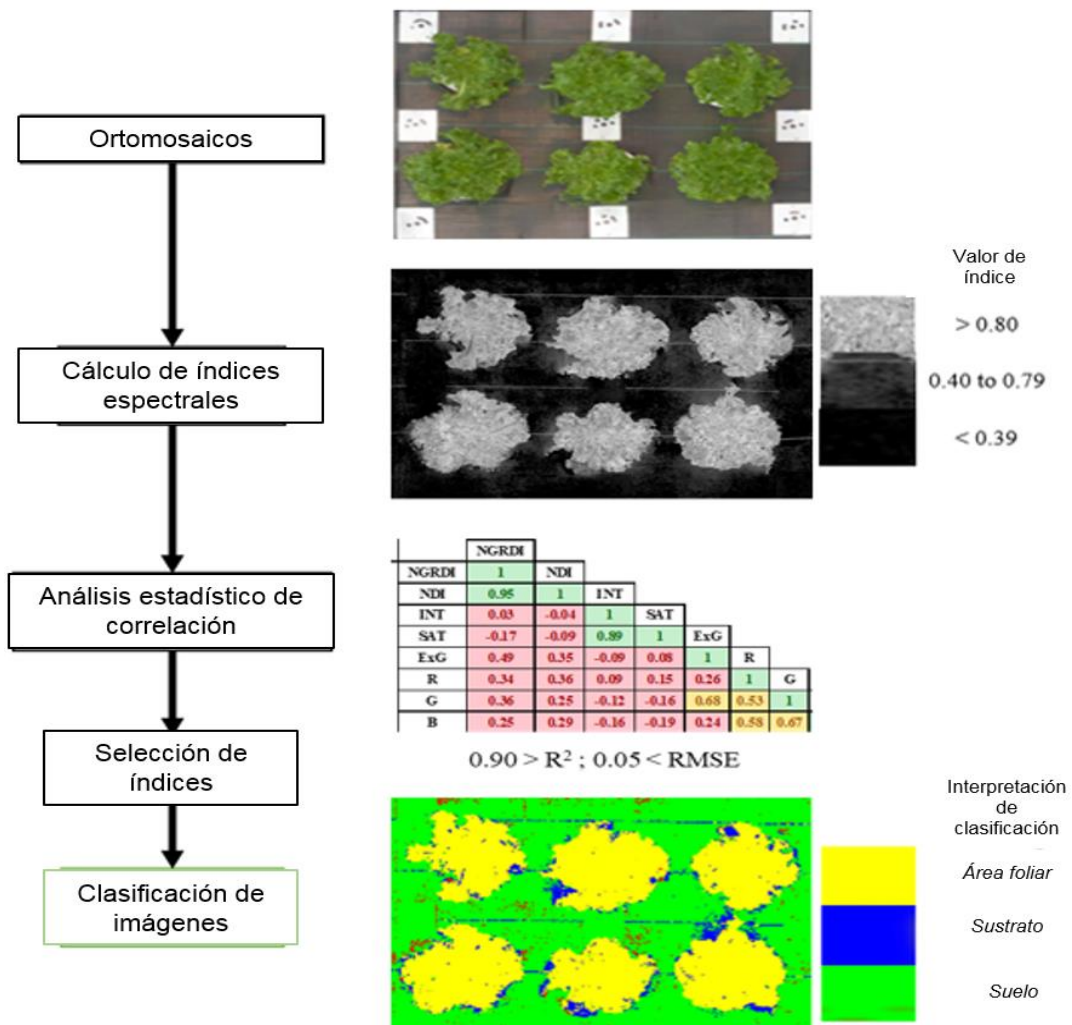


Figura 2. Proceso de análisis espectral de ortomosaicos escalados.

Análisis estadístico

El análisis de varianza y la prueba de Tukey para comparación por pares se realizó utilizando el software estadístico SAS, versión 9.1 (SAS Institute, EE. UU.) Con un factor unidireccional (nivel de nitrógeno) y significación estadística a $P \leq 0.01$. Se calculó la media aritmética (\bar{x}), el error estándar (EE), el coeficiente de variación (CV) y la diferencia mínima significativa (DMS). Además, se determinó el modelo de regresión lineal simple en el software estadístico SigmaPlot, versión 12 (SyStat Software Inc., EE. UU.) para evaluar la correlación entre los índices espectrales y los valores de los datos de referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta de los cultivos a los niveles de nitrógeno (N)

A los 42 DAT, el tratamiento de 16 mEq L⁻¹ NO₃-N tuvo los valores máximos (diferencia estadísticamente significativa) de Chl, concentración de N y área foliar en comparación con el resto de los tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Respuesta a diferentes niveles de NO₃-N a los 42 días después del trasplante (ddt) en lechuga romana.

Tratamiento mEq L ⁻¹ NO ₃ -N	\bar{X}		
	Clorofila (mg g ⁻¹ PF)	Nitrógeno (% PS)	Área foliar (cm ²)
0	0.387 b	2.48 b	49.3 d
4	0.396 b	2.51 b	51.0 cd
8	0.402 b	2.54 b	53.9 c
12	0.411 b	2.75 b	65.6 b
16	0.453 a	3.76 a	73.1 a
CV	0.067	0.085	0.070
LSD	0.038	0.906	4.437

Nota. Letras diferentes entre columnas significan una diferencia estadística mínima ($P = 0.01$). PF: Peso fresco. PS: peso seco.

Los resultados mostraron una relación positiva entre la concentración de nitrógeno de la solución nutritiva y la concentración de nitrógeno en el tejido vegetal. Esta tendencia fue informada por Zandvakili *et al.* (2019) en cuatro cultivares de lechuga y por Fallovo *et al.* (2009) en la cosecha de lechuga "Green Salad Bowl". De manera similar, hubo una relación positiva entre la concentración de nitrógeno aplicada con la concentración de clorofila y el área foliar. Estas mismas tendencias se informaron para clorofila en la lechuga "Parris Island" (Konstantopoulou *et al.*, 2012). El nitrógeno es el nutriente más

plantas, por lo que se conocen como índices de verdor. Posteriormente, dada su capacidad para resaltar las características espectrales de las bandas verde y roja, se utilizaron como indicador de la cantidad y calidad del material fotosintético de las plantas (Rasmussen *et al.*, 2016), por lo que en hortalizas de hoja como la lechuga podría ser un indicador de clorofila, área foliar y biomasa. En el cultivo de lechuga, Jung *et al.* (2015) reportaron que el índice *g* tuvo la correlación más alta para la estimación del área foliar ($r = 0.93$). Nuestros resultados son similares a los reportados por Xue y Yang (2008), donde NGRDI y NDI podrían usarse para el cálculo de la concentración de N en la etapa vegetativa del arroz ($r = 0.95$). Por lo anterior, estos índices permiten estimar la estimación del área foliar de forma precisa y rápida similar a lo reportado en cultivos hortícolas por Usha y Singh (2013).

El índice TGI mostró una correlación moderada y significativa ($r > 0.60$) con clorofila y nitrógeno. En contraste, los índices INT, SAT, *r*, *b*, *rb*, *bg* y *rg* produjeron una correlación no significativa débil a moderada ($r < 0.60$) con los datos de referencia.

En resumen, se encontró que los índices espectrales más eficientes son aquellos que consideran las bandas espectrales de la región verde y roja. Por otro lado, los índices ExG y *g* que incorporan la banda azul tienen menor desempeño en la predicción de clorofila, nitrógeno y área foliar, lo que puede deberse a la baja sensibilidad del tejido vegetal en la banda azul (~ 450 nm).

Comparación entre datos de referencia e índices espectrales

Concentración de clorofila

Los valores de clorofila se compararon para dos períodos: 1) todo el ciclo de cultivo de 1 a 42 ddt, y 2) de 22 a 42 ddt (Cuadro 4). Para todo el ciclo, los índices NGRDI ($r = 0.94$) y *g* ($r = 0.86$) tuvieron una fuerte correlación lineal (Fig. 3).

Cuadro 4. Coeficientes de regresión lineal y error estándar para la relación entre la concentración de clorofila y los índices espectrales.

Periodo evaluado	Índice	Regresión lineal coeficiente		Error estándar
		a	b	
1 a 42 días	NGRDI**	0.1052	1.3601	0.07
	EXG**	0.1054	0.8673	0.08
	G**	0.1133	2.1406	0.06
22 a 42 días	NGRDI**	1.4536	0.1804	0.06
	EXG**	1.4524	0.6623	0.07
	G**	1.0622	0.2043	0.05

** – alta correlación entre las variables ($P = 0.01$)

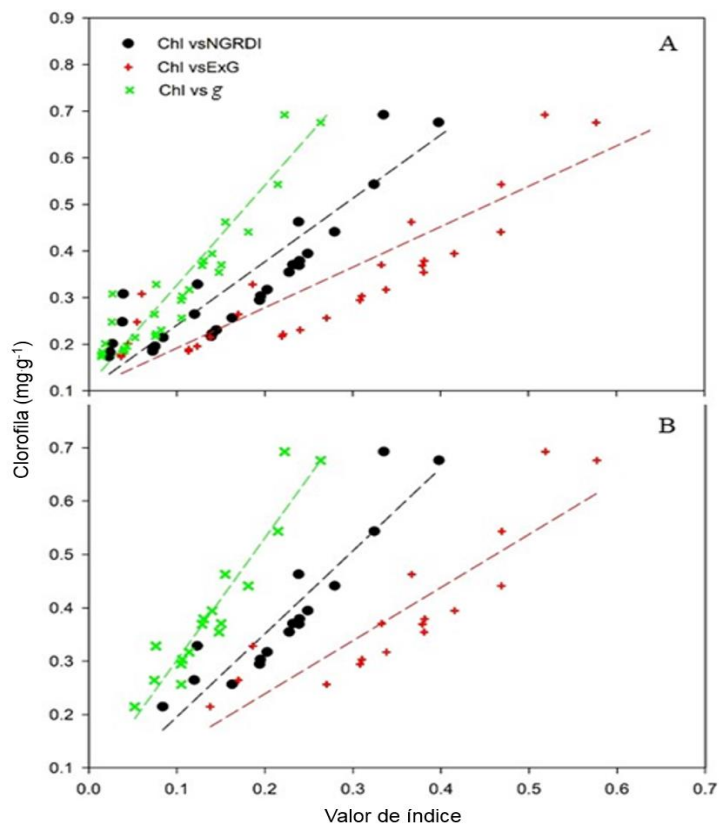


Figura 3. Correlación entre la concentración de clorofila y los índices espectrales (NGRDI, ExG y g) a 42 ddt (A) y los últimos 21 ddt (B).

Estos resultados son similares a los obtenidos por Álvarez-Bermejo *et al.* (2017) en tomate y pepino utilizando el NGRDI ($r = 0.90$), y De la Cruz *et al.* (2011) en trigo utilizando el índice g ($r = 0.97$). Además, existe una fuerte correlación lineal con el índice ExG ($r = 0.88$, RMSE = 0.03), valor comparable al reportado por Elazab *et al.* (2016) en trigo ($r > 0.93$). Por otro lado, Lin *et al.* (2013) obtuvieron coeficientes de correlación de 0.85 entre la concentración de ExG y clorofila en plantas de pepino durante su etapa vegetativa.

Se obtuvo un mayor ajuste al modelo de regresión lineal si se consideran los valores de 22 a 42 ddt (Fig. 3). El índice que presentó mayor correlación fue ExG ($r = 0.92$, RMSE = 0,03) frente a NGRDI ($r = 0.93$, RMSE = 0.04) y g ($r = 0.93$, RMSE = 0.02). Sun *et al.* (2016) obtuvieron resultados similares, ya que registraron fuertes correlaciones ($r \geq 0.88$) entre el índice ExG y la concentración de clorofila en pepino. En este sentido, Baresel *et al.* (2017) sugieren que los índices NGRDI y ExG pueden determinar la concentración de clorofila en cultivos, pues al usar la banda g (500 a 550 nm) resalta los pigmentos responsables del color verde de las plantas como la clorofila permitiendo su cuantificación. Por otro lado, Hunt *et al.* (2013) encontraron que la relación entre NGRDI y Chl no está bien establecida para todas las etapas del cultivo, pero podría ser más pronunciada en las etapas iniciales debido a la existencia de una correlación subyacente con el área foliar.

Concentración de nitrógeno

La Cuadro 5 muestra el análisis de correlación y los coeficientes de regresión entre la concentración de N y los valores de los índices espectrales.

Cuadro 5. Coeficientes de regresión lineal para la relación entre la concentración de nitrógeno y los índices espectrales

Periodo evaluado	Índice	Regresión lineal coeficiente		Error estándar
		a	b	
	NGRDI**	7.9238	1.8789	0.06
1 a 42 días	EXG**	5.1094	1.8646	0.07
	G**	12.2480	0.1133	0.07
	NGRDI**	3.6735	1.5245	0.08
22 a 42 días	EXG**	2.3247	1.9866	0.06
	G**	6.6737	0.1535	0.05

** – alta correlación entre las variables ($P = 0.01$)

Los valores de concentración de nitrógeno tuvieron una alta correlación lineal con el NGRDI ($r = 0.95$, $RMSE = 0.06$), ExG ($r = 0.94$, $RMSE = 0.04$) y el índice g ($r = 0.96$, $RMSE = 0.04$) a lo largo de los 42 ddt (Fig. 4).

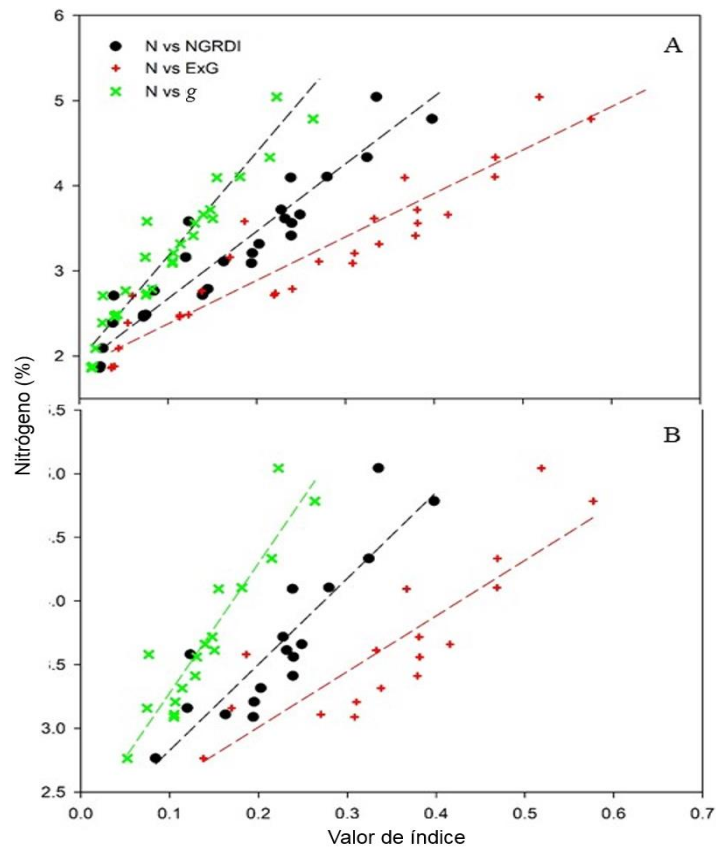


Figura 4. Correlación entre la concentración de nitrógeno (N) y los índices espectrales (NGRDI, ExG y g) a 42 DAT (A) y los últimos 21 DAT (B).

Durante la etapa vegetativa del cultivo de lechuga (últimos 21 ddt del ciclo del cultivo), la relación entre la concentración de nitrógeno y el NGRDI ($r = 0.97$, $RMSE = 0.05$), ExG ($r = 0.97$, $RMSE = 0.04$) y g ($r = 0.97$, $RMSE = 0.06$) mostró un mayor ajuste al modelo de regresión lineal (Fig. 4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Meyer y Neto (2008), quienes reportaron coeficientes de correlación ≥ 0.85 para el índice ExG en la cuantificación de nitrógeno en etapas de crecimiento vegetativo en soya.

Pocos estudios utilizan el NGRDI para determinar la concentración de nitrógeno en vegetales; sin embargo, el uso de este índice espectral ha mostrado una fuerte correlación (≥ 0.84) en la etapa vegetativa del maíz (Hunt *et al.*, 2013; Elazab *et al.*, 2016), arroz (Zheng *et al.*, 2018) y trigo (Yang *et al.*, 2020). Además, se demostró que los índices espectrales de la región visible RGB son eficientes para determinar la concentración de nitrógeno en las plantas de frijol debido a su

efecto sobre la cantidad y coloración de los pigmentos dentro de los tejidos vegetales (Lee y Lee, 2013), lo que indica que el uso de los índices representa una metodología confiable y precisa para cuantificar la concentración de nitrógeno en cultivos de hojas.

Área foliar

La Cuadro 6 muestra los coeficientes de regresión y los resultados del análisis estadístico.

Cuadro 6. Coeficientes de regresión exponencial para la relación entre el área foliar y los índices espectrales.

Periodo evaluado	Índice	Regresión exponencial		Error estándar
		Coeficiente		
		a	b	
1 a 42 días	NGRDI**	1.2705	2.4701	0.06
	EXG**	2.6704	2.1802	0.07
	G**	4.1901	1.8506	0.07
22 a 42 días	NGRDI**	1.5974	1.0563	0.08
	EXG**	1.2445	1.4357	0.06
	G**	2.1352	1.0406	0.05

** – alta correlación entre las variables ($P = 0.01$)

Los índices NGRDI ($r = 0.94$, $RMSE = 0.05$), ExG ($r = 0.95$, $RMSE = 0.04$) y g ($r = 0.96$, $RMSE = 0.03$) mostraron el mejor ajuste a un modelo exponencial para estimar el área foliar (Fig. 5).

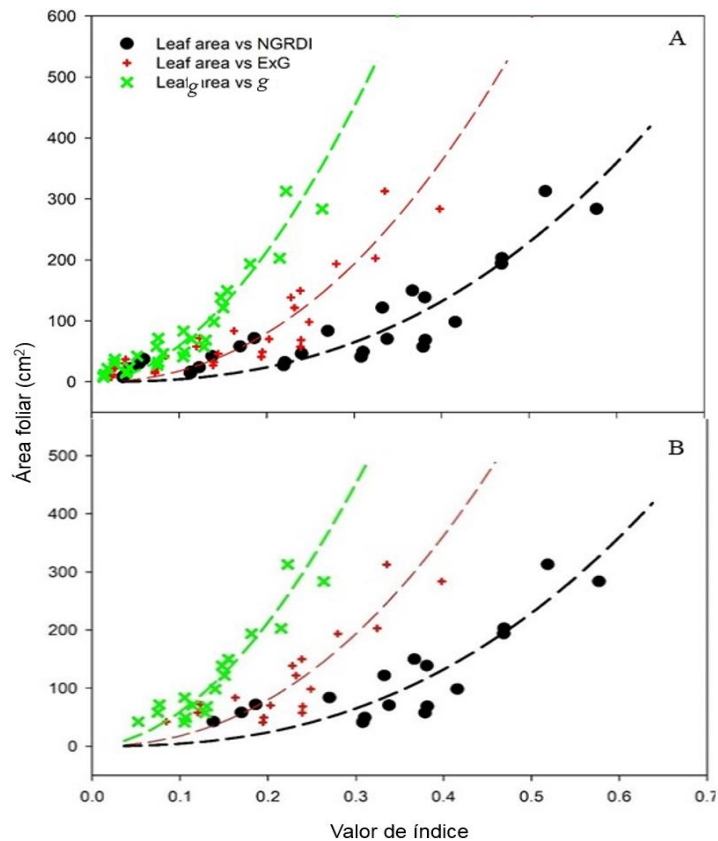


Figura 5. Correlación entre la concentración de área foliar y los índices espectrales (NGRDI, ExG y g) a 42 ddt (A) y los últimos 21 ddt (B).

Este modelo matemático es diferente al reportado por Campillo *et al.* (2010) para el índice g , porque encontraron un mejor ajuste a un modelo lineal ($r \geq 0.92$) en tomate. Además, Horgan *et al.* (2015) y Beniaich *et al.* (2019) reportaron valores con ajuste a modelos lineales entre área foliar y NGRDI en pimiento dulce ($r = 0.83$) y albahaca ($r = 0.85$), respectivamente.

La biomasa se puede utilizar como predictor del área foliar, especialmente en las primeras etapas del crecimiento del cultivo. Estudios en cebolla (Ballesteros *et al.*, 2018) y tomate (Sun y Wang, 2019) reportan altas correlaciones ($r \geq 0.87$) entre el índice espectral g y el área foliar; esto se atribuye a la tasa de crecimiento del cultivo. Además, Hunt *et al.* (2013) encontraron que el NGRDI está altamente correlacionado con la cantidad de biomasa en los cultivos de maíz y soja, especialmente en las primeras etapas, pero tiende a saturarse a medida que se

desarrolla el cultivo. Por lo tanto, NGRDI puede ser útil en plantas de ciclo corto como las hortalizas de hoja.

En las primeras etapas del cultivo de lechuga, la tasa de crecimiento del área foliar es menor que en las últimas etapas; por tanto, la relación con los índices con este parámetro no es lineal. Además, los resultados de nuestro experimento muestran un mejor ajuste al modelo exponencial en los últimos 21 días de cultivo. Esto se puede explicar, porque en las primeras etapas la cámara RGB tiene una limitación espacial para detectar el área foliar en hojas pequeñas, esta limitación se reduce a medida que crece el cultivo. Por lo tanto, la eficiencia de esta herramienta utilizando los índices espectrales derivados de imágenes digitales RGB depende de la fenología y el hábito de crecimiento de la planta.

CONCLUSIONES

El índice NGRDI tuvo el mayor coeficiente de correlación con los valores de concentración de clorofila ($r = 0.95$) y N ($r = 0.93$). Además, el índice de exceso de verde (ExG) obtuvo la mayor correlación con el área foliar ($r = 0.92$). Estos índices resaltan la respuesta espectral en las regiones verde y roja y son más precisos que los índices que utilizan la banda azul.

La lechuga romana tiene un crecimiento foliar acelerado en las últimas etapas de su ciclo vegetativo. En este estudio, los valores de los índices NGRDI, ExG y g comparados con el área foliar se ajustan mejor a un modelo exponencial. Entonces, el uso de esta técnica requiere considerar el tipo de cultivo y su fenología o hábito de crecimiento.

La precisión de los índices espectrales derivados de imágenes digitales RGB (rojo, verde y azul) para estimar la concentración de nitrógeno, clorofila y el área foliar aumenta en las últimas etapas del cultivo de lechuga romana. Esto se debe a que en las primeras etapas de crecimiento las hojas son de tamaño pequeño, lo que constituye una limitación espacial para la detección por la cámara RGB.

El uso de índices espectrales derivados de imágenes digitales RGB es útil y preciso para la estimación de la concentración de nitrógeno, clorofila y el área foliar durante la producción de lechuga. Podría ser una alternativa de bajo costo a los métodos destructivos, y puede ser parte de un sistema combinado con medidores portátiles (SPAD, atLEAF y otros) para el monitoreo en tiempo real de vegetales cultivados.

REFERENCIAS

- Ali M. M., Al-ani A., Eamus D., Tan D. K. Y. 2013. AI algorithm based on the RGB colour model to estimate plant chlorophyll and nitrogen contents. 2013 International Conference on Sustainable Environment and Agriculture, 57: 52–60. <https://doi.org/10.7763/IPCBEE.2013.V57.10>
- Álvarez-Bermejo J. A., Giagnocavo C., Li M., Morales E. C., Santos D. P. M., Yang X. T. 2017. Image processing methods to evaluate tomato and zucchini damage in post-harvest stages. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 10(5): 126–133. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20171005.3087>
- Ballesteros R., Ortega J. F., Hernandez D., Moreno M. A. 2018. Onion biomass monitoring using UAV-based RGB imaging. *Precision Agriculture*, 19(5): 840–857. <https://doi.org/10.1007/s11119-018-9560-y>
- Baresel J. P., Rischbeck P., Hu Y., Kipp S., Hu Y., Barmeier G., Mistele B. 2017. Use of a digital camera as alternative method for non-destructive detection of the leaf chlorophyll content and the nitrogen nutrition status in wheat. *Computers and Electronics in Agriculture*, 140: 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.05.032>
- Beniaich A., Silva M. L. N., Avalos F. A. P. Menezes M. D. de, Cândido B. M. 2019. Determination of vegetation cover index under different soil management systems of cover plants by using an unmanned aerial vehicle with an onboard digital photographic camera. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(1): 49. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n1p49>
- Cammarano D., Fitzgerald G. J., Casa R., Basso B. 2014. Assessing the robustness of vegetation indices to estimate wheat N in mediterranean environments. *Remote Sensing*, 6 (4): 2827–2844

<https://doi.org/10.3390/rs6042827>

- Campillo C., García M. I., Daza C., Prieto M. H. 2010. Study of a non-destructive method for estimating the leaf area index in vegetable crops using digital images. *HortScience*, 45(10): 1459–1463. <https://doi.org/10.21273/hortsci.45.10.1459>
- Chung Y. S., Choi S. C., Silva R. R., Kang J. W., Eom J. H., Kim C. 2017. Case study: estimation of sorghum biomass using digital image analysis with Canopeo. *Biomass and Bioenergy*, 105: 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.06.027>
- De la Cruz D. J. A., Sánchez G. P., Galvis S. A., Carrillo S. J. A. 2011. Spectral indexes in sweet pepper for diagnosis of nitrogen nutrient status. *Terra Latinoamericana*, 29 (3): 259–265.
- Elazab A., Ordóñez R. A., Savin R., Slafer G. A., Araus J. L. 2016. Detecting interactive effects of N fertilization and heat stress on maize productivity by remote sensing techniques. *European Journal of Agronomy*, 73: 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.11.010>
- Elsayed S., Barmeie, G., Schmidhalter U. 2018. Passive Reflectance Sensing and Digital Image Analysis Allows for Assessing the Biomass and Nitrogen Status of Wheat in Early and Late Tillering Stages. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01478>
- Falovo C., Roupael Y., Rea E., Battistelli A., Colla G. 2009. Nutrient solution concentration and growing season affect yield and quality of *Lactuca sativa* L. var. *acephala* in floating raft culture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89 (10): 1682–1689. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3641>
- Grenzdörffer G. J. 2014. Crop height determination with UAS point clouds. ISPRS Technical Commission I Symposium. Denver, USA, p. 135–140. <https://doi.org/10.5194/isprsarchives-XL-1-135-2014>
- Gruda N., Bisbis M., Tanny, J. 2019. Impacts of protected vegetable cultivation on climate change and adaptation strategies for cleaner production A review. *Journal of Cleaner Production*, 225: 324–339. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.295>
- Horgan G. W. Song, Y. Glasbey C. A., Van Der Heijden G. W. A. M., Polder G., Dieleman J. A., Van Eeuwijk F. A. 2015. Automated estimation of leaf area

- development in sweet pepper plants from image analysis. *Functional Plant Biology*, 42(5): 486–492. <https://doi.org/10.1071/FP14070>
- Hunt E. R., Cavigelli M., Daughtry C. S. T., McMurtrey J. E., Walthall C. L. 2005. Evaluation of Digital Photography from Model Aircraft for Remote Sensing of Crop Biomass and Nitrogen Status. *Precision Agriculture*, 6 (4): 359–378. <https://doi.org/10.1007/s11119-005-2324-5>
- Hunt E. R., Doraiswamy P. C., McMurtrey J. E., Daughtry C. S. T., Perry E. M., Akhmedov B. 2013. A visible band index for remote sensing leaf chlorophyll content at the canopy scale. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 21: 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.jag.2012.07.020>
- Jannoura R., Brinkmann K., Uteau D., Bruns C., Joergensen R. G. 2015. Monitoring of crop biomass using true colour aerial photographs taken from a remote controlled hexacopter. *Biosystems Engineering*, 129: 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.11.007>
- Jung D.-H., Park S. H., Han X. Z., Kim H.-J. 2015. Image Processing Methods for Measurement of Lettuce Fresh Weight. *Journal of Biosystems Engineering*, 40(1): 89–93. <https://doi.org/10.5307/JBE.2015.40.1.089>
- Kalra Y. 1997. Handbook of reference methods for plant analysis. USA, p. 88
- Konstantopoulou E., Kapotis G., Salachas G., Petropoulos S. A., Chatzieustratiou E., Karapanos I. C., Passam H. C. 2012. Effect of nitrogen application on growth parameters, yield and leaf nitrate content of greenhouse lettuce cultivated during three seasons. *Journal of Plant Nutrition*, 35 (8): 1246–1254. <https://doi.org/10.1080/01904167.2012.676135>
- Lee K.-J., Lee B.-W. 2013. Estimation of rice growth and nitrogen nutrition status using color digital camera image analysis. *European Journal of Agronomy*, 48: 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.02.011>
- Lin K., Chen J., Si H., Wu J. 2013. A review on computer vision technologies applied in greenhouse plant stress detection. *Communications in Computer and Information Science*, 363: 192–200. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37149-3_23
- Liu S., Li L., Gao W., Zhang Y., Liu Y., Wang S., Lu J. 2018. Diagnosis of nitrogen status in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) using *in-situ*

- hyperspectral data and unmanned aerial vehicle (UAV) multispectral images. *Computers and Electronics in Agriculture*, 151: 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.05.026>
- Mackinney G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 140 (2): 315–322.
- Mao H., Gao H., Zhang X., Kumi F. 2015. Nondestructive measurement of total nitrogen in lettuce by integrating spectroscopy and computer vision. *Scientia Horticulturae*, 184: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.027>
- Mercado-Luna A., Rico-García E., Lara-Herrera, A., Soto-Zarazúa G., Ocampo-Velásquez R., Guevara-González R., Herrera-Ruiz G., Torres-Pacheco I. 2010. Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Agricultural Research*, 9 (33): 5326–5332. <https://doi.org/10.5897/AJB10.130>
- Meyer G. E., Neto J. C. 2008. Verification of color vegetation indices for automated crop imaging applications. *Computers and Electronics in Agriculture*, 63(2): 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2008.03.009>
- Muñoz-Huerta R. F., Guevara-Gonzalez R. G., Contreras-Medina L. M., Torres-Pacheco I., Prado-Olivarez J., Ocampo-Velazquez R. V. 2013. A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: Advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors (Switzerland)*, 13 (8): 10823–10843. <https://doi.org/10.3390/s130810823>
- Parks S. E., Irving D. E., Milham P. J. 2012. A critical evaluation of on-farm rapid tests for measuring nitrate in leafy vegetables. *Scientia Horticulturae*, 134: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.015>
- Paz Pellat F., Romero Sanchez M. E., Palacios Vélez E., Bolaños González M., Aldrete A., Valdez Lazalde J. R. 2015. Scopes and limitations of spectral vegetation indices: analysis of broad band indices. *Terra Latinoamericana*, 33 (1): 27–49 (in Spanish).
- Prey L., von Bloh M., Schmidhalter U. 2018. Evaluating RGB imaging and multispectral active and hyperspectral passive sensing for assessing early plant vigor in winter wheat. *Sensors*, 18 (9): 2931. <https://doi.org/10.3390/s18092931>

- Rasmussen J., Ntakos G., Nielsen J., Svensgaard J., Poulsen R. N., Christensen S. 2016. Are vegetation indices derived from consumer-grade cameras mounted on UAVs sufficiently reliable for assessing experimental plots? *European Journal of Agronomy*, 74: 75–92. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.11.026>
- Sandmann M., Graefe J., Feller C. 2013. Optical methods for the non-destructive estimation of leaf area index in kohlrabi and lettuce. *Scientia Horticulturae*, 156: 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.04.003>
- Sandmeier S. R. 2000. Acquisition of bidirectional reflectance factor data with field goniometers. *Remote Sensing of Environment*, 73 (3): 257–269. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(00)00102-4)
- Santamaria P., Elia A., Serio F. 2002. Effect of solution nitrogen concentration on yield, leaf element content, and water and nitrogen use efficiency of three hydroponically-grown rocket salad genotypes. *Journal of Plant Nutrition*, 25 (2): 245–258. <https://doi.org/10.1081/PLN-100108833>
- Steiner A. A. 1984. The universal nutrient solution. *Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture*. Wageningen, The Netherlands, p. 633–649.
- Sun G. X., Li Y. B., Wang X. C., Hu G. Y., Wang X., Zhang Y. 2016. Image segmentation algorithm for greenhouse cucumber canopy under various natural lighting conditions. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 9(3): 130–138. <https://doi.org/10.3965/j.ijabe.20160903.2102>
- Sun G., Wang X. 2019. Three-dimensional point cloud reconstruction and morphology measurement method for greenhouse plants based on the Kinect sensor self-calibration. *Agronomy*, 9(10): 203–263 <https://doi.org/10.3390/agronomy9100596>
- Taiz L., Zeiger E., Moller I. M., Murphy A. 2014. *Plant Physiology & Development*. (S. Associates, Ed.) (6 th).
- Usha K., Singh B. 2013. Potential applications of remote sensing in horticulture- A review. *Scientia Horticulturae*, 153: 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.01.008>
- Vollmann J., Walter H., Sato T., Schweiger P. 2011. Digital image analysis and chlorophyll metering for phenotyping the effects of nodulation in soybean.

- Computers and Electronics in Agriculture, 75 (1): 190–195.
<https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.11.003>
- Wettstein D. 1957. Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12 (3): 427–506 (in German).
- Xue L., Yang L. 2008. Recommendations for nitrogen fertilizer topdressing rates in rice using canopy reflectance spectra. *Biosystems Engineering*, 100 (4): 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.05.005>
- Yadav S. P., Ibaraki Y., Gupta S. D. 2010. Estimation of the chlorophyll content of micropropagated potato plants using RGB based image analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100 (2): 183–188.
<https://doi.org/10.1007/s11240-009-9635-6>
- Yuzhu H. 2011. Nitrogen determination in pepper (*Capsicum frutescens* L.) plants by color image analysis (RGB). *African Journal of Biotechnology*, 10(77): 1003–1023. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1974>
- Zandvakili O. R., Barker A. V., Hashemi M., Etemadi F., Autio W. R., Weis S. 2019. Growth and nutrient and nitrate accumulation of lettuce under different regimes of nitrogen fertilization. *Journal of Plant Nutrition*, 42 (14): 1575–1593. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1617313>
- Zhao J., Zhang Y., Tan Z., Song Q., Liang N., Yu L., Zhao J. 2012. Using digital cameras for comparative phenological monitoring in an evergreen broad-leaved forest and a seasonal rain forest. *Ecological Informatics*, 10: 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2012.03.001>
- Zheng H., Cheng T., Li D., Zhou X., Yao X., Tian Y., Zhu Y. 2018. Evaluation of RGB, Color-Infrared and Multispectral Images Acquired from Unmanned Aerial Systems for the Estimation of Nitrogen Accumulation in Rice. *Remote Sensing*, 10(6): 824. <https://doi.org/10.3390/rs10060824>
- Zhou W., Lv T., Hu Y., Liu W., Bi Q., Jin C., Lin X. 2020. Effect of nitrogen limitation on antioxidant qualities is highly associated with genotypes of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Pedosphere*, 30(3): 414–425.
[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60833-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60833-7)

CAPÍTULO III

RELACIONES ENTRE LAS LECTURAS DE MEDIDORES PORTÁTILES DE CLOROFILA Y LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA, NITRÓGENO Y MATERIA AÉREA FRESCA EN ALBAHACA 'NUFAR'

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100 con las concentraciones de clorofila y nitrógeno en albahaca 'Nufar'. Además, determinamos la relación de las lecturas de la medición de clorofila con la materia aérea fresca de brotes de albahaca. Las plantas se regaron con cinco niveles de N (0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ de NO₃) con base en una solución Steiner modificada durante 42 días después del trasplante. Las plantas se evaluaron semanalmente con SPAD, atLEAF, MC-100 y concentración de clorofila, nitrógeno y materia aérea fresca en laboratorio. La relación entre las lecturas SPAD y concentración de clorofila, nitrógeno y materia aérea fresca fue fuerte, positiva y significativa, con coeficientes de correlación entre 0.94 y 0.98, y coeficientes de determinación de 0.91 a 0.98. Para las lecturas atLEAF, los coeficientes de correlación fueron de 0.96 a 0.99, y Se obtuvieron coeficientes de determinación entre 0.91 a 0.97. Se observó una relación similar, con coeficientes de correlación y determinación de 0.96 a 0.99 y de 0.91 a 0.97, respectivamente, con las lecturas del MC-100. Las relaciones entre las lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 también fueron fuertes, positivas y significativas, con un coeficiente de correlación de 0.98 y un coeficiente de determinación de 0.96. Las ecuaciones de regresión mostraron que las lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 en albahaca estaban relacionadas linealmente con clorofila, nitrógeno y materia aérea fresca. Los medidores SPAD, atLEAF y MC-100 pueden usarse para estimar la concentración de nitrógeno de una manera no destructiva, rápida y confiable durante el cultivo de albahaca; sin embargo, atLEAF podría considerarse una alternativa menos costosa en comparación con los medidores SPAD y MC-100.

PALABRAS CLAVES: *Ocimum basilicum* L., medidor portátil, muestreo no destructivo, nutrición de cultivos

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es un elemento esencial e indispensable para el crecimiento y desarrollo de las plantas porque es un componente integral de las proteínas, los aminoácidos, ácidos nucleicos y la clorofila. La clorofila genera el color verde característico de las plantas y es un pigmento esencial para la fotosíntesis (Taiz *et al.*, 2014). La concentración de clorofila de la hoja está estrechamente correlacionada con la concentración de nitrógeno en la planta (Zebarth *et al.*, 2002), por lo tanto, monitorear las concentraciones de clorofila y nitrógeno puede ayudar a maximizar el manejo de nutrientes para un crecimiento óptimo de la planta y rendimiento de cultivos agrícolas y hortícolas (Argenta *et al.*, 2003).

Las determinaciones de clorofila y nitrógeno mediante métodos destructivos son precisas, pero requieren mucho tiempo y suelen ser costosas (Kalaji *et al.*, 2017). Por el contrario, los medidores portátiles no destructivos se han utilizado con éxito para algunas especies de plantas para estimar clorofila y/o nitrógeno (Cunha *et al.*, 2015; Kokila *et al.*, 2018) y así permitir el monitoreo en la misma hoja y en diferentes partes del ciclo de producción del cultivo (Kalaji *et al.*, 2017). El medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Konica Minolta®, Japón) puede usarse para la determinación rápida y no destructiva de la concentración relativa de clorofila en la hoja (Ali *et al.*, 2007). Brevemente, la transmisión de luz a través de la hoja se mide a 650 y 940 nm, la longitud de onda de 650 nm coincide con la región espectral de la actividad máxima de clorofila y la transmitancia a 940 nm se usa para compensar factores como el contenido de humedad de la hoja (Padilla *et al.* 2018).

Las lecturas de SPAD están relacionadas con la concentración de clorofila foliar (Basyouni *et al.*, 2015; Uddling *et al.*, 2007). El medidor de clorofila atLEAF Plus (FT Green LLC®, EE. UU.) funciona de manera similar al medidor SPAD pero usa una longitud de onda de 660 nm en lugar de 650 nm, y produce mediciones con valores similares a los obtenidos con SPAD (Padilla *et al.*, 2018). Además, el medidor atLEAF es una alternativa más económica en comparación con el medidor SPAD (de Souza *et al.*, 2019; Basyouni *et al.*, 2015), mientras que el medidor de clorofila MC-100 (Apogee Instruments Inc. Logan, UT, EE. UU.) registra la concentración relativa de clorofila a la longitud de onda de 653 nm y

931 nm en un área de aproximadamente 64 mm² (de Souza *et al.* 2019) y tiene se ha utilizado para determinar la concentración de clorofila en hojas, evaluación de estrés nutricional y optimización de cultivos (Padilla *et al.*, 2018).

La concentración de clorofila y nitrógeno determinada en el laboratorio tiene altas correlaciones con las lecturas de SPAD en cultivos que incluyen maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Hurtado *et al.*, 2010) y en cultivos de hortalizas que incluyen tomates (*Solanum lycopersicum* L.) (Ferreira *et al.*, 2006) y repollo (*Brassica oleracea* L.). Si bien se ha informado que el sistema atLEAF tiene altas correlaciones para cultivos que incluyen maíz y trigo (Zhu *et al.*, 2012), y cultivos hortícolas ornamentales que incluyen poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch) (Dunn *et al.*, 2018a) y hierbas aromáticas como la salvia (*Salvia splendens* Sellow ex Nees) (Dunn *et al.*, 2018b). El medidor MC-100 es relativamente nuevo y los datos son escasos, de Souza *et al.* (2019) ha informado correlaciones estadísticamente significativas en pimiento dulce (*Capsicum annuum* L.).

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.) es un cultivo mundial importante, que representa aproximadamente 14.9 millones de toneladas de producción en todo el mundo (FAO, 2019). En México, la albahaca es un importante cultivo de hortalizas de hoja, ocupando el tercer lugar en producción, con 352.78 toneladas producidas (SIAP, 2019), y representa 120 millones de dólares en exportaciones a 12 países del mundo (OEC, 2019).

En las verduras de hoja y las hierbas aromáticas, el color verde de las hojas es especialmente importante como indicador de calidad para el consumo fresco y la comercialización (La *et al.*, 2010). La determinación de la concentración de clorofila y nitrógeno en las hojas *in situ* a lo largo del tiempo representa una importante herramienta de producción de cultivos para maximizar la calidad y la comerciabilidad. El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre clorofila, nitrógeno y materia aérea fresca con lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 en albahaca 'Nufar'.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y material vegetal

El experimento se realizó en un invernadero de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado Morelos, ubicada en Cuernavaca, Morelos, México (18° 58' 51" N, 99° 13' 55" W a una altitud de 1.866 m) durante mayo y junio de 2019.

El invernadero se cubrió con plástico de color blanquecino y malla anti-pulgones en las paredes laterales. Los valores de temperatura, humedad relativa y radiación solar se registraron cada 5 minutos durante la duración del estudio (Hobo® modelo U12-012, Onset Computer Corporation, Bourne, MA). Las temperaturas máximas y mínimas registradas fueron 42 °C y 14 °C, respectivamente, con una media de 26 °C. La humedad relativa fue de 80, 20 y 49 % correspondientes a máxima, mínima y media, respectivamente. La radiación solar promedio fue de 545 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Las semillas de albahaca 'Nufar' (Johnny's Seeds, ME, EE. UU.) Se sembraron el 1 de abril de 2019 en una bandeja de poliestireno de 200 cavidades llena con sustrato de germinación de semillas comerciales BM2 Berger®, 30 días después, las plántulas se trasplantaron en bolsas de polietileno de 8 L, que contenía roca volcánica (localmente llamada tezontle) como sustrato con una granulometría de 1 a 10 mm (Cruz-Crespo *et al.*, 2012).

Tratamientos y medición de variables

Las plantas se regaron durante 21 días desde el trasplante con 0.5 - 1.0 L de solución nutritiva Steiner (1984), modificada para aplicar cinco niveles de nitrato (0, 4, 8, 12 y 16 $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$) (Mercado-Luna *et al.*, 2010). Las plantas se regaron para lograr un volumen de lixiviado del 15 al 20 % para evitar la acumulación de sales. Los micronutrientes se agregaron a la solución nutritiva como quelatos a 80 $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ del Microsol Rexene® Mix SQM comercial (GA, EE. UU.). El pH de las soluciones nutritivas se ajustó a 5.6 – 6.0 con ácido sulfúrico.

Para las mediciones *in situ* se utilizaron los equipos portátiles SPAD-502 Plus Minolta, atLEAF Chl Plus y MC-100 Apogee Instruments Inc. (Figura 1), de

acuerdo con la metodología sugerida por León *et al.* (2007) y de Souza *et al.* (2019). Las lecturas se tomaron entre las 11:00 y las 12:00; el promedio de cada lectura se obtuvo de 10 registros con seis repeticiones. La concentración de clorofila en el laboratorio se determinó en las mismas hojas que se muestrearon con los medidores portátiles. Inmediatamente después de finalizar las mediciones *in situ*, se cosechó materia aérea fresca de brotes para determinar su peso con una balanza OHAUS. Estas muestras se secaron luego en un horno de aire forzado a 70 °C durante 72 horas, se molieron y se cuantificó el N total mediante el método micro Kjeldahl (Kalra, 1998). La concentración de clorofila ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) se determinó con el método espectrofotométrico descrito por Mackinney (1941) y Wettstein (1957). Todas las determinaciones, *in situ* y de laboratorio, se realizaron semanalmente de 7 a 42 días después del trasplante.

Diseño y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos (0, 4, 8, 12 y 16 $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ de NO_3) y seis repeticiones. La unidad experimental fue una maceta que contenía una planta (Figura 2). Con los valores obtenidos *in situ* y de laboratorio, se realizaron correlaciones de las lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 versus concentración de clorofila, nitrógeno y materia aérea fresca con el software SigmaPlot graphs v12.5.



Figura 1. Uso de SPAD (a), atLEAF (b) y MC-100 (c) para medir la concentración relativa de clorofila en albahaca 'Nufar'.



Figura 2. Vista frontal del crecimiento de albahaca 'Nufar' en función del nivel de $\text{NO}_3\text{-N}$ a los 42 días después del trasplante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta a los niveles de nitrógeno

Se observaron diferencias ($\alpha = 0.01$) para las lecturas de SPAD, atLEAF y MC 100 con las concentraciones de nitrógeno y clorofila, y la biomasa fresca en función a los niveles de nitrógeno aplicado a la albahaca 'Nufar' (Cuadro 1).

Para las variables, se observó un aumento al aumentar el nivel de nitrógeno en la solución nutritiva. En este sentido, Basyouni *et al.*, (2015) también informaron una tendencia similar para las lecturas de nitrógeno y SPAD en hojas de flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima*). En otro estudio, Padilla *et al.* (2019) informan una diferencia estadística para los niveles de nutrición de nitrógeno en el pimiento dulce, cuanto mayor sea la cantidad de N aplicada, mayores serán los rendimientos.

Cuadro 1. Lecturas de SPAD, atLEAF, MC 100, materia aérea fresca y concentraciones de nitrógeno y clorofila en albahaca 'Nufar' a los 42 ddt (días después del trasplante).

Nitrógeno (mEq·L⁻¹)	Lecturas SPAD	Lecturas atLEAF	Lecturas MC 100	Nitrógeno (%)	Clorofila (mg·g⁻¹)	Materia aérea fresca (g·planta⁻¹)
0	42.4 d	44.3 d	44.2 c	1.34 d	2.85 c	111.1 d
4	43.6 d	45.3 d	46.1 c	1.41 d	3.01 c	121.6 d
8	47.9 c	50.5 c	48.9 bc	1.85 c	3.21 b	145.3 c
12	52.7 b	55.7 b	52.1 b	2.11 b	3.56 b	185.4 b
16	56.8 a	59.1 a	58.3 a	2.63 a	3.98 a	217.3 a

Correlación entre las lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 con clorofila, nitrógeno y materia aérea fresca

Concentración de clorofila

La correlación con el modelo de regresión lineal entre las lecturas SPAD y la concentración de clorofila (Cuadro 2) fue altamente significativa y positiva ($\alpha = 0.01$, $r = 0.98$). Estos resultados son similares a los reportados por Fenech-Larios *et al.* (2009), quienes encontraron una alta correlación entre las lecturas de SPAD y la concentración de clorofila ($r = 0.99$) en plántulas de albahaca. Valores similares ($r = 0.99$) han sido reportados por Mendoza-Tafolla *et al.* (2019) en lechuga romana (*Lactuca sativa* L.). Sin embargo, las correlaciones del presente estudio son superiores a las reportadas por Martín *et al.* (2007), quienes en laurustina (*Viburnum tinus*), tobira (*Pittosporum tobira*) y madroño (*Arbutus unedo*), encontraron coeficientes de correlación entre 0.36 y 0.52, posiblemente los coeficientes de correlación más bajos reportados por Martín *et al.* (2007) reflejan la diferencia fisiológica entre especies leñosas y herbáceas.

Cuadro 2. Correlaciones, ecuaciones de regresión y coeficientes para lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 con la concentración de clorofila en albahaca 'Nufar'.

Correlación	Ecuación de regresión	r	R ²	RMSE
SPAD y clorofila	Clorofila = 0.0079 SPAD + 0.0650	0.98**	0.97	0.06
atLEAF y clorofila	Clorofila = 0.0086 atLEAF + 0.0036	0.96**	0.93	0.03
MC 100 y clorofila	Clorofila = 0.0121 MC 100 – 0.0922	0.98**	0.96	0.04

** : Significancia de correlación $P \leq 0.01$.

El coeficiente de correlación de las lecturas de atLEAF con clorofila fue de 0.96 y el coeficiente de determinación de 0.93 ($\alpha = 0.01$). Estos resultados indican un ajuste más significativo del modelo de regresión lineal en comparación con los reportados por Zhu *et al.*, (2011). Obtuvieron coeficientes de determinación de 0.72 a 0.88 en maíz, trigo, cebada (*Hordeum vulgare*), papa (*Solanum tuberosum*) y canola (*Brassica napus*). Hebbar *et al.* (2016) reportaron coeficientes de correlación de 0.68 a 0.95 en hojas de palma de coco (*Cocos nucifera*). Para el medidor MC 100, el coeficiente de correlación fue de 0.98 y el coeficiente de determinación de 0.96 ($\alpha = 0.01$) para un modelo de regresión lineal. Padilla *et al.* (2019) reportaron coeficientes de correlación que van desde 0.87 a 0.97 y coeficientes de determinación entre 0.76 a 0.94 en pimiento dulce.

La concentración de clorofila en hojas de albahaca se puede estimar con suficiente precisión a partir de las lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 con la ecuación de regresión lineal (Figura 3).

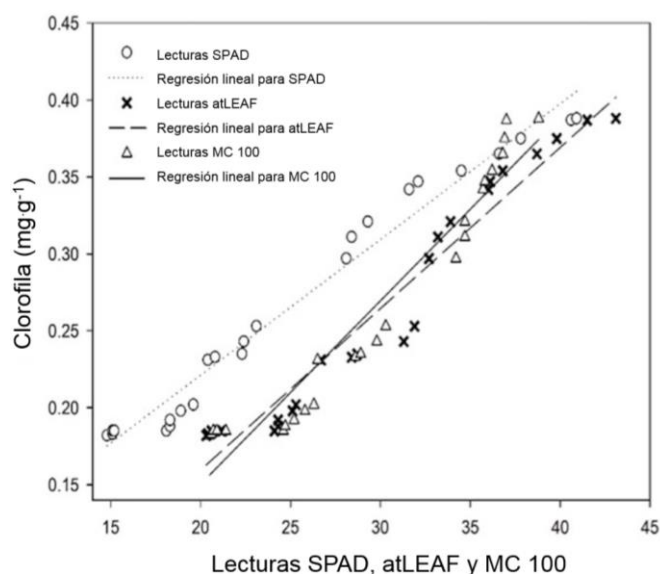


Figura 3. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 con la concentración de clorofila en albahaca 'Nufar'.

Concentración de nitrógeno

La relación entre SPAD, atLEAF y MC 100 fue altamente significativa (coeficientes de correlación de 0.97, 0.98 y 0.94, respectivamente) con la concentración de nitrógeno en plantas de albahaca 'Nufar' (Figura 4), y tuvieron un ajuste a la modelo de regresión lineal con coeficientes de determinación de 0.95, 0.97 y 0.89, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Correlaciones, ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación para lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 con la concentración de nitrógeno en albahaca 'Nufar'.

Correlación	Ecuación de regresión	r	R ²	RMSE
SPAD y nitrógeno	$N = 0.0336 \text{ SPAD} + 0.1751$	0.97**	0.95	0.03
atLEAF y nitrógeno	$N = 0.0378 \text{ atLEAF} - 0.1298$	0.98**	0.97	0.03
MC 100 y nitrógeno	$N = 0.0502 \text{ MC 100} - 0.4549$	0.94**	0.89	0.05

** : Significancia de correlación $P \leq 0.01$.

Por su parte, Ali *et al.* (2007) encontraron coeficientes de correlación que iban de 0,93 a 0,97 para la relación entre el medidor SPAD y la concentración de nitrógeno en el cultivo de tomate de invernadero. Dunn *et al.* (2018b) informaron

valores de correlación de 0.96 para la relación entre atLEAF y nitrógeno en plántulas de salvia (*Salvia officinalis*), y De Souza *et al.* (2019) compararon los medidores atLEAF y MC 100 para determinar la concentración de nitrógeno en pimiento dulce obteniendo correlaciones que van desde 0.90 y 0.97 para ambos medidores.

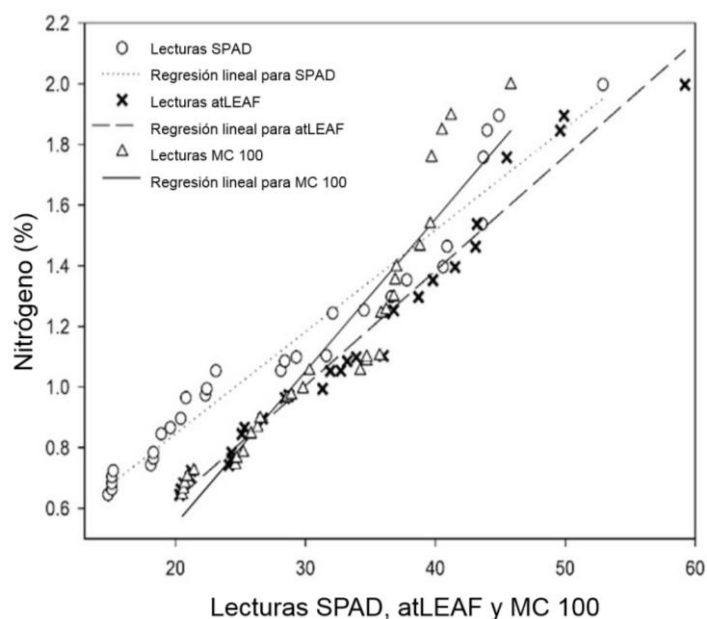


Figura 4. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC 100 con la concentración de nitrógeno en albahaca 'Nufar'.

Materia aérea fresca

La correlación entre las lecturas SPAD y materia aérea fresca (Figura 5) fue significativa y positiva ($\alpha = 0.01$) con coeficientes de correlación y determinación de 0.94 y 0.88, respectivamente (Cuadro 4). Estos resultados son similares a los de Cunha *et al.* (2015), quienes obtuvieron coeficientes de correlación entre 0.92 y 0.98 en la relación entre SPAD y rúcula fresca (*Eruca vesicaria*). Cho *et al.* (2007) sugirieron que las lecturas SPAD se pueden usar en el campo para estimar el rendimiento de la materia de brotes frescos y predecir el rendimiento del cultivo de pepino (*Cucumis sativus*).

Cuadro 4. Correlaciones, ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación para las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 con la materia aérea fresca en albahaca 'Nufar'.

Correlación	Ecuación de regresión	r	R ²	RMSE
SPAD y materia aérea fresca	Materia aérea fresca = 4.3016 SPAD – 64.9720	0.94**	0.88	0.06
atLEAF y materia aérea fresca	Materia aérea fresca = 6.1576 atLEAF – 13.7030	0.93**	0.87	0.02
MC100 y materia aérea fresca	Materia aérea fresca = 4.9606 MC 100 – 10.777	0.97**	0.94	0.05

** : Significancia de correlación $P \leq 0.01$.

La correlación entre las lecturas de atLEAF y materia aérea fresca (Figura 5) fue significativa ($\alpha = 0.01$) y presentó un excelente ajuste a la regresión lineal, con un coeficiente de correlación de 0.93 y un coeficiente de determinación de 0.87 (Cuadro 4). Los resultados fueron similares a los reportados por Dey, Sharma y Meshram (2016), en los cuales betel (*Piper betle*) obtuvo valores de 0.97 y 0.95 para los coeficientes de correlación y determinación, respectivamente. Los valores obtenidos con el MC 100 fueron altamente significativos, con valores de correlación de 0.97 y un coeficiente de determinación de 0.94 para un modelo de regresión lineal.

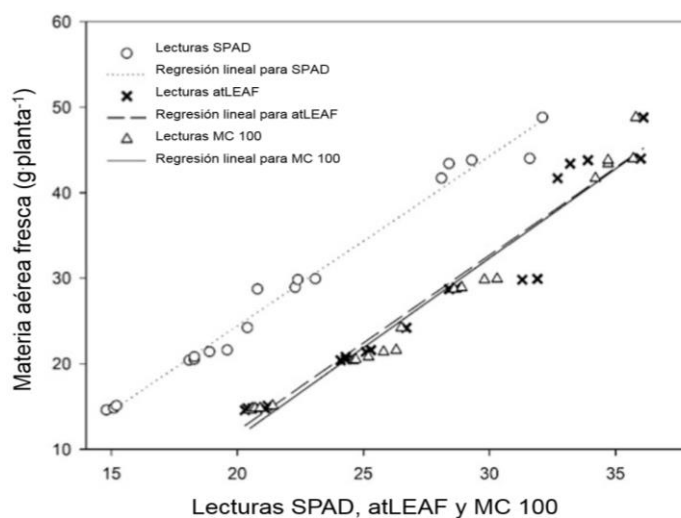


Figura 5. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 con la materia aérea fresca en albahaca 'Nufar'.

Correlación entre las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100

La correlación entre las lecturas SPAD y atLEAF fue altamente significativa ($\alpha = 0.01$) con un coeficiente de correlación de 0.98 y un coeficiente de determinación de 0.97 (Cuadro 5). Asimismo, se obtuvo un ajuste adecuado a la ecuación de regresión lineal (Figura 6a). Estos resultados son similares a los reportados por Dunn *et al.* (2018a), quienes obtuvieron coeficientes de correlación de 0.80 a 0.95 entre las lecturas de SPAD y atLEAF en hojas de flor de pascua. Zhu *et al.* (2011) encontraron correlaciones significativas entre las lecturas SPAD y atLEAF para maíz, cebada y papa, con intervalos para el coeficiente de determinación que van de 0.90 a 0.92.

Cuadro 5. Correlaciones, ecuaciones de regresión y coeficientes de correlación para la relación entre las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 en albahaca 'Nufar'.

Correlación	Ecuación de regresión	r	R ²	RMSE
SPAD y atLEAF	SPAD = 0.8852 atLEAF + 8.1197	0.98**	0.97	0.06
SPAD y MC-100	SPAD = 0.6286 MC 100 +13.675	0.97**	0.94	0.03
atLEAF y MC-100	atLEAF = 0.6982 MC 100 + 8.3040	0.97**	0.94	0.04

** : Significancia de correlación $P \leq 0.01$.

Los coeficientes de correlación y determinación entre SPAD y MC 100 fueron 0.97 y 0.94, respectivamente, en un modelo de regresión lineal (Figura 6b). Los resultados fueron similares a los obtenidos por Padilla *et al.* (2019), quienes reportan coeficientes de correlación que van desde 0.95 a 0.98 y coeficientes de determinación entre 0.90 a 0.95 en pimiento dulce. La relación entre atLEAF y MC-100 presentó valores de coeficientes de correlación de 0.97 y coeficientes de determinación de 0.94.

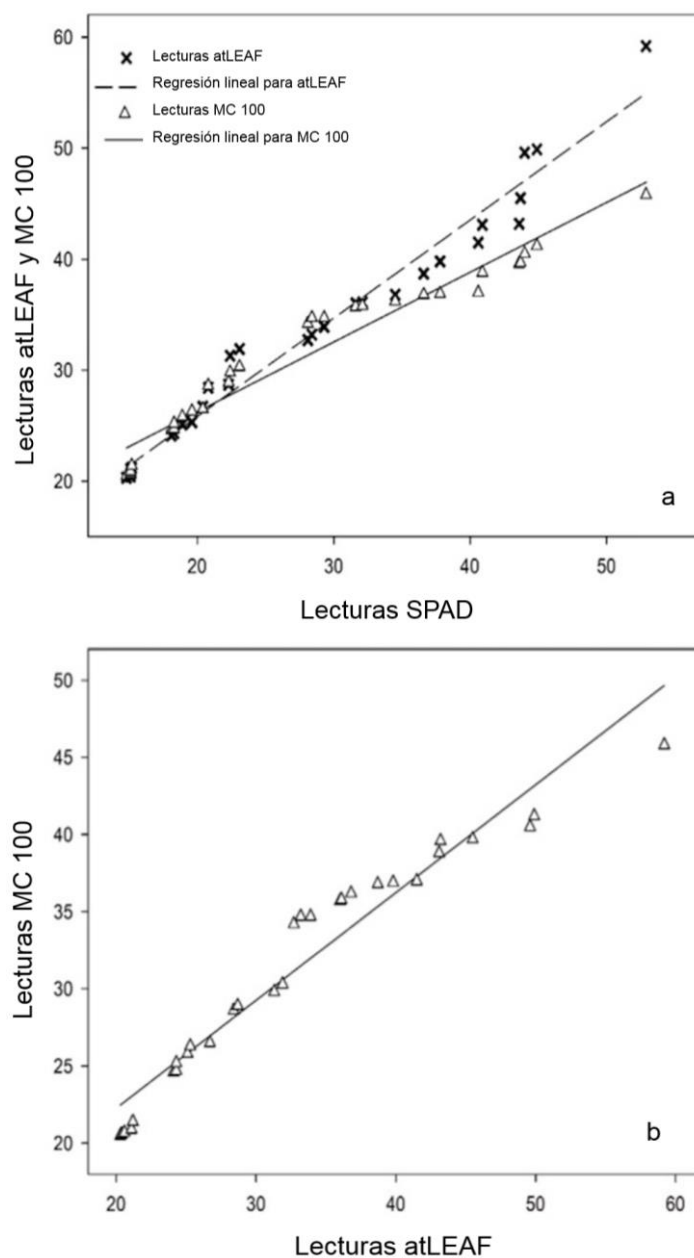


Figura 6. Correlación entre los medidores portátiles SPAD, atLEAF y MC 100 en albahaca 'Nufar'. a) relación entre lecturas SPAD con atLEAF y MC 100; y b) relación entre lecturas atLEAF y MC 100.

El estudio actual demuestra que durante la producción de albahaca 'Nufar', es factible utilizar el medidor SPAD, atLEAF o MC-100 para estimar con precisión y rapidez la concentración de clorofila, nitrógeno y materia aérea fresca. Si bien todos los medidores funcionaron bien en este estudio, es esencial tener en cuenta que actualmente existe una diferencia considerable de precio entre los sistemas.

Por lo tanto, este es uno de los primeros estudios en demostrar que los medidores atLEAF y MC-100 determinan la concentración de nitrógeno durante la producción de albahaca. Además, los resultados obtenidos también muestran que los medidores portátiles de clorofila son herramientas útiles en el manejo de hierbas aromáticas, como la albahaca. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 en las hojas pueden no representar todo el dosel de la planta y, por lo tanto, deben observarse con cierta precaución.

CONCLUSIONES

Este estudio muestra que los medidores SPAD, atLEAF y MC 100 predicen, de manera no destructiva, rápida y precisa, las concentraciones de clorofila, nitrógeno y materia aérea fresca en albahaca 'Nufar', basado en ecuaciones de regresión lineal.

Las lecturas SPAD tuvieron correlaciones lineales altas, positivas y significativas, con concentración de clorofila ($R^2 = 0.97$), nitrógeno ($R^2 = 0.95$) y materia aérea fresca ($R^2 = 0.88$); y las lecturas de atLEAF tenían una correlación lineal con la concentración de clorofila ($R^2 = 0.93$), nitrógeno ($R^2 = 0.97$) y materia aérea fresca ($R^2 = 0.87$), y las lecturas de MC 100 tenían una correlación lineal similar con la concentración de clorofila ($R^2 = 0.96$), nitrógeno ($R^2 = 0.89$) y materia aérea fresca ($R^2 = 0.94$).

La relación entre las lecturas SPAD con atLEAF y MC 100 también fue alta, positiva y tuvo correlaciones lineales significativas ($R^2 = 0.97$ y 0.94 respectivamente) y de manera similar la correlación entre atLEAF y MC 100 ($R^2 = 0.94$).

Las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 permiten la estimación temprana del estado de clorofila y nitrógeno de la planta utilizada para programar la aplicación de fertilizantes de manera más eficiente durante el cultivo de albahaca. Además, el medidor atLEAF es actualmente más asequible que los medidores SPAD y MC 100.

REFERENCIAS

- Ali, M. M., Al-Ani, A., Eamus, D., & Tan, D. K. Y. (2007). Leaf nitrogen determination using handheld meters. *Precision Agriculture*. Retrieved 2020 March 12 from http://www.regional.org.au/au/asa/2012/precision-agriculture/7979_alim.htm
- Argenta, G., Silva, P. R. F., Fosthofer, E. L., Strieder, M. L., Suhre, E., & Teichmann, L. L. (2003). Monitoramento do nível de nitrogênio. *R. Bras. Ci. Solo*, 27(1), 109–119. DOI: 10.1590/S0100-06832003000100012
- Basyouni, R., Dunn, B. L., & Goad, C. (2015). Use of nondestructive sensors to assess nitrogen status in potted poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* L. (Willd. ex Klotzsch)) production. *Scientia Horticulturae*, 192, 47–53. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.05.011
- Cho, Y. Y., Oh, S., Oh, M. M., & Son, J. E. (2007). Estimation of individual leaf area, fresh weight, and dry weight of hydroponically grown cucumbers (*Cucumis sativus* L.) using leaf length, width, and SPAD value. *Scientia Horticulturae*, 111(4), 330–334. DOI: 10.1016/j.scienta.2006.12.028
- Cruz-Crespo, E., Sandoval-Villa, M., Volke-Haller, V. H., Can-Chulim, A., & Sánchez-Escudero, J. (2012). Mixtures of substrates and nutrient solution concentration effect on growth and yield of tomato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1361–1373. DOI: 10.29312/remexca.v3i7.1343
- Cunha, A. R. da, Katz, I., Sousa, A. de P., & Martinez Uribe, R. A. (2015). Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de lisianthus en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido. *Idesia (Arica)*, 33(2), 97–105. DOI: 10.4067/S0718-34292015000200012
- de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Thompson, R. B., Gallardo, M., Grasso, R., & Padilla, F. M. (2019). The use of chlorophyll meters to assess crop N status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. *Sensors*, 19(13), 2949. DOI: 10.3390/s19132949
- Dey, A. K., Sharma, M., & Meshram, M. R. (2016). An analysis of leaf chlorophyll measurement method using chlorophyll meter and image processing technique. *Procedia Computer Science*, 85, 286–292. DOI:

10.1016/j.procs.2016.05.235

- Dunn, B. L., Singh, H., & Goad, C. (2018). Relationship between chlorophyll meter readings and nitrogen in poinsettia leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 41(12), 1566–1575. DOI: 10.1080/01904167.2018.1459697
- Dunn, B. L., Singh, H., Payton, M., & Kincheloe, S. (2018). Effects of nitrogen, phosphorus, and potassium on SPAD-502 and atLEAF sensor readings of *Salvia*. *Journal of Plant Nutrition*, 41(13), 1674–1683. DOI: 10.1080/01904167.2018.1458874
- Fenech-Larios, L., Troyo-Diéguez, E., Trasviña-Castro, M., Ruiz-Espinoza, F., Beltrán-Morales, A., ... & Zamora-Salgado, S. (2009). Relationship between a non-destructive method and a destructive extraction method, for measuring the chlorophyll content in basil seedling leaves (*Ocimum basilicum L.*). (English), 25(1), 99–102. Retrieved 2020 March 14 from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=52292598&lang=es&site=ehost-live>
- Ferreira, M. M., Ferreira, G. B., Fontes, P. C., & Dantas, J. P. (2006). Índice SPAD e teor de clorofila no limbo foliar do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica, em duas épocas de cultivo. *Revista Ceres*, 53(305), 83–92.
- Hebbar, K. B., Subramanian, P., Sheena, T. L., Shwetha, K., Sugatha, P., Arivalagan, M., & Varaprasad, P. V. (2016). Chlorophyll and nitrogen determination in coconut using a non-destructive method. *Journal of Plant Nutrition*, 39(11), 1610–1619. DOI: 10.1080/01904167.2016.1161781
- Hurtado, S. M. C., Silva, C. A., de Resende, Á. V., Corazza, E. J., Shiratsuchi, L. S., & Higashikawa, F. S. (2010). Sensibilidade do clorofilômetro para diagnóstico nutricional de nitrogênio no milho. *Ciencia e Agrotecnologia*, 34(3), 688–697.
- Kalaji, H. M., Dąbrowski, P., Cetner, M. D., Samborska, I. A., Łukasik, I., Brestic, M., & Panchal, B. M. (2017). A comparison between different chlorophyll content meters under nutrient deficiency conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 40(7), 1024–1034. DOI: 10.1080/01904167.2016.1263323

- Kokila, M., Karthi, J., Madhuvasaki, E., Sathya, S., & Vignesh, B. (n.d.). Estimation Of chlorophyll content in maize leaf: A review. *International Conference on Emerging Trends in Engineering*, 2348–8352. Retrieved 2020 April 02 from www.internationaljournalsrsg.org
- La, O., Unidos, E., Unido, R., & La, S. (2010). Albahaca (*Ocimum basilicum* L.), 1–5.
- León, A. P., Viña, S. Z., Frezza, D., Chaves, A., & Chiesa, A. (2007). Estimation of chlorophyll contents by correlations between spad-502 meter and chroma meter in butterhead lettuce. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(19–20), 2877–2885. DOI: 10.1080/00103620701663115
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 140(315-322).
- Martín, I., Alonso, N., López, M. C., Prieto, M., Cadahía, C., & Eymar, E. (2007). Estimation of leaf, root, and sap nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter for ornamental shrubs. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(3) 1785–1803. DOI: 10.1080/00103620701435555
- Mendoza-Tafolla, R. O., Juárez-López, P., Ontiveros-Capurata, R.E., Sandoval-Villa, M., Alia-Tejacal, I., & Alejo-Santiago, G. (2019). Estimating nitrogen and chlorophyll status of romaine lettuce using SPAD and atLEAF Readings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3) 751–756. DOI: 10.15835/nbha47311525
- Mercado-Luna, A., Rico-García, E., Soto-Zarazúa, A. L.-H. G., Guevara-González, R. O.-V. R., Herrera-Ruiz, G., & Torres-Pacheco¹, I. (2010). Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Agricultural Research*, 9(33), 5326–5332. DOI: 10.5897/AJB10.130
- Padilla, F. M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Giménez, C., & Thompson, R. B. (2018). Different responses of various chlorophyll meters to increasing nitrogen supply in sweet pepper. *Frontiers in Plant Science*, 9(1-14) DOI: 10.3389/fpls.2018.01752

- Padilla, F. M., Gallardo, M., Peña-Fleitas, M. T., de Souza, R., & Thompson, R. B. (2018). Proximal optical sensors for nitrogen management of vegetable crops: a review. *Sensors*, *18*(7), 2083. DOI: 10.3390/s18072083
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M., & Murphy, A. (2014). *Plant Physiology & Development*. Sixth Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA. 756 p.
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K., & Pleijel, H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research*, *91*(1), 37–46. DOI: 10.1007/s11120-006-9077-5
- Wettstein, D. (1957). Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, *12*(3), 427–506. DOI: 10.1016/0014-4827(57)90165-9
- Zebarth, B. J., Younie, M., Paul, J. W., & Bittman, S. (2002). Evaluation of leaf chlorophyll index for making fertilizer nitrogen recommendations for silage corn in a high fertility environment. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *33*(5–6), 665–684. DOI: 10.1081/CSS-120003058
- Zhu, J., Tremblay, N., & Liang, Y. (2011). A Corn nitrogen status indicator less affected by soil water content. *Agronomy Journal*, *103*(3), 890. DOI: 10.2134/agronj2010.0351
- Zhu, J., Tremblay, N., & Liang, Y. (2012). Comparing SPAD and atLEAF values for chlorophyll assessment in crop species. *Canadian Journal of Soil Science*, *92*(4), 645–648. DOI: 10.4141/cjss2011-100

CAPÍTULO IV

ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE N Y CLOROFILA EN ALBAHACA 'NUFAR' MEDIANTE ÍNDICES ESPECTRALES RGB

RESUMEN

El análisis no destructivo de tejido vegetal es una técnica confiable para estimar el estado nutricional de la planta, en este trabajo se estimó la concentración de nitrógeno (N) y clorofila en albahaca 'Nufar' mediante índices espectrales RGB calculados a partir de imágenes digitales. Las plantas de albahaca var. "Nufar" fueron cultivadas en invernadero e irrigada bajo cinco niveles de N (NO_3^-) 0, 4, 8, 12 y 16 $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ a partir de la solución Steiner. Las imágenes digitales RGB de las plantas se adquirieron semanalmente y se procesaron para obtener ortomosaicos escalados con los cuales se calcularon 17 índices espectrales. El tratamiento de 16 $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ de N tuvo un efecto positivo y estadísticamente significativo en el crecimiento, desarrollo y coloración de las plantas de la albahaca desde los 14 días después del trasplante. La relación entre los índices NGRDI, RI y CIVE con la concentración de las variables concentración de N, clorofila y área foliar en función al tratamiento de NO_3^- fue elevada ($r = 0.88$ y 0.95), por el contrario, la relación entre nueve de los índices con las variables obtuvo los valores más bajos de este experimento ($r = 0.09$ y 0.40). De los 17 índices calculados el NGRDI, RI y CIVE mostraron mejor predicción (r entre 0.88 y 0.96) de las variables evaluadas.

PALABRAS CLAVE: *Ocimum basilicum*; nutrición de cultivos; muestreo no destructivo; análisis de imágenes; concentración de N.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N), es después del carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O) el elemento más abundante en los tejidos de las plantas y está involucrado en varios procesos fisiológicos (Taiz *et al.*, 2014), como la producción de clorofila, lo cual significa que es de vital importancia en los programas de nutrición de los cultivos agrícolas (Cao *et al.*, 2013).

La determinación del contenido de N en cultivos agrícolas es importante para tener una adecuada productividad de cultivo y se realiza frecuentemente mediante métodos destructivos como Kjeldahl y Dumas (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013); aunque estos métodos son precisos y estandarizados, a menudo están limitados por la escala espacial y son costosos (Ali *et al.*, 2017). Como alternativa, los métodos no destructivos permiten obtener resultados *in situ*, en menos tiempo, con mayor frecuencia y no requieren de personal altamente especializado (Vollmann *et al.*, 2011).

Dentro de los métodos no destructivos se incluyen a los basados en imágenes digitales, las cuales han sido empleadas ampliamente para estimar la concentración de N y clorofila varios cultivos (Mao *et al.*, 2015a; Mercado-Luna *et al.*, 2010; Usha y Singh, 2013) y representan una alternativa viable por su precisión y confiabilidad (Mendoza-Tafolla *et al.*, 2021).

Las imágenes digitales adquiridas por sensores y cámaras han sido usadas para estudiar características biofísicas de la vegetación a partir de sus características espectrales, por ejemplo, el crecimiento vegetal (Horgan *et al.*, 2015), detección de estrés hídrico (Su *et al.*, 2020) y concentración de N en plantas (Baresel *et al.*, 2017), monitoreo de fenología (Lee y Lee, 2013) y detección de plagas y enfermedades de cultivos (Nagai *et al.*, 2016).

Por otra parte, a partir de las imágenes digitales se han calculado índices espectrales con los valores de reflectancia de dos o más longitudes de onda para resaltar características de interés como el estado nutrimental de las plantas (Paz Pellat *et al.*, 2015) y uso de suelo (Toomey *et al.*, 2015). Varios estudios reportan el uso de índices espectrales para cuantificar la concentración de N en cultivos

hortícolas como lechuga (Mao *et al.*, 2015; Mendoza-Tafolla *et al.*, 2021), pimiento dulce (Han-Yuzhu, 2011), remolacha (Sánchez-Sastre *et al.*, 2020), tomate (Padilla *et al.*, 2015), melón (Peña-Fleitas *et al.*, 2015) y papa (Yadav *et al.*, 2010). Sin embargo, son escasos los reportes en hortalizas de hoja como albahaca en donde se utilicen índices espectrales calculados a partir de imágenes del rango del visible (RGB).

La albahaca es una especie importante en el campo de las plantas aromáticas debido a su uso como condimento, además de poseer aceites esenciales que emanan un agradable aroma y sabor (Loughrin y Kasperbauer, 2003). Tiene uso farmacéutico por sus propiedades diuréticas y estimulantes; empleada en la industria de la elaboración de perfumes (Singletary, 2018), la albahaca es comúnmente usada como especia culinaria en México, además, tiene numerosas aplicaciones en aromaterapia (INIFAP, 2017), y la producción de albahaca durante el año 2017 fue de 1,723.61 toneladas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP, 2017). Por lo tanto, el propósito de esta investigación fue estimar la concentración de N y clorofila en hojas de albahaca mediante el uso índices espectrales RGB calculados a partir de imágenes digitales como herramienta potencial para el uso eficiente de la fertilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones generales y manejo del cultivo

El experimento se realizó en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, ubicado en las coordenadas 18° 58' 51" LN, 99° 13' 55" LO y altitud de 1,866 m en la localidad de Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México, entre los meses mayo junio de 2019, en un invernadero tipo túnel con cubierta plástica de color blanquecino y con malla antiáfidos en las paredes laterales, donde se registró la temperatura, humedad relativa y radiación solar con un datalogger Hobo® (modelo U12-012, Onset Computer Corporation, Bourne, MA). La temperatura media fue de 26 °C. La humedad media fue de 45 % y la radiación solar fue 518 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en promedio.

Se utilizó semillas del cultivar de albahaca 'Nufar' sembradas el 01 de abril de 2019 en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato comercial BM2 Berger®; y trasplantadas el 06 de mayo de 2019 en bolsas de polietileno con capacidad de 8 L, que contenían roca volcánica (localmente llamado tezontle) como sustrato con granulometría de 1 a 7 mm.

Tratamientos y medición de variables

Los tratamientos de niveles de nitrógeno fueron cinco niveles de nitrato con base en la solución nutritiva de Steiner (1984): 0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ (Mercado-Luna *et al.*, 2010) aplicados desde el trasplante, para lo cual se regó con 0.5 L de las soluciones nutritivas durante los primeros 21 días y con 1.5 L los siguientes 21 días. Se consideró un drenaje de 15 a 20 % para evitar acumulación de sales. Los fertilizantes que se usaron para preparar las soluciones nutritivas fueron nitrato de calcio (Ca(NO₃)₂·4H₂O); nitrato de potasio (KNO₃); sulfato de magnesio (MgSO₄·7H₂O); sulfato de potasio (K₂SO₄) y fosfato monopotásico (KH₂PO₄). Los micro nutrientes se agregaron en mezcla comercial de quelatos Microsol Rexene® Mix SQM en dosis de 80 g·m⁻³. El pH de las soluciones nutritivas se acidificó con ácido sulfúrico después de su preparación a valores entre 5.6 y 6.0.

Diseño experimental y datos referencia

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos (0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ de NO₃⁻) con seis repeticiones. La unidad experimental fue una maceta que contenía una planta y los datos de referencia medidos *in situ* y laboratorio fueron concentración de N, concentración de clorofila y área foliar.

Inmediatamente después de terminar las mediciones *in situ* se cosechó la materia aérea fresca de las plantas para determinar el peso de materia aérea fresca con una báscula OHAUS® con aproximación de 0.01 g. Estas muestras se secaron en un horno de aire forzado a 70 °C durante 72 horas. Con las muestras secas y molidas, se cuantificó el N total por el método de micro Kjeldahl (Kalra, 1998). La concentración de clorofila (mg·g⁻¹) se determinó con el método espectrofotométrico descrito por Mackinney (1941) y Wettstein (1957). Las

determinaciones tanto *in situ* como de laboratorio se realizaron semanalmente desde los 7 días después del trasplante (ddt) hasta los 42 ddt.

Adquisición de imágenes y procesamiento

Las imágenes digitales fueron adquiridas mediante una cámara visible RGB (Samsung, WB250F de 16 Mpx), montada en un goniómetro (Sandmeier, 2000), en un intervalo de inclinación de 20 a 160°, y a partir de un proceso de restitución fotogramétrica utilizando el software Agisoft Photoscan® se obtuvieron los ortomosaicos. En la Figura 1 se muestra las diferentes etapas que se realizaron desde la adquisición de las imágenes hasta su respectivo procesamiento.

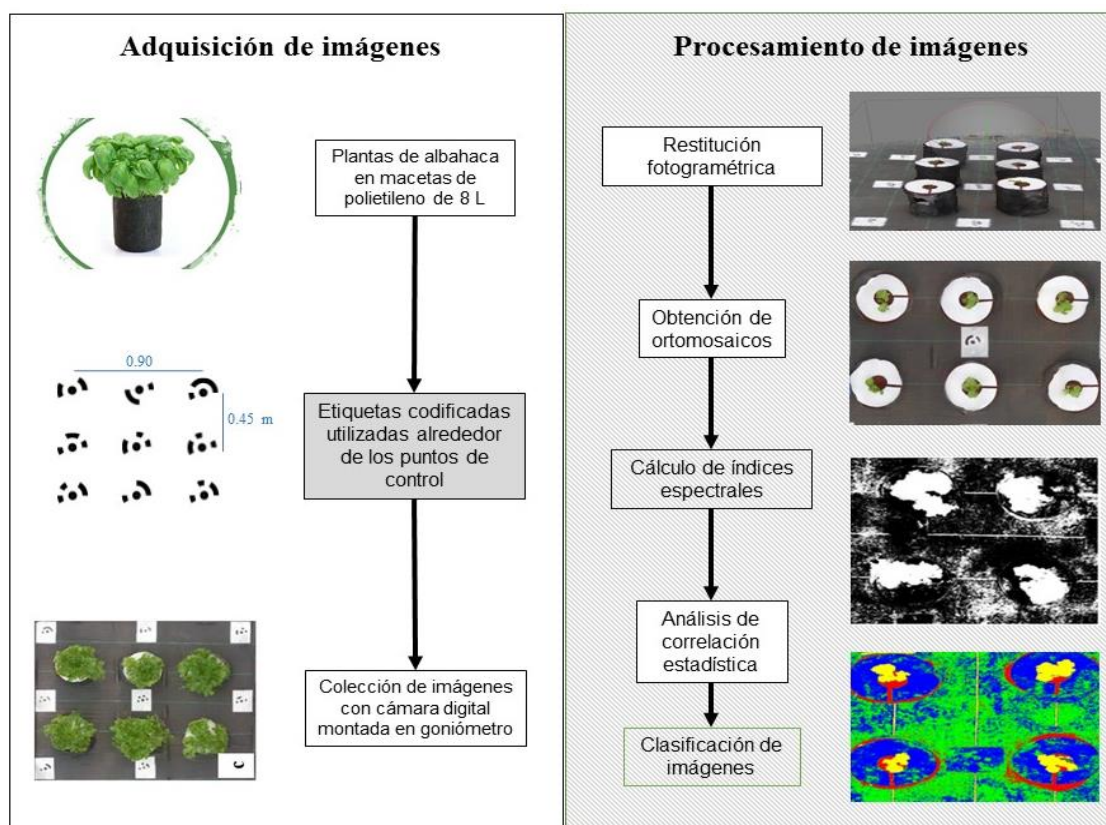


Figura 1. Etapas del proceso de adquisición y procesamiento de imágenes de albahaca 'Nufar'.

Cálculo y clasificación de índices espectrales

A partir de los mosaicos obtenidos de la restitución fotogramétrica fueron calculados diecisiete índices espectrales de vegetación (Cuadro 1) para imágenes RGB mediante una secuencia de comandos en el software R (versión

3.5.0). Una vez determinados los índices espectrales RGB se realizó una matriz de correlación (Chung *et al.*, 2017) entre los diecisiete índices con las variables concentración de N, concentración de clorofila y área foliar para determinar los índices con mayores valores de correlación.

Posteriormente, con cada imagen obtenida de los tres índices que obtuvieron mayores valores en la matriz de correlación sometida a un proceso de clasificación supervisada utilizando el método de máxima verosimilitud para separar los píxeles correspondientes al cultivo de albahaca. Finalmente se realizaron estimaciones de las variables y se correlacionaron con los valores de referencia obtenidos en laboratorio.

Cuadro 1. Índices espectrales calculados a partir de imágenes RGB.

Nombre del índice	Siglas	Fórmula	Aplicación (Referencia)
1) Normalized Green Red Difference Index	NGRDI	$(g-r)/(g+r)$	Uso eficiente de N en trigo (Wan <i>et al.</i> , 2018)
2) Normalized Difference Index	NDI	$(r-g)/(r+g+0.01)$	Diagnóstico nutrimental del cultivo colza (Zhang <i>et al.</i> , 2016)
3) Ground Level Image Analysis	GLI	$[(g-r)+(g+b)]/(r+g+b)$	Diagnóstico nutrimental del trigo (Louhaichi <i>et al.</i> , 2001)
4) Intensity	INT	$(r+g+b)/3$	Concentración de N en lechuga (Mao, 2015)
5) Saturation	SAT	$1-(3*r*g*b)$	
6) Redness Index	RI	$(r-g)/(r+g)$	Diferenciación entre suelo y vegetación (Huete y Escadafal, 1991)
7) Color Index of Vegetation Extraction	CIVE	$(0.441*r)-(0.811*g)+(0.385*b)+18.78745$	Crecimiento de cultivos básicos y hortícolas (Kataoka <i>et al.</i> , 2008)
8) Excess Red Vegetative Index	ExR	$[(1.4*r)-g]/(r+g+b)$	Crecimiento de cultivos básicos (Meyer <i>et al.</i> , 1998)
9) Excess Green Index	ExG	$[(2*g)-(r+b)]/(r+g+b)$	Cobertura de cultivos (Beniaich <i>et al.</i> , 2019)
10) Excess Red-Green	ExRG	$ExG-ExR$	Crecimiento de cultivos básicos y hortícolas (Meyer & Neto, 2008)
11) Channel Index R	R	$r/(r+g+b)$	
12) Channel Index G	G	$g/(r+g+b)$	
13) Channel Index B	B	$b/(r+g+b)$	Concentración de N y Chl en trigo (Baresel <i>et al.</i> , 2017)
14) Binary Channel Index RB	RB	r/b	
15) Binary Channel Index RG	RG	r/g	
16) Binary Channel Index BG	BG	b/g	
17) Triangular Green Index	TGI	$g-(0.39*r)-(0.61*b)$	Uso eficiente de N en trigo (Fernandez-Gallego <i>et al.</i> , 2019)

Regiones de la banda espectral: r - rojo 650–700 nm, g - verde 500–550 nm y b - azul 450–500 nm.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza y su respectiva prueba de Tukey para la comparación utilizando el software estadístico SAS, versión 9.1 (SAS Institute, EE. UU.) con un factor unidireccional y significancia estadística a $P \leq 0.01$, media aritmética (\bar{x}), coeficiente de variación (CV) y se calculó la diferencia mínima significativa (DMS). Para los modelos de regresión lineal simple y las correlaciones entre índices espectrales y valores de datos de referencia fue utilizado el software estadístico SigmaPlot, versión 12.5 (SysStat Software Inc., EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de la matriz de correlación

El análisis de correlación de los índices espectrales calculados presentó similitudes entre NGRDI, NDI y TGI (Cuadro 2). De manera similar a lo reportado en arroz por Cammarano *et al.* (2014) donde los índices espectrales NGRDI y NDI obtuvieron coeficientes de correlación de 0.90 y 0.88 respectivamente, y pudieron usarse de manera indistinta para el cálculo de la concentración de N. Por otra parte, Fernandez-Gallego (2019) reportaron coeficientes de correlación superiores a 0.80 para la relación entre NGRDI y TGI en trigo. Por el contrario, Wan *et al.* (2018) encontraron baja correlación ($r < 0.49$) entre NGRDI con índices espectrales calculados a partir de imágenes multispectrales y RGB en *Brassica napus* L. Por su parte, Ide y Oguma (2010) reportan que en cultivo de trigo la relación entre NDI, RG, RB y BG con la concentración de N y Chl es baja, mientras la correlación entre NGRDI y ExG con las mismas variables es alta (r entre 0.90 y 0.80).

Por otro lado, el índice espectral ExG mostró una correlación moderada (r entre 0.68 y 0.76) con las variables de referencia, estos son valores inferiores (r entre 0.80 y 0.90) a los reportados por Mendoza-Tafolla *et al.* (2021) en lechuga romana. Por otro lado, los índices INT, SAT, R, B, RB, y BG registraron una correlación no significativa ($r < 0.50$) con los datos de referencia. Además, existe una correlación moderada a débil ($r < 0.74$) entre NGRDI con R, G y B, estos resultados coinciden con los obtenidos en tomate por Ali *et al.* (2017) quienes tuvieron coeficientes de correlación entre 0.48 y 0.59. Según lo reportado por Usha y Singh (2013) los índices espectrales NGRDI y ExG tienen fuertes correlaciones con las variable de área foliar en cultivos hortícolas, lo que permite utilizar estos índices para la estimación de forma precisa y rápida.

Se encontraron correlaciones fuertes ($r > 0.92$) entre los índices NGRDI, RI y CIVE con la concentración de N, concentración de clorofila y área foliar determinada mediante técnicas convencionales. Inicialmente estos índices se desarrollaron para detectar las partes verdes de plantas, por lo que se conocen como índices de verdor o índices de extracción de vegetación y han sido utilizados para diferenciar plantas de suelo (Mandal, 2016), posteriormente, dada su capacidad para resaltar las características espectrales de las bandas verde y roja, se utilizaron como indicador de la cantidad y calidad del material fotosintético de las plantas (Rasmussen *et al.*, 2016), por lo que en hortalizas de hoja como la albahaca podría ser un indicador de concentración de N, concentración de clorofila y área foliar. Los resultados obtenidos en la matriz de correlación indican que los índices que muestran mejor coeficiente de correlación son NGRDI, RI y CIVE son los más recomendables para estimar la concentración de clorofila y de N. Por lo cual, de los 17 índices espectrales calculados sólo los índices NGRDI, RI y CIVE fueron utilizados para correlacionarlos y estimar las variables de referencia.

Cuadro 2. Matriz de correlación entre índices espectrales y valores de datos de referencia en albahaca 'Nufar'.

	NGRDI	NDI	GLI	INT	SAT	RI	CIVE	ExR	ExG	ExRG	R	G	B	RB	RG	BG	TGI	Nitrógeno	Clorofila	Área foliar
NGRDI	1	0.76	0.52	-0.22	0.34	0.85	0.88	-0.23	-0.11	-0.09	0.09	0.12	0.13	0.43	0.43	0.45	0.63	0.93	0.93	0.92
NDI		1	0.24	0.34	0.23	0.32	0.32	0.34	0.23	0.24	0.34	0.63	0.09	0.11	0.11	0.14	0.38	0.43	0.35	0.45
GLI			1	0.23	0.43	0.22	0.19	0.03	0.08	0.11	0.21	0.23	0.18	0.17	-0.13	0.21	0.34	0.39	0.33	0.45
INT				1	0.25	-0.23	-0.34	-0.14	0.27	0.34	0.31	0.45	0.39	0.12	-0.14	0.34	0.34	0.02	0.05	0.09
SAT					1	0.12	0.11	0.23	0.09	0.12	0.45	0.47	0.34	0.19	0.25	0.34	0.29	0.15	0.13	0.11
RI						1	0.86	-0.09	-0.08	-0.11	0.12	-0.26	0.09	0.02	0.53	-0.5	0.23	0.94	0.95	0.97
CIVE							1	0.11	0.14	0.18	0.23	0.23	0.22	0.19	0.05	0.06	0.04	0.93	0.97	0.94
ExR								1	0.09	0.09	0.27	0.34	0.32	0.35	0.21	-0.08	0.45	0.48	0.43	0.39
ExG									1	0.13	0.18	0.14	0.355	0.21	0.29	0.32	0.32	0.68	0.76	0.69
ExRG										1	0.21	0.59	-0.06	-0.09	-0.05	0.24	-0.09	0.45	0.48	0.68
R											1	0.11	0.14	0.15	0.37	0.53	-0.09	0.11	0.14	0.21
G												1	0.45	0.56	-0.08	-0.11	0.12	0.76	0.82	0.77
B													1	0.11	0.32	0.51	0.15	-0.14	-0.21	-0.13
RB														1	0.47	0.36	0.11	-0.23	-0.21	-0.19
RG															1	0.29	0.24	0.23	0.24	0.31
BG																1	0.32	0.49	0.32	0.45
TGI																	1	0.34	0.12	0.14
Nitrógeno																		1	0.98	0.95
Clorofila																			1	0.95
Área foliar																				1

Respuesta de las variables en función de los tratamientos aplicados

El tratamiento de 16 mEq·L⁻¹ de NO₃⁻ registró los promedios más altos de concentración de N, concentración de clorofila y área foliar en comparación con el resto de los tratamientos (Cuadro 3). Esto coincide a lo reportado por Coelho *et al.* (2010) quienes a fertilizaciones superiores a los 12 mEq·L⁻¹ de N obtuvieron mayores rendimientos en el cultivo de papa. En este sentido, Basyouni *et al.* (2015) también informaron una tendencia similar para las concentraciones de N y clorofila en hojas de flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima*). En otro estudio, Padilla *et al.* (2018) informan una diferencia estadística para los niveles de nutrición nitrogenada en el pimiento dulce, ya que cuanto mayor sea la cantidad de N aplicado, mayores serán los rendimientos en ese cultivo.

Se observaron diferencias estadísticas ($\alpha = 0.01$) para las variables concentración de N, concentración de clorofila y área foliar estimadas por los índices NGRDI, RI y CIVE, con lo cual se puede mencionar que el uso de estos índices espectrales RGB permite estimar las variables determinadas ya que el porcentaje de exactitud osciló entre 89.8 y 95.4 %. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Costa *et al.* (2021) quienes obtuvieron diferencias significativas con el uso de los mismos índices en cultivo de maíz.

Cuadro 3. Índices espectrales utilizados para estimar N, clorofila y área foliar de los tratamientos de NO₃⁻ aplicados a las plantas de albahaca 'Nufar'.

Tratamientos de NO ₃ ⁻ (mEq·L ⁻¹)	\bar{X}											
	Valores de referencia			Normalized green-red difference index (NGRDI)			Redness index (RI)			Color index of vegetation extraction (CIVE)		
	N (%)	Clorofila (mg·g ⁻¹)	Área foliar (cm ²)	N (%)	Clorofila (mg·g ⁻¹)	Área foliar (cm ²)	N (%)	Clorofila (mg·g ⁻¹)	Área foliar (cm ²)	N (%)	Clorofila (mg·g ⁻¹)	Área foliar (cm ²)
0	0.6 d	0.10 c	33.3 d	0.6 d	0.08 c	30.9 d	0.5 d	0.07 c	31.1 d	0.5 d	0.11 c	34.5 d
4	0.7 d	0.15 c	48.6 d	0.6 d	0.17 c	46.4 d	0.6 d	0.10 c	42.1 d	0.6 d	0.12 c	49.8 d
8	1.1 c	0.36 b	108.4 c	1.1 c	0.33 b	100.2 c	1.2 c	0.30 b	101.1 c	1.0 c	0.33 b	111.1 c
12	1.8 b	0.47 b	175.1 b	1.6 b	0.43 b	168.8 b	1.6 b	0.41 b	149.8 b	1.4 b	0.46 b	169.8 b
16	2.5 a	0.75 a	245.9 a	2.3 a	0.70 a	226.8 a	2.2 a	0.72 a	202.2 a	2.3 a	0.74 a	241.2 a
CV	0.073	0.084	0.064	0.093	0.098	0.093	0.088	0.084	0.090	0.089	0.094	0.099
DMS	0.038	0.203	52.341	0.034	0.192	54.353	0.038	0.206	58.942	0.031	0.212	51.110
Exactitud (%)	--	--	--	91.1	93.9	91.2	89.8	91.4	90.4	91.3	95.4	93.4

Comparación entre las variables de referencia e índices espectrales NGRDI, RI y CIVE

En la Figura 2 se muestran las correlaciones entre la concentración de N, concentración de clorofila y área foliar con los índices espectrales NGRDI, RI y CIVE.

Concentración de N

Los valores de concentración de N tuvieron una alta correlación lineal con el índice NGRDI ($r = 0.96$, RMSE = 0.08) (Figura 2A). Los índices RI ($r = 0.97$, RMSE = 0.05) y CIVE ($r = 0.95$, RMSE = 0.06) (Figuras 2B y 2C, respectivamente) se ajustaron a un modelo de regresión lineal, resultados similares a los obtenidos por Lee *et al.* (2013) que reportaron coeficientes de determinación ≥ 0.90 en la cuantificación de N en el cultivo de arroz; asimismo, Elazab *et al.* (2016) obtuvieron coeficientes de determinación ≥ 0.82 para la relación entre el índice NGRDI y la concentración de N en maíz. Estos resultados son similares a los reportados por Xue y Yang (2008), donde NGRDI podría usarse para el cálculo de la concentración de N en la etapa vegetativa del arroz ($r = 0.95$). Zhao *et al.* (2012) reportan en tomate que la relación entre índices RGB con la concentración de N oscila entre débil y moderada (r entre 0.49 y 0.75), mientras que la correlación entre NGRDI con las mismas variables es fuerte (r entre 0.88 y 0.95). En este sentido, los índices espectrales de la región visible RGB son eficientes para determinar el contenido de N en las plantas de frijol debido al efecto que tiene el N en la cantidad y coloración de los pigmentos dentro de los tejidos vegetales (Lee *et al.* 2013). Esto indica que el uso de índices espectrales representa una metodología confiable y precisa para cuantificar la concentración de N en cultivos de hoja.

Concentración de clorofila

Durante el ciclo de cultivo de la albahaca los resultados mostraron que los índices espectrales NGRDI, RI y CIVE tuvieron coeficientes de correlación entre 0.94 y 0.96 para la concentración de clorofila, y se ajustaron a un modelo de regresión lineal (R^2 entre 0.89 y 0.92) (Figuras 2D, 2E y 2F, respectivamente). Estos resultados son similares a los obtenidos por Costa *et al.* (2021) durante el crecimiento vegetativo de maíz mediante los índices RI y CIVE ($r = 0.90$) y Alvarez-Bermejo *et al.* (2017) en tomate y pepino utilizando el índice NGRDI ($r = 0.90$). Además, existió una fuerte correlación lineal con el índice RI ($r = 0.92$, RMSE = 0.03), valor comparable al

reportado por Elazab *et al.* (2016) en etapas vegetativas de maíz ($r > 0.78$). Por otro lado, Lin *et al.* (2013) obtuvieron coeficientes de correlación de 0.85 en la concentración de clorofila en plantas de pepino.

Área foliar

Los valores de área foliar mostraron un mejor ajuste a un modelo de regresión lineal con NGRDI ($r = 0.94$, $RMSE = 0.06$) (Figura 2G) en el ciclo de cultivo. Este modelo matemático es distinto al reportado por Mendoza-Tafolla *et al.* (2021) quienes para el índice NGRDI encontraron mayor ajuste a un modelo exponencial $r \geq 0.92$ en lechuga romana. Los índices RI ($r = 0.96$, $RMSE = 0.06$) y CIVE ($r = 0.95$, $RMSE = 0.06$) se ajustaron mejor a un modelo de regresión lineal similar al reportado por Baresel *et al.* (2017) quienes para el índice NGRDI encontraron mayor ajuste a un modelo lineal $r \geq 0.87$ en la etapa de crecimiento de trigo. Jannoura *et al.* (2015) reportaron valores con ajuste a modelos lineales entre área foliar y NGRDI en maíz ($r = 0.86$). Por otro lado, Hunt *et al.* (2005) obtuvieron valores de correlación lineal para área foliar y NGRDI de $r = 0.87$ en el cultivo de arroz.

En el cultivo de lechuga, Jung *et al.* (2015) reportaron que el índice NGRDI tuvo la correlación más alta para la estimación del área foliar ($r = 0.93$). Dicho comportamiento corresponde al acelerado crecimiento del área foliar en las últimas etapas del cultivo. Por lo cual, estas diferencias de ajuste entre los modelos de regresión lineal y exponencial sugieren que para estimar el área foliar de los cultivos mediante índices espectrales RGB se debe considerar la fenología típica y hábitos de crecimiento vegetal.

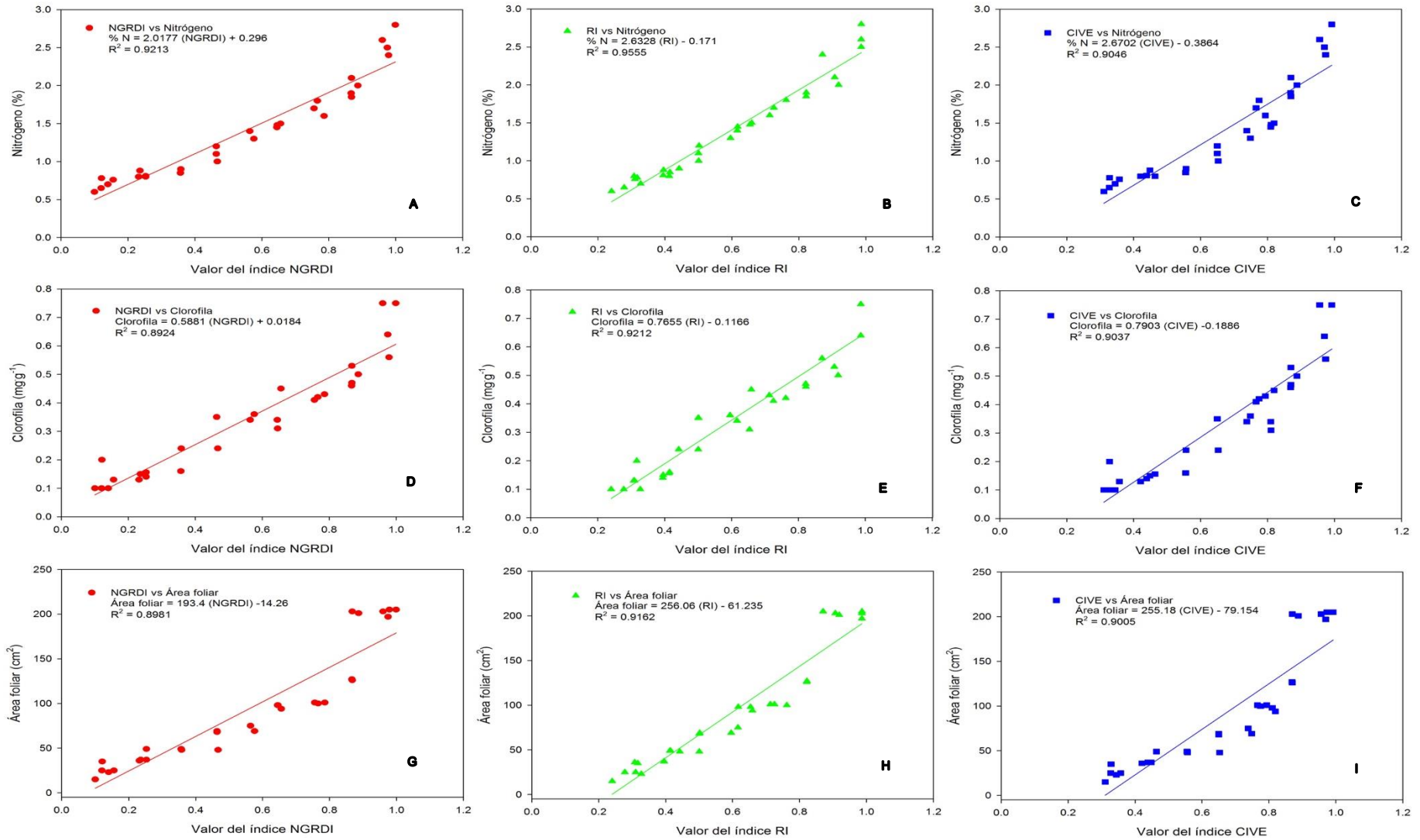


Figura 2. Relaciones entre la concentración de N, concentración de clorofila y área foliar con los índices espectrales NGRDI, RI y CIVE calculados a partir de imágenes RGB de albahaca 'Nufar'.

La determinación de las variables como concentración de N, clorofila y área foliar en albahaca son similares y comparables con otros cultivos y es útil en las hortalizas en las cuales la parte comercializable es la hoja, ya que en este tipo de cultivos lo más importante es el área foliar (Sandmann *et al.*, 2013). por lo tanto, este método resulta útil en las hortalizas que tienen un crecimiento vegetativo acelerado. En resumen, se encontró que los índices espectrales más eficientes son aquellos que consideran las bandas espectrales de la región verde y roja. Por otro lado, los índices que incorporan la banda azul tienen menor desempeño en la predicción de las variables de referencia utilizadas en este experimento, lo que puede deberse a la baja sensibilidad del tejido vegetal en la banda azul.

*Estimación y comparación de las variables de referencia vs. NGRDI, RI y CIVE
Concentración de N estimado vs. medido*

La concentración de N estimado a partir de los índices espectrales NGRDI, RI y CIVE mostró alta correlación con los valores medidos en laboratorio ($r = 0.96$, 0.97 y 0.98 respectivamente) (Figura 3) y se ajustó en los tres casos a una regresión lineal. Estos valores son semejantes a los obtenidos por de la Casa *et al.* (2013) quienes estimaron la concentración de N en papa con índices espectrales y obtuvieron coeficientes de correlación entre 0.94 a 0.98 . En otro estudio, Yang *et al.* (2020) reportaron un coeficiente de correlación de 0.90 en la estimación del contenido de N con el índice NGRDI en la etapa vegetativa de trigo. Por otra parte, Beniaich *et al.* (2019) mencionan que el índice CIVE fue el mejor ($r > 0.85$) para determinar la biomasa de los cultivos de frijol y mijo, la cual está asociada estrechamente a la concentración de N en las plantas. Por lo anterior, se puede mencionar que los índices NGRDI, RI y CIVE son confiables y precisos para estimar la concentración de N en cultivos de hoja al tener altas correlaciones con los valores de clorofila de referencia.

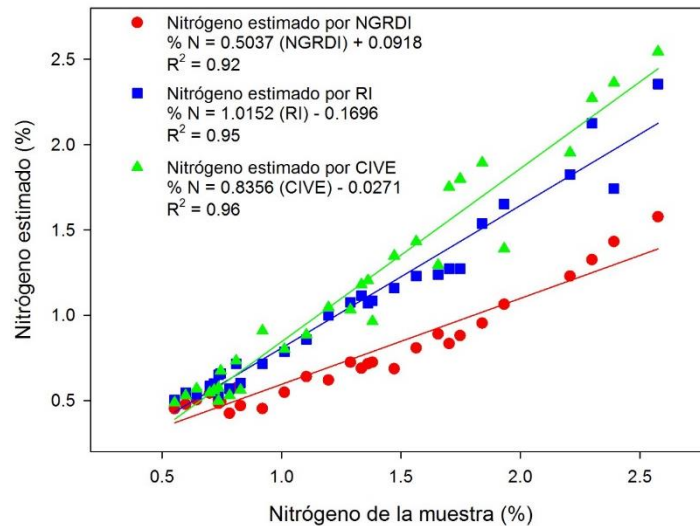


Figura 3. Relación entre el N de la muestra obtenido en laboratorio y el N estimado a partir de los índices NGRDI, RI y CIVE en albahaca 'Nufar'.

Concentración de clorofila estimada vs. medida

Al igual que con la concentración de N, la concentración de clorofila estimada con índices espectrales NGRDI, RI y CIVE tuvo una fuerte correlación lineal con los valores medidos en laboratorio, con coeficientes de correlación entre 0.99 y 0.96 respectivamente (Figura 4). Estos valores son similares a los registrados por de la Casa *et al.* (2012) quienes estimaron y predijeron el rendimiento y concentración de clorofila en papa con índices espectrales y obtuvieron coeficientes de correlación entre 0.90 a 0.95. Además, Wan *et al.* (2018) registraron coeficientes de correlación de 0.90 a 0.95 en la estimación del contenido de clorofila con índices calculados a partir de imágenes RGB e multiespectrales en el cultivo de *Brassica napus* L. En otro estudio, Ray *et al.* (2004) mencionan que el índice RI permite determinar, diferenciar y estimar la cobertura del cultivo de papa fertilizado con distintos niveles de N. Por lo cual, se puede destacar el potencial uso de los índices NGRDI, RI y CIVE en la estimación de concentración de clorofila en cultivos hortícolas.

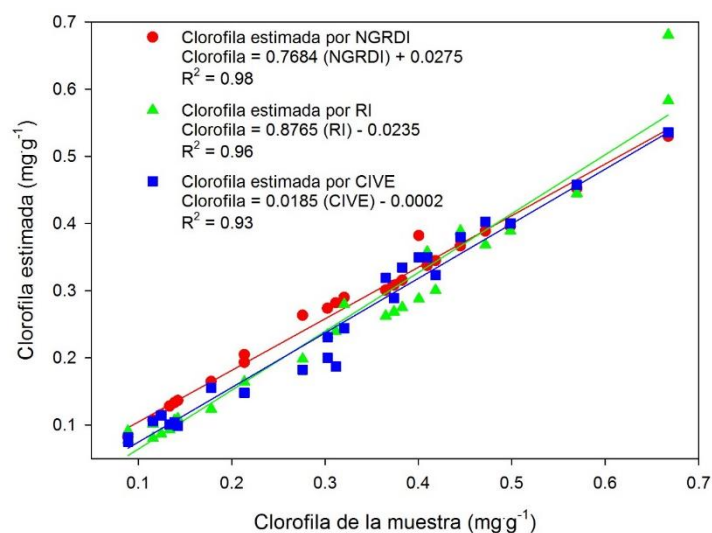


Figura 4. Relación entre la clorofila de la muestra obtenida en laboratorio y el N estimado a partir de los índices NGRDI, RI y CIVE en albahaca 'Nufar'.

Área foliar medida vs estimada

Los valores de área foliar medidos en las plantas de albahaca 'Nufar' presentaron una alta correlación con los valores de área foliar estimados a partir de índices espectrales NGRDI, RI y CIVE con coeficientes de correlación de 0.97, 0.98 y 0.98, respectivamente (Figura 5) y se ajustaron a regresiones lineales. Estos valores son superiores (r entre 0.56 y 0.90) a los reportados por Mandal (2016) quien utilizó el índice RI para diferenciar cobertura vegetal en cultivos extensivos. Por su parte, Beniaich *et al.* (2019) mencionan que el índice CIVE permite determinar el área foliar de los cultivos de frijol y mijo al registrar coeficiente de correlación superiores a 0.90. En este sentido, Sakamoto *et al.* (2012) afirma los índices espectrales permiten estimar el área foliar del cultivo de frijol. Por todo lo anterior, se puede observar que los índices NGRDI, RI y CIVE tienen gran utilidad al ser confiables y precisos en la diferenciación, clasificación y estimación de coberturas vegetales y específicamente área foliar en hortalizas.

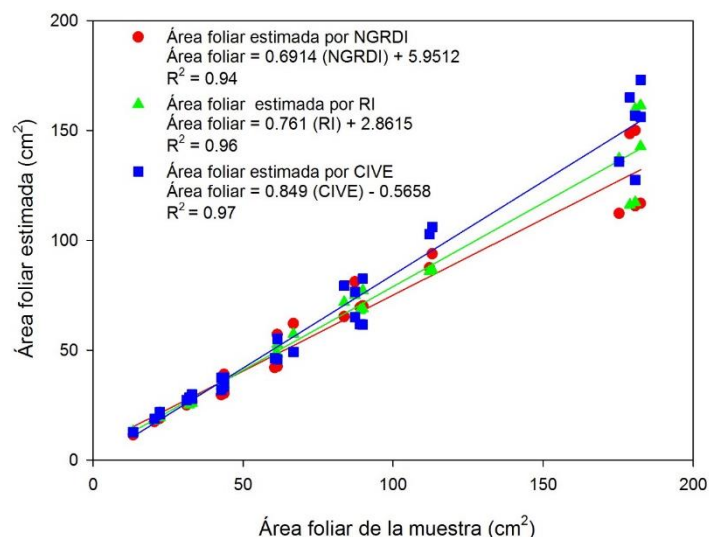


Figura 5. Relación entre el área foliar de la muestra obtenida en laboratorio y el N estimado a partir de los índices NGRDI, RI y CIVE en albahaca 'Nufar'.

Correlación entre los índices espectrales NGRDI, RI y CIVE

La relación entre los índices NGRDI y RI (Figura 6A) tuvo un coeficiente de correlación de 0.98, mismo valor para el coeficiente de correlación entre los índices NGRDI y CIVE, ambas correlaciones se ajustaron en una regresión lineal. De la misma forma, el coeficiente de correlación entre los índices RI y CIVE (Figura 6B) fue de 0.96 y también se ajustó a una regresión lineal. Estos valores son semejantes a los reportados por Costa *et al.* (2021) para la relación entre estos mismos índices espectrales en el cultivo de mijo (*Panicum miliaceum*). Esto puede confirmar e indicar que para estimar las variables de referencia se puede utilizar cualquiera de estos índices y obtener correlaciones fuertes y una exactitud confiable en las estimaciones resultantes.

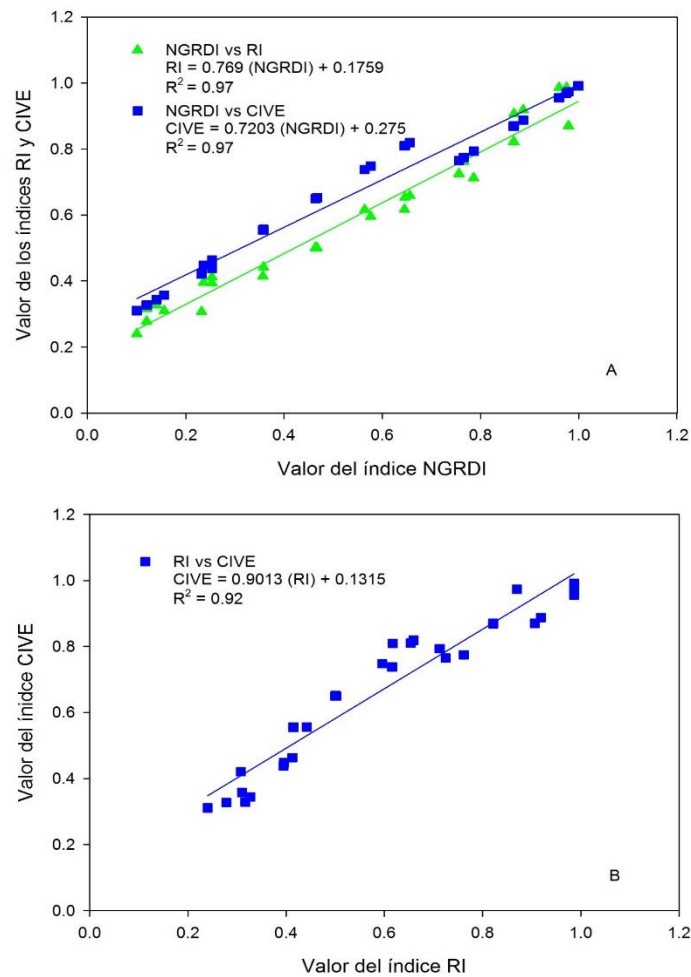


Figura 6. Relación entre los índices NGRDI, RI y CIVE obtenidos de imágenes RGB de albahaca 'Nufar'. A) correlación entre el índice NGRDI con los índices RI y CIVE; B) correlación entre el índice RI con el índice CIVE

CONCLUSIONES

El uso de índices espectrales calculados a partir de imágenes digitales RGB de plantas de albahaca 'Nufar' permitieron estimar la concentración de N, concentración de clorofila y área foliar.

Los índices espectrales NGRDI, RI y CIVE (R^2 entre 0.92 a 0.98) mostraron el mejor ajuste a los diferentes modelos de predicción en comparación al resto de los índices calculados para la concentración de N, concentración de clorofila y área foliar.

Los índices espectrales a partir de imágenes RGB de albahaca 'Nufar' representan una alternativa confiable y precisa a los métodos destructivos para la estimación de las variables de referencia evaluadas en este trabajo, lo cual puede coadyuvar a mejorar la eficiencia de la aplicación de fertilizantes nitrogenados y reducir su impacto en el ambiente.

El tipo y hábito de crecimiento de las hortalizas aromáticas como la albahaca 'Nufar', presentan mayor crecimiento foliar radial hacia el final del periodo de cultivo, lo que permite correlacionar los índices NGRDI, RI y CIVE en una regresión lineal ($R^2 > 0.94$).

REFERENCIAS

- Ali, M. M., Al-Ani, A., Eamus, D., & Tan, D. K. Y. (2017). Leaf nitrogen determination using non-destructive techniques—A review. *Journal of Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1143954>
- Álvarez-Bermejo, J. A., Giagnocavo, C., Li, M., Morales, E. C., Santos, D. P. M., & Yang, X. T. (2017). Image processing methods to evaluate tomato and zucchini damage in post-harvest stages. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 10(5), 126–133. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20171005.3087>
- Baresel, J. P., Rischbeck, P., Hu, Y., Kipp, S., Hu, Y., Barmeier, G., & Mistele, B. (2017). Use of a digital camera as alternative method for non-destructive detection of the leaf chlorophyll content and the nitrogen nutrition status in wheat. *Computers and Electronics in Agriculture*, 140, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.05.032>
- Baresel, J. P., Rischbeck, P., Hu, Y., Kipp, S., Hu, Y., Barmeier, G., ... Schmidhalter, U. (2017). Use of a digital camera as alternative method for non-destructive detection of the leaf chlorophyll content and the nitrogen nutrition status in wheat. *Computers and Electronics in Agriculture*, 140, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.05.032>

- Basyouni, R., Dunn, B. L., & Goad, C. (2015). Use of nondestructive sensors to assess nitrogen status in potted poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* L. (Willd. ex Klotzsch)) production. *Scientia Horticulturae*, *192*, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.011>
- Beniaich, A., Silva, M. L. N., Avalos, F. A. P., Menezes, M. D. de, & Cândido, B. M. (2019). Determination of vegetation cover index under different soil management systems of cover plants by using an unmanned aerial vehicle with an onboard digital photographic camera. *Semina: Ciências Agrárias*, *40*(1), 49. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n1p49>
- Cammarano, D., Fitzgerald, G., Casa, R., & Basso, B. (2014). Assessing the robustness of vegetation indices to estimate wheat N in mediterranean environments. *Remote Sensing*, *6*(4), 2827–2844. <https://doi.org/10.3390/rs6042827>
- Cao, Q., Miao, Y., Wang, H., Huang, S., Cheng, S., Khosla, R., & Jiang, R. (2013). Non-destructive estimation of rice plant nitrogen status with Crop Circle multispectral active canopy sensor. *Field Crops Research*, *154*, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.08.005>
- Chung, Y. S., Choi, S. C., Silva, R. R., Kang, J. W., Eom, J. H., & Kim, C. (2017). Case study: Estimation of sorghum biomass using digital image analysis with Canopeo. *Biomass and Bioenergy*, *105*, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.06.027>
- Coelho, F. S., Fontes, P. C. R., Puiatti, M., Neves, J. C. L., & Silva, M. C. de C. (2010). Dose de nitrogênio associada à produtividade de batata e índices do estado de nitrogênio na folha. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, *34*(4), 1175–1183.
- Costa, T. R. S., Azevedo, M. C. de, Costa, J. E., Sousa, V. F. de O., Silva, A. V. da, & Mielezrski, F. (2021). Índices vegetais fotogramétricos no milho em sucessão a plantas de cobertura do solo em Areia, Paraíba (Brasil). *Research, Society and Development*, *10*(7), e7510716403. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16403>
- De la Casa, A., Ovando, G., Bressanini, L., & Martinez, J. (2013). Estimación de

la cobertura del suelo y evaluación de la fertilización nitrogenada en papa con registros de cámaras digitales convencionales y modificadas. In *Congreso Argentino de Agroinformática* (pp. 94–104).

De la Casa, A., Ovando, G., Bressanini, L., Martínez, J., & Rodríguez, A. (2012). Predicción de la variabilidad del rendimiento de papa a partir de la cobertura del follaje. *Agriscientia*, 29, 15–24.

Elazab, A., Ordóñez, R. A., Savin, R., Slafer, G. A., & Araus, J. L. (2016). Detecting interactive effects of N fertilization and heat stress on maize productivity by remote sensing techniques. *European Journal of Agronomy*, 73, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.11.010>

Fernandez-Gallego, J. A., Kefauver, S. C., Vatter, T., Aparicio Gutiérrez, N., Nieto-Taladriz, M. T., & Araus, J. L. (2019). Low-cost assessment of grain yield in durum wheat using RGB images. *European Journal of Agronomy*, 105(March), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.02.007>

Han Yuzhu. (2011). Nitrogen determination in pepper (*Capsicum frutescens* L.) plants by color image analysis (RGB). *African Journal of Biotechnology*, 10(77). <https://doi.org/10.5897/AJB11.1974>

Horgan, G. W., Song, Y., Glasbey, C. A., van der Heijden, G. W. A. M., Polder, G., Dieleman, J. A., ... van Eeuwijk, F. A. (2015). Automated estimation of leaf area development in sweet pepper plants from image analysis. *Functional Plant Biology*, 42(5), 486. <https://doi.org/10.1071/FP14070>

Huete, A. R., & Escadafal, R. (1991). Assessment of biophysical soil properties through spectral decomposition techniques. *Remote Sensing of Environment*, 35(2–3), 149–159. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(91\)90008-T](https://doi.org/10.1016/0034-4257(91)90008-T)

Hunt, E. R., Cavigelli, M., Daughtry, C. S. T., McMurtrey, J. E., & Walthall, C. L. (2005). Evaluation of digital photography from model aircraft for remote sensing of crop biomass and nitrogen status. *Precision Agriculture*, 6(4), 359–378. <https://doi.org/10.1007/s11119-005-2324-5>

Ide, R., & Oguma, H. (2010). Use of digital cameras for phenological observations. *Ecological Informatics*, 5(5), 339–347.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2010.07.002>

- Jannoura, R., Brinkmann, K., Uteau, D., Bruns, C., & Joergensen, R. G. (2015). Monitoring of crop biomass using true colour aerial photographs taken from a remote controlled hexacopter. *Biosystems Engineering*, 129, 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.11.007>
- Jung, D.-H., Park, S. H., Han, X. Z., & Kim, H.-J. (2015). Image processing methods for measurement of lettuce fresh weight. *Journal of Biosystems Engineering*, 40(1), 89–93. <https://doi.org/10.5307/JBE.2015.40.1.089>
- Kalra, P. Y. (1998). *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. *Crop Science* (Vol. 38). <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800060050x>
- Kataoka, T., Kaneko, T., Okamoto, H., & Hata, S. (n.d.). Crop growth estimation system using machine vision. In *Proceedings 2003 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM 2003)* (Vol. 2, pp. b1079–b1083). IEEE. <https://doi.org/10.1109/AIM.2003.1225492>
- Teiz, A. (2014). *Plant Physiology and Development*. (O. University & Press, Eds.) (6th ed.).
- Lee, K.-J., & Lee, B.-W. (2013). Estimation of rice growth and nitrogen nutrition status using color digital camera image analysis. *European Journal of Agronomy*, 48, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.02.011>
- Lin, K., Chen, J., Si, H., & Wu, J. (2013). A review on computer vision technologies applied in greenhouse plant stress detection. *Communications in Computer and Information Science*, 363, 192–200. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37149-3_23
- Loughrin, J. H., & Kasperbauer, M. J. (2003). Aroma content of fresh basil (*ocimum basilicum* L.) leaves is affected by light reflected from colored mulches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2272–2276. <https://doi.org/10.1021/jf021076c>
- Louhaichi, M., Borman, M. M., & Johnson, D. E. (2001). Spatially located platform

and aerial photography for documentation of grazing impacts on wheat. *Geocarto International*, 16(1), 65–70. <https://doi.org/10.1080/10106040108542184>

Mackinney, G. (1941). Article : Absorption of Light By, 315–323.

Mandal, U. K. (2016). Spectral color indices based geospatial modeling of soil organic matter in chitwan district, Nepal. *ISPRS - International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, XLI-B2, 43–48. <https://doi.org/10.5194/isprsarchives-XLI-B2-43-2016>

Mao, H., Gao, H., Zhang, X., & Kumi, F. (2015a). Nondestructive measurement of total nitrogen in lettuce by integrating spectroscopy and computer vision. *Scientia Horticulturae*, 184, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.027>

Mao, H., Gao, H., Zhang, X., & Kumi, F. (2015b). Nondestructive measurement of total nitrogen in lettuce by integrating spectroscopy and computer vision. *Scientia Horticulturae*, 184, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.027>

Mendoza-Tafolla, R. O., Ontiveros-Capurata, R.-E., Juarez-Lopez, P., Alia-Tejacal, I., Lopez-Martinez, V., & Ruiz-Alvarez, O. (2021). Nitrogen and chlorophyll status in romaine lettuce using spectral indices from RGB digital images. *Zemdirbyste-Agriculture*, 108(1), 79–86. <https://doi.org/10.13080/z-a.2021.108.011>

Mercado-Luna, A., Rico-García, E., Soto-Zarazúa, A. L.-H. G., Guevara-González, R. O.-V. R., Herrera-Ruiz, G., & Torres-Pacheco¹, I. (2010). Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Agricultural Research*, 9(33), 5326–5332. <https://doi.org/10.5897/AJB10.130>

Meyer, G.E., Hindman, T., & Laksmi, K. (1998). Machine vision detection parameters for plant species identification. In D. (ed.) (Ed.), *Proceedings of SPIE 3543* (pp. 327–335).

Meyer, George E., & Neto, J. C. (2008). Verification of color vegetation indices for automated crop imaging applications. *Computers and Electronics in*

- Muñoz-Huerta, R. F., Guevara-Gonzalez, R. G., Contreras-Medina, L. M., Torres-Pacheco, I., Prado-Olivarez, J., & Ocampo-Velazquez, R. V. (2013). A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: Advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors (Switzerland)*, *13*(8), 10823–10843. <https://doi.org/10.3390/s130810823>
- Nagai, S., Ichie, T., Yoneyama, A., Kobayashi, H., Inoue, T., Ishii, R., ... Iitoka, T. (2016). Usability of time-lapse digital camera images to detect characteristics of tree phenology in a tropical rainforest. *Ecological Informatics*, *32*, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2016.01.006>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., & Thompson, R. B. (2015). Threshold values of canopy reflectance indices and chlorophyll meter readings for optimal nitrogen nutrition of tomato. *Annals of Applied Biology*, *166*(2), 271–285. <https://doi.org/10.1111/aab.12181>
- Padilla, Francisco M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Giménez, C., & Thompson, R. B. (2018). Different responses of various chlorophyll meters to increasing nitrogen supply in sweet pepper. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01752>
- Paz Pellat, F., Romero Sanchez, M. E., Palacios Vélez, E., Bolaños González, M., Aldrete, A., & Valdez Lazalde, J. R. (2015). Scopes and limitations of spectral vegetation indices: analysis of broad band indices. *Terra Latinoamericana*, *33*(1), 27–49.
- Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Thompson, R. B., Farneselli, M., & Padilla, F. M. (2015). Assessing crop N status of fertigated vegetable crops using plant and soil monitoring techniques. *Annals of Applied Biology*, *167*(3), 387–405. <https://doi.org/10.1111/aab.12235>
- Rasmussen, J., Ntakos, G., Nielsen, J., Svendsgaard, J., Poulsen, R. N., & Christensen, S. (2016). Are vegetation indices derived from consumer-grade cameras mounted on UAVs sufficiently reliable for assessing experimental plots? *European Journal of Agronomy*, *74*, 75–92.

<https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.11.026>

- Ray, S. S., Singh, J. P., Das, G., & Panigrahy, S. (2004). Use of high resolution remote sensing data for generating sitespecific soil mangement plan. *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences - ISPRS Archives*, 35(May 2014), 2–7.
- Sakamoto, T., Gitelson, A. A., Nguy-Robertson, A. L., Arkebauer, T. J., Wardlow, B. D., Suyker, A. E., ... Shibayama, M. (2012). An alternative method using digital cameras for continuous monitoring of crop status. *Agricultural and Forest Meteorology*, 154–155, 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2011.10.014>
- Sánchez-Sastre, L. F., Alte da Veiga, N. M. S., Ruiz-Potosme, N. M., Carrión-Prieto, P., Marcos-Robles, J. L., Navas-Gracia, L. M., & Martín-Ramos, P. (2020). Assessment of rgb vegetation indices to estimate chlorophyll content in sugar beet leaves in the final cultivation stage. *AgriEngineering*, 2(1), 128–149. <https://doi.org/10.3390/agriengineering2010009>
- Sandmann, M., Graefe, J., & Feller, C. (2013). Optical methods for the non-destructive estimation of leaf area index in kohlrabi and lettuce. *Scientia Horticulturae*, 156, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.04.003>
- Sandmeier, S. R. (2000). Acquisition of bidirectional reflectance factor data with field goniometers. *Remote Sensing of Environment*, 73(3), 257–269. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(00)00102-4)
- Singletary, K. W. (2018). Basil: A brief summary of potential health benefits. *Nutrition Today*, 53(2), 92–97. <https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000267>
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. *Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture.*, 633–649.
- Su, J., Coombes, M., Liu, C., Zhu, Y., Song, X., Fang, S., ... Chen, W.-H. (2020). Machine learning-based crop drought mapping system by uav remote sensing RGB imagery. *Unmanned Systems*, 08(01), 71–83. <https://doi.org/10.1142/S2301385020500053>

- Toomey, M., Friedl, M. A., Frohling, S., Hufkens, K., Klosterman, S., Sonnentag, O., ... Richardson, A. D. (2015). Greenness indices from digital cameras predict the timing and seasonal dynamics of canopy-scale photosynthesis. *Ecological Applications*, 25(1), 99–115. <https://doi.org/10.1890/14-0005.1>
- Usha, K., & Singh, B. (2013). Potential applications of remote sensing in horticulture-A review. *Scientia Horticulturae*, 153, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.01.008>
- Vollmann, J., Walter, H., Sato, T., & Schweiger, P. (2011). Digital image analysis and chlorophyll metering for phenotyping the effects of nodulation in soybean. *Computers and Electronics in Agriculture*, 75(1), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.11.003>
- Wan, L., Li, Y., Cen, H., Zhu, J., Yin, W., Wu, W., ... He, Y. (2018). Combining UAV-based vegetation indices and image classification to estimate flower number in oilseed rape. *Remote Sensing*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/rs10091484>
- Wettstein, D. (1957). Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12(3), 427–506.
- Xue, L., & Yang, L. (2008). Recommendations for nitrogen fertilizer topdressing rates in rice using canopy reflectance spectra. *Biosystems Engineering*, 100(4), 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2008.05.005>
- Yadav, S. P., Ibaraki, Y., & Dutta Gupta, S. (2010). Estimation of the chlorophyll content of micropropagated potato plants using RGB based image analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 100(2), 183–188. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9635-6>
- Yang, M., Hassan, M. A., Xu, K., Zheng, C., Rasheed, A., Zhang, Y., ... He, Z. (2020). Assessment of water and nitrogen use efficiencies through uav-based multispectral phenotyping in winter wheat. *Frontiers in Plant Science*, 11(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00927>
- Zhang, D., Song, X., Mansaray, L. R., Zhou, Z., Zhang, K., Han, J., ... Xu, L. (2016). Estimating leaf area index of sugarcane based on multi-temporal digital images. In *2016 Fifth International Conference on Agro-*

Geoinformatics (Agro-Geoinformatics) (pp. 1–5). IEEE.
<https://doi.org/10.1109/Agro-Geoinformatics.2016.7577689>

Zhao, J., Zhang, Y., Tan, Z., Song, Q., Liang, N., Yu, L., & Zhao, J. (2012). Using digital cameras for comparative phenological monitoring in an evergreen broad-leaved forest and a seasonal rain forest. *Ecological Informatics*, 10, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2012.03.001>

CAPÍTULO V

ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y NITRÓGENO MEDIANTE MEDIDORES PORTÁTILES NO DESTRUCTIVOS EN ARÚGULA (*Eruca sativa* Mill.)

RESUMEN

El nitrógeno (N) es un nutrimento esencial para las plantas y el elemento más requerido en hortalizas de hoja. El objetivo de esta investigación fue estimar la concentración de clorofila y N mediante medidores portátiles no destructivos en arúgula (*Eruca sativa* L.). La investigación se realizó en invernadero, donde los tratamientos fueron cinco niveles de N-NO₃ (0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹). Las evaluaciones fueron semanales tanto para las variables de invernadero (biomasa fresca, lecturas SPAD, atLEAF y MC-100) como de laboratorio (concentraciones de clorofila y N). Los resultados mostraron que la relación entre lecturas SPAD, nitrógeno, clorofila y materia fresca fueron altas, positivas y significativas, con coeficientes de correlación de 0.93 – 0.97; para lecturas atLEAF, se observaron relaciones similares, con coeficientes de correlación de 0.96 – 0.99. Las relaciones entre lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 también fue alta, positiva y significativa, con coeficientes de correlación de 0.97 a 0.98. Esto indica que los medidores SPAD, atLEAF y MC-100 son métodos *in situ* válidos para estimar el estado nutrimental de clorofila y N en el cultivo de arúgula bajo condiciones de invernadero de manera no destructiva, rápida y precisa.

PALABRAS CLAVE: SPAD, atLEAF, MC-100, nutrición de cultivos, hortaliza de hoja.

INTRODUCCIÓN

Para las plantas el nitrógeno (N) es un elemento esencial ya que forma parte de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos y clorofila, este último, es pigmento esencial para la fotosíntesis y responsable del color verde de las plantas (Taiz *et al.*, 2014). La concentración de clorofila de la hoja está estrechamente relacionada con el contenido de N en la planta (Zebarth *et al.*, 2002), por lo tanto, el monitoreo de las concentraciones de clorofila y N puede ayudar en el manejo

de la nutrición para un adecuado crecimiento de los cultivos agrícolas y óptimos rendimientos (Gitelson *et al.*, 2003).

Los métodos destructivos para la determinación de N y clorofila son precisos, pero requieren mucho tiempo y son costosos (Kalaji *et al.*, 2017). En contraste, los medidores portátiles no destructivos se han utilizado con éxito en algunas especies para estimar la clorofila o N (Loh *et al.*, 2002; Abdelhamidg *et al.*, 2004) y permiten la medición de clorofila o N en la misma hoja a través del tiempo en el cultivo (Yamamoto *et al.*, 2002; Kalaji *et al.*, 2017).

El medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Konica Minolta®, Japón) se utiliza para la determinación rápida y no destructiva de la concentración relativa de clorofila en la hoja (Gianquinto *et al.*, 2003), la transmisión de luz a través de la hoja se mide a 650 y 940 nm, la longitud de onda de 650 nm coincide con la región espectral de la actividad máxima de clorofila y la transmitancia a 940 nm es utilizada para compensar factores como el contenido de humedad de la hoja y su espesor (de Souza *et al.*, 2019). Los valores obtenidos mediante el SPAD oscilan entre 0 y 99 y se ha reportado que este valor está relacionado con la concentración de clorofila foliar (Uddling *et al.*, 2007; Basyouni y Dunn, 2014; Basyouni *et al.*, 2015;).

El medidor de clorofila atLEAF Plus (FT Green LLC®, EUA) funciona de manera similar al medidor SPAD, pero utiliza una longitud de onda de 660 nm en lugar de 650 nm (Zhu *et al.*, 2012) y se obtienen lecturas con valores similares a las obtenidas con el SPAD (Basyouni *et al.*, 2015), pero el medidor atLEAF es una alternativa más económica en comparación con el SPAD (Zhu *et al.*, 2012; Basyouni y Dunn, 2014; Mendoza-Tafolla *et al.*, 2019).

Por otra parte, el medidor MC-100 (Apogee Instruments®, Logan, UT, USA) registra la concentración relativa de clorofila en la longitud de onda de 653 nm y 931 nm en un área de aproximadamente 64 mm² (de Souza *et al.*, 2019) y se ha empleado para la determinación de la concentración de clorofila en hojas, evaluación del estrés nutrimental y la optimización de cosechas (Padilla *et al.*, 2018).

Se ha reportado que la concentración de clorofila y de nitrógeno determinados en laboratorio presentan altas correlaciones con las lecturas SPAD en tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Fontes y Ronchi, 2002; Reis *et al.*, 2006), papa (*Solanum tuberosum*) (Gianquinto *et al.*, 2003; Coelho *et al.*, 2010), cebolla (*Allium cepa*), repollo (*Brassica oleracea*), zanahoria (*Daucus carota*) (Westerveld *et al.*, 2003), remolacha (*Beta vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) (Calderón *et al.*, 2011); mientras que con con atLEAF se han reportado altas correlaciones en papa (*Solanum tuberosum*), salvia (*Salvia splendens*) (Dunn *et al.*, 2018b) y clavel (*Dianthus chinensis*) (Basyouni *et al.*, 2015).

Mendoza-Tafolla *et al.* (2019) reportaron coeficiente de correlación de 0.94 y 0.98 para la concentración de nitrógeno y de clorofila, respectivamente, determinados con los medidores portátiles SPAD y atLEAF en lechuga romana, sin embargo, hacen falta más investigaciones en hortalizas *gourmet* con potencial de incrementar su superficie cultivada, como es el caso de arúgula. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estimar la concentración de clorofila y nitrógeno en arúgula mediante medidores portátiles no invasivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y material vegetal

El experimento se realizó en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, localizado en Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México, en los meses junio y julio de 2020, en un invernadero tipo túnel con cubierta plástica de color blanquecino con 30 % de sombreo y con malla antiáfidos en las paredes laterales, ubicado en las coordenadas 18° 58' 51" LN, 99° 13' 55" LO y altura de 1,866 m. Se registró la temperatura, humedad relativa y radiación solar con un datalogger Hobo®.

Se utilizó el cultivar de arúgula Wild rocket. Las semillas se sembraron el 01 de mayo de 2020 en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato comercial BM2 Berger®; después, el 15 de junio del mismo año se trasplantaron en bolsas de polietileno con capacidad de 10 L que contenía roca volcánica (localmente llamado tezontle) como sustrato con granulometría de 1 a 7 mm.

Tratamientos y medición de variables

Los tratamientos se comenzaron a aplicar el día del trasplante, los cuales fueron cinco niveles de nitrato con base en la solución nutritiva de Steiner (1984): 0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ (Mercado-Luna *et al.*, 2010), y para su aplicación se regó con 0.5 L de las soluciones nutritivas durante los primeros 21 días y con 1.5 L los 21 días restantes. Se consideró un drenaje de 15 a 20 % para evitar acumulación de sales. Los fertilizantes que se usaron para preparar las soluciones nutritivas fueron nitrato de calcio, nitrato de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio y sulfato monopotásico. Para el caso de los micronutrientes se utilizó una mezcla comercial de quelatos (Microsol Rexene® Mix SQM) en dosis de 80 g por m⁻³, es decir, considerando el suministro de 3 mg·L⁻¹ de hierro; la mezcla de micronutrientes contiene hierro (7.5 %), manganeso (3.7 %), boro (0.4 %), zinc (0.6 %), cobre (0.3 %) y molibdeno (0.2 %). El pH de las soluciones nutritivas se acidificó después de su preparación a valores entre 5.6 y 6.0 con ácido sulfúrico.

El muestreo *in situ* empleando los medidores portátiles SPAD 502® Plus Minolta, atLEAF® CHL Plus y MC 100 Apogee, se realizó semanalmente de acuerdo a la metodología de León *et al.* (2007). Cada valor de los medidores portátiles se obtuvo del promedio de 10 lecturas (5 a cada lado de la nervadura central de la hoja), en tres hojas recientemente maduras y completamente expandidas, entre las 11:00 y las 12:00 h, y con seis repeticiones. Para la determinación de la concentración de clorofila, las mismas hojas que se muestrearon con SPAD, atLEAF y MC 100 se conservaron a -80 °C durante una semana hasta su análisis en laboratorio.

La concentración de clorofila (mg·g⁻¹) se determinó con el método espectrofotométrico descrito por Mackinney (1941) y Wettstein (1957), en donde la biomasa fresca (1 g) se homogeniza con 20 mL de acetona concentrada, posteriormente se filtró el homogenizado y se aforó a 50 mL de acetona al 80 %, las suspensiones se mantuvieron en oscuridad entre los pasos de procesamiento. Después se realizaron lecturas de absorbancia (A) a 645 nm y 663 nm en un espectrofotómetro (HACH DR 5000) (de Souza *et al.*, 2019).

Inmediatamente después de terminar las mediciones *in situ* se cosechó la biomasa aérea fresca de las plantas para cuantificar el peso de biomasa fresca con una báscula OHAUS® con aproximación de 0.01 g. Estas muestras se secaron con un horno de aire forzado a 70 °C durante 72 horas. Con las muestras secas y molidas, se cuantificó el nitrógeno total por el método de micro Kjeldahl (Kalra, 1998). Las determinaciones tanto las *in situ* como de laboratorio se realizaron semanalmente desde los 7 días después del trasplante (ddt) hasta los 42 ddt.

Diseño y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos (0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ de NO⁻³) con seis repeticiones. La unidad experimental fue una maceta que contenía una planta.

Con los valores obtenidos *in situ* y en laboratorio se realizaron correlaciones de las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 con la concentración de N, concentración de clorofila y biomasa fresca aérea de la planta, con el programa SigmaPlot® (Versión 12.5). A los datos obtenidos en la cosecha (42 ddt), se les realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0.05$), con el programa estadístico Statistical Analysis Software® (SAS Institute, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones ambientales de cultivo y respuesta a los niveles de N

La temperatura media fue de 23 °C, la humedad relativa media de 69 % y la radiación solar media de 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Respecto al comportamiento de las plantas con los niveles de N, se observaron diferencias ($\alpha = 0.01$) para lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 con las concentraciones de N y clorofila, y biomasa fresca en función de los niveles de N aplicados a arúgula (Cuadro 1). Para todas las variables se observó un incremento al aumentar el nivel de N en la solución nutritiva. Al respecto, Dunn *et al.* (2018a) también reportaron tendencia similar para N y lecturas SPAD en hojas de salvia.

Cuadro 1. Lecturas SPAD, atLEAF, MC-100 biomasa fresca y concentraciones de N y clorofila en arúgula a los 42 ddt.

N aportado (mEq·L ⁻¹)	Lecturas SPAD	Lecturas atLEAF	Lecturas MC-100	Nitrógeno (%)	Clorofila (mg·g ⁻¹)	Biomasa fresca (g·planta ⁻¹)
0	39.2 c	43.4 c	44.3 c	1.67 c	3.15 c	101.9 c
4	40.1 c	44.0 c	45.3 c	1.74 c	3.34 c	108.3 c
8	45.7 b	46.6 bc	47.8 c	2.01 b	3.67 b	126.2 b
12	46.2 b	51.2 b	53.4 b	2.09 b	3.75 ab	146.7 a
16	49.5 a	57.3 a	59.1 a	2.46 a	3.87 a	150.2 a

Correlación entre SPAD, atLEAF, N, clorofila y materia aérea fresca

Se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.01$) para las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 con las concentraciones de N y clorofila, y biomasa fresca en función de los niveles de N aplicados a la arúgula (Cuadro 2). Para las variables se observó un incremento al aumentar el nivel de nitrógeno en la solución nutritiva. Al respecto, Basyouni *et al.* (2015) también informaron una tendencia similar para las lecturas de nitrógeno y SPAD en hojas de flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima*). En otro estudio, Padilla *et al.* (20018b) reportan diferencia estadística para los niveles de nutrición nitrogenada en pimiento dulce, siendo que cuanto mayor es la cantidad de N aplicado, aumentan los rendimientos.

Cuadro 2. Correlaciones, ecuaciones de regresión, y coeficientes de correlación para lecturas SPAD, atLEAF, MC-100 biomasa fresca, concentraciones de N y clorofila en arúgula.

Correlación	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación	CME
SPAD y N	% N = 0.0336 SPAD + 0.1751	0.97**	0.03
atLEAF y N	% N = 0.0378 atLEAF - 0.1298	0.98**	0.03
MC-100 y N	% N = 0.0502 MC-100 - 0.4549	0.94**	0.05
SPAD y clorofila	Clorofila = 0.0079 SPAD + 0.0650	0.98**	0.06
atLEAF y clorofila	Clorofila = 0.0086 atLEAF + 0.0036	0.96**	0.03
MC-100 y clorofila	Clorofila = 0.0121 MC-100 - 0.0922	0.98**	0.04
SPAD y materia fresca	Materia fresca = 4.3016 SPAD - 64.9720	0.94**	0.06
atLEAF y materia fresca	Materia fresca = 6.1576 atLEAF - 13.7030	0.93**	0.02
MC-100 y materia fresca	Materia fresca = 4.9606 MC-100 - 10.777	0.97**	0.05
SPAD y atLEAF	SPAD = 0.8852 atLEAF + 8.1197	0.98**	0.06
SPAD y MC-100	SPAD = 0.6286 MC-100 + 13.675	0.97**	0.03
atLEAF y MC-100	atLEAF = 0.6982 MC-100 + 8.3040	0.97**	0.04

** Indica correlación altamente significativa entre las variables ($\alpha = 0.01$).

Relación del contenido de clorofila versus Lecturas SPAD, atLEAF y MC-100

La correlación entre lecturas SPAD y la concentración de clorofila (Cuadro 2) fue altamente significativa y positiva ($\alpha = 0.01$, $r = 0.98$). Estos resultados son similares a los de Fenech-Larios *et al.* (2009) quienes encontraron alta correlación entre lecturas SPAD y concentración de clorofila ($r = 0.99$) en plántulas de albahaca; también son similares a los reportados por Mendoza-Tafolla *et al.* (2019) en lechuga romana ($r = 0.99$). Las correlaciones del presente estudio son superiores a los reportados por Martín *et al.* (2007), quienes en laurustina (*Viburnum tinus*), tobira (*Pittosporum tobira*) y madroño (*Arbutus unedo*), encontraron coeficientes de correlación entre 0.36 y 0.52. Estas diferencias pueden deberse al tipo de planta, ya que estas últimas especies son arbustivas o leñosas.

En cuanto al atLEAF, el coeficiente de correlación fue de 0.96 ($\alpha = 0.01$). Estos resultados indican que presentaron mayor ajuste al modelo de regresión lineal en comparación a los reportados por Zhu *et al.* (2012) quienes obtuvieron coeficientes de determinación entre 0.72 y 0.88 para clorofila y atLEAF en maíz, trigo, cebada, papa y canola. Por su parte, Hebbar *et al.* (2016) tuvieron coeficientes de correlación entre 0,68 y 0,95 en hojas de palmera cocotera (*Cocos nucifera*). Para el medidor MC-100, el coeficiente de correlación fue de 0.98 ($\alpha = 0.01$) para un modelo de regresión lineal. Por su lado, Padilla *et al.* (2019) reportan coeficientes de correlación entre 0.87 y 0.97 en pimiento dulce. Tanto para SPAD, atLEAF y MC-100 la ecuación de regresión lineal (Figura 1) permite hacer predicciones de la concentración de clorofila de forma precisa y confiable en plantas de arúgula, lo cual puede servir para estimar el estado nutricional del cultivo, y a partir de esto, sugerir dosis de fertilización nitrogenada.

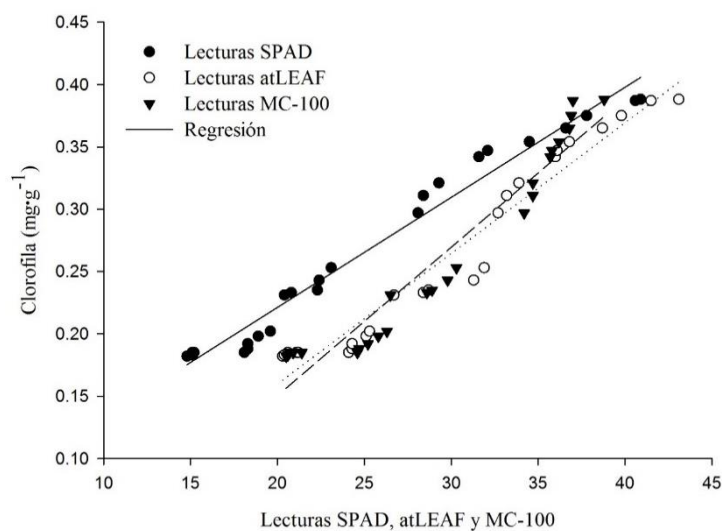


Figura 1. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 vs. la concentración de clorofila en arúgula.

Lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 con N

La relación entre SPAD, atLEAF y MC-100 fue altamente significativa (coeficientes de correlación de 0.97, 0.98 y 0.94, respectivamente) con la concentración de nitrógeno en plantas de arúgula (Figura 2); y presentaron un ajuste al modelo de regresión lineal. Ali *et al.* (2007) encontraron coeficientes de correlación entre 0.93 a 0.97 para la relación entre el medidor SPAD y

concentración de nitrógeno en el cultivo de tomate de invernadero. Por otra parte, Dunn *et al.* (2018a) reportó valores de correlación de 0.96 para la relación entre atLEAF y N en plántulas de salvia; y De Souza *et al.* (2019) comparó los medidores atLEAF y MC-100 para determinar la concentración de N en pimiento dulce obteniendo correlaciones entre 0.90 y 0.97 para ambos medidores.

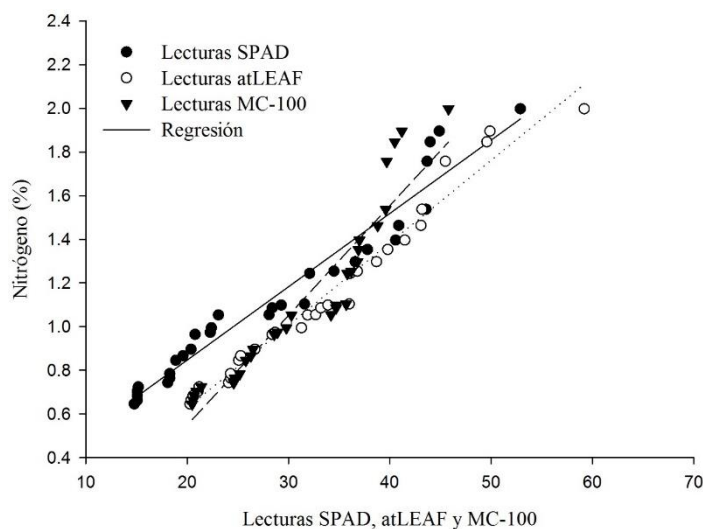


Figura 2. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 con la concentración de nitrógeno en arúgula.

Lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 con biomasa fresca

La correlación entre las lecturas SPAD y materia fresca (Figura 3) fue significativa y positiva ($\alpha = 0.01$) con coeficiente de correlación de 0.94 (Cuadro 1). Estos resultados son similares a los de Cunha *et al.* (2015) quienes tuvieron coeficientes de correlación entre 0.92 y 0.98 en la relación entre SPAD y peso fresco de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). En este sentido, Cho *et al.* (2007) mencionan que las lecturas SPAD pueden ser utilizados en campo para estimar el rendimiento de materia aérea fresca y predecir el rendimiento en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*).

En cuanto a la correlación entre las lecturas atLEAF y materia aérea fresca (Figura 3) fue significativa ($\alpha = 0.01$) y presentó buen ajuste a la regresión lineal, con coeficiente de correlación de 0.93 (Cuadro 1). Estos resultados son similares a los de Dey *et al.* (2016) quienes en betel (*Piper betle*) reportaron coeficiente de correlación de 0.97.

Para los valores obtenidos con el MC-100 fue significativa ($\alpha = 0.01$) con valores de correlación de 0.97 para un modelo de regresión lineal.

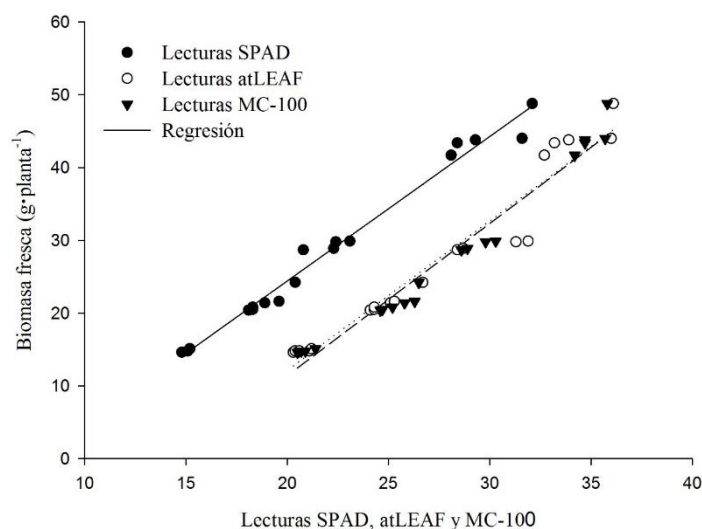


Figura 3. Correlación entre los valores SPAD, atLEAF y MC-100 con la materia aérea fresca en arúgula.

Lecturas SPAD, atLEAF y MC-100

La correlación entre las lecturas SPAD y atLEAF fue altamente significativa ($\alpha = 0.01$) con coeficiente de correlación de 0.98 (Cuadro 1); asimismo, se obtuvo un adecuado ajuste a la ecuación de regresión lineal (Figura 4a). Estos resultados son aproximados Dunn *et al.* (2018b) obtuvieron coeficientes de correlación de 0.80 a 0.95 entre las lecturas SPAD y atLEAF en hojas de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*). Por su parte, Zhu *et al.* (2011), encontraron correlaciones significativas entre las lecturas SPAD y atLEAF para maíz, cebada y papa.

En cuanto a la relación del SPAD con el MC-100 los coeficientes de correlación y determinación fueron 0.97 y 0.94 respectivamente en un modelo de regresión lineal (Figura 4b). Resultados similares a los obtenidos por Padilla *et al.* (2019) quienes reportan coeficientes de correlación entre 0.95 y 0.98 en pimiento dulce (*Capsicum annuum*). Por otra parte, la relación entre atLEAF y MC-100 tuvo coeficiente de correlación de 0.97.

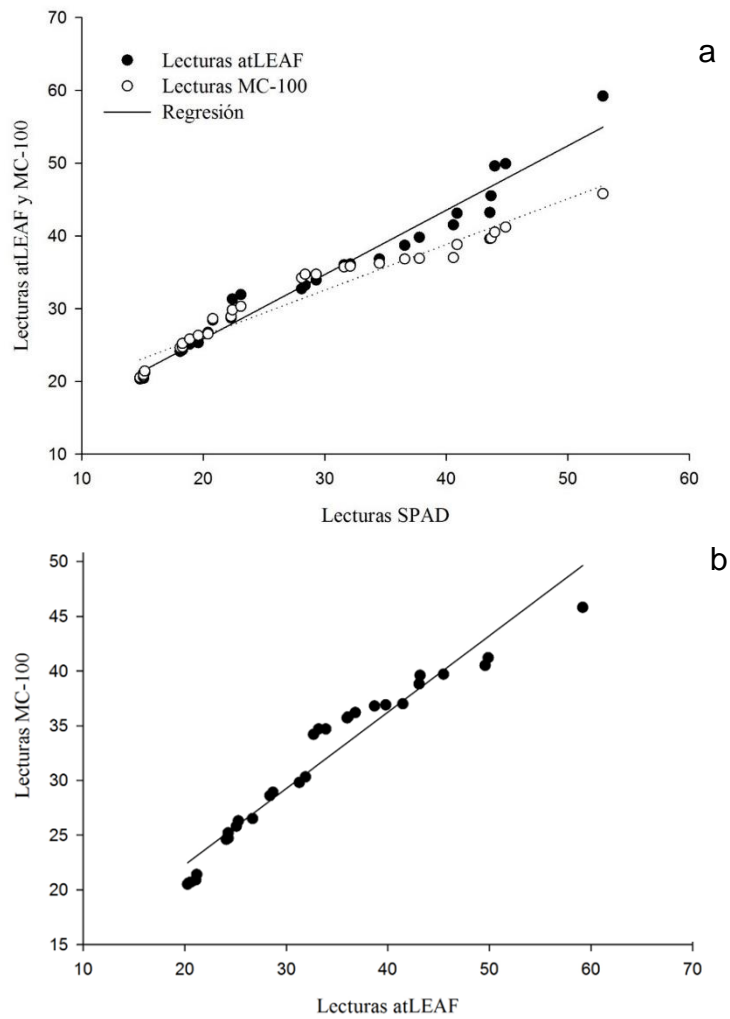


Figura 4. Correlación entre los medidores portátiles SPAD, atLEAF y MC-100 en arúgula. a) relación entre lecturas SPAD con atLEAF y MC-100 y b) relación entre lecturas atLEAF y MC-100.

Los resultados de la presente investigación muestran que en el cultivo de arúgula es factible usar SPAD, atLEAF ó MC-100 con fines de estimación de la concentración de clorofila, de nitrógeno, así como de la producción de materia fresca, con resultados confiables. Sin embargo, el atLEAF es aproximadamente 80 % más económico en comparación con el SPAD 502 Plus y el medidor MC-100. En adición a lo anterior, la importancia de los resultados del presente estudio radica en que constituyen el primer reporte del uso de los medidores SPAD, atEAF y de MC-100 en el cultivo de arúgula lo que potencialmente puede servir para el uso más racional de fertilizantes nitrogenados en esta especie, los cuales tienen repercusiones tanto ambientales como en la salud humana.

CONCLUSIONES

La relación entre lecturas SPAD, nitrógeno, clorofila y biomasa fresca fue alta, positiva y significativa, con coeficientes de correlación de 0.95 - 0.98 en plantas de arúgula; para lecturas atLEAF, se observaron relaciones similares, con coeficientes de correlación de 0.96 a 0.99. La relación entre lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 también fue alta, positiva y significativa, con coeficiente de correlación de 0.98.

Las ecuaciones de regresión mostraron que las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 están relacionados linealmente con nitrógeno, clorofila y materia fresca en arúgula.

Los medidores portátiles SPAD, atLEAF y MC 100 pueden usarse para estimar el estado nutrimental de nitrógeno de manera no destructiva, rápida y precisa durante el crecimiento del cultivo de arúgula, sin embargo, el atLEAF puede considerarse como una alternativa más económica en comparación con el SPAD y el MC-100.

REFERENCIAS

- Abdelhamidg, M., Horiuchi, T. y Oba, S. 2004. Evaluation of the SPAD value in faba bean (*Vicia faba* L.) leaves in relation to different fertilizer applications. *Plant Production Science*. 6(3): 185–189. <https://doi.org/10.1626/ppp.6.185>
- Ali, M. M.; Al-Ani, A.; Eamus, D. y Tan, D. K. Y. 2007. Leaf nitrogen determination using handheld meters. *Precision Agriculture. Journal of Plant Nutrition*. 40(7): 928–953.
- Basyouni, R. y Dunn, B. L. 2014. Use of reflectance sensors to monitor plant nitrogen status in horticultural plants. *Agricultural and Forest Meteorology*. 6: 581-584 <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2323.9206>
- Basyouni, R., Dunn, B. L. y Goad, C. 2015. Use of nondestructive sensors to assess nitrogen status in potted poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* L. (Willd. ex Klotzsch)) production. *Scientia Horticulturae*. 192: 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.011>

- Calderón M., L. A., Bernal R., A. M. y Pérez T., M. M. 2011. Ensayo preliminar sobre la utilización de un medidor portátil de clorofila para estimar el nitrógeno foliar en orégano (*Origanum vulgare* L.). Facultad de ciencias, 7(2), 150–166.
- Cho, Y. Y., Oh, S., Oh, M. M. y Son, J. E. 2007. Estimation of individual leaf area, fresh weight, and dry weight of hydroponically grown cucumbers (*Cucumis sativus* L.) using leaf length, width, and SPAD value. *Scientia Horticulturae*. 111(4): 330–334. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.12.028>
- Coelho, F. S., Fontes, P. C. R., Puiatti, M., Neves, J. C. L. y Silva, M. C. de C. 2010. Dose de nitrogênio associada à produtividade de batata e índices do estado de nitrogênio na folha. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*. 34(4): 1175–1183.
- Cunha, A. R. da, Katz, I., Sousa, A. de P. y Martinez Uribe, R. A. 2015. Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de lisianthus en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido. *Idesia (Arica)*. 33(2): 97–105. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292015000200012>
- de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Thompson, R. B., Gallardo, M., Grasso, R. y Padilla, F. M. 2019. The use of chlorophyll meters to assess crop n status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. *Sensors* 19(13): 2949. <https://doi.org/10.3390/s19132949>
- Dey, A. K., Sharma, M. y Meshram, M. R. 2016. An analysis of leaf chlorophyll measurement method using chlorophyll meter and image processing technique. *Procedia computer science*. 85: 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2016.05.235>
- Dunn, B. L., Singh, H. y Goad, C. 2018. Relationship between chlorophyll meter readings and nitrogen in poinsettia leaves. *Journal of Plant Nutrition*. 41(12): 1566–1575. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1459697>
- Dunn, B. L., Singh, H., Payton, M. y Kincheloe, S. 2018. Effects of nitrogen, phosphorus, and potassium on SPAD-502 and atLEAF sensor readings of *Salvia*. *Journal of Plant Nutrition*. 41(13): 1674–1683. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1458874>
- Fenech-Larios, L., Troyo-Diéguez, E., Trasviña-Castro, M., Ruiz-Espinoza, F., Beltrán-Morales, A., Murillo-Amador, B. y Zamora-Salgado, S. 2009.

Relación entre un método no destructivo y uno de extracción destructivo, para medir el contenido de clorofila en hojas de plántula de albahaca (*Ocimum basilicum* L). (Spanish). Relationship between a non-destructive method and a destructive extraction method, for measuring the chlorophyll content in basil seedling leaves (*Ocimum basilicum* L). (English), 25(1), 99–102.

Fontes, P. C. R. y Ronchi, C. P. 2002. Critical values of nitrogen indices in tomato plants grown in soil and nutrient solution determined by different statistical procedures. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 37(10): 1421–1429. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2002001000010>

Gianquinto, G., Sambo, P. y Pimpini, F. 2003. The use of SPAD-502 chlorophyll meter for dynamically optimizing the nitrogen supply in potato crop: First results. *Acta Horticulturae*. 607: 191–196. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.607.29>

Gitelson, A. A., Gritz †, Y. y Merzlyak, M. N. 2003. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *Journal of Plant Physiology*. 160(3); 271–282. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00887>

Hebbar, K. B., Subramanian, P., Sheena, T. L., Shwetha, K., Sugatha, P., Arivalagan, M. y Varaprasad, P. V. 2016. Chlorophyll and nitrogen determination in coconut using a non-destructive method. *Journal of Plant Nutrition*. 39(11): 1610–1619. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1161781>

Kalaji, H. M., Dąbrowski, P., Cetner, M. D., Samborska, I. A., Łukasik, I., Brestic, M. y Panchal, B. M. 2017. A comparison between different chlorophyll content meters under nutrient deficiency conditions. *Journal of Plant Nutrition*. 40(7): 1024–1034. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1263323>

Kalra, P. Y. 1998. *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. Crop Science (Vol. 38). <https://doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800060050x>

León, A. P., Viña, S. Z., Frezza, D., Chaves, A. y Chiesa, A. 2007. Estimation of chlorophyll contents by correlations between SPAD-502 meter and chroma meter in butterhead lettuce. *Communications in Soil Science and*

- Plant Analysis. 38(19–20): 2877–2885.
<https://doi.org/10.1080/00103620701663115>
- Loh, F. C. W., Grabosky, J. C. y Bassuk, N. L. 2002. Using the SPAD 502 meter to assess chlorophyll and nitrogen content of benjamin fig and cottonwood leaves. HortTechnology. 2: 682–686.
<https://doi.org/10.21273/HORTTECH.12.4.682>
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. Journal of Biological Chemistry. 140(2): 315–322.
- Martín, I., Alonso, N., López, M. C., Prieto, M., Cadahía, C. y Eymar, E. 2007. Estimation of leaf, root, and sap nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter for ornamental shrubs. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 38(13–14): 1785–1803.
<https://doi.org/10.1080/00103620701435555>
- Mendoza-Tafolla, R. O., Juárez-Lopez, P., Ontiveros-Capurata, R.E., Sandoval-Villa, M., Alia-Tejacal, I. y Alejo-Santiago, G. 2019. Estimating nitrogen and chlorophyll status of romaine lettuce using SPAD and atLEAF readings. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 47(3): 751-760 <https://doi.org/10.15835/nbha47311525>
- Mercado-Luna, A., Rico-García, E., Soto-Zarazúa, A. L.H. G., Guevara-González, R. O.V. R., Herrera-Ruiz, G. y Torres-Pacheco, I. 2010. Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). African Journal of Agricultural Research. 9(33): 5326–5332. <https://doi.org/10.5897/AJB10.130>
- Padilla, F. M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Giménez, C. y Thompson, R. B. 2018. Different responses of various chlorophyll meters to increasing nitrogen supply in sweet pepper. Frontiers in Plant Science. 9: 63-72. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01752>
- Reis, A. R. dos, Furlani Junior, E., Buzetti, S. y Andreotti, M. 2006. Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. Bragantia. 65(1): 163–171. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052006000100021>
- SAS Institute, 2004. Statistical Analysis System, SAS Institute, Inc. Cary., N. C. USA.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. En Proceedings of the 6th

- International Congress on Soilless Culture International Soc. For Soilless Culture. ISOSC. (pp. 633–649). Wageningen, The Netherlands.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M. y Murphy, A. 2014. *Plant Physiology & Development*. (S. Associates, Ed.) (6 th).
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K. y Pleijel, H. 2007. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research*. 91(1): 37–46. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9077-5>
- Westerveld, S. M., McKeown, A. W., McDonald, M. R. y Scott-Dupree, C. D. 2003. Chlorophyll and nitrate meters as nitrogen monitoring tools for selected vegetables in southern Ontario. *Acta Horticulturae*. 627: 259–266. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.627.33>
- Wettstein, D. 1957. Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*. 12(3): 427–506.
- Yamamoto, A., Nakamura, T., Adu-Gyamfi, J. J. y Saigusa, M. 2002. Relationship between chlorophyll content in leaves of sorghum and pigeonpea determined by extraction method and by chlorophyll meter (SPAD-502). *Journal of Plant Nutrition*. 25(10): 2295–2301. <https://doi.org/10.1081/PLN-120014076>
- Zebarth, B. J., Younie, M., Paul, J. W. y Bittman, S. 2002. Evaluation of leaf chlorophyll index for making fertilizer nitrogen recommendations for silage corn in a high fertility environment. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 33(5–6): 665–684. <https://doi.org/10.1081/CSS-120003058>
- Zhu, J., Tremblay, N. y Liang, Y. 2011. A Corn Nitrogen Status Indicator Less Affected by Soil Water Content. *Agronomy Journal*. 103(3): 890. <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0351>
- Zhu, J., Tremblay, N. y Liang, Y. 2012. Comparing SPAD and atLEAF values for chlorophyll assessment in crop species. *Canadian Journal of Soil Science*. 92(4): 645–648. <https://doi.org/10.4141/cjss2011-100>

CAPÍTULO VI

ESTIMACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA Y NITRÓGENO EN ARÚGULA (*Eruca vesicaria* L.) MEDIANTE TÉCNICAS NO DESTRUCTIVAS

RESUMEN

El análisis no destructivo de tejido vegetal es una técnica confiable para estimar el estado nutrimental de la planta, en este trabajo se estimó la concentración de nitrógeno (N) y clorofila en arúgula (*Eruca vesicaria* L.) mediante medidores portátiles e índices espectrales calculados a partir de imágenes RGB. La arúgula se cultivó en invernadero de cubierta plástica e irrigada con cinco niveles de NO_3 0, 4, 8, 12 y 16 $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$. Las imágenes digitales RGB de las plantas se obtuvieron cada semana y se procesaron para obtener ortomosaicos escalados con los cuales se calcularon seis índices espectrales. El tratamiento de 16 $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ de N tuvo un efecto notable en el crecimiento, desarrollo y coloración de las plantas de la arúgula a los 42 días después del trasplante. Las relaciones entre lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 también fue alta, positiva y significativa, con coeficientes de correlación de 0.98 y de determinación de 0.96. Las ecuaciones de regresión mostraron que las lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 en arúgula estuvieron relacionados linealmente con todas las variables evaluadas. De los seis índices calculados, NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G mostraron mejor predicción (R^2 entre 0.88 y 0.94) de la concentración de clorofila, N, área foliar, materia seca y fresca. La relación entre NGRDI y la concentración de clorofila es elevada ($R^2 = 0.95$ y $r = 0.90$), lo cual puede indicar el potencial uso de índices espectrales para la determinación rápida y precisa de las variables evaluadas.

PALABRAS CLAVE: nutrición de cultivos; muestreo no destructivo; análisis de imágenes; concentración de N.

INTRODUCCIÓN

La determinación del contenido de nitrógeno (N) en cultivos agrícolas se realiza frecuentemente mediante métodos destructivos como Kjeldahl y Dumas; aunque estos métodos son precisos y estandarizados, a menudo están limitados por la escala espacial y son costosos (Wiwart *et al.*, 2009). Como alternativa, los métodos no destructivos permiten obtener resultados *in situ*, en menos tiempo,

con mayor frecuencia y no requieren de personal altamente especializado (Vollmann *et al.*, 2011).

Los métodos no destructivos y específicamente los medidores portátiles se han utilizado con éxito en algunas especies para determinar la concentración de clorofila y N (Cunha *et al.*, 2015; Kokila *et al.*, 2018) ya que permiten la medición de en la misma hoja a través del tiempo en el ciclo de cultivo (Kalaji *et al.*, 2017).

El medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Konica Minolta®, Japón) se utiliza para la determinación rápida y no destructiva de la concentración relativa de clorofila en la hoja (Ali *et al.*, 2007), la transmisión de luz a través de la hoja se mide a 650 y 940 nm, la longitud de onda de 650 nm coincide con la región espectral de la actividad de clorofila y la transmitancia a 940 nm es utilizada para compensar factores como el contenido de humedad de la hoja (Auearunyawat *et al.*, 2013). Se ha reportado que las lecturas SPAD están relacionadas con la concentración de clorofila foliar en cultivos como lechuga, salvia y papa (Coelho *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2018; Mendoza-Tafolla *et al.*, 2019)

Otro medidor portátil de clorofila es el atLEAF Plus (FT Green LLC®, EUA) funciona de manera similar al medidor SPAD, pero utiliza una longitud de onda de 660 nm en lugar de 650 nm y se obtienen lecturas con valores similares a las obtenidas con el SPAD (Padilla *et al.*, 2018), pero el medidor atLEAF es una alternativa más económica en comparación con el SPAD (Basyouni, 2015).

El medidor MC-100 (Apogee Instruments Inc. Logan, UT, USA) registra la concentración relativa de clorofila en la longitud de onda de 653 nm y 931 nm en un área de aproximadamente 64 mm² y se ha empleado para la determinación de la concentración de clorofila en hojas, evaluación del estrés nutrimental y la optimización de cosechas (de Souza *et al.*, 2019).

Por otra parte, los métodos basados en imágenes digitales han sido empleados ampliamente para estimar características físicas y químicas de cultivos hotícolas

como tomate (Padilla *et al.*, 2018), lechuga (Mendoza-Tafolla *et al.*, 2021), pimiento dulce (Han-Yuzhu, 2011), remolacha (Sánchez-Sastre *et al.*, 2020), melón (Peña-Fleitas *et al.*, 2015) y papa (Yadav *et al.*, 2010) y representan una alternativa viable por su precisión y confiabilidad (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013; Prey *et al.*, 2018).

Las imágenes digitales adquiridas por sensores y cámaras han sido usadas para estudiar características biofísicas de la vegetación a partir de sus características espectrales, por ejemplo, el crecimiento vegetal (Graham *et al.*, 2010), detección de estrés hídrico y concentración de N en plantas (Cao *et al.*, 2013), monitoreo de fenología (Richardson *et al.*, 2001; Toomey *et al.*, 2015) y detección de plagas y enfermedades de cultivos (Nagai *et al.*, 2016).

La determinación y el uso de índices espectrales calculados a partir de imágenes RGB combinan los valores de reflectancia de dos o más longitudes de onda para resaltar características de interés como el estado nutrimental de las plantas (Paz Pellat *et al.*, 2015). Varios estudios reportan el uso de índices espectrales para cuantificar el estado nutrimental de cultivos como arroz. (Vigneau *et al.*, 2011), detección de trigo (Yue *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013), maíz (Prey *et al.*, 2018; Sakamoto *et al.*, 2012), cebada (Näsi *et al.*, 2018), y hortalizas como tomate (Padilla *et al.*, 2015; Peña-Fleitas *et al.*, 2015), melón (Peña-Fleitas *et al.*, 2015) y papa (Yadav *et al.*, 2010).

La arúgula es uno de los cultivos más importante del grupo de las hortalizas de hoja *gourmet* a nivel mundial, debido a su alto valor nutritivo y porque es una fuente de vitaminas y minerales (Sáez *et al.*, 2017). En el año 2020, la producción mundial de arúgula fue de 1.1 millones de toneladas siendo Brasil el primer productor mundial con el 55 % de la producción global con 627 toneladas (Sáez *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019). México tuvo en el 2019 una producción de 475 toneladas equivalente al 42 % mundial (SIAP, 2019) y es el tercer exportador a nivel latinoamericano de arúgula con un valor de 259 millones de pesos (SIAP, 2020). Por lo cual, el propósito de esta investigación fue estimar la concentración de clorofila y N en arúgula (*Eruca vesicaria* L.) mediante técnicas no destructivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones generales y manejo del cultivo

El experimento se realizó en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, localizado en Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México, en los meses de mayo a julio de 2020, en un invernadero tipo túnel con cubierta plástica de color blanquecino y con malla antiáfidos en las paredes laterales, con las coordenadas 18° 58' 51" LN, 99° 13' 55" LO y altitud de 1,866 m, en donde se registró la temperatura, humedad relativa y radiación solar con un datalogger Hobo® (modelo U12-012, Onset Computer Corporation, Bourne, MA). La temperatura media fue de 24.3 °C. La humedad media fue de 62.1 % y la radiación solar fue 475.3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en promedio.

Se utilizó el cultivar de arúgula Wild rocket. Las semillas se sembraron el 01 de mayo de 2020 en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato comercial BM2 Berger®; posteriormente, se trasplantaron el 08 de junio de 2020 en bolsas de polietileno con capacidad de 8 L, que contenía roca volcánica (localmente llamado tezontle) como sustrato con granulometría de 1 a 7 mm.

Tratamientos y medición de variables

Los tratamientos fueron cinco niveles de nitrato con base en la solución nutritiva de Steiner (1984): 0, 4, 8, 12 y 16 $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ (Mercado-Luna *et al.*, 2010) y se aplicaron desde el día del trasplante; para su aplicación se regó con 0.5 L de las soluciones nutritivas durante los primeros 21 días y con 1.5 L los siguientes 21 días. Se consideró un drenaje de 15 a 20 % para evitar acumulación de sales. Se usaron fertilizantes comerciales para preparar las soluciones nutritivas: nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$); nitrato de potasio (KNO_3); sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$); sulfato de potasio (K_2SO_4) y fosfato monopotásico (KH_2PO_4). Los micro nutrientes se agregaron en mezcla comercial de quelatos Microsol Rexene® Mix SQM en dosis de 80 $\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. El pH de las soluciones nutritivas se acidificó con ácido sulfúrico después de su preparación a valores entre 5.6 y 6.0.

Diseño experimental y datos referencia

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos (0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ de NO₃⁻) con seis repeticiones. La unidad experimental fue una maceta que contenía una planta y las variables de referencia determinadas fueron concentración de N, concentración de clorofila y área foliar.

Se realizaron las mediciones *in situ* empleando los medidores portátiles SPAD 502® Plus Minolta, atLEAF® FT Green y MC-100 ®Apogee, con cada equipo se tomaron lecturas de todas las unidades experimentales en dos puntos distintos por hoja de tres hojas por planta (216 lecturas totales por semana), en las hojas recientemente maduras y completamente expandidas, antes del riego diario que correspondía a las 12:00 horas cada semana, con los datos obtenidos se calculó el promedio por planta y tratamiento.

Inmediatamente después de terminar las mediciones *in situ* se cosechó la biomasa aérea de las plantas, se cuantificó el peso de biomasa fresca con una báscula OHAUS® con aproximación de 0.01 g. El contenido de N (%) se determinó mediante la metodología descrita por Sandoval-Villa *et al.* (1992), que consistió en pesar 0.1 g de tejido vegetal previamente secado en un horno de aire forzado a 70 °C durante 72 horas hasta obtener peso constante, luego se agregó 1.5 g de la mezcla catalizador más 3.5 mL de H₂SO₄ para llevar a cabo la digestión a 400 °C por 45 min, posteriormente cuando la muestra estaba a temperatura ambiente se agregó 5 gotas de fenolftaleína al 1 % y 40 mL de agua, la destilación se recuperó en 10 mL de H₃BO₃ al 4 % con pH de 4.5, la titulación se realizó con HCl 0.02 M hasta lograr un cambio de color apreciable entre el azul y el rojizo mate de la solución de H₃BO₃, finalmente los volúmenes necesarios para la titulación de las muestras y el blanco se sustituyeron en la siguiente ecuación:

$$\% N = \frac{(\text{HCl gastado de la muestra} - \text{HCl gastado del blanco}) * 0.02 * 0.014 * 100}{\text{gramos de la muestra}}$$

El contenido de clorofila ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) se determinó con el método espectrofotométrico descrito por Mackinney (1941) y Wettstein (1957), en donde la biomasa fresca (1 g) se homogeniza con 20 mL de acetona concentrada, posteriormente se filtró el homogenizado y se aforo a 50 mL de acetona al 80 %, las suspensiones se mantuvieron en oscuridad entre los pasos de procesamiento. Después se realizaron lecturas de absorbancia (A) a 645 nm y 663 nm en un espectrofotómetro X-rite® Mod. 3290, los cálculos se realizaron con la ecuación:

$$\text{Clorofila total} = (20.2 * A_{645 \text{ nm}}) + (8.02 * A_{663 \text{ nm}})$$

Las determinaciones de las variables tanto *in situ* como de laboratorio se realizaron semanalmente desde los 7 días después del trasplante (ddt) hasta los 42 ddt.

Adquisición y procesamiento de imágenes

Las imágenes digitales fueron adquiridas mediante una cámara visible RGB (Samsung, WB250F de 16 Mpx), montada en un goniómetro (Sandmeier, 2000), en un intervalo de inclinación de 20 a 160°. A partir de un proceso de restitución fotogramétrica mediante el software Agisoft Photoscan® se obtuvieron ortomosaicos, y posteriormente se calcularon seis índices espectrales RGB (Cuadro 1) para imágenes RGB mediante una secuencia de comandos en el software R (versión 3.5.0).

Cuadro 1. Índices espectrales calculados a partir de imágenes RGB

Nombre del índice	Siglas	Formula	Referencia
1) Normalized Green Red Difference Index	NGRDI	$(g-r)/(g+r)$	Wan et al., 2018
2) Redness Index	RI	$(r-g)/(r+g)$	Huete & Escadafal, 1991
3) Color Index of Vegetation Extraction	CIVE	$(0.441*r)-(0.811*g)+(0.385*b)+18.78745$	Kataoka et al., 2008
4) Excess Red Vegetative Index	ExR	$[(1.4*r)-g]/(r+g+b)$	Meyer et al., 1998
5) Excess Green Index	ExG	$[(2*g)-(r+b)]/(r+g+b)$	Beniaich et al., 2019
6) Channel Index G	G	$g/(r+g+b)$	Baresel et al., 2017

Regiones de la banda espectral: r - rojo 650–700 nm, G - verde 500–550 nm y b - azul 450–500 nm

Posteriormente, con cada imagen obtenida de los tres índices que obtuvieron mayores valores en la matriz de correlación se realizó un proceso de clasificación supervisada mediante el método de máxima verosimilitud para separar los píxeles correspondientes al cultivo de arúgula (Figura 1). Finalmente, se realizaron estimaciones de las variables y se correlacionaron con los valores de referencia obtenidos en laboratorio.

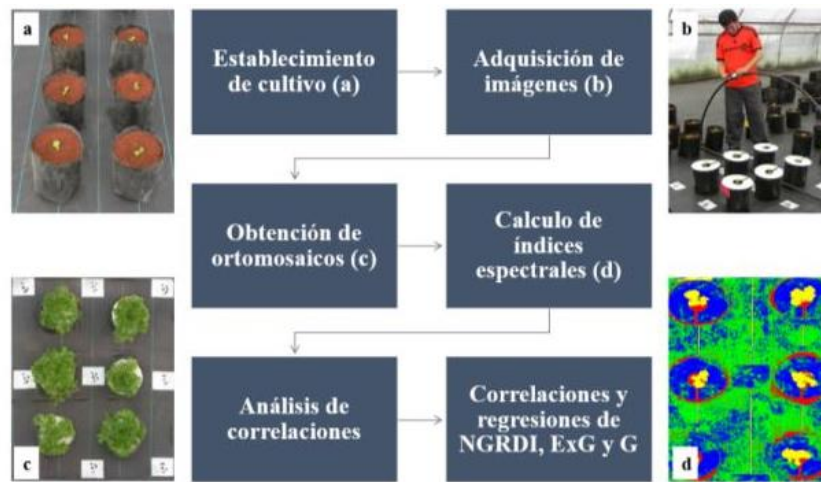


Figura 1. Proceso para determinar las correlaciones entre las variables evaluadas y los índices espectrales RGB en arúgula 'Wild rocket'

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza y su respectiva prueba de Tukey para la comparación de los tratamientos utilizando el software estadístico SAS, versión 9.1 (SAS Institute, EE. UU.) con un factor unidireccional y significancia estadística a $P \leq 0.01$, media aritmética (\bar{x}), coeficiente de variación (CV) y se calculó la diferencia mínima significativa (DMS). La exactitud (%) se determinó por diferencia entre la media y de la media aritmética (\bar{x}).

Para los modelos de regresión lineal simple y las correlaciones entre índices espectrales y valores de datos de referencia se usó el software estadístico SigmaPlot, versión 12.5 (SyStat Software Inc., EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSION

Respuesta a los niveles de N

Respecto al comportamiento de las plantas con los niveles de N, se observaron diferencias estadísticas significativas ($\alpha = 0.01$) para las lecturas SPAD, atLEAF y MC 100 (Cuadro 2) con las concentraciones de clorofila y N en función de los niveles de N aplicados a arúgula y la diferencia mínima significativa entre el efecto de los tratamientos fue a partir de los 28 ddt, en donde en las variables de concentración de clorofila y concentración de N el tratamiento de 16 mEq·L⁻¹ quién obtuvo los promedios más altos en comparación con el resto de los

tratamientos. Todas las variables mostraron incrementos al aumentar el nivel de N en la solución nutritiva. Dunn *et al.* (2018) reportaron una tendencia similar para N y lecturas SPAD en hojas de salvia. Por su parte, de Souza *et al.* (2019) mencionan diferencias estadísticas para los distintos niveles de N suministrado en pimiento dulce, ya que a mayor concentración se tuvo mayor rendimiento.

Las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100 se ajustaron a una regresión lineal simple y tienen coeficientes de correlación positivo (r) entre 0.94 y 0.96 respectivamente y coeficientes de determinación (R^2) entre 0.92 y 0.96 respectivamente (RMSE entre 0.028 y 0.043). Estos valores fueron superiores a los reportados en otras especies vegetales, por ejemplo orégano ($R^2 = 0.64$) para la correlación de SPAD y concentración de N foliar (Medellín-Calderón *et al.*, 2011). La concentración de N y las lecturas atLEAF muestran un alto coeficiente de correlación lineal ($R^2 = 0.99$, RMSE = 0.029, $\alpha = 0.01$) estos resultados son similares a los reportados por Zhu *et al.* (2012) quienes obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) entre 0.78 y 0.92 para la estimación de la concentración de N en maíz, trigo, cebada, papa y canola. En otro estudio, Basyouni *et al.* (2015) informaron valores de correlación altos ($R^2 = 0.75 - 0.83$) entre la concentración de N y las lecturas de atLEAF al evaluar tratamientos nitrogenados en nochebuena.

Los resultados del presente estudio sugieren que tanto el SPAD, atLEAF y MC-100 son instrumentos confiables para estimar la concentración de clorofila y N en plantas de arúgula, como se reporta para albahaca (Mendoza-Tafolla *et al.*, 2019), pimiento dulce (de Souza *et al.*, 2019) y salvia (Dunn *et al.*, 2018).

Cuadro 2. Lecturas SPAD, atLEAF, MC-100, cantidad de materia fresca y concentraciones de N y clorofila en arúgula a los 42 ddt.

Días después del trasplante (ddt)	N aportado (mEq·L ⁻¹)	Lecturas SPAD	Lecturas atLEAF	Lecturas MC-100	N (%)	Clorofila (mg·g ⁻¹)
14	0	22.2 ns	27.7 ns	30.1 ns	1.02 ns	1.12 ns
	4	23.4 ns	27.8 ns	29.8 ns	1.09 ns	1.42 ns
	8	24.3 ns	28.1 ns	29.4 ns	1.12 ns	1.23 ns
	12	23.9 ns	28.0 ns	28.2 ns	1.02 ns	1.12 ns
	16	24.2 ns	28.1 ns	29.0 ns	1.20 ns	1.25 ns
21	0	26.3 ns	30.1 ns	32.3 ns	1.27 ns	1.45 ns
	4	27.3 ns	29.7 ns	33.2 ns	1.28 ns	1.48 ns
	8	26.7 ns	29.9 ns	31.9 ns	1.35 ns	1.53 ns
	12	26.8 ns	30.3 ns	34.2 ns	1.38 ns	1.57 ns
	16	26.9 ns	30.1 ns	34.2 ns	1.45 ns	1.57 ns
28	0	32.1 d	34.2 c	35.6 c	1.34 c	1.54 c
	4	34.5 d	35.2 c	36.7 c	1.36 c	1.64 c
	8	37.9 c	38.9 b	38.9 c	1.49 c	1.89 b
	12	40.1 b	40.2 b	43.6 b	1.65 b	1.99 b
	16	42.1 a	45.7 a	47.6 a	1.76 a	2.32 a
35	0	35.3 c	38.1 d	40.1 c	1.58 c	3.00 c
	4	37.4 c	40.0 cd	42.1 c	1.65 c	3.01 c
	8	42.1 b	42.3 c	45.3 b	1.89 b	3.32 b
	12	44.5 ab	46.2 b	50.3 b	1.98 b	3.45 b
	16	46.7 a	51.3 a	55.4 a	2.34 a	3.76 a
42	0	39.2 c	43.4 c	44.3 c	1.67 c	3.15 c
	4	40.1 c	44.0 c	45.3 c	1.74 c	3.34 c
	8	45.7 b	46.6 bc	47.8 c	2.01 b	3.67 b
	12	46.2 b	51.2 b	53.4 b	2.09 b	3.75 ab
	16	49.5 a	57.3 a	59.1 a	2.46 a	3.87 a
DMS		4.643	4.963	5.329	0.343	0.458
CME		0.023	0.046	0.032	0.044	0.029

DMS = Diferencia mínima significativa; CME = Cuadrado medio del error

Comparación entre las variables de referencia e índices espectrales

Concentración de clorofila

La correlación entre las lecturas de SPAD y la concentración de clorofila (Figura 2A) fue altamente significativa y positiva ($R^2 = 0.97$, $RMSE = 0.028$, $\alpha = 0.01$), que son similares a los de Fenech-Larios *et al.* (2009) quienes encontraron una alta correlación entre las lecturas de SPAD y la concentración de clorofila ($r = 0.99$) en plántulas de albahaca. Las correlaciones de nuestro presente estudio son más fuertes que las reportadas por Martín *et al.* (2007) que en *Viburnum*, *pittosporum* y madroño, encontraron coeficientes de correlación entre 0.36 y 0.52. La concentración de clorofila y las lecturas de atLEAF tuvieron una alta correlación lineal ($R^2 = 0.97$, $RMSE = 0.043$, $\alpha = 0.01$). En eso, nuestros resultados tuvieron un ajuste mayor en comparación con los descritos por Zhu *et al.* (2012) quienes reportaron coeficientes de determinación entre 0.72 y 0.88 para la concentración de clorofila con lecturas de atLEAF en maíz, trigo, cebada, papa y canola.

La correlación entre la concentración de clorofila con los índices espectrales NGRDI, RI, CIVE, ExG, Exr y G fue alta, con coeficientes de correlación entre 0.96 y 0.88 respectivamente (Figura 2B) y nuevamente se ajustaron a regresiones lineales. Estos resultados son similares a los obtenidos por Álvarez-Bermejo *et al.* (2017) en tomate y pepino utilizando el NGRDI, y De la Cruz *et al.* (2011) en la etapa vegetativa del trigo utilizando el índice G. Además, existe una fuerte correlación lineal con el índice RI ($RMSE = 0.03$), valor comparable al reportado por Ray *et al.* (2004) en trigo. El índice que presentó mayor correlación fue NGRDI ($R^2 = 0.96$, $RMSE = 0.054$). Por otro lado, Sun *et al.* (2016) reportaron resultados similares con valores de correlaciones (r) mayores a 0.88 entre el índice NGRDI y la concentración de clorofila en pepino. En este sentido, Baresel *et al.* (2017) sugieren que los índices NGRDI y ExG pueden determinar la concentración de clorofila en cultivos hortícolas, pues al usar la banda verde (500 a 550 nm) resalta los pigmentos responsables del color verde de las plantas como la clorofila lo que permite su cuantificación.

Cuadro 3. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de la concentración de clorofila y las lecturas de los medidores portátiles e índices espectrales en plantas de arúgula 'Wild rocket'.

Tratamientos de NO ₃ ⁻ (mEq·L ⁻¹)	\bar{x}									
	Valor de referencia	Medidores portátiles			Índices espectrales RGB					
	Clorofila (mg·g ⁻¹)	SPAD	atLEAF	MC-100	NGRDI	RI	CIVE	ExG	ExR	G
0	0.30 d	32.1 d	34.4 e	33.1 d	0.28 d	0.28 c	0.30 d	0.25 c	0.23 c	0.26 d
4	0.32 d	34.4 d	38.4 d	35.2 d	0.30 d	0.29 c	0.34 d	0.38 c	0.29 d	0.30 cd
8	0.53 cd	40.3 c	41.7 c	39.1 c	0.55 c	0.51 b	0.50 c	0.49 bc	0.50 c	0.51 c
12	0.93 b	45.5 b	46.9 b	43.2 b	0.94 b	0.88 b	0.82 b	0.88 b	0.87 b	0.88 b
16	1.21 a	48.8 a	50.1 a	46.3 a	1.09 a	1.05 a	1.01 a	1.02 a	1.12 a	1.24 a
CV	0.013	0.071	0.032	0.043	0.024	0.063	0.029	0.088	0.035	0.054
DMS	0.351	3.263	3.002	2.932	0.314	0.382	0.383	0.328	0.311	0.396
Exactitud (%)	--	97.8	95.7	95.5	93.2	90.2	89.4	87.3	88.2	91.0

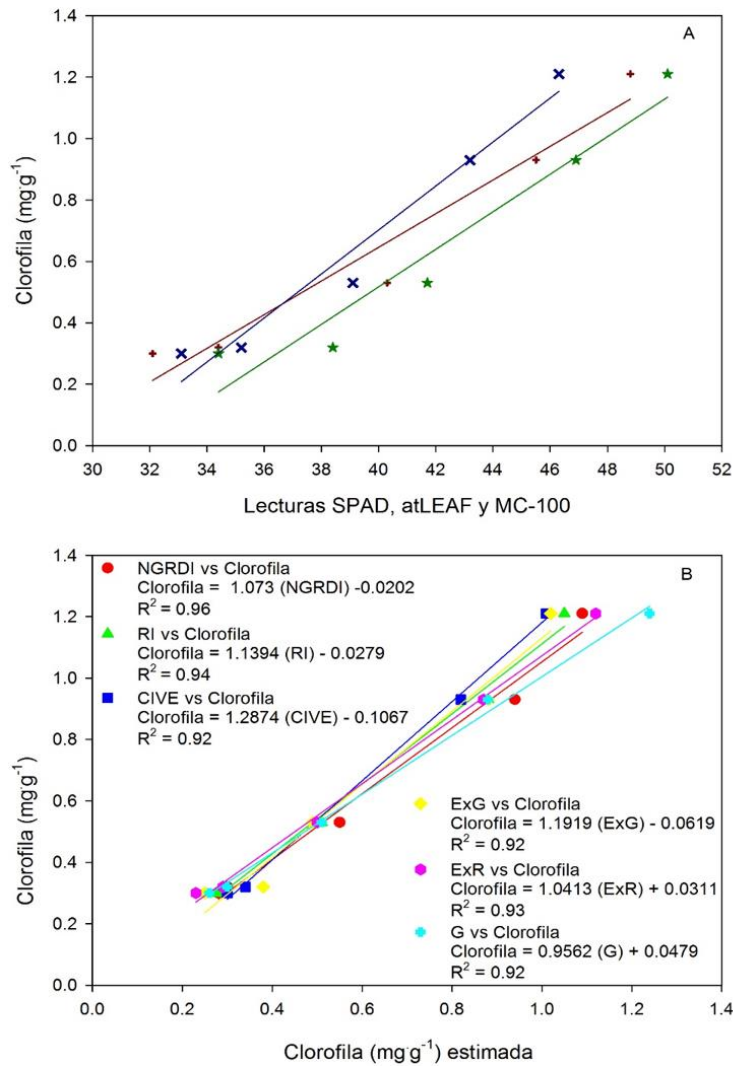


Figura 2. Relación entre la clorofila estimada por los métodos no destructivos con la clorofila de la muestra obtenida en laboratorio de plantas de arúgula 'Wild rocket'. A) correlación con los medidores portátiles SPAD, atLEAF y MC-100; B) correlación con los índices espectrales NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G

Concentración de N

Los valores de concentración de N tuvieron una alta correlación lineal (Figura 3) con el NGRDI ($R^2 = 0.94$, RMSE = 0.075), RI ($R^2 = 0.91$, RMSE = 0.064), CIVE ($R^2 = 0.91$, RMSE = 0.064), ExG ($R^2 = 0.89$, RMSE = 0.075), ExR ($R^2 = 0.87$, RMSE = 0.083) y el índice G ($R^2 = 0.90$, RMSE = 0.056) a lo largo de los 42 ddt (Cuadro 4).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Meyer y Neto (2008), quienes reportaron coeficientes de correlación ≥ 0.85 para el índice ExG en la cuantificación de N en etapas de crecimiento vegetativo en soja. Por su parte, el trabajo realizado por de la Casa *et al.* (2013) quienes estimaron la concentración de N en papa con índices espectrales reportan coeficientes de correlación entre 0.94 a 0.98. En otro estudio, Yang *et al.* (2020) registraron un coeficiente de correlación de 0.90 en la estimación del contenido de N con el índice NGRDI en la etapa de crecimiento en trigo y Beniaich *et al.* (2019) mencionan que el índice CIVE fue el mejor ($r = 0.89$) para determinar la biomasa de los cultivos de frijol.

Además, se demostró que los índices espectrales de la región visible RGB son eficientes para determinar la concentración de N en plantas de frijol debido a su efecto sobre la cantidad y coloración de los pigmentos dentro de los tejidos vegetales (Lee y Lee, 2013), lo que indica que el uso de índices espectrales RGB representan una metodología confiable y precisa para cuantificar la concentración de N en cultivos de hojas. Por lo anterior, se puede mencionar que los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G son confiables y precisos para estimar la concentración de N en cultivos de hoja al tener altas correlaciones con los valores de clorofila de referencia.

Cuadro 4. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de la concentración de N y los índices espectrales en plantas de arúgula 'Wild rocket'.

Tratamientos de NO_3^- ($\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$)	\bar{x}						
	Valor de referencia N (%)	Índices espectrales RGB					
		NGRDI	RI	CIVE	ExG	ExR	G
0	0.63 d	0.54 d	0.57 d	0.60 d	0.59 d	0.65 c	0.58 d
4	0.75 d	0.75 c	0.78 c	0.68 d	0.69 cd	0.70 c	0.73 cd
8	0.98 cd	0.89 c	0.88 c	0.90 c	0.89 c	0.97 bc	0.98 c
12	1.24 b	1.20 b	1.14 b	1.22 b	1.11 b	1.11 b	1.20 b
16	1.78 a	1.65 a	1.63 a	1.70 a	1.63 a	1.52 a	1.65 a
CV	0.021	0.072	0.065	0.064	0.091	0.088	0.062
DMS	0.292	0.334	0.351	0.382	0.342	0.374	0.385
Exactitud (%)	--	94.8	93.2	92.8	89.9	86.9	89.3

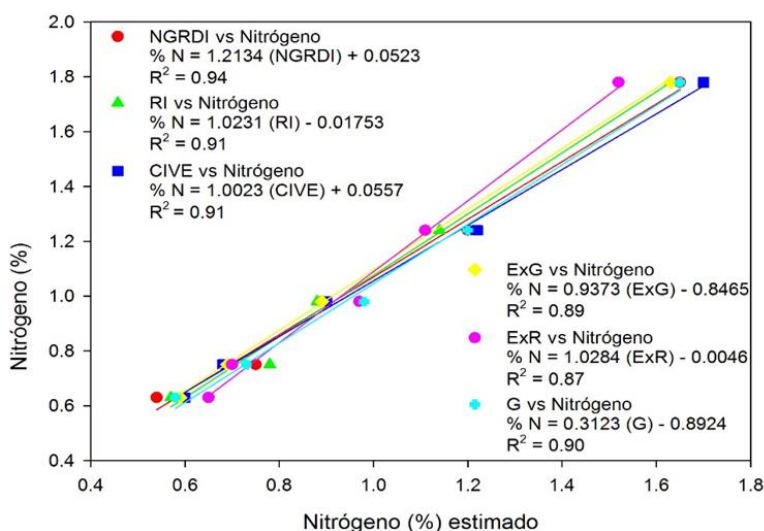


Figura 3. Relación entre el N estimado por los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G con el N de la muestra obtenido en laboratorio de plantas de arúgula 'Wild rocket'

Área foliar

Las correlaciones entre el área foliar de las plantas de arúgula 'Wild rocket' con los índices espectrales NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G tuvieron coeficientes de correlación de 0.92 y 0.94 respectivamente y se ajustaron a regresiones lineales (Figura 4). Este modelo matemático es similar al reportado por Campillo *et al.* (2010) para el índice G, ya que reportan ajuste al modelo lineal (R^2) de 0.92 en tomate. Por su parte, Horgan *et al.* (2015) y Beniaich *et al.* (2019) reportaron valores con ajuste a modelos lineales entre área foliar y NGRDI en pimiento dulce ($R^2 = 0.80$) y albahaca ($R^2 = 0.82$) respectivamente.

El índice NGRDI ($R^2 = 0.92$, RMSE = 0.047) mostró el mayor coeficiente de correlación para la variable de área foliar. Estos valores son superiores (r entre 0.69 y 0.87) a los reportados por Wan *et al.* (2018) quien utilizó el índice NGRDI para diferenciar etapas fenológicas. Por su parte, Beniaich *et al.* (2019) mencionan que el índice CIVE permite determinar el área foliar de los cultivos de frijol y mijo al registrar coeficiente de correlación superiores a 0.90. Además, Hunt *et al.* (2013) encontraron que el NGRDI está altamente correlacionado con la cantidad de biomasa en los cultivos de maíz y soja, especialmente en las primeras etapas, pero tiende a saturarse a medida que se desarrolla el cultivo. En este sentido, Sakamoto *et al.* (2012) afirma los índices espectrales permiten estimar el área foliar del cultivo de frijol durante el crecimiento de las plantas y hasta la floración del cultivo.

Estudios en cebolla (Ballesteros *et al.*, 2018) y tomate (Sun *et al.*, 2019) reportan altas correlaciones ($R^2 \geq 0.84$) entre el índice espectral G y el área foliar; esto se atribuye a la tasa de crecimiento del cultivo. Por todo lo anterior, se puede observar que los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G son de utilidad al ser confiables y precisos en la diferenciación, clasificación y estimación de coberturas vegetales y específicamente área foliar en hortalizas.

Cuadro 5. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de área foliar y los índices espectrales en plantas de arúgula 'Wild rocket'.

Tratamientos de NO_3^- ($\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$)	\bar{x}						
	Valor de referencia Área foliar (cm^2)	Índices espectrales RGB					
		NGRDI	RI	CIVE	ExG	ExR	G
0	43.2 d	40.2 d	41.2 d	44.8 d	40.2 d	44.3 d	39.2 d
4	60.8 d	62.3 d	58.3 d	62.3 d	53.2 d	62.3 d	52.3 d
8	100.2 c	98.3 c	95.3 c	90.3 c	98.2 c	101.3 c	98.3 c
12	145.3 b	134.2 b	139.4 b	138.4 b	142.3 b	153.3 b	139.2 b
16	199.8 a	185.0 a	192.0 a	189.4 a	182.3 a	204.2 a	182.3 a
CV	0.023	0.086	0.075	0.083	0.073	0.084	0.063
DMS	38.526	34.382	33.463	33.184	33.384	32.457	34.532
Exactitud (%)	--	92.1	90.3	90.3	91.0	90.7	92.8

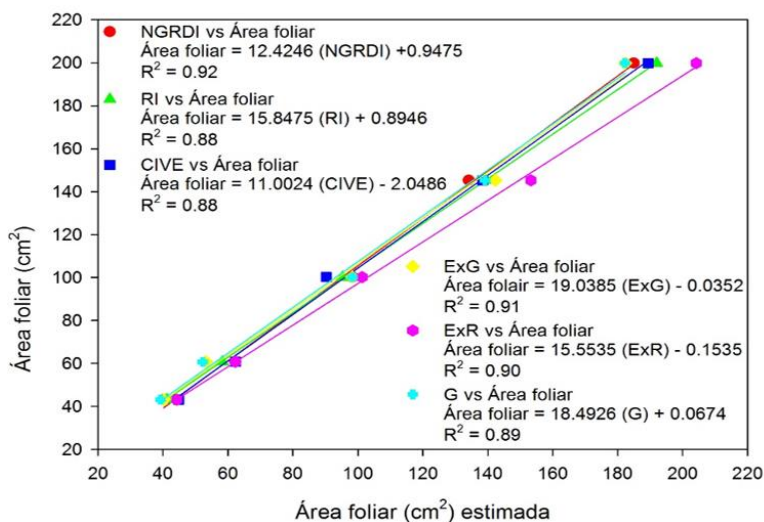


Figura 4. Relación entre el área foliar estimada por los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G con el área foliar de la muestra obtenida en laboratorio de plantas de arúgula Wild rocket

Materia fresca

La relación entre los índices espectrales NGRDI ($R^2 = 0.92$, RMSE = 0.034), RI ($R^2 = 0.90$, RMSE = 0.046), CIVE ($R^2 = 0.91$, RMSE = 0.032), ExG ($R^2 = 0.89$, RMSE = 0.071), ExR ($R^2 = 0.89$, RMSE = 0.083) y el índice G ($R^2 = 0.93$, RMSE = 0.023) y materia fresca de las plantas de arúgula tuvieron una alta correlación lineal (Figura 5) durante los 42 ddt (Cuadro 6). Para la predicción de materia fresca, Jannoura *et al.* (2015) mostró una correlación significativa y positiva ($r = 0.88$) de NGRDI para avena y guisantes.

Por su parte, Hunt *et al.* (2005) observaron una correlación lineal de NGRDI ($R^2 = 0.90$) con la materia fresca de alfalfa, maíz y soja, pero también observaron efectos de saturación de la variable predictora para mayores rendimientos de materia fresca en etapas fenológicas avanzadas de estos cultivos. Por lo cual, se deben realizar más investigaciones para evaluar los índices calculados a partir de imágenes RGB ya que tienen el potencial uso para determinar modelos de predicción de maduración y cosecha de cultivos extensivos y hortícolas (Lussem *et al.*, 2019).

Cuadro 6. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de materia fresca y los índices espectrales en plantas de arúgula Wild rocket

Tratamientos de NO_3^- ($\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$)	\bar{x}						
	Valor de referencia	Índices espectrales RGB					
	Materia fresca ($\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$)	NGRDI	RI	CIVE	ExG	ExR	G
0	13.1 d	10.1 d	12.1 d	12.3 d	11.1 d	12.1 d	10.2 d
4	23.3 d	20.4 cd	22.1 d	19.9 cd	19.1 d	19.1 cd	21.8 cd
8	38.7 c	36.6 c	40.2 c	35.8 c	36.2 c	32.3 c	30.9 c
12	62.3 b	63.1 b	58.2 b	62.1 b	62.5 b	61.1 b	58.3 b
16	82.7 a	85.3 a	80.1 a	86.9 a	83.5 a	83.5 a	80.1.3 a
CV	0.028	0.062	0.084	0.062	0.083	0.065	0.083
DMS	20.453	21.483	22.840	21.945	22.9563	21.634	20.504
Exactitud (%)	--	95.6	92.5	92.7	90.9	89.9	87.2

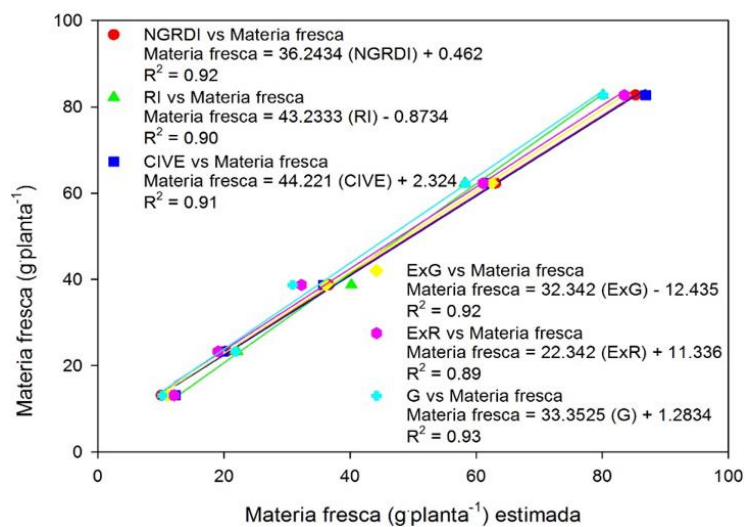


Figura 5. Relación entre la materia fresca estimada por los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G con la materia fresca de la muestra obtenida en laboratorio de plantas de arúgula 'Wild rocket'

Materia seca

La relación entre materia seca de las plantas de arúgula con los índices espectrales NGRDI ($R^2 = 0.94$, RMSE = 0.078), RI ($R^2 = 0.92$, RMSE = 0.085), CIVE ($R^2 = 0.90$, RMSE = 0.078), ExG ($R^2 = 0.89$, RMSE = 0.097), ExR ($R^2 = 0.91$, RMSE = 0.096) y el índice G ($R^2 = 0.88$, RMSE = 0.081) tuvieron una alta correlación lineal (Figura 6) durante los 42 ddt (Cuadro 7). Resultados similares a los obtenidos por Lussem *et al.* (2018) quienes reportan coeficientes para el índice NGRDI entre 0.85 y 0.91 en pasto. Por su parte, Niu *et al.* (2019) registraron variación entre de coeficientes entre 0.67 a 0.89 en la determinación de materia seca del cultivo de maíz. Otro estudio realizado por Lussem *et al.* (2019) demostraron que mediante el uso de índices espectrales y en específico con el índice NGRDI puede estimar la materia seca en varias plantas ruderales con una exactitud mayor al 85 %. Por lo cual, y como es conocido la materia seca se puede utilizar como predictor del rendimiento en cultivos hortícolas de hoja, lo que posiciona a los índices espectrales como una alternativa rápida y precisa en la predicción de rendimientos.

Cuadro 7. Comparación entre los valores de referencia obtenidos en laboratorio de materia seca y los índices espectrales en plantas de arúgula 'Wild rocket'.

Tratamientos de NO_3^- ($\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$)	\bar{x}						
	Valor de referencia	Índices espectrales RGB					
	Materia seca ($\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$)	NGRDI	RI	CIVE	ExG	ExR	G
0	1.8 c	1.6 c	1.5 c	1.5 c	1.5 c	1.2 c	1.4 c
4	2.1 c	1.9 c	2.0 c	1.9 c	2.3 c	2.0 c	2.2 c
8	2.9 c	2.7 c	2.4 c	2.8 c	2.4 c	2.4 c	3.0 c
12	7.1 b	6.8 b	6.4 b	6.2 b	6.8 b	6.5 b	5.9 b
16	12.2 a	11.8 a	11.2 a	10.9 a	12.5 a	11.1 a	11.3 a
CV	0.019	0.075	0.074	0.075	0.079	0.081	0.080
DMS	3.834	3.578	3.583	3.842	3.572	3.427	3.567
Exactitud (%)	--	90.1	89.9	90.1	90.2	88.2	87.1

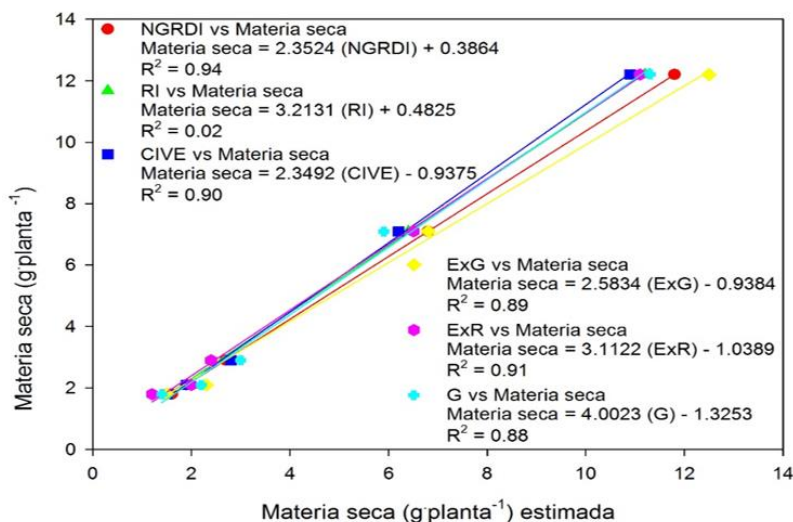


Figura 6. Relación entre la materia seca estimada por los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G con la materia seca de la muestra obtenida en laboratorio de plantas de arúgula 'Wild rocket'

CONCLUSIONES

Los medidores portátiles SPAD, atLEAF y MC-100 predicen con precisión las concentraciones de clorofila y N en las hojas de plantas de arúgula a partir de ecuaciones de regresión lineal. Las lecturas SPAD tuvieron correlaciones lineales altas, positivas y significativas con N ($R^2 = 0.94$) y concentración de clorofila ($R^2 = 0.96$), las lecturas de atLEAF tuvieron una correlación lineal similar con N ($R^2 = 0.94$) y concentración de clorofila ($R^2 = 0.94$), el medidor MC-100 tuvo valores de coeficientes de determinación de $R^2 = 0.93$ para la concentración de clorofila, así como la concentración de N.

El índice espectral NGRDI tuvo el mayor coeficiente de correlación con los valores de clorofila ($r = 0.98$), N ($r = 0.97$), área foliar ($r = 0.95$) y materia seca ($r = 0.94$). Además, el índice espectral G obtuvo la mayor correlación con la materia fresca ($r = 0.96$). Estos índices resaltan la respuesta espectral en las regiones verde y roja y son más precisos que los índices que utilizan la banda azul.

Las plantas de arúgula tienen un crecimiento foliar acelerado en las últimas etapas de su ciclo vegetativo. En este estudio, los valores de los índices NGRDI, RI, CIVE, ExG, ExR y G comparados con el área foliar se ajustan mejor a un modelo lineal (R^2 entre 0.88 y 0.92). Entonces, el uso de esta técnica requiere considerar el tipo de cultivo y su fenología o hábito de crecimiento.

La precisión de los índices espectrales derivados de imágenes digitales RGB (rojo, verde y azul) para determinar la concentración de clorofila, N, área foliar, materia fresca y seca aumenta en las últimas etapas del cultivo de arúgula. El uso de índices espectrales derivados de imágenes digitales RGB es útil y preciso para la estimación del estado nutrimental de clorofila y N durante la producción de arúgula.

REFERENCIAS

- Ali, M. M. ; Al-Ani, A. ; Eamus, D. ; Tan, D. K. Y. (2007). Leaf nitrogen determination using handheld meters. *Precision Agriculture*.
- Alvarez-Bermejo, J., Giagnocavo, C., Ming, L., Castillo Morales, E., P. Morales Santos, D., & Xinting, Y. (2017). Image processing methods to evaluate tomato and zucchini damage in post-harvest stages. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 10(5), 126–133. <https://doi.org/10.25165/ijabe.20171005.3087>
- Baresel, J. P., Rischbeck, P., Hu, Y., Kipp, S., Hu, Y., Bartheimer, G., & Mistele, B. (2017). Use of a digital camera as alternative method for non-destructive detection of the leaf chlorophyll content and the nitrogen nutrition status in wheat. *Computers and Electronics in Agriculture*, 140, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.05.032>
- Basyouni, R., Dunn, B. L., & Goad, C. (2015). Use of nondestructive sensors to assess nitrogen status in potted poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* L. (Willd. ex Klotzsch)) production. *Scientia Horticulturae*, 192, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.011>
- Beniaich, A., Silva, M. L. N., Avalos, F. A. P., Menezes, M. D. de, & Cândido, B. M. (2019). Determination of vegetation cover index under different soil management systems of cover plants by using an unmanned aerial vehicle with an onboard digital photographic camera. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(1), 49. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n1p49>
- Campillo, C., García, M. I., Daza, C., & Prieto, M. H. (2010). Study of a non-destructive method for estimating the leaf area index in vegetable crops using digital images. *HortScience*, 45(10), 1459–1463. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.10.1459>
- Cao, Q., Miao, Y., Wang, H., Huang, S., Cheng, S., Khosla, R., & Jiang, R. (2013). Non-destructive estimation of rice plant nitrogen status with Crop Circle multispectral active canopy sensor. *Field Crops Research*, 154, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.08.005>
- Coelho, F. S., Fontes, P. C. R., Puiatti, M., Neves, J. C. L., & Silva, M. C. de C.

- (2010). Dose de nitrogênio associada à produtividade de batata e índices do estado de nitrogênio na folha. *Revista Brasileira de Ciencia Do Solo*, 34(4), 1175–1183.
- Cunha, A. R. da, Katz, I., Sousa, A. de P., & Martinez Uribe, R. A. (2015). Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de lisianthus en función de diferentes dosis de N en ambiente protegido. *Idesia (Arica)*, 33(2), 97–105. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292015000200012>
- de la Casa, A., Ovando, G., Bressanini, L., & Martinez, J. (2013). Estimación de la cobertura del suelo y evaluación de la fertilización nitrogenada en papa con registros de cámaras digitales convencionales y modificadas. In *Congreso Argentino de Agroinformatica* (pp. 94–104).
- De la Cruz, D. J. A., Sánchez, G. P., Galvis, S. A., & Carrillo, S. J. A. (2011). Spectral indexes in sweet pepper for diagnosis of nitrogen nutrient status. *Terra Latinoamericana*, 29 (3), 259–265.
- de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Thompson, R. B., Gallardo, M., Grasso, R., & Padilla, F. M. (2019). The use of chlorophyll meters to assess crop n status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. *Sensors*, 19(13), 2949. <https://doi.org/10.3390/s19132949>
- Dunn, B. L., Singh, H., Payton, M., & Kincheloe, S. (2018). Effects of nitrogen, phosphorus, and potassium on SPAD-502 and atLEAF sensor readings of Salvia. *Journal of Plant Nutrition*, 41(13), 1674–1683. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1458874>
- Fenech-Larios, L., Troyo-Diéguez, E., Trasviña-Castro, M., Ruiz-Espinoza, F., Beltrán-Morales, A., Murillo-Amador, B., ... Zamora-Salgado, S. (2009). Relación entre un método no destructivo y uno de extracción destructivo, para medir el contenido de clorofila en hojas de plántula de albahaca (*Ocimum basilicum* L). *Universidad y Ciencia*, 25(1), 99–102.
- Graham, E. A., Riordan, E. C., Yuen, E. M., Estrin, D., & Rundel, P. W. (2010). Public Internet-connected cameras used as a cross-continental ground-based plant phenology monitoring system. *Global Change Biology*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02164.x>

- Horgan, G. W., Song, Y., Glasbey, C. A., van der Heijden, G. W. A. M., Polder, G., Dieleman, J. A., ... van Eeuwijk, F. A. (2015). Automated estimation of leaf area development in sweet pepper plants from image analysis. *Functional Plant Biology*, 42(5), 486. <https://doi.org/10.1071/FP14070>
- Huete, A. R., & Escadafal, R. (1991). Assessment of biophysical soil properties through spectral decomposition techniques. *Remote Sensing of Environment*, 35(2–3), 149–159. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(91\)90008-T](https://doi.org/10.1016/0034-4257(91)90008-T)
- Hunt, E. R., Doraiswamy, P. C., McMurtrey, J. E., Daughtry, C. S. T., Perry, E. M., & Akhmedov, B. (2013). A visible band index for remote sensing leaf chlorophyll content at the canopy scale. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 21, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.jag.2012.07.020>
- I, M., N, A., MC, L., M, P., C, C., & E., E. (2007). Estimation of leaf, root, and sap nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter for ornamental shrubs. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(13–14), 1785–1803.
- Jannoura, R., Brinkmann, K., Uteau, D., Bruns, C., & Joergensen, R. G. (2015). Monitoring of crop biomass using true colour aerial photographs taken from a remote controlled hexacopter. *Biosystems Engineering*, 129, 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.11.007>
- Kalaji, H. M., Dąbrowski, P., Cetner, M. D., Samborska, I. A., Łukasik, I., Brestic, M., ... Panchal, B. M. (2017). A comparison between different chlorophyll content meters under nutrient deficiency conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 40(7), 1024–1034. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1263323>
- Kataoka, T., Kaneko, T., Okamoto, H., & Hata, S. (n.d.). Crop growth estimation system using machine vision. In *Proceedings 2003 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM 2003)* (Vol. 2, pp. b1079–b1083). IEEE. <https://doi.org/10.1109/AIM.2003.1225492>
- Kokila, M., Karthi, J., Madhuvasaki, E., Sathya, S., & Vignesh, B. (n.d.). Estimation of chlorophyll content in maize leaf: a review. *International Conference on Emerging Trends in Engineering*, 2348–8352.
- Lee, K.-J., & Lee, B.-W. (2013). Estimation of rice growth and nitrogen nutrition

- status using color digital camera image analysis. *European Journal of Agronomy*, 48, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2013.02.011>
- Lussem, U., Bolten, A., Gnyp, M. L., Jasper, J., & Bareth, G. (2018). Evaluation of rgb-based vegetation indices from uav imagery to estimate forage yield in grassland. *The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, XLII-3, 1215–1219. <https://doi.org/10.5194/isprs-archives-XLII-3-1215-2018>
- Lussem, Ulrike, Bolten, A., Menne, J., Gnyp, M. L., Schellberg, J., & Bareth, G. (2019). Estimating biomass in temperate grassland with high resolution canopy surface models from UAV-based RGB images and vegetation indices. *Journal of Applied Remote Sensing*, 13(03), 1. <https://doi.org/10.1117/1.JRS.13.034525>
- Mackinney, G. (1941). Article : Absorption of Light By, 315–323.
- Medellín-Calderón, L. A., Rozo-Bernal, A. M., & Trujillo-Pérez, M. M. (2011). Ensayo preliminar sobre la utilización de un medidor portátil de clorofila para estimar el n foliar en orégano (*Origanum vulgare* L.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 7(2), 150–166. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2051>
- Mendoza-Tafolla, R. O., Juárez-Lopez, P., Ontiveros-Capurata, R.-E., Sandoval-Villa, M., Alia-Tejacal, I., & Alejo-Santiago, G. (2019). Estimating nitrogen and chlorophyll status of romaine lettuce using SPAD and at LEAF Readings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3). <https://doi.org/10.15835/nbha47311525>
- Mercado-Luna, A., Rico-García, E., Soto-Zarazúa, A. L.-H. G., Guevara-González, R. O.-V. R., Herrera-Ruiz, G., & Torres-Pacheco¹, I. (2010). Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Agricultural Research*, 9(33), 5326–5332. <https://doi.org/10.5897/AJB10.130>
- Meyer, G.E., Hindman, T., & Laksmi, K. (1998). Machine vision detection parameters for plant species identification. In D. (ed.) (Ed.), *Proceedings of SPIE 3543* (pp. 327–335).
- Meyer, George E., & Neto, J. C. (2008). Verification of color vegetation indices for

- automated crop imaging applications. *Computers and Electronics in Agriculture*, 63(2), 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2008.03.009>
- Muñoz-Huerta, R. F., Guevara-Gonzalez, R. G., Contreras-Medina, L. M., Torres-Pacheco, I., Prado-Olivarez, J., & Ocampo-Velazquez, R. V. (2013). A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: Advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors (Switzerland)*, 13(8), 10823–10843. <https://doi.org/10.3390/s130810823>
- Nagai, S., Ichie, T., Yoneyama, A., Kobayashi, H., Inoue, T., Ishii, R., ... Itioka, T. (2016). Usability of time-lapse digital camera images to detect characteristics of tree phenology in a tropical rainforest. *Ecological Informatics*, 32, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2016.01.006>
- Näsi, R., Viljanen, N., Kaivosoja, J., Alhonoja, K., Hakala, T., Markelin, L., & Honkavaara, E. (2018). Estimating biomass and nitrogen amount of barley and grass using UAV and aircraft based spectral and photogrammetric 3D features. *Remote Sensing*, 10(7), 1082. <https://doi.org/10.3390/rs10071082>
- Niu, Q., Feng, H., Li, C., Yang, G., Fu, Y., Li, Z., & Pei, H. (2019). Estimation of leaf nitrogen concentration of winter wheat using UAV-based RGB imagery (pp. 139–153). https://doi.org/10.1007/978-3-030-06179-1_15
- Padilla, F. M., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., & Thompson, R. B. (2015). Threshold values of canopy reflectance indices and chlorophyll meter readings for optimal nitrogen nutrition of tomato. *Annals of Applied Biology*, 166(2), 271–285. <https://doi.org/10.1111/aab.12181>
- Padilla, Francisco M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Giménez, C., & Thompson, R. B. (2018). Different responses of various chlorophyll meters to increasing nitrogen supply in sweet pepper. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01752>
- Paz Pellat, F., Romero Sanchez, M. E., Palacios Vélez, E., Bolaños González, M., Aldrete, A., & Valdez Lazalde, J. R. (2015). Alcances y limitaciones de los índices espectrales de la vegetación: análisis de índices de banda ancha. *Terra Latinoamericana*, 33(1), 27–49.
- Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Thompson, R. B., Farneselli, M., & Padilla, F. M.

- (2015). Assessing crop N status of fertigated vegetable crops using plant and soil monitoring techniques. *Annals of Applied Biology*, 167(3), 387–405. <https://doi.org/10.1111/aab.12235>
- Prey, L., von Bloh, M., & Schmidhalter, U. (2018). Evaluating RGB imaging and multispectral active and hyperspectral passive sensing for assessing early plant vigor in winter wheat. *Sensors*, 18(9), 2931. <https://doi.org/10.3390/s18092931>
- Ray, S. S., Singh, J. P., Das, G., & Panigrahy, S. (2004). Use of high resolution remote sensing data for generating sitespecific soil mangement plan. *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences - ISPRS Archives*, 35(May 2014), 2–7.
- Richardson, M. D., Karcher, D. E., & Purcell, L. C. (2001). Quantifying turfgrass cover using digital image analysis. *Crop Science*, 41(6), 1884. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.1884>
- Sáez, R., MisakichiJeremías, M., & Shindoi, F. (2017). Análisis económico de la rúcula y lechuga.
- Sakamoto, T., Gitelson, A. A., Nguy-Robertson, A. L., Arkebauer, T. J., Wardlow, B. D., Suyker, A. E., ... Shibayama, M. (2012). An alternative method using digital cameras for continuous monitoring of crop status. *Agricultural and Forest Meteorology*, 154–155, 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2011.10.014>
- Sandmeier, S. R. (2000). Acquisition of bidirectional reflectance factor data with field goniometers. *Remote Sensing of Environment*, 73(3), 257–269. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(00)00102-4)
- Silva, P. A. da, Kinjo, S., Melo, M. P. B. X. de, & Sala, F. C. (2019). Evaluation of arugula cultivars and seed production in the organic system. *Journal of Seed Science*, 41(4), 423–430. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n4218457>
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. *Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture.*, 633–649.
- Sun, G. X., Li, Y. B., Wang, X. C., Hu, G. Y., Wang, X., & Zhang, Y. (2016). Image segmentation algorithm for greenhouse cucumber canopy under various

- natural lighting conditions. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 9(3), 130–138. <https://doi.org/10.3965/j.ijabe.20160903.2102>
- Toomey, M., Friedl, M. A., Frohling, S., Hufkens, K., Klosterman, S., Sonnentag, O., ... Richardson, A. D. (2015). Greenness indices from digital cameras predict the timing and seasonal dynamics of canopy-scale photosynthesis. *Ecological Applications*, 25(1), 99–115. <https://doi.org/10.1890/14-0005.1>
- Vigneau, N., Ecartot, M., Rabatel, G., & Roumet, P. (2011). Potential of field hyperspectral imaging as a non destructive method to assess leaf nitrogen content in Wheat. *Field Crops Research*, 122(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.02.003>
- Villa, M. S., González, G. A., Juan Luis, T. T., & Santelises, A. A. (1992). Effect of the nh₄/no₃ ratio on gs and pepcase activities and on dry matter production in wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 15(11), 2545–2557. <https://doi.org/10.1080/01904169209364493>
- Vollmann, J., Walter, H., Sato, T., & Schweiger, P. (2011). Digital image analysis and chlorophyll metering for phenotyping the effects of nodulation in soybean. *Computers and Electronics in Agriculture*, 75(1), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.11.003>
- Wan, L., Li, Y., Cen, H., Zhu, J., Yin, W., Wu, W., ... He, Y. (2018). Combining UAV-based vegetation indices and image classification to estimate flower number in oilseed rape. *Remote Sensing*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/rs10091484>
- Wettstein, D. (1957). Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12(3), 427–506.
- Wiwart, M., Fordoński, G., Żuk-Gołaszewska, K., & Suchowilska, E. (2009). Early diagnostics of macronutrient deficiencies in three legume species by color image analysis. *Computers and Electronics in Agriculture*, 65(1), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2008.08.003>
- Yadav, S. P., Ibaraki, Y., & Gupta, S. D. (2010). Estimation of the chlorophyll content of micropropagated potato plants using RGB based image analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100(2), 183–188. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9635-6>

- Yang, M., Hassan, M. A., Xu, K., Zheng, C., Rasheed, A., Zhang, Y., ... He, Z. (2020). Assessment of water and nitrogen use efficiencies through UAV-based multispectral phenotyping in winter wheat. *Frontiers in Plant Science*, 11(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00927>
- Yue, S., Meng, Q., Zhao, R., Ye, Y., Zhang, F., Cui, Z., & Chen, X. (2012). Change in nitrogen requirement with increasing grain yield for winter wheat. *Agronomy Journal*, 104(6), 1687. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0232>
- Zhou, L., He, H., Sun, X., Zhang, L., Yu, G., Ren, X., ... Zhao, F. (2013). Modeling winter wheat phenology and carbon dioxide fluxes at the ecosystem scale based on digital photography and eddy covariance data. *Ecological Informatics*, 18, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2013.05.003>
- Zhu, J., Tremblay, N., & Liang, Y. (2012). Comparing SPAD and atLEAF values for chlorophyll assessment in crop species. *Canadian Journal of Soil Science*, 92(4), 645–648. <https://doi.org/10.4141/cjss2011-100>

CAPITULO VII

ANÁLISIS COMPARATIVO DE MÉTODOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO EN CULTIVOS HORTÍCOLAS

IIINTRODUCCIÓN

La estimación precisa de los requerimientos nutrimentales en plantas durante el periodo de cultivo es un factor fundamental para hacer un uso eficiente de fertilizantes (Taiz *et al.*, 2014). Después de carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O), el nitrógeno (N) es el elemento más importante, ya que es fundamental para la fotosíntesis (Ali *et al.*, 2017). El N forma parte de varias proteínas enzimáticas que catalizan y regulan los procesos de crecimiento de la planta (Lemaire *et al.*, 2008) y se ha demostrado que la fertilización con N incrementa el rendimiento y el desarrollo de biomasa de los cultivos (Sáez-Plaza *et al.*, 2013).

Es frecuente que el suministro de N sea limitado y de forma empírica, lo que ocasiona que los agricultores realicen fertilizaciones sin dosis óptimas en función a estudios previos de suelo, agua o tejido vegetal (de Souza *et al.*, 2019), lo que puede provocar una fertilización nitrogenada deficiente, lo que limita la productividad de las plantas (Ali *et al.*, 2017). Esto implica gastos innecesarios por parte de los agricultores, lixiviación de nitratos, la desnitrificación y volatilización son los principales procesos de pérdida de fertilizantes nitrogenados lo que contribuye a la contaminación ambiental (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

La principal forma de optimizar las prácticas agrícolas para obtener rendimientos respetuosos con el medio ambiente y reducir costos es mediante la determinación de nutrientes, para lo cual existen métodos destructivos y no destructivos (Ali *et al.*, 2017). La mayoría de estudios desarrollados para optimizar las estrategias de fertilización en cultivos se basan en herramientas comerciales y desarrolladas a medida (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

Los métodos destructivos de tejido vegetal son las técnicas básicas para estimar el estado nutrimental de las plantas tanto en campo como en condiciones protegidas (Sáez-Plaza *et al.*, 2013). Los métodos clásicos para la determinación de N son la digestión de Kjeldahl y la combustión de Dumas, utilizados ampliamente debido a su confiabilidad (de Souza, 2019). Sin embargo, estas técnicas demandan tiempo y recursos; de manera alternativa, varios estudios reportan sobre herramientas más rápidas y no destructivas diseñadas para la estimación la concentración de N en las plantas (Padilla *et al.*, 2018).

Los métodos no destructivos suelen utilizar las propiedades ópticas de los pigmentos de hojas como la clorofila y los polifenoles como indicadores del contenido de N en plantas (Elazab *et al.*, 2016; Muñoz-Huerta *et al.*, 2013). Algunas de estas herramientas miden la concentración de clorofila foliar, que está altamente correlacionado con la cantidad de N en la planta (de Souza *et al.*, 2019). En otros casos se han desarrollado métodos basados en sensores remotos acoplados a satélite y utilizando cámaras digitales para estimar la concentración de N y su respectiva fluctuación a través del tiempo (Zebarth *et al.*, 2009) y sus etapas fenológicas (Padilla *et al.*, 2018) en los cuales se mide la reflectancia del cultivo para estimar la concentración de N durante el periodo de cultivo (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

Lo anterior da evidencia de la diversidad de técnicas no destructivas para determinar la concentración de N en plantas, lo que brinda una amplia gama de opciones el momento de escoger el método más adecuado, por lo que el objetivo del presente artículo de revisión es proporcionar un análisis comparativo de los métodos, técnicas e instrumentos recientes para la determinación de N en los cultivos agrícolas, esto con la finalidad de aportar información relevante al momento de selección del método de muestreo y de tal manera optimizar la fertilización de los cultivos hortícolas.

MÉTODOS DESTRUCTIVOS

Los métodos clásicos para la determinación de N, como la digestión de Kjeldahl y la combustión de Dumas, están basados en el análisis de tejidos y se han usado ampliamente en muestras de plantas debido a su fiabilidad en la determinación de nitrógeno orgánico y son considerados métodos de referencia (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013). El método propuesto por Johan Kjeldahl (1883), conocido comúnmente como digestión Kjeldahl se ha utilizado ampliamente para la determinación de N en alimentos, bebidas, carne, piensos, cereales, estiércol, aguas residuales, suelos y tejidos vegetales. Este método comprende tres etapas: digestión, destilación y estimación en función del amonio. El método de digestión de Kjeldahl tiene algunas desventajas ya que sólo mide el N unido a los componentes orgánicos (proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos) y el amonio de la muestra (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013). Otras formas de N, como el nitrato y el nitrito, no se pueden medir mediante este procedimiento (de Souza, 2019).

Otro método destructivo clásico para la determinación del N total es el método de combustión Dumas (1831), que supera algunas deficiencias del método Kjeldahl y es un método de referencia para la determinación del N en muestras orgánicas e inorgánicas (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013). El método de Dumas, a diferencia del método de Kjeldahl, puede determinar el N total en la muestra cuando exista una cantidad sustancial de nitrato. Los inconvenientes del método de Dumas es la combustión incompleta que provoca la pérdida de N en la muestra y que requiere de un peso pequeño de muestra (200 a 300 mg).

MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS

a) Ópticos

Las propiedades ópticas de algunos pigmentos de hojas, como la clorofila y los polifenoles, se han utilizado como indicadores del estado nutrimental de N en las plantas (Ali *et al.*, 2017; Muñoz-Huerta *et al.*, 2013; Sáez-Plaza *et al.*, 2013). Algunos equipos miden el contenido de clorofila foliar, que está altamente correlacionado con el contenido de N en la planta (Hunt *et al.*, 2005).

Los cambios en el color foliar son un indicador de la nutrición y la salud de las plantas, el color de la hoja se puede medir con escalas visuales y guías de color económicas que aunque son fáciles de usar no son cuantitativamente rigurosas o empleando instrumentos sofisticados que incluyen medidores de clorofila, reflectómetros y espectrofotómetros que son costosos y pueden requerir entrenamiento especial (Zebarth *et al.*, 2009). Los datos de reflectancia obtenidos con reflectómetros o espectrofotómetros pueden proporcionar una cuantificación de los factores de estrés en las plantas (Ali *et al.*, 2017; Goffart *et al.*, 2011).

GreenSeeker

El GreenSeeker es un instrumento que provee un índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI), cuya interpretación puede contribuir al diagnóstico rápido y dirigido de las condiciones nutricionales (especialmente de nitrógeno), el estado fisiológico, la incidencia de estrés, y el rendimiento potencial de los cultivos (Sáez-Plaza *et al.*, 2013). Este índice es adjetivado como “normalizado” porque produce valores en el rango del 1 y el -1 y que permite integrar y analizar mediciones de luz del rojo y rojo lejano realizadas con sensores remotos o próximos a las plantas, e identificar la presencia de vegetación verde y viva con base en su reflexión en los ámbitos de frecuencia de la luz correspondientes al rojo y rojo lejano (Ali *et al.*, 2017). El sensor óptico de iluminación GreenSeeker utiliza diodos emisores de luz (LED) de alta intensidad que irradian luz a 780 nm (infrarrojo cercano) y 600 nm (rojo), estos LED se pulsan a altas frecuencias y el detector de fotodiodos mide la magnitud de la luz reflejada y posteriormente la iluminación de fondo se elimina mediante filtros electrónicos, la magnitud de la señal filtrada se mide mediante un convertidor A/D multiplexado, para convertir la señal de analógico a digital (Rambo *et al.*, 2010).

Crop-Circle

El Crop-Circle usa tecnología que contiene una sola fuente de luz LED que emite luz visible mediante un sensor de luz y puede ser de mano o montado en cualquier

tipo de vehículo (Rambo *et al.*, 2010). Hay dos modelos de sensores, que utilizan capacidades de detección amarillo/infrarrojo cercano (590 y 880 nm) y rojo/infrarrojo cercano (650 y 880 nm), los sensores de fotos con sensibilidad espectral capturan la porción de luz reflejada de regreso al sensor desde el dosel de la planta (Ali *et al.*, 2017). El Crop-Circle minimiza su dependencia de otras fuentes de luz al distinguir su propia fuente de luz que es modulante (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013). El proceso de trabajo de Crop-Circle es similar al del sistema GreenSeeker, y se ha utilizado para detectar la biomasa y el área foliar de muchos cereales (Dey *et al.*, 2016) es un instrumento de tres canales que tiene una gama de filtros de interferencia en el rango VIS e infrarrojo cercano, los filtros se colocan en el canal respectivo, generalmente un filtro está en la banda del infrarrojo cercano y normalmente los otros dos en el rango VIS, cada canal da un valor real y luego calcula proporciones o índices, finalmente da cinco salidas (Ali *et al.*, 2017). El Crop-Circle es un sensor activo, que tiene una distancia óptima entre el sensor y el dosel de 30 a 36 pulgadas (750 a 900 mm), este sistema tiene más flexibilidad en términos de programación y uso de sensores en el rango de 440 a 800 nm, cada sensor contiene seis filtros como un conjunto estándar, estos incluyen, 450, 550, 650, 670, 730 y 760 nm (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

Sensor N Yara

El sensor N Yara (Yara International ASA, Oslo, Noruega) es un escáner multiespectral montado en tractor (Zebarth *et al.*, 2009) que utiliza un espectrómetro de dos diodos, con dos espectrómetros a cada lado del vehículo, el espectrómetro utiliza cuatro lentes con una vista oblicua a 64° con el cenit, para analizar la reflectancia de la luz del cultivo (Muñoz-Huerta, 2013). El sensor N Yara determina la demanda de nitrógeno midiendo el grado de reflejo del cultivo sobre un área total de aproximadamente 50 m². La medición se hace cada segundo y el sistema está diseñado a operar bajo velocidades normales de operación y a todas las anchuras de carril. La tecnología de percepción aplicada a la agricultura se basa en la curva típica de reflejos de una vegetación.

El sensor N Yara mide el grado de reflejos a una frecuencia de banda correspondiente al contenido de clorofila y biomasa en el cultivo y calcula la absorción actual de nitrógeno. Tasas óptimas de aplicación se derivan de los datos de absorción de nitrógeno y se envían al módulo controlador de grados variables de la esparcidora, que a su vez hace los ajustes correspondientes a las tasas de aplicación (Ali *et al.*, 2017). El proceso entero de determinar los requerimientos de nitrógeno del cultivo y la aplicación de la cantidad correcta de fertilizante pasa instantáneamente, sin demora ninguna.

b) Clorofilómetros

Los clorofilómetros son otro grupo de técnicas que miden el contenido de clorofila foliar, el cual está altamente correlacionado con el contenido de N en la planta (Dunn *et al.*, 2018), en donde se emplean instrumentos sofisticados que incluyen medidores de clorofila (por ejemplo, SPAD 502, Dualex y fluorescencia de clorofila), reflectómetros y espectrofotómetros, estos últimos suelen ser costosos y pueden requerir personal calificado especializado para su operación (Zhu *et al.*, 2012). El uso de los valores de reflectancia obtenidos con reflectómetros o espectrofotómetros pueden proporcionar una cuantificación precisa de los factores de estrés nutrimental en las plantas (Zhou *et al.*, 2010). Aunque la reflectancia de un cultivo depende de muchos factores, incluida la iluminación incidente y la condición fisiológica del cultivo (Martín *et al.*, 2007) las deficiencias de nutrientes pueden detectarse comparando los valores de reflectancia obtenidos en campo contra valores obtenidos en cultivos sin limitante de nutrientes (Padilla *et al.*, 2018).

SPAD 502

El SPAD 502 (Minolta Co. Japón) ha desarrollado el medidor de clorofila SPAD-502 Plus, que mide el verdor relativo o el contenido de clorofila de las hojas (Sandmann *et al.*, 2013). Debido a que el contenido de clorofila de la hoja está estrechamente relacionado con la concentración de N en la hoja (Padilla *et al.*, 2018), este medidor se ha usado para evaluar el contenido de N foliar. El medidor SPAD estima la concentración relativa de clorofila en una hoja al medir la transmitancia diferencial de

la luz a través de ella, dentro de una pequeña cámara (2-3 mm) en la que se sostiene una parte de la hoja, el medidor emite luz desde dos diodos, uno que produce una longitud de onda pico cercana a 650 nm (roja), que es absorbida por la clorofila y la otra, un pico cerca de 940 nm de longitud de onda (cerca del infrarrojo) se transmite a través de las hojas, y sirve como referencia interna para compensar el grosor de la hoja y el contenido de humedad (Dunn *et al.*, 2018). Por lo tanto, las concentraciones de clorofila de las hojas se correlacionan con los valores del medidor SPAD (Zhu *et al.*, 2012).

atLEAF y MC-100

El medidor de clorofila atLEAF Plus funciona de manera similar con una longitud de onda de 940 nm, pero a diferencia del medidor SPAD, el atLEAF utiliza una longitud de onda de 660 nm en lugar de 650 nm (Zhu *et al.*, 2012) y se obtienen lecturas con valores similares a las obtenidas con el SPAD (Basyouni *et al.*, 2015). El medidor atLEAF es una alternativa más económica en comparación con el SPAD (Mendoza-Tafolla *et al.*, 2019). El MC-100 medidor registra la concentración relativa de clorofila en la longitud de onda de 653 nm y 931 nm en un área de aproximadamente 64 mm² (de Souza *et al.*, 2019) y se ha empleado para la determinación de la concentración de clorofila en hojas, evaluación del estrés nutrimental y la optimización de cosechas en pimiento dulce (Padilla *et al.*, 2018).

c) Sensores remotos

Existen sensores remotos montados en diversas plataformas (por ejemplo, drones o satélites) para obtener información de las propiedades ópticas de algunos pigmentos de hojas (clorofila y polifenoles) y el análisis de las características espectrales de tejidos vegetales para relacionarlas con el contenido de N (Lemaire *et al.*, 2008). La evaluación del estado nutrimental utilizando sensores remotos depende de los cambios estructurales del tejido foliar, estos cambios pueden ser el resultado una menor reflectancia de la luz lo que conduce a un cambio de los parámetros de color que se puede relacionar con el contenido de nutrientes. La

mayoría de estos sistemas han sido ampliamente probados en cultivos como trigo, centeno, avena, entre otros (Rambo *et al.*, 2010).

El desarrollo de cámaras digitales ha hecho que métodos de bajo costo basados en imágenes digitales sean accesibles, lo que ha facilitado la configuración de calibraciones para la detección de diferentes condiciones de la planta. La interpretación de imágenes digitales se desarrolló de algoritmos computarizados (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013). El análisis digital de imágenes se ha utilizado para estudiar parámetros biofísicos de las plantas, diagnosticar enfermedades, evaluar el estrés hídrico, estimar cobertura foliar y relacionar el color de plantas con el estado nutricional de las plantas (Goffart *et al.*, 2011). Las imágenes también se han utilizado para estimar las densidades de la caña de azúcar en campo (Li *et al.*, 2010), para detectar daños por insectos (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013), así como las deficiencias de nutrientes y agua. Hasta ahora, se pueden detectar varios tipos de estrés a través de imágenes, pero el patrón de condiciones espectrales específicas debe verificarse mediante observaciones controladas, incluidas las condiciones de referencia conocidas dentro de la imagen (Hurtado *et al.*, 2010).

Las técnicas de detección remota también se han utilizado para estimar el contenido de nutrientes en cultivos en crecimiento utilizando una sola longitud de onda o una combinación de longitudes de onda (Zebarth *et al.*, 2009). Debido a su influencia sobre la clorofila foliar y la fotosíntesis, es de esperarse una estrecha relación entre el contenido de nutrientes foliares y la reflectancia espectral, particularmente en la absorción visible. Las técnicas de sensores remotos se han utilizado principalmente en la gestión de los recursos naturales para la cobertura terrestre y la estimación de biomasa, y para observar los cambios en el uso de la tierra (Sáez-Plaza *et al.*, 2013; Zebarth *et al.*, 2009) y por otro lado, el cálculo de índices espectrales ha demostrado estar indirectamente relacionados con el estado de N de los cultivos (Argenta *et al.*, 2003).

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Varios factores influyen en la idoneidad y la aplicabilidad de los diferentes medidores del contenido de N en campo, a continuación, se muestra un análisis comparativo entre los diferentes métodos no destructivos para la determinación de N en plantas, la metodología para la comparación de los diversos métodos analizados en esta revisión consistió en:

- a) Costos: se realizaron cotizaciones con proveedores y fabricantes para tener una referencia de inversión inicial y de acuerdo con el número de análisis que se podrían llevar a cabo con los insumos cotizados se calculó el costo por análisis.
- b) Precisión: se tomaron como referencias la literatura científica publicada donde se declara la precisión de algún método o equipo, los reportes de los fabricantes en sus estudios de control, artículos de difusión y promoción.
- c) Tiempo de proceso: de manera similar al inciso anterior, se consultó literatura científica y reportes de los fabricantes en sus estudios de control donde se declaraba el tiempo de proceso de algún método o equipo.
- d) Requerimiento de personal: se determinó a partir de los principios de la técnica y/o análisis para llevarlas a cabo y de acuerdo con la escala de las clasificaciones internacionales de ocupaciones.

Costos

Los métodos no destructivos requieren una mayor inversión inicial, pero a largo plazo se tiene un mayor ahorro por contar con los diferentes equipos. Los equipos no destructivos más baratos se han usado ampliamente en arroz, maíz y caña de azúcar los cuales son menos rentables en comparación frutales como el aguacate, durazno y manzana o las frutillas como arándano, zarzamora etc., lo cual, permite tener una idea que los productores y técnicos que estos métodos son económicos a largo plazo, sin embargo, como este enfoque se basa en la inspección de las características del color de la hoja, la precisión no está garantizada, especialmente para diferentes condiciones de iluminación (Chen *et al.*, 2019).

El costo relativamente alto de SPAD 502 lo hace menos atractivo para los pequeños agricultores, especialmente de los países en desarrollo y al igual que el SPAD 502, las técnicas de procesamiento de imágenes tienen bajo costo (Grenzdörffer *et al.*, 2014), sobre todo si se trata de estudiar áreas de gran extensión, ya que en general, son más baratas que la toma de fotos aéreas o levantamientos topográficos extensos en el campo.

Por otro lado, los sensores GreenSeeker, Sensor N Yara y Crop-Circle tienen menor costo de adquisición, por lo que está más al alcance de agricultores y asesores técnicos, lo que representa ahorros importantes en el manejo de la fertilización del cultivo. Las imágenes satelitales tienen bajo costo, sobre todo si se trata de estudiar áreas de gran extensión, ya que en general, las imágenes satelitales son más baratas que la toma de fotos aéreas o levantamientos topográficos extensos en el campo (Chen *et al.*, 2020).

Precisión

El SPAD-502, Dualex y ionómetros son menos sensibles a las condiciones de iluminación, pero no han demostrado un rendimiento constante en todas las especies, la fluctuación del rendimiento del SPAD-502 está influenciada por su pequeña área de medición (alrededor de 12.57 mm²) (Huuskonen y Oksanen, 2018), a pesar de que sólo se aplica a un número limitado de especies de cultivos de porte bajo y su precisión varía de acuerdo con la temperatura y posiciones de las hojas. Existen principalmente dos limitaciones que restringen el uso del medidor SPAD-502 en tejidos de plantas (Cunha *et al.*, 2015). El primero de ellos, son los errores de muestreo inducidos por el estrés que pueden influir en el contenido de clorofila en las plantas (Schlemmer *et al.*, 2005). El último problema podría evitarse calibrando el medidor SPAD para la variedad específica que se cultiva, este equipo no es útil para detectar la absorción de N de lujo como en plantas de maíz una vez alcanzada un nivel de sobre fertilización (Padilla *et al.*, 2018).

Los sensores GreenSeeker, Sensor N Yara y Crop-Circle pueden tomar medidas de vigor del cultivo in-situ y no depende de las condiciones meteorológicas, pueden recopilar datos durante las operaciones comunes tales como asperjar, cultivar, cortar, etc. y tienen la practicidad que con un programa GIS los datos se pueden utilizar para crear zonas de manejo, zonas de muestreo, identificación de plagas y enfermedades, evaluación de la eficacia de los sistemas de drenaje, sistemas de gestión de riesgo, determinar las fechas óptimas de cosecha y la creación de mapas para la recomendación de N, una desventaja de estos sensores actualmente se cuenta con algoritmos de referencia para sólo ocho condiciones y seis cultivos (trigo de primavera, trigo de invierno, maíz de temporal, maíz de riego, cebada, triticale, sorgo y canola), y se requiere un año en la calibración para su uso en el cultivo de caña de azúcar con una precisión 90 % con referencia a los métodos destructivos, y en algunos casos se debe aplicar técnicas geoestadísticas y geománticas de percepción remota para ajustar la calibración de los modelos de regresión lineal diseñados para encontrar las dosis o valores recomendadas de fertilización (Ali *et al.*, 2017; Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

En particular, el Sensor N Yara se ha utilizado eficientemente para la determinación de N en diversos cultivos como papa, maíz, trigo, cebada, cebolla y colza (Yara, 2006). Para minimizar los errores causados por la nubosidad y la poca luz, se presenta una nueva versión con sensor activo, que ha mejorado la eficiencia general del sensor (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

Las imágenes satelitales en comparación a las imágenes digitales obtenidas por cámaras multiespectrales, los sensores ópticos son menos eficientes comparados con el medidor de clorofila SPAD-502, ya que se dificulta distinguir los niveles de N bajo cualquier nivel de irradiación, como sombra o luz solar plena, y no puede usarse en cualquier momento durante el día (Zhou *et al.*, 2010), además, el requerimiento de corta distancia (aproximadamente 10 cm de planta) para medir el contenido de clorofila foliar y el área pequeña de cobertura (50 cm²) limita su uso para áreas más grandes (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013).

Por otro lado, las imágenes digitales se ven afectadas por las condiciones ambientales y necesidad de compra de imágenes y equipo específico para su procesamiento y clasificación, sin dejar de lado la superficie que se abarca y que deben establecerse de manera adecuada para producir resultados confiables en las diferentes especies (Ojeda-Bustamante *et al.*, 2016). Esta técnica permite mayor accesibilidad a lugares remotos y se pueden combinar con otras capas de sistemas de información geográfica (SIG), con lo anterior, se puede ayudar a la interpretación de las mismas, a la misma vez que las imágenes pueden ayudar a crear y actualizar capas de SIG y gracias a la codificación digital de la imagen en distintas bandas espectrales, pueden realizarse numerosas operaciones matemáticas o algoritmos que destaquen las características de interés en el terreno y no se limitan a captar la luz visible (Malambo *et al.*, 2018).

Entre las desventajas de las imágenes satelitales se encuentra que en muchos casos, sobre todo si se trata de un área desconocida por el observador se necesitará calibrar la imagen (deberá ser verificada en el terreno) y es preciso que se realice en la imagen una corrección geométrica, para que se adapte al relieve y al esferoide de la tierra, y se geo-referencie, es decir, que se le asignen coordenadas reales a la imagen, ya que en ocasiones pueden confundirse fenómenos diferentes en la imagen que tengan las mismas características espectrales (arena blanca con un techo blanco) captando fenómenos indeseables como nubes o sombras (Komárek *et al.*, 2018; Ojeda-Bustamante *et al.*, 2016). En concreto, las imágenes satelitales generalmente no son apropiadas para mapas detallados (a gran escala), sin embargo, esto está cambiando debido a la mayor resolución espacial de los sensores de satélite más modernos.

Tiempo de proceso

Las imágenes digitales tienen su principal ventaja en la rapidez, tanto en la periodicidad de la adquisición de nueva información, como en la obtención de la misma por el usuario (que hoy puede hacerse casi instantáneamente a través del

internet) y desventaja (para algunos cultivos de ciclo corto) es su repetición en el tiempo, es decir, cada imagen vuelve a pasar por el misma área cada cierto tiempo, permitiendo hacer estudios comparativos a lo largo del tiempo (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013), además y como método alternativo al tratamiento mapas, el uso de sensores permite variar las estimaciones de N (Mendoza-Tafolla *et al.*, 2021) o requerimientos sin previo análisis de datos involucrado, y el uso de la percepción remota junto con los sensores montados en tractores pueden pronosticar los rendimientos del cultivo y, en este caso, los mapas de rendimiento puede validar la tecnología predictiva basada en sensores manuales como el SPAD-502 (Li *et al.*, 2009).

Requerimiento de personal

Los métodos como el SPAD-502, Dualox y ionómetros no requieren capacitación exhaustiva del operador ya que los resultados son fáciles de interpretar en comparación a los métodos que involucran pre y post procesamiento de Imágenes satelitales y digitales (Huuskonen *et al.*, 2018).

El GreenSeeker, Sensor N Yara y Crop-Circle son equipos portátiles de fácil operación y con similar precisión a las técnicas convencionales, pero en ocasiones es necesaria la contratación de un experto y el uso de un software especializado para la realización de la calibración del modelo y las lecturas en campo deben de hacerse de manera constante durante la calibración equipo tradicional (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013; Sáez-Plaza *et al.*, 2013).

En la Cuadro 1 se muestra un comparativo con los datos más relevantes a tomar en cuenta a la hora de elegir alguna de las distintas técnicas, métodos y/o análisis para la determinación de la concentración de N en el tejido vegetal independientemente de la época de muestreo y del cultivo de interés.

Técnica/Método	Costo (USD por ha)	Tiempo de procesamiento	Precisión	Habilidades generales deseables	
Destructivo	Kjeldahl	\$ 35	5 días	98 %	<ul style="list-style-type: none"> • Media-alta especialidad • Conocimientos de química y biología • Preparación de muestras • Interpretación de resultados • Un análisis puede representar 1 ha
	Dumas	\$ 40	6 días	98 %	<ul style="list-style-type: none"> • Baja especialidad • Preparación de muestras • Interpretación de resultados • Un análisis puede representar 1 ha
	SPAD 502, atLEAF, MC-100	\$ 1	1 minuto	90 %	<ul style="list-style-type: none"> • Baja especialidad • Toma de muestras • Uso de equipos de baja-media especialidad • Interpretación de resultados • Un análisis puede representar 1 planta
No destructivo	Green Seeker	\$ 1	1 minuto	90 %	<ul style="list-style-type: none"> • Baja especialidad • Uso de maquinaria (exclusivo de algunos sensores) • Toma de muestras • Uso de equipos de baja-media especialidad • Interpretación de resultados • Un análisis puede representar 1 planta
	Yara N sensor	\$ 2	1 minuto	93 %	<ul style="list-style-type: none"> • Media especialidad • Uso de maquinaria • Planeación y toma de muestras • Uso de equipos de baja-media especialidad • Interpretación de resultado • Un análisis puede representar 1 planta
	Imagen digital	\$ 50	2-3 días	95 -95 %	<ul style="list-style-type: none"> • Media-alta especialidad • Uso de equipos fotográficos (fijos en suelo o en drones) • Conocimientos medios de computación • Conocimientos en el procesamiento de imágenes digitales • Un análisis puede representar desde 10 m² hasta 10 ha

CONCLUSIONES

Debido a su impacto ambiental y económico, existe una creciente preocupación sobre el manejo de fertilizantes nitrogenados y su determinación en los campos de cultivo, la digestión de Kjeldahl y la combustión de Dumas se han utilizado como métodos de referencia para determinar los contenidos orgánicos de N y de amonio, sin embargo, son destructivos y requieren mucho tiempo, requieren el uso de reactivos tóxicos y preprocesamiento de muestras.

Además de ser no invasivo, las propiedades ópticas de las plantas se han aplicado para medir el contenido de N en las plantas debido a la alta correlación entre los pigmentos de las hojas, sin embargo, con un alto suministro de fertilizantes nitrogenados, la clorofila alcanza la saturación, lo que impide la detección de nitratos y amonio excesivo en las plantas y las propiedades ópticas pueden verse afectadas por otros tipos de estrés, como la deficiencia de agua.

Por otro lado, los valores relativos de concentración de clorofila obtenidos al usar gráficos de referencia dentro de un campo de cultivos (N cero o sobre fertilizado) apuntan a reducir el efecto de otros factores además del estado N en los campos de cultivo, aumentando la sensibilidad de las mediciones ópticas. Se han creado índices y metodologías para lograr una mejor medición, las imágenes de satélite se pueden utilizar para estimar el estado de N de cultivo en un campo completo, pero consumen mucho tiempo porque las imágenes no se actualizan tan rápido como se requiere para la administración de nutrimentos en algunos cultivos de ciclo corto.

Las nuevas metodologías implican una combinación de técnicas, tales como mediciones de formas nitrogenadas estables (es decir, clorofila) y móviles (es decir, amonio y nitrato), la concentración de nitrato de peciolo se ha utilizado en varios estudios, y se ha demostrado que las mediciones de concentración de nitratos de la planta son más sensibles a los cambios que las mediciones ópticas, además, la concentración de nitrato en la savia puede usarse para detectar plantas sobre fertilizadas. Sin embargo, la concentración de nitrato de savia no puede medir otras

formas y a pesar de esto, la concentración de nitrato combinada con mediciones ópticas puede superar algunas limitaciones de ambas técnicas.

REFERENCIAS

- Ali, M. M., Al-Ani, A., Eamus, D., & Tan, D. K. Y. (2017). Leaf nitrogen determination using non-destructive techniques—A review. *Journal of Plant Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1143954>
- Argenta, G., Silva, P. R. F., Fosthofer, E. L., Strieder, M. L., Suhre, E., & Teichmann, L. L. (2003). Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 27(1), 109–119. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832003000100012>
- Basyouni, R., Dunn, B. L., & Goad, C. (2015). Use of nondestructive sensors to assess nitrogen status in potted poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* L. (Willd. ex Klotzsch)) production. *Scientia Horticulturae*, 192, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.011>
- Chen, A., Orlov-Levin, V., & Meron, M. (2019). Applying high-resolution visible-channel aerial imaging of crop canopy to precision irrigation management. *Agricultural Water Management*, 216(November 2018), 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.02.017>
- Chen, T., Yang, W., Zhang, H., Zhu, B., Zeng, R., Wang, X., ... Zhang, L. (2020). Early detection of bacterial wilt in peanut plants through leaf-level hyperspectral and unmanned aerial vehicle data. *Computers and Electronics in Agriculture*, 177(July), 105708. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105708>
- Cruz Crespo, E., Sandoval Villa, M., Volke Haller, V. H., Can Chulim, A., & Sánchez Escudero, J. (2018). Efecto de mezclas de sustratos y concentración de la solución nutritiva en el crecimiento y rendimiento de tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1361–1373.

<https://doi.org/10.29312/remexca.v3i7.1343>

- Cunha, A. R. da, Katz, I., Sousa, A. de P., & Martinez Uribe, R. A. (2015). Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de *lisianthus* en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido. *Idesia (Arica)*, 33(2), 97–105. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292015000200012>
- de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Thompson, R. B., Gallardo, M., Grasso, R., & Padilla, F. M. (2019). The use of chlorophyll meters to assess crop n status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. *Sensors*, 19(13), 2949. <https://doi.org/10.3390/s19132949>
- Dey, A. K., Sharma, M., & Meshram, M. R. (2016). An analysis of leaf chlorophyll measurement method using chlorophyll meter and image processing technique. *Procedia Computer Science*, 85, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2016.05.235>
- Dunn, B. L., Singh, H., Payton, M., & Kincheloe, S. (2018). Effects of nitrogen, phosphorus, and potassium on SPAD-502 and atLEAF sensor readings of *Salvia*. *Journal of Plant Nutrition*, 41(13), 1674–1683. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1458874>
- Elazab, A., Ordóñez, R. A., Savin, R., Slafer, G. A., & Araus, J. L. (2016). Detecting interactive effects of N fertilization and heat stress on maize productivity by remote sensing techniques. *European Journal of Agronomy*, 73, 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.11.010>
- Goffart, J.-P., Olivier, M., & Frankinet, M. (2011). Crop nitrogen status assessment tools in a decision support system for nitrogen fertilization management of potato crops. *HortTechnology*, 21(3), 282–286. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.21.3.282>
- Grenzdörffer, G. J. (2014). Crop height determination with UAS point clouds. *ISPRS - International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences*, XL–1, 135–140. <https://doi.org/10.5194/isprsarchives-XL-1-135-2014>

- Hunt, E. R., Cavigelli, M., Daughtry, C. S. T., McMurtrey, J. E., & Walthall, C. L. (2005). Evaluation of digital photography from model aircraft for remote sensing of crop biomass and nitrogen status. *Precision Agriculture*, 6(4), 359–378. <https://doi.org/10.1007/s11119-005-2324-5>
- Hurtado, S. M. C., Silva, C. A., Resende, Á. V. de, Corazza, E. J., Shiratsuchi, L. S., & Higashikawa, F. S. (2010). Sensibilidade do clorofilômetro para diagnóstico nutricional de nitrogênio no milho. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(3), 688–697. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000300023>
- Huuskonen, J., & Oksanen, T. (2018). Soil sampling with drones and augmented reality in precision agriculture. *Computers and Electronics in Agriculture*, 154(September), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.08.039>
- Kjeldahl, J. (1883). Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. *J. Anal. Chem.*, 366–382.
- Komárek, J., Klouček, T., & Prošek, J. (2018). The potential of unmanned aerial systems: A tool towards precision classification of hard-to-distinguish vegetation types? *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 71(February), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.jag.2018.05.003>
- Lemaire, G., Jeuffroy, M.-H., & Gastal, F. (2008). Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. *European Journal of Agronomy*, 28(4), 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.01.005>
- Li, Y., Chen, D., Walker, C. N., & Angus, J. F. (2010). Estimating the nitrogen status of crops using a digital camera. *Field Crops Research*, 118(3), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.05.011>
- Malambo, L., Popescu, S. C., Murray, S. C., Putman, E., Pugh, N. A., Horne, D. W., ... Bishop, M. (2018). Multitemporal field-based plant height estimation using 3D point clouds generated from small unmanned aerial systems high-resolution imagery. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 64(June 2017), 31–42.

<https://doi.org/10.1016/j.jag.2017.08.014>

- Martín, I., Alonso, N., López, M. C., Prieto, M., Cadahía, C., & Eymar, E. (2007). Estimation of Leaf, Root, and Sap Nitrogen Status using the SPAD-502 Chlorophyll Meter for Ornamental Shrubs. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(13–14), 1785–1803. <https://doi.org/10.1080/00103620701435555>
- Mendoza-Tafolla, R. O., Juárez-Lopez, P., Ontiveros-Capurata, R.-E., Sandoval-Villa, M., Alia-Tejacal, I., & Alejo-Santiago, G. (2019). Estimating nitrogen and chlorophyll status of romaine lettuce using SPAD and at LEAF Readings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3). <https://doi.org/10.15835/nbha47311525>
- Mendoza-Tafolla, R. O., Ontiveros-Capurata, R.-E., Juárez-Lopez, P., Alia-Tejacal, I., Lopez-Martinez, V., & Ruiz-Alvarez, O. (2021). Nitrogen and chlorophyll status in romaine lettuce using spectral indices from RGB digital images. *Zemdirbyste-Agriculture*, 108(1), 79–86. <https://doi.org/10.13080/z-a.2021.108.011>
- Muñoz-Huerta, R. F., Guevara-Gonzalez, R. G., Contreras-Medina, L. M., Torres-Pacheco, I., Prado-Olivarez, J., & Ocampo-Velazquez, R. V. (2013). A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: Advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors (Switzerland)*, 13(8), 10823–10843. <https://doi.org/10.3390/s130810823>
- Ojeda-Bustamante, W., Flores-Velázquez, J., & Ontiveros-Capurata, R. E. (2016). Uso y manejo de drones con aplicaciones al sector hídrico, (January), 425.
- Padilla, F. M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Giménez, C., & Thompson, R. B. (2018). Different Responses of Various Chlorophyll Meters to Increasing Nitrogen Supply in Sweet Pepper. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01752>
- Padilla, F. M., Gallardo, M., Peña-Fleitas, M. T., de Souza, R., & Thompson, R. B. (2018). Proximal Optical Sensors for Nitrogen Management of Vegetable

- Crops: A Review. *Sensors*, 18(7), 2083. <https://doi.org/10.3390/s18072083>
- Rambo, L., Ma, B.-L., Xiong, Y., & Regis Ferreira da Silvia, P. (2010). Leaf and canopy optical characteristics as crop-N-status indicators for field nitrogen management in corn. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173(3), 434–443. <https://doi.org/10.1002/jpln.200900022>
- Sáez-Plaza, P., Michałowski, T., Navas, M. J., Asuero, A. G., & Wybraniec, S. (2013). An overview of the kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 43(4), 178–223. <https://doi.org/10.1080/10408347.2012.751786>
- Sandmann, M., Graefe, J., & Feller, C. (2013). Optical methods for the non-destructive estimation of leaf area index in kohlrabi and lettuce. *Scientia Horticulturae*, 156, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.04.003>
- Schlemmer, M. R., Francis, D. D., Shanahan, J. F., & Schepers, J. S. (2005). Remotely measuring chlorophyll content in corn leaves with differing nitrogen levels and relative water content. *Agronomy Journal*, 97(1), 106–112. <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0106>
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M., & Murphy, A. (2014). *Plant Physiology & Development*. (Sinauer Associates, Ed.) (Sixth edit). Sunderland, MA, USA.
- Zebarth, B. J., Drury, C. F., Tremblay, N., & Cambouris, A. N. (2009). Opportunities for improved fertilizer nitrogen management in production of arable crops in eastern Canada: A review. *Canadian Journal of Soil Science*, 89(2), 113–132. <https://doi.org/10.4141/CJSS07102>
- Zhou, Q., Liu, Z., & Huang, J. (2010). Detection of nitrogen-overfertilized rice plants with leaf positional difference in hyperspectral vegetation index. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 11(6), 465–470. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0900348>
- Zhu, J., Tremblay, N., & Liang, Y. (2012). Comparing SPAD and atLEAF values for chlorophyll assessment in crop species. *Canadian Journal of Soil Science*,

CONCLUSIONES GENERALES

- El análisis de imágenes digitales RGB permitió estimar el estado nutrimental de nitrógeno en lechuga, albahaca, y arúgula en forma rápida y precisa.
- El análisis de imágenes permitió calcular el crecimiento con una precisión superior a 90 % en lechuga, albahaca y arúgula.
- El nivel de nitrato de 12 y 16 mEq·L⁻¹ en la solución nutritiva favoreció el crecimiento y rendimiento en lechuga, albahaca y arúgula.
- Las técnicas no destructivas permitieron estimar el estado nutrimental de nitrógeno con una precisión superior a 90 % en lechuga, albahaca y arúgula.

ANEXOS



Available online: www.notulaebotanicae.ro

Print ISSN 0255-965X; Electronic 1842-4309

Not Bot Horti Agrobo, 2019, 47(3):751-756. DOI:10.15835/nbha47311589



Original Article

Estimating Nitrogen and Chlorophyll Status of Romaine Lettuce Using SPAD and atLEAF Readings

Rodrigo Omar MENDOZA-TAFOLLA¹, Porfirio JUAREZ-LOPEZ¹,
Ronald-Ernesto ONTIVEROS-CAPURATA^{2*}, Manuel SANDOVAL-
VILLA³, Iran ALIA-TEJACAL¹, Gelacio ALEJO-SANTIAGO⁴

¹Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Av. Universidad 1001, 62209 Cuernavaca, Morelos, México; rodrigoomt@hotmail.com; porfiriojlopez@yahoo.com; iran.alia@uaem.mx

²Cátedra CONACYT- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Paseo Cuauhnáhuac 8532, 62550 Jiutepec, Morelos,

México; rononti@gmail.com; reontiverosca@conacyt.mx (*corresponding author)

³Colegio de Postgraduados, Edafología, Campus Montecillo 56230, Montecillo, Estado de México, México; msandoval@colpos.mx

⁴Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, Carretera Tepic-Compostela Km. 9, 63780, Xalisco, Nayarit, México; gelacioalejo@hotmail.com

Abstract

Nitrogen (N) is an essential nutrient for plant growth and development and is especially important in the production of high quality leafy green crops. In this experiment, leaf N concentration, chlorophyll concentration (Chl) and weight above fresh matter (AFM) of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *longifolia*) were estimated by correlations between *in situ* SPAD and atLEAF readings. Lettuce was grown in high tunnels during 42 days and was irrigated at five nitrogen levels: 0, 4, 8, 12 and 16 mEq·L⁻¹ of NO₃⁻, with a modified Steiner nutrient solution. The N concentration, Chl concentration and AFM were determined in the laboratory, while SPAD and atLEAF readings were measured *in situ* weekly. SPAD readings had high, positive and significant linear correlations with N (R² = 0.90), Chl (R² = 0.97) and AFM (R² = 0.98); The atLEAF readings had a similar linear correlation with N (R² = 0.91), Chl (R² = 0.92) and AFM (R² = 0.97). Both, SPAD and atLEAF readings had high, positive, and significant linear correlation (R² = 0.96). Suggesting that, SPAD and atLEAF meters can be used to non-destructively and accurately estimate the N status of lettuce, in a reliable and quick manner during the crop production cycle.

Keywords: above fresh matter; crop nutrition; *Lactuca sativa*; non-destructive sampling; soilless culture

Introduction

Nitrogen (N) is an essential nutrient for plant growth and development. It is found in amino acids, nucleic acids, proteins and in chlorophyll (Chl). The Chl concentration of the leaf is closely related to N concentration in the plant (Zebarth *et al.*, 2002), therefore, monitoring plant Chl and N concentrations during production could be used as a management strategy to enhance plant growth, yield and marketability (Gitelson *et al.*, 2003; Peng and Yuan, 2017).

Current destructive methods for the determination of N and Chl are precise, but time-consuming and relatively expensive (Kalaji *et al.*, 2017). In contrast, portable non-destructive equipment has been used successfully with some

plant species to quickly estimate the leaf Chl or N concentrations *in situ* (Loh *et al.*, 2002; Abdelhamid *et al.*, 2003; Padilla *et al.*, 2018a) and enable repeat measurements from the same leaf during a production cycle (Kalaji *et al.*, 2017; Yamamoto *et al.*, 2002).

The SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter (Konica Minolta*, Japan) is used for rapid and non-destructive determination of relative leaf Chl concentration (Gianquinto *et al.*, 2004). Transmission of light through the leaf is measured at 650 and 940 nm; the wavelength of 650 nm coincides with the spectral region with maximum chlorophyll activity, while transmittance at 940 nm is used to compensate for factors, including leaf moisture content and thickness (Zhu *et al.*, 2012). It has been reported that the SPAD readings are related to the concentration of foliar

Received: 24 Apr 2019. Received in revised form: 02 May 2019. Accepted: 14 May 2019. Published online: 22 May 2019.

ISSN 1392-3196 / e-ISSN 2335-8947

Zemdirbyste-Agriculture, vol. 108, No. 1 (2021), p. 79–86

DOI 10.13080/z-a.2021.108.011

Nitrogen and chlorophyll status in romaine lettuce using spectral indices from RGB digital images

Rodrigo Omar MENDOZA-TAFOLLA¹, Ronald Ernesto ONTIVEROS-CAPURATA²,
Porfirio JUAREZ-LOPEZ¹, Iran ALIA-TEJACAL¹, Victor LOPEZ-MARTINEZ¹,
Osias RUIZ-ALVAREZ³

¹Autonomous University of the State of Morelos, Faculty of Agricultural Sciences
Avenida Universidad 1001, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

²Mexican Institute of Water Technology, National Council of Science and Technology (CONACYT)
Paseo Cuauhnáhuac 8532, 62550 Jiutepec, Morelos, Mexico
E-mail: reontiverosca@conacyt.mx

³National Remote Sensing and Modeling Laboratory (LNMySR),
National Institute of Agricultural and Livestock Forest Research (INIFAP)
Km. 32.5 Carretera Aguascalientes – Zacatecas, 20670, Pabellon de Arteaga, Aguascalientes, Mexico

Abstract

Destructive methods for crop nutrition estimation are accurate and standardized but costly and limited by spatial scale. Non-destructive techniques such as the use of digital imaging provide fast and reliable results *in situ*; however, there is limited information on these non-destructive techniques in leafy vegetable crops. During the study it was estimated the concentration of nitrogen (N) and chlorophyll (Chl) in romaine lettuce using spectral indices derived from the RGB (red, green and blue) digital images. The lettuce crop was grown in plastic tunnels and irrigated with five N levels: 0, 4, 8, 12, and 16 mEq L⁻¹ NO₃-N (corresponding to 0, 248, 496 and 744 mg L⁻¹, respectively) based on a modified Steiner solution. The treatment of 16 mEq L⁻¹ NO₃-N showed the highest growth at 42 days after transplanting (DAT). Digital images of the plants were acquired weekly with a RGB camera and processed to obtain scale mosaics and twelve spectral vegetation indices. Correlation analysis of the spectral indices indicated that normalized green-red difference index (NGRDI), excess green (ExG) and green channel (g) indices showed a positive linear correlation with the concentration of N ($r > 0.93$) and Chl ($r > 0.93$). Besides, an exponential correlation with leaf area ($r > 0.86$) was founded, which was stronger in the last 21 DAT due to the acceleration in leaf growth during the vegetative stage of the crop. These results show that RGB digital images are a low cost, non-destructive, reliable and accurate method to estimate N and Chl concentration and leaf area in romaine lettuce during production. Therefore, this technique could be an affordable alternative that combined with portable meters (i.e. SPAD) provides real-time monitoring of the nutritional status of the lettuce crop, especially in crop factories.

Key words: *Lactuca sativa* var. *longifolia*, leaf area, non-destructive techniques, nitrogen, chlorophyll, spectral index.

Introduction

Chlorophyll (Chl) and nitrogen (N) are essential components of plants because of their role in protein production and photosynthesis. An excess or deficiency of these can cause toxicity or low yield (Taiz et al., 2014). Precise assessment and evaluation of the nutritional status of the crop *in situ* and at different time scales is required to optimize the use of fertilizers and reduce costs (Muñoz-Huerta et al., 2013).

Nitrogen concentration in plants is usually determined by two approaches – the destructive or non-destructive methods. Destructive methods such

as Kjeldahl and Dumas are based on tissue analysis and although they are accurate and standardized, they are often limited by the size of the plots, high cost and efforts required for sampling (Paz Pellat et al., 2015; Baresel et al., 2017). Non-destructive methods allow for remote information collection in less time and do not require highly specialized personnel (Vollmann et al., 2011). Besides, measurements may be applied frequently and repeatedly on the same plant; thus allowing the monitoring of leaf area and crop N status for efficiently adjusting fertilization rates throughout the growing

Please use the following format when citing the article:

Mendoza-Tafolla R. O., Ontiveros-Capurata R. E., Juárez-López P., Alia-Tejaca I., López-Martínez V., Ruiz-Alvarez O. 2021. Nitrogen and chlorophyll status in romaine lettuce using spectral indices from RGB digital images. Zemdirbyste-Agriculture, 108 (1): 79–86. DOI 10.13080/z-a.2021.108.011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Morelos, 28 de octubre de 2021.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“ESTIMACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE NITRÓGENO MEDIANTE MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS EN LECHUGA, ALBAHACA Y ARÚGULA”** que presenta el **M. C. RODRIGO OMAR MENDOZA TAFOLLA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ** y la Codirección del **DR. RONALD ERNESTO ONTIVEROS CAPURATA** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. GELACIO ALEJO SANTIAGO
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GELACIO ALEJO SANTIAGO | Fecha:2021-10-29 12:20:46 | Firmante

hwV4jW6xNITeVBpuCmdFbbJ23FWgUpFGaWpxBdjM7rJbzG+bpESJbl0GzjTdPmFTq0jFcnZ2xAAajcOGe7OQc96h3EX+W9TQzq8t8ti84PYnWueUAwdceFGVi5tOk3YQ1gZ0/Ej
sdfC8pkyHjJOiLiQDtlISyErR4WVeZKj+7O66l1C5XsWWHCY3ZYy0PDh4F4e1els7GXs53hk83xigYti1rDugyudX98PUOApMZMwQDM8uvx+umuPseBGgwDipuNIRpoBfgFPCfKID
KrRuGasMNxyd7mpsf79SFoSEbKbld3tLI51NpfQfvppodBtoO2+HOXsORX8PDekLXwvRRPA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[SudIG1mKp](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/q9YrHEW5VQG2A6Clab8pf6kVdLaLFlx5>





Cuernavaca, Morelos, 28 de octubre de 2021.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“ESTIMACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE NITRÓGENO MEDIANTE MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS EN LECHUGA, ALBAHACA Y ARÚGULA”** que presenta el **M. C. RODRIGO OMAR MENDOZA TAFOLLA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ** y la Codirección del **DR. RONALD ERNESTO ONTIVEROS CAPURATA** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. IRÁN ALIA TEJACAL
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRAN ALIA TEJACAL | Fecha:2021-10-28 22:25:40 | Firmante

beDmYbNYFnsbNt267+NCptOtWlKSNGQYTTVo0cBkPCruc/tlko3YwuKWqwhsWV1Fy46AG2TG/EE1bntpulWq7WZRa9jZTnGfw2OyFg2TUUmIEl8qysY3o7PTmj8yr0iwEhcl2o
jhvS+8CxYUtzpuYvEYxRQqRpcm/pR/UUM+j0/Z6uc+My39Ueem+3kwVLXfY1RIKNNtHWuJlicfImuXN9Mcxelr7GN6xxatx+OfIgvbeE0vdrGhxfJ3LuaszGHoCekEXNg2UloTfUNpK
yliUkogPEVwgtGh7VtbyCeRNSxWYYjdfyZbyir9YRrW6XHvt9UpHHGvJC/8zh+UaJQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[FdwuSoM3E](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/IMKcflcHO7CxP0za6NeMHRnsu8vvjOJ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Morelos, 28 de octubre de 2021.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“ESTIMACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE NITRÓGENO MEDIANTE MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS EN LECHUGA, ALBAHACA Y ARÚGULA”** que presenta el **M. C. RODRIGO OMAR MENDOZA TAFOLLA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ** y la Codirección del **DR. RONALD ERNESTO ONTIVEROS CAPURATA** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. MANUEL SANDOVAL VILLA
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MANUEL SANDOVAL VILLA | Fecha:2021-10-28 22:32:03 | Firmante

Xa2+b8npgXCvebOejQCF0Oxkd1yO769ptJlIjJtD3aYweC2d9ZCEi37ia97InsxBxBn990tJWI8RM6OgkKQ9XS6A0IIE16RlpYfzlpkqbmSOhOyxIjAfwQwnPmbop6hJKhZcpIsCOaE
QumievSoprNtf9hUAQ20P64rex120r4U6NqL/GqCh9QOdtPSP+QCdOc0ESGNErcPXxq5fcWBv8wep9et26GxcCdGk+eVza/CeDlz4434ODSPvjwQ3vrdLGq79WJXdt/Dp65h71afp
MSHu/jkP+dD4QDhvRaiNhAgeHXQ3KG2gm8faYfG8Q7rb/+LxnX2xn/bIS5bvV9Uv3Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[GhZuwTOgn](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/H6AN7DJt04EaqyFFpNyuBksXqFPNSqdm>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Morelos, 28 de octubre de 2021.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

**MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.**

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“ESTIMACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE NITRÓGENO MEDIANTE MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS EN LECHUGA, ALBAHACA Y ARÚGULA”** que presenta el **M. C. RODRIGO OMAR MENDOZA TAFOLLA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ** y la Codirección del **DR. RONALD ERNESTO ONTIVEROS CAPURATA** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. OSCAR GABRIEL VILLEGAS TORRES
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OSCAR GABRIEL VILLEGAS TORRES | Fecha:2021-11-01 10:35:08 | Firmante

lqyhpq1camowJYQrINvAf7bRjJqJ7jqyVVLNgLV6CKecuJo0TXSwWGJ9JfCfJMscjeO4P0eSVtfkMqMH4Nn092NRFdF/IdAI8ARURduoz7C3Q7MQ0Rq8qYJ0I+kMvyrBaKNukZDgd
eSR/m5k8Euh2cil0HfVvkgSut1e76qLpY9ybx7xVvy+pTXvTYI9ZZdv3+q0rL6kiUQbmFtqhUnyeBCQET12kAZBuhqJi+U1ClufynaqwOYduej3HD+UFClanAsqZlaN+uy9nxYfe1cQnsz
bc8GE5+IC8m4TdM1OH5MyovMe5uU6weF3SFniS0znetiEw4TEgUjGfSNwT9QUCKJg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[3nGNXFKhC](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ry1qAVigqtrL05c4Ya3rnltIMtc4SLWi>





Cuernavaca, Morelos, 28 de octubre de 2021.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“ESTIMACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE NITRÓGENO MEDIANTE MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS EN LECHUGA, ALBAHACA Y ARÚGULA”** que presenta el **M. C. RODRIGO OMAR MENDOZA TAFOLLA**, mismo que fue desarrollado bajo mi dirección y la codirección del **DR. RONALD ERNESTO ONTIVEROS CAPURATA** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PORFIRIO JUAREZ LOPEZ | Fecha:2021-10-28 22:14:24 | Firmante

sufmm/ugKEs4HAQG0SicqblvtKAQRZK3Dhr/rxJCHMbmLkvJaatynYZYrqFOkrbXaDFPS0la5DUg/vOTO9CnoUm0ug3uos6B34ngCBkxV6RPCOSUmpZOPPgNZaEgxUBdVxbTIm8VP7exto0vo+Ui7y2b6ZISiaTd070jimgK5tfnw5V4lidDI39C2JGwPJmp1C4te8aHpiWHVDPgryaNid3e5Mt1aAORAUJ0Y0IOIQx6+rAej/U/6htksbCYnEeThiheXKLZpbPm89uk4we6220y5WoiZn3a6ldSIBJ4GEI/CkQkdHmES+7suspMuNKXtZKIFIOyRiJ5iUunmBz7Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



5H8eXNzI0

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/BBKog6AyQiL0XgExqow1i1tsai0M1bhT>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Morelos, 28 de octubre de 2021.

Asunto: Voto Aprobación de Tesis.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESENDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS.
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“ESTIMACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE NITRÓGENO MEDIANTE MÉTODOS NO DESTRUCTIVOS EN LECHUGA, ALBAHACA Y ARÚGULA”** que presenta el **M. C. RODRIGO OMAR MENDOZA TAFOLLA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ** y la codirección del **DR. RONALD ERNESTO ONTIVEROS CAPURATA** y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. VÍCTOR LÓPEZ MARTÍNEZ
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av, universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México 62209
Tel (777)3297046, 3297000 Ext. 3304. fagropecuarias@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR LOPEZ MARTINEZ | Fecha:2021-10-29 16:24:24 | Firmante

JGZBg+2swutXDKddISMfoKAfb8i526nsT7u+myqeLDsc8Je8nk0jgWA2XRlKrvqMkDNF+S66MFC4AXMyBwiZT4MZ9jdW24YpBgbFODCKUpsTJg7Zjybrfn9911w88dNxyU+q5mKXfUdb1yC0STSsW44B7OnUUyKXQ6e9gTLaW2PlzAs4wTxyC1KNyt/rwJVGUdA81sxqvSKW/+KwJN119aQ5Ds036/XUYuX2ro8u+HiKBREDU06wgPmVY7gQhJnEnj5/5bupJco/M7pTaGiPoNcWd+IH4+buALjQCqKuV9zQ2I90buFzjr7TPA0mi6LeMu568lhjTb0F5jz4k85wJQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[qFpmbD0LG](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/MaSg7xM9diyTYZGjMebXhRBvajbiwTuS>

