



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS

AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

EDAFOLOGÍA-NUTRICIÓN VEGETAL

**REFLECTANCIA EN HOJAS DE PIMIENTO Y
FRESA PARA EL DIAGNÓSTICO NUTRIMENTAL**

JAIRO AARÓN DE LA CRUZ DURÁN

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: **REFLECTANCIA EN HOJAS DE PIMIENTO Y FRESA PARA EL DIAGNÓSTICO NUTRIMENTAL**, realizada por el alumno **M.C. Jairo Aarón de la Cruz Durán**, bajo el Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO _____

Dr. Prometeo Sánchez García

ASESOR _____

Dr. Manuel Sandoval Villa

ASESOR _____

Dra. Libia Iris Trejo Téllez

ASESOR _____

Dr. Enrique Ojeda Trejo

ASESOR _____

Dr. María Antonieta Goytia Jiménez

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios.

Al Colegio de Postgraduados por darme la oportunidad de continuar con mis estudios y brindarme las facilidades para el desarrollo y conclusión del presente trabajo de investigación.

A mi Consejo Particular de quienes reconozco su liderazgo como profesores e investigadores, generadores de nuevos conocimientos que impulsan el desarrollo agrícola de México.

Al Dr. Prometeo Sánchez García por su apoyo, estímulo, enseñanza y confianza brindada sin reservas. Por su amistad y gran calidad humana.

Al Dr. Manuel Sandoval Villa por su sencillez, calidad humana y apoyo en la revisión de esta tesis.

A la Dra. Libia Iris Trejo Téllez por su confianza, amistad y orientación en mis estudios y revisión de esta tesis.

Al Dr. Enrique Ojeda Trejo por su amistad y constante orientación en la revisión de esta tesis.

A la Dra. María Antonieta Goytia Jiménez por su amistad y motivación en la superación profesional.

A Laura Santamaría Téllez, Wenceslao Vidal García del área de Nutrición Vegetal por su buena disposición y amistad...Gracias.

A mis amigos de estudios que juntos compartimos experiencias: David Hernández Hernández, Felipe San Juan, Daniel Gallegos Cossío e Ibar Felipe Tlatilpa Santamaría.

PROFESORES INTEGRANTES DEL COSEJO PARTICULAR

Cada uno dejo en mí una huella imborrable, regalándome sus conocimientos, su tiempo, y lo máspreciado, su amistad y confianza. Reciban ustedes mi gratitud. Gracias por todo, y que dios los bendiga.

Dr. Prometeo Sánchez García



Ingeniero Agrónomo, Doctor en Nutrición Vegetal y Fertilidad de Suelos por la Universidad Rusa de la Amistad de los Pueblos en 1992. Profesor-Investigador titular del Colegio de Postgraduados en Nutrición de Cultivos. Investigador del SNI Nivel I.

Líneas de investigación: Diagnostico Nutrimental e Hidroponía

La generación, desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico nutrimental en cultivos de interés agrícola

Dr. Manuel Sandoval Villa



Ingeniero Agrónomo Especialista en Suelos, egresado de la Universidad Autónoma Chapingo, 1987. Doctor en Ciencias en Nutrición Vegetal por la Universidad de Auburn, Alabama, USA, 1999. Experto en agricultura protegida e intensiva. Investigador del SIN Nivel I.

Líneas de investigación:

Hidroponía e Interacción Nutrición-Fitopatógenos

Fisiología de los cultivos, adaptabilidad de las plantas a presiones nutrimentales, Cultivos hidropónicos, manejo de cultivos en invernadero

Dra. Libia Iris Trejo Téllez



Ingeniero Agrónomo Especialista en Suelos, egresado de la Universidad Autónoma Chapingo, 1995. Maestra en Ciencias, egresada del Colegio de Postgraduados, 2000. Doctora en Ciencias Naturales, egresada de la Universidad Libre de Berlín, 2004.

Líneas de investigación: Biología Celular y Estrés Nutrimental

Respuesta al estrés ambiental, Influencia de concentraciones tóxicas y déficit de nutrimentos esenciales sobre actividades enzimáticas, Metales pesados y su relación con absorción de nutrimentos esenciales, Interacción nutrimentos y factores climáticos, Biología celular y moléculas de la resistencia al estrés nutrimental.



Dr. Enrique Ojeda Trejo

Ingeniero Agrónomo Especialista en Suelos, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México; Maestro en Ciencias en Edafología, Colegio de Postgraduados, México; Doctor of Philosophy por el Department of Geography, Durham University U.K.

Líneas de investigación:

Percepción remota y cartografía automatizada.

Levantamientos fisiográficos y de suelos, zonificación agroecológico, evaluación de tierras, sistemas de información geográficos participativos, aplicaciones de la percepción remota a el monitoreo nutricional de cultivos e incendios forestales.

Dra. María Antonieta Goytia Jiménez



Licenciatura: Biología en la UNAM, 1979;
Maestría: Fisiología Vegetal en el CP, 1994;
Doctorado: Fisiología Vegetal en el CP, 2000.

Líneas de investigación:

Fisiología Vegetal y biocombustibles.

Investigación en donde destacan los encaminados a dar uso a los desechos de cultivos, a la generación de biocombustibles y mejoramiento genético y protección de la higuera (*Ricinus communis L.*).

DEDICATORIA

A Joaquín León Vázquez por su apoyo y enseñanzas de la vida que han sido mi tesis para una constante superación.

A mi madre Fabiola Durán Guiral por las noches de desvelos que le hice pasar, sus cuidados y su apoyo incondicional que siempre me ha brindado, por los momentos amargos que por mi culpa ha pasado...perdón.

A mí siempre querida hermana Fabiola Noemí por su gratitud y momentos felices que me ha regalado durante mi vida.

A un excelente profesor-investigador Prometeo Sánchez García por su amistad tan generosa, orientación y apoyo que siempre me ha brindado. Gracias.

A mis amigos y familiares con los que compartí parte de mi destino y que han estado en mi camino, mi eterno agradecimiento por su cariño y amistad.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	4
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
LITERATURA CITADA	13
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	16
IV. CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO EN HOJAS DE PIMIENTO (<i>Capsicum annuum L.</i>) CON UN ESCÁNER DIGITAL.....	17
RESUMEN	17
ABSTRACT	18
INTRODUCCIÓN	19
MATERIALES Y MÉTODOS	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	33
LITERATURA CITADA	34
V. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO EN PIMIENTO POR ESPECTRORADIOMETRÍA	38
RESUMEN	39
SUMMARY	40
INTRODUCCIÓN	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47

CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
VI. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO EN FRESA MEDIANTE UN ESCÁNER DIGITAL	59
RESUMEN	59
ABSTRACT	60
INTRODUCCIÓN	61
MATERIALES Y MÉTODOS	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	71
LITERATURA CITADA	72
VII. CONCLUSIONES GENERALES	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diseño de tratamientos	24
Cuadro 2. Relación entre los valores digitales, obtenidos mediante digitalización de imágenes con un escáner, en las bandas azul, verde, roja, L, a, b, croma y matiz y la concentración de N en hojas de pimiento.....	29
Cuadro 3. Diseño de tratamientos.....	63
Cuadro 4. Relación entre los valores digitales, obtenidos mediante digitalización de imágenes con escáner, en las bandas azul, verde, roja, L, a, b, croma y hue y la concentración de N en hojas de fresa.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala de color CIELAB	5
Figura 2. Escala de color CIELAB	21
Figura 3. Saco de cultivo de con tezontle rojo y fibra de coco como sustrato (50% y 50%, v/v).	23
Figura 4. Obtención de las imágenes digitales mediante un escáner plano.	24
Figura 5. Espacio de color RGB.	25
Figura 6. Proceso de obtención de los valores de N mediante el método microkjeldahl, A: Muestras ya predigestadas y digestadas listas para su destilación; B: Instrumento de destilación; C: Muestra ya titulada después de su destilación.	26
Figura 7. Concentración foliar de N en pimiento en función de la concentración de N en la solución nutritiva.	27
Figura 8. Reflectancia de luz (valores digitales en RGB) en hojas de pimiento, para los diferentes tratamientos con N.	28
Figura 9. Relación entre los valores de CIELAB (L, a y b) y la concentración de N en hoja de pimiento en tratamientos con diferentes niveles de N en la solución nutritiva.	30
Figura 10. Relación entre los valores de croma (A) y matiz (B) con los niveles de N en la solución nutritiva.	32
Figura 11. Muestreo de hojas con el CROPSCAN.	45
Figura 12. Firma espectral en hojas de pimiento a los 180 días después del transplante, en función de la concentración de NO_3^- en la solución nutritiva.	55

Figura 13. (A) Firma espectral visible, (B) firma espectral infrarroja y (C) concentración de N en follaje del cultivo de chile pimiento (*Capsicum annuum L.*) en función de la concentración de N en la solución nutritiva.56

Figura 14. Relación entre los valores de reflectancia de la banda verde-510nm (a), verde-560nm (b), roja-610nm (c), infrarrojo-810nm (d) y infrarrojo-830nm (e) con la concentración de nitrógeno (N) en la parte aérea de plantas de pimiento. N = nitrógeno en hoja; R^2 = coeficiente de determinación; r = coeficiente de correlación.57

Figura 15. Relación entre los valores NDVI con las bandas roja-610 nm e infrarrojo-830 nm, con la concentración de N en la parte aérea de plantas de pimiento. N = nitrógeno en hoja; R^2 = coeficiente de determinación; r = coeficiente de correlación.58

Figura 16. Sacos de cultivo con fresas63

Figura 17. Imágenes obtenidas con escáner64

Figura 20 Relación entre los valores de CIELAB (L, a y b) y la concentración de N en la solución nutritiva.69

Figura 21. Relación entre los valores de chroma (A) y hue (B) con los niveles de N en la solución nutritiva.....70

REFLECTANCIA EN HOJAS DE PIMIENTO Y FRESA PARA EL DIAGNÓSTICO NUTRIMENTAL

RESUMEN

El desarrollo de los sensores remotos por los países desarrollados, ha permitido generar imágenes satelitales de alta resolución, e instrumentos que proporcionan información precisa: cámaras digitales, espectrómetros, ceptómetros, sensores cuánticos lineales, analizadores de dosel, entre otros; así como también equipo de cómputo de alta capacidad y potencia, programas de cómputo para digitalización y análisis de la información en tiempo real. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue generar nuevas tecnologías que den mayor certidumbre y competitividad a la comercialización, mayor valor de la producción en los mercados futuros, valor de aseguramiento del cultivo y su producción, a través de generación de conocimiento e información en tiempo real a la agricultura protegida como a campo abierto de nuestro país, apoyados en la percepción remota y fotobiología.

Con la finalidad de encontrar un procedimiento económico, rápido y confiable que estime el contenido de nitrógeno (N), se estableció un experimento en los invernaderos de la Universidad Autónoma Chapingo. La unidad experimental consistió de una planta de pimiento o fresa, según el caso, establecidas en sacos de cultivo de polietileno blanco calibre 600 de 100x30 cm a una distancia de 1.5 m entre hileras y 0.3 m entre plantas. Como sustrato se utilizó una mezcla de fibra de coco y tezontle rojo, 50/50 (v/v). Se emplearon soluciones nutritivas con cuatro niveles de N: 0, 4, 12 y 20 mol_c m⁻³ (en el último tratamiento 4 mol_c m⁻³ corresponden a NH₄⁺), a partir de la solución Steiner. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones. En fructificación, en cada unidad experimental, se seleccionaron 10-15 hojas y en éstas se midió la reflectancia con un radiómetro y posteriormente se digitalizaron mediante un escáner. Posteriormente, con el programa de cómputo VISUAL BASIC, cada imagen se separó en sus colores primarios (bandas azul, verde y rojo) y se obtuvieron dimensiones CIELAB L*, a* y b*, pureza del color (croma) y ángulo de tono (matiz). En

laboratorio se determinó la concentración de N mediante el método microkjeldahl. Las concentraciones de N en las hojas se relacionaron con las reflectancias obtenidas con el radiómetro y las imágenes de escáner en las bandas azul, verde y roja, y sus dimensiones CIELAB L*, a* y b*, pureza del color (croma) y ángulo de tono (matiz) mediante el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS, 2003).

Palabras claves: biotelemática, espectroradiómetro, reflectancia, *Capsicum annuum*, *Fragaria x ananassa*, sensores remotos, escáner de escritorio.

REFLECTANCE IN PEPPER AND STRAWBERRY LEAVES FOR DIAGNOSIS NUTRIMENTAL

ABSTRACT

The development of remote sensing by developed countries, has generated high resolution satellite images, and tools that provide accurate information: digital cameras, spectrometers, ceptometer, quantum sensors linear canopy analyzers, among others, as well as powerful computing devices, software for the digitization and analysis of real time information. Thus, the objective of this research was to generate new technologies that help to provide greater certainty and marketing competitiveness, greater production value in the futures markets, crop insurance value and production, through generation of knowledge and information in real-time for protected and in field agriculture, supported by remote sensing and photobiology.

In order to find an economical, fast and reliable to estimate for nitrogen (N), an experiment was established in the greenhouses of Chapingo. The experimental unit consisted of one pepper or strawberry plant, established in white polyethylene bags caliber 600 of 100x30 cm at a distance of 1.5 m between rows and 0.3 m between plants. As substrate we used a mixture of coconut fiber and red tezontle, 50/50 (v / v). Nutrient solutions were used with four levels of N: 0, 4, 12 and 20 molc m⁻³ (in the last treatment 4 molc m⁻³ corresponded to NH₄⁺) from the Steiner solution. The experimental design was completely randomized with four replications. In fruiting in each experimental unit, we selected six blades and reflectancy was measured and then scanned. Later, with the VISUAL BASIC computer program, each image was separated into its primary colors (blue, green and red bands) and gave dimensions CIELAB L*, a* b* color purity (chroma) and hue angle (hue). In laboratory N concentration was determined by the method of microkjeldahl. Concentrations of N in the leaves were related to reflectances obtained with the radiometer and scan images in the bands blue, green and red, and its dimensions CIELAB L*, a* b* color purity (chroma) and angle tone (hue) using the statistical program Statistical Analysis System (SAS, 2003).

Keywords: biotelematic, spectroradiometer, reflectance, *Capsicum annuum*, *Fragaria x ananassa*, remote sensing, desktop scanner

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Son muchos los factores que afectan el rendimiento y la calidad de los cultivos, la nutrición es uno de los más importantes. El estado nutrimental es la situación que guardan los nutrimentos esenciales en las plantas además de su proporción respecto a otros nutrimentos. En un estado nutrimental óptimo generalmente no se presentan sintomatología y es la situación que se considera “normal” en una planta determinada. Sin embargo, cuando existe un desequilibrio nutricional severo, ocurren síntomas visuales en la planta. La única manera de saber si un cultivo está nutrido es hacer un análisis de tejido durante la estación de crecimiento. El análisis de tejido es una herramienta que nos ayuda en el monitoreo y en la evaluación del estado nutrimental de los cultivos (Reuter y Robinson, 1986). Actualmente, las técnicas para detectar anomalías nutrimentales en los cultivos son muy lentas y costosas, por lo que, la evaluación del estado nutrimental en cultivos intensivos mediante imágenes digitales es una alternativa prometedora para llevar a cabo un mejor manejo nutrimental de los cultivos.

La percepción remota ofrece una solución viable para abatir los costos asociados con la detección de estrés en plantas a diferentes escalas en la agricultura. La radiación solar interactúa con muchos de los compuestos importantes para el crecimiento y desarrollo de los cultivos, resultando en características de reflectancia identificables. Los que contribuyen con la reflectancia comúnmente son clorofila, agua, proteínas y materiales de la pared celular. La deficiencia de nitrógeno disminuye el rendimiento y calidad al limitar la síntesis de aminoácidos y clorofila. Los síntomas visuales por estrés de nitrógeno incluyen clorosis de la planta y senescencia de las hojas (Marschner, 1995).

La percepción remota ha sido usada generalmente para monitorear la salud de cultivos de alto valor comercial, ahora es práctica recurrente para uso en cultivos agrícolas en general.

Para llevar a cabo el análisis digital de la reflectancia de las hojas es necesario tener una medida del color de las mismas, para lo cual se debe determinar el color de cada píxel en la superficie de la hoja. Un scanner de cama permite obtener información espectral concentrada en el espectro visible. Los datos se almacenan en imágenes como coordenadas en las regiones del espacio rojo, verde y azul (RGB). En este espacio los colores se representan como una mezcla de rojo, verde y azul en una

escala de 8-bit, esto es, en un rango donde las intensidades de estos colores varían de 0 a 255. (Leon *et al*, 2006).

Los espacios de color son sistemas en el que se describen los colores de forma numérica como CIE LAB, HSB, HSL, RGB etc. Para superar las limitaciones de cromaticidad en diagramas como RGB la CIE recomienda utilizar una escala de colores uniforme como es CIE 1976 ($L^*a^*b^*$). Estas escalas de colores se basan en la teoría de visión de los colores opuestos, la cual dice que dos colores no pueden ser verde y rojo o azul y amarillo al mismo tiempo. Por lo cual un solo valor debe utilizarse para describir los atributos rojo/verde y amarillo/azul. El CIE Lab es un modelo que utiliza ejes para la brillantez (L) y valores en rojo-verde (a) azul-amarillo (b). En la Figura 1 de Poce-Fatou, *et al* 2011, la escala de color CIE LAB es una escala de color aproximadamente uniforme.

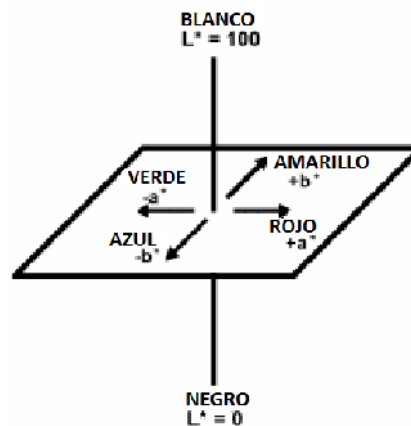


Figura 1. Escala de color CIELAB

En una escala de color uniforme, las diferencias entre puntos trazados en el espacio de color corresponden a diferencias visuales entre los colores trazados. El espacio de color CIE LAB es organizado en una forma de cubo. El eje L^* corre de arriba abajo. El máximo valor para L^* es 100, que representa un difusor de reflejado perfecto. El mínimo para L^* es el cero, que representa negro. El eje a^* y b^* no tienen límites específicos numéricos. Positivo a^* es rojo. Negativo a^* es verde. Positivo b^* es amarillo. Negativo b^* es azul.

Actualmente no existe un programa comercial para medir el color con $L^*a^*b^*$ en píxeles. Dado que los digitalizadores proveen información en el sistema de color RGB en píxeles por lo que es necesario generar un programa de computo en Visual Basic

con base en la transformación de las coordenadas espaciales de color RGB en coordenadas espaciales $L^*a^*b^*$.

Las mediciones de propiedades ópticas o espectrales han demostrado que generan índices de reflectancia basados en longitudes de onda del espectro visible y del infrarrojo cercano para determinar la salud de los cultivos.

Por tal motivo, en el presente trabajo se realizaron experimentos con la finalidad de diagnosticar deficiencia y toxicidad de N, en plantas de pimiento y fresa cultivados hidropónicamente en invernadero, mediante imágenes digitales. Además, se obtuvo la regresión entre la reflectancia de cada banda del radiómetro así como de las imágenes sus bandas (azul, verde y roja) y sus dimensiones CIELAB L^* , a^* y b^* , pureza del color (croma) y ángulo de tono (matiz) del cultivo de pimiento y fresa con las deficiencias y toxicidades de N inducidas y la concentración de N en follaje. Lo anterior fue con el propósito de diagnosticar deficiencia y toxicidad de N antes de que éstas se manifiesten visualmente.

Los resultados de esta investigación se presentan a manera de artículos, y se presentan en el orden siguiente:

En el capítulo IV se presenta el artículo titulado: CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO EN HOJAS DE PIMIENTO (*Capsicum annuum L.*) CON UN ESCÁNER DIGITAL. Esta investigación cubrió el objetivo de Identificar deficiencias y exceso de N en hojas de pimiento a través de imágenes digitales de escáner.

En el capítulo V se presenta el artículo titulado: ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO EN PIMIENTO POR ESPECTRORADIOMETRÍA. Esta investigación cubrió el objetivo de Identificar deficiencias y exceso de N en hojas de pimiento y fresa con el radiómetro CROPSACAN.

En el capítulo VI se presenta el artículo titulado: ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO EN FRESA MEDIANTE UN ESCANER DIGITAL. Esta investigación cubrió el objetivo de Identificar deficiencias y exceso de N en hojas de fresa con el escáner.

Al final de este documento se presentan las conclusiones generales obtenidas de esta investigación.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.2. Interacción de la radiación y la planta

La reflectancia y transmisión son definidas como las tasas de radiación reflejada o transmitida de la radiación incidente. La radiación incidente que no es reflejada o transmitida por la hoja es absorbida.

La interacción de la radiación solar con las moléculas de las plantas controla la reflectancia visible e infrarroja. Los componentes bioquímicos y estructurales influyen en la tendencia de las plantas para absorber, transmitir, y reflejar diferentes longitudes de onda de la radiación solar 300-3000 nm.

La absorción de radiación de onda corta por parte de las plantas es controlada por interacciones moleculares dentro del tejido vegetal, donde los electrones absorben la radiación solar entrante en longitudes de onda controladas por uniones químicas y estructurales (Gates, 1965; Jones, 1991). Por lo tanto, los cambios en las concentraciones de químicos absorbentes proveen una base para los cambios en absorción, transmisión, y reflectancia vegetal.

Los dos componentes de absorción visible e infrarroja principalmente en las hojas de las plantas son clorofila y agua. La absorción por clorofila es principalmente afectada por las transiciones de electrones ente 430 y 460 nm, y 640 y 660 nm (Taiz y Zeiger, 2002), mientras que las bandas de absorción del agua se centran alrededor de 970 nm, 1200 nm, 1450 nm, y 1780 nm. Otros compuestos bioquímicos absorbentes importantes incluyen proteínas, lípidos, almidón, celulosa, N, y aceites. La estimación de las concentraciones de estos compuestos bioquímicos por medio de la reflectancia infrarroja es difícil dados los traslapes de las bandas de absorción de varios componentes bioquímicos.

Todo objeto en la naturaleza posee una distribución única de radiación electromagnética, ésta puede ser reflejada, transmitida o absorbida (Soria *et al.*, 1998). En este principio se basa la curva de reflectancia espectral o firma espectral, ya que cada especie vegetal presenta una reflectancia exclusiva según sus características morfológicas, fisiológicas, nutrimentales o causadas por efecto de un déficit de humedad. La señal que recibe el sensor corresponde a la energía electromagnética reflejada, a lo que le llamamos o designamos el color. La firma espectral es distinta según las longitudes de onda (Soria *et al.*, 1998).

3.3. Propiedades espectrales de las plantas

Aunque la clorofila es el pigmento más importante en la fotosíntesis en el proceso, intervienen otros pigmentos auxiliares que la complementan. Existen en la membrana interna de los cloroplastos la clorofila -a- (azul-verdoso), la clorofila -b- (verde-amarillenta) y en menor grado carotenos y xantofilas formando (junto con proteínas portadoras) dos sistemas de pigmentos llamados foto sistema I (FSI) y foto sistema II (FSII), cada uno con cierto número de moléculas individuales. El FSI contiene moléculas de clorofila -a-, clorofila -b- y carotenos. El FSII contiene en otras proporciones las dos clorofilas mencionadas y carotenos. Cada tipo de pigmento absorbe ciertas longitudes de onda de luz. Al haber un sistema formado con diferentes pigmentos, es más amplia la gama de longitudes de onda que pueden absorberse. Parece ser que la energía de excitación del electrón puede transferirse de molécula a molécula por un fenómeno llamado resonancia magnética y de los receptores finales de esta energía son ciertas moléculas de la clorofila -a- a las que se les ha dado el nombre de centros de reacción. Ahí los electrones son excitados hasta un grado energético tal que abandonan la molécula y fluyen por una cadena de sustancias captoras y transportadoras de electrones a través de reacciones de oxidoreducción.

Existen aproximadamente 400 moléculas de pigmentos receptores de fotones en el centro de reacción; al conjunto se le da el nombre de antena o complejo cosechador de luz. Se cree que solo las moléculas de los centros de reacción son capaces de lanzar electrones fuera de la clorofila, hacia los compuestos receptores de electrones.

Todas las demás moléculas de clorofila -a-, clorofila -b- y demás pigmentos actúan como antenas para captar diversas longitudes de onda (azul-rojo) y transmitir esta energía de excitación de molécula en molécula hasta los centros de reacción.

En el FSI las moléculas de clorofila -a- que se activan (oxidán) por una longitud de onda de 700 nm son las que constituyen el centro de reacción. Por ello al FSI se le conoce como P_{700} . En el FSII, el centro de reacción lo constituyen las moléculas de clorofila -a- activadas con longitudes de onda de 680 nm. Al FSII se le conoce como P_{680} (Salisbury y Ross, 1994).

La variación de la reflectancia del dosel está regida por las propiedades ópticas de las hojas. Estas propiedades están relacionadas con la capacidad de absorción de la luz (Baret *et al.*, 1994). La absorbancia por el follaje de los cultivos en el espectro visible

depende principalmente de la concentración de las moléculas de clorofilas y carotenoides y, es menor en la región de longitud de onda de 550 nm, donde el pico de la reflectancia es frecuentemente menor de 20 %. La deficiencia de algunos nutrimentos influye a que exista una menor cantidad de pigmentos y consecuentemente el color de la hoja presente una menor intensidad, ocasionando una mayor reflectancia. Plantas saludables reflejan más luz verde que plantas enfermas o cloróticas (Palacios-Velez y Palacios-Sánchez, 2003).

3.4. Estrés nutrimental y reflectancia espectral

La clorofila domina la reflectancia y transmisión de radiación visible de la hoja. El N es un componente principal de la clorofila (Taiz y Zeiger, 2002), y la concentración de clorofila a menudo se correlaciona estrechamente con la concentración de N en las hojas (Costa *et al.*, 2001). La clorofila absorbe la radiación roja y azul, resultando en poca reflectancia de estos colores en la vegetación verde.

El pico de absorción azul se traslapa con la absorción de carotenoides, por lo tanto, la reflectancia azul generalmente no es usada para estimar la concentración de clorofila (Sims y Gamon, 2002). La máxima absorción roja se da entre 660 y 680 nm (Curran, 1989), pero relativamente bajas concentraciones de clorofila pueden saturar esta región de absorción (Sims y Gamon, 2002). Por lo tanto, la concentración de clorofila se predice generalmente de la reflectancia en el rango de 550 ó 700 nm, porque estas regiones se saturan con mayores concentraciones de clorofila.

Los cambios en la forma del espectro de reflectancia entre 550 y 660 nm a veces pueden ser usados para identificar clorosis (Carter y Spiering, 2002).

El mesófilo de la hoja refleja una gran proporción de la radiación NIR (Taiz y Zieger, 2002). La región de rápido incremento en reflectancia entre las regiones roja e infrarroja del espectro, es a menudo usada para indicar la salud de la planta (Jago *et al.*, 1999). Horler *et al.* (1983) observaron que la concentración de clorofila en las hojas se correlaciona con la máxima pendiente de reflectancia en el límite entre los dominios espectrales rojo y NIR.

Zhao *et al.* (2005) realizaron un experimento en plantas de sorgo, donde usaron como fuente de nutrimentos la solución nutritiva de Hoagland al 100, 20 y 0 % de N.

Cuantificaron la reflectancia en follaje y encontraron que las plantas irrigadas con 0 % de N presentaron significativamente un incremento lineal en la reflectancia en las longitudes de onda 555 y 715 nm ($r = -0.82$). Estos autores concluyen que la concentración de N en el follaje de sorgo puede ser estimado por medio de la reflectancia en dicha longitud de onda.

En el mismo año, Zhao et al. establecieron un experimento con algodón en el que aplicaron N a 0, 50, 100, 200 %, respectivamente de la dosis recomendada, y mediante la cuantificación de la reflectancia determinaron que se relaciona estrechamente con la concentración de N en follaje. Estos resultados nos indican que es posible detectar la deficiencia de N de forma temprana, antes que ocurra un efecto irreversible en el cultivo. Noh *et al.* (2006) mencionan que las plantas deficientes en N presentan una coloración amarilla, por lo que no sólo se puede detectar la deficiencia así también el grado de deficiencia dicho nutrimento.

3.5. Importancia del N para las plantas

El N es un nutrimento de alta demanda por las plantas los requerimientos en las primeras etapas de desarrollo son bajos, pero la demanda de N se incrementa conforme la planta crece. Algunas plantas en la etapa máxima de desarrollo pueden demandar cantidades de 3 a 5 kg ha⁻¹ día⁻¹. Posteriormente cuando la planta madura la demanda de N disminuye. El N es un elemento constituyente de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Por esta razón la materia seca vegetal puede alcanzar hasta 6% de N, y el intervalo de concentración en el tejido normalmente varía desde 0.5 hasta 6%. Las grandes cantidades requeridas por las plantas, en combinación con la baja disponibilidad del N en los suelos agrícolas, hacen del N el nutrimento limitante más frecuente para los cultivos (Epstein y Bloom, 2005). De acuerdo con Alcántar *et al.* (2007) el N está presente en coenzimas, nucleótidos, amidas, ureidos y en la molécula de clorofila y participa en todas las reacciones enzimáticas y en todo el metabolismo. El N es esencial en la división y expansión celular, por lo tanto en el crecimiento (Pérez y Castro, 2010), también es constituyente de una multitud de compuestos llamados alcaloides, que no son metabolitos esenciales y se cree sirven como compuestos que almacenan N (Jones *et al.*, 1991). Una deficiencia de N limita la división y expansión celular, el desarrollo de los cloroplastos, por lo que se producen plantas débiles y

enanas, con crecimiento lento, que maduran precozmente, con rendimiento y calidad significativamente bajos. Los síntomas iniciales y más severos se ven en las hojas más antiguas, donde las proteínas se hidrolizan y el N es translocado como aminoácido de los tejidos viejos a las porciones en crecimiento activo de la planta. La proteólisis resulta en un colapso de cloroplastos, con una disminución en el contenido de clorofila y el amarillamiento de las hojas (Marschner, 1995). El estrés nutrimental por deficiencia de N está involucrada en la producción de los compuestos nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP+) y adenosin trifosfato (ATP). Estos compuestos son utilizados por la ribulosa-1-5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) para la fijación de CO₂. Las plantas con exceso de N tienen follaje más abundante de color verde oscuro y tienden a ser más susceptibles a enfermedades y a la invasión de insectos debido a que su savia contiene gran cantidad de aminoácidos libres, azúcares y nitratos que las vuelven más atractivas (Cisneros y Godfrey, 2001; Ortega-Arenas *et al.*, 2006). Por lo anterior, es indispensable conocer el contenido de N en los cultivos pues contribuye en gran medida al crecimiento y desarrollo óptimo de la planta durante su ciclo fisiológico y como consecuencia, se ve reflejado en el rendimiento. Existen diversos métodos, desde los que emplean un balance entre demanda y suministro de N (Palma-López *et al.*, 2002), los cuales requieren de análisis de laboratorio; otros métodos utilizan equipos portátiles, como el medidor de nitratos en savia (Rangel-Lucio *et al.*, 2002), el estimador de clorofila (Varvel *et al.*, 2007), hasta sensores remotos (Solari *et al.*, 2008).

3.6. Diagnóstico nutrimental

Mediante el estudio de la nutrición vegetal se pretende establecer con que capacidad actúan cada uno de los elementos esenciales para la planta; también en que cantidad son necesarios, cómo asegurar que las plantas reciban estos elementos en la proporción y cantidad adecuada, diagnosticar y evitar problemas nutrimentales (Castro, 1998).

El diagnóstico nutrimental se basa en métodos para identificar deficiencias, toxicidades o desbalances nutrimentales. Una deficiencia nutrimental ocurre cuando un nutriente es insuficiente o no puede ser asimilado por la planta. De manera similar, una toxicidad

nutrimental ocurre cuando existen condiciones de exceso, desbalance o condiciones ambientales desfavorables.

Desde el punto de vista nutrimental, las plantas cultivadas pueden manifestar deficiencia o exceso del nutrimento. La clorosis y la necrosis así como el patrón de distribución de ambas son criterios importantes en el diagnóstico nutrimental. Los síntomas visibles de la deficiencia de un nutrimento son más específicos que los de su toxicidad (Gárate y Bonilla, 2001).

La estimación de las cantidades de nutrientes requeridas para alcanzar cierto rendimiento precisa ciertos conocimientos teóricos y el empleo de técnicas de análisis químico de suelo y planta. Estas últimas se emplean para medir los contenidos totales de nutrientes en la planta al momento de la colecta (cualquiera que este sea), y son análisis que se realizan con anterioridad y sus valores son conocidos. Este dato, junto con los rendimientos esperados o posibles y los índices de cosecha respectivos, se emplea para calcular la demanda nutrimental, esto es, los kilogramos por hectárea de un nutrimento que la planta debe poder extraer desde el suelo e incorporar a sus tejidos para alcanzar los rendimientos indicados. El análisis de tejido vegetal tiene tres variantes bien definidas, cuyos objetivos son, en general, distintos. Estas variantes son: el análisis del total de la parte aérea de la planta, el análisis de hojas u otros órganos de referencia y el análisis de savia (Etchevers, 1999).

LITERATURA CITADA

Alcántar G. G., Trejo-Téllez, L.I., Fernández P., L. y M. Rodríguez Mendoza. 2007. Elementos esenciales. pp. 7-48. In: Nutrición de Cultivos. Editorial Mundi-Prensa. México.

Baret, F., V. C. Vanderbilt, M. D. Steven and S. Jacquemoud. 1994. Use of spectral analogy to evaluate canopy reflectance sensitivity to leaf optical properties. *Remote Sensing of Environment*. 48:253-260.

Carter, G. A., y B. A. Spiering. 2002. Optical properties of intact leave for estimating chlorophyll concentration. *J. Environ. Qual.* 31:1424-1432.

Castro, B. R. 1998. Índices nutrimentales en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 87 p.

Cisneros, J. J. and L. D. Godfrey. 2001. Midseason pest status of the cotton aphid (Homoptera: Aphididae) in California cotton: is nitrogen a key factor? *Environmental Entomology* 30: 501- 510.

Costa, C., L. M. Dwyer, P. Dutilleul, D. W. Stewart, B. L. Ma, y J. D. Smith. 2001. Inter-relationships of applied nitrogen, spad, and yield of leafy and nonleafy maize genotypes. *J. Plant Nutr.* 24:1173-1194.

Curran, P. J. 1989. Remote sensing of foliar Chemistry. *Remote Sens. Environ.* 30:271-278.

Epstein, E. and Bloom, A.J. 2005. Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. Second edition. Sinauer Associates, USA.

Etchevers, J. D. 1999. Técnicas de diagnóstico útiles en la medición de la fertilidad del suelo y el estado nutrimental de los cultivos. *Terra* 17:209-219.

Gárate, A. e I. Bonilla. 2001. Nutrición mineral y producción vegetal. In: Azcón-Bieto, J. y M. Talón (Coordinadores). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. McGraw-Hill e Interamericana de España, S. A. U. Madrid, España. pp. 113-130

Gates D. M., H. J. Keegan, J. C. Schleter, and V. R. Weidner. 1965. Spectral properties of plants. *Applied Optics* 4(1):11-20.

Horler, D.N.H., M. Dockray, J. Barber, and A.R. Barringer. 1983. Red edge measurements for remotely sensing plant chlorophyll content. *Adv. Space Res.* 3:273-277.

Jago, R. A., M.E.J. Cutler, y P. J. Curran. 1999. Estimating canopy chlorophyll concentration from field and airborne spectra. *Remote Sens. Environ.* 68:217-224.

Jones, J. B. Jr., B. Wolf, and H. A. Mills. 1991. *Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide.* Micro-Macro-Publishing, Athens, GA, USA.

Leon A. K, M. B. Domingo, P. C. Franco, and C. A. Jorge Leon. 2006. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images. *Food Res. Internat.* 39: 1084–1091.

Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants.* Academic Press. San Diego, CA. USA.

Noh H., Q. Zhang, B. Shin, S. Han, and L. Feng. 2006. A neural network model of maize crop nitrogen stress assessment for a multi-spectral imaging sensor. *Biosystems Engin.* 94:477 485.

Ortega A. L. D., A. D. A. Miranda y V. M. Sandoval. 2006. Densidad de huevos y ninfas de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (WEST.) en *Gerbera jamesonii* H. Bolus con diferentes regímenes de fertilización nitrogenada. *Agrociencia* 40: 363-371.

Palacios-Vélez, E. y J. E. Palacios-Sánchez. 2003. *Introducción a los sensores remotos y a los sistemas de información geográfica (Agricultura Asistida por Sensores Remotos).* Colegio de Postgraduados. Hidrociencias. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

Palma-López, D. J., S. Salgado-García, J. J. Obrador-Olán, A. Trujillo-Narcia, L. del C. Lagunes-Espinoza, J. Zavala-Cruz, A. Ruiz-Bello y M. A. Carrera-Martel. 2002. Sistema integrado para recomendar dosis de fertilización en caña de azúcar (SIRDF). *Terra* 20: 347-358.

Pérez G. M. y R. Castro B. 2010. *El chile manzano.* Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 128 p.

Poce F. J. A., M. Bethencourt, D. F. J. Moreno, and S. J. M. Palacios. 2011. Using a flatbed scanner to measure detergency: A cost-effective undergraduate laboratory. *J. Chem. Educ.* 88:1314–1317.

Rangel-Lucio, J.A., G. Alcántar-González, J. Z. Castellanos-Ramos, E. García-Moya, C. Trejo-López y H. Vaquera-Huerta. 2002. Comparación de dos pruebas para diagnosticar nitrógeno en sorgo. *Terra* 20: 383-390.

Reuter, D.J. y J.B. Robinson. 1986. Plant analysis and interpretation manual. Inkata Press. Sydney, Australia.

Salisbury, B. F. y C. W. Ross. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Interamericana. México D. F. 759 pp.

Sims D. A. y J. A. Gamon. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81:337-354.

Solari, F., J. Shanahan, R. Ferguson, J. Schepers, and A. Gitelson. 2008. Active sensor reflectance measurements of corn nitrogen status and yield potential. *Agronomy Journal* 100: 571–579.

Soria R. C., C. A. Ortiz-Solorio, F. G. Islas y F. H. Volke. (1998). Sensores remotos: Principios y aplicaciones en la evaluación de los recursos naturales; Experiencias en México. Colegio de Postgraduados, CONACYT, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C. Publicación especial 7. México. pp. 93.

Taiz L. and E. Zeiger. 2002. Plant physiology. The Benjamin /Cummings Publishing Company, CA, USA. 565 p.

Varvel, G. E., W. W. Wilhelm, J. F. Shanahan and J. S. Schepers. 2007. An algorithm for corn nitrogen recommendations using a chlorophyll meter based sufficiency index. *Agronomy Journal* 99: 701-706.

Zhao, D., K. R. Reddy, V. G. Kakani and V. R. Reddy. 2005. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyper spectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy* 22:391-403

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

Medir la reflectancia foliar y compararla con muestras de pimiento y fresa expuestas a diferentes niveles de suministro de N, para determinar la utilidad de las firmas espectrales de hojas de pimiento y fresa para su uso en el diagnóstico de estrés por N.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Obtener la reflectancia en hojas de pimiento y fresa mediante imágenes digitales (con escáner) y un radiómetro (CROPSCAN).
- Determinar la concentración de nitrógeno en hojas de pimiento y fresa, en plantas sometidas a diferentes niveles de nitrógeno en la solución nutritiva.
- Correlacionar los resultados de reflectancia con la concentración de nitrógeno en hojas de pimiento y fresa para determinar la viabilidad del uso de imágenes digitales (obtenidas con un escáner) y la reflectancia obtenida con un radiómetro pasivo (CROPSCAN) para el diagnóstico nutrimental.

2.2 Hipótesis General

La reflectancia producida por las plantas de pimiento y fresa, con diferentes niveles de suministro, conduce a la identificación de deficiencia y exceso de nitrógeno.

2.2.1 Hipótesis Particulares

- La concentración de N en plantas de pimiento y fresa se relaciona de manera negativa con la reflectancia de imágenes digitales de sus hojas obtenidas con escáner.
- La concentración de N en plantas de pimiento se relaciona de manera positiva con la reflectancia del infrarrojo cercano y negativo en el visible, obtenida mediante el radiómetro CROPSCAN midiendo sus hojas.
- En el espacio espectral visible e infrarrojo cercano se detectan cambios en las propiedades ópticas de la hoja, resultado del estrés por N.

IV. CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO EN HOJAS DE PIMIENTO (*Capsicum annuum* L.) CON UN ESCÁNER DIGITAL

QUANTIFICATION OF NITROGEN IN PEPPER LEAVES (*Capsicum annuum* L.) WITH A DIGITAL SCANNER

De la Cruz-Durán Jairo Aarón¹, Sánchez-García Prometeo^{1‡}, Sandoval-Villa Manuel¹, Trejo-Téllez Libia Iris¹, Ojeda-Trejo Enrique¹, Goytia-Jiménez María Antonieta

2

RESUMEN

Para generar un método sencillo, confiable y económico de diagnóstico nutrimental en pimiento (*Capsicum annuum* L.), se estableció un estudio en invernadero y evaluaron los cambios de la reflectancia en hojas y su relación con el contenido de N. Se emplearon soluciones nutritivas sin N y con 4, 12 y 20 meq L⁻¹. En la etapa de fructificación se obtuvieron imágenes digitales de hojas recientemente maduras con un escáner. Cada imagen se separó con el programa Visual Basic en colores primarios de luz visible, azul (450 – 495 nm), verde (495 – 570) y rojo (620 – 750 nm), y se obtuvieron dimensiones CIELAB L*, a* y b*, pureza del color (croma) y ángulo de tono (matiz). En las mismas hojas se determinó la concentración de N con el método microkjeldahl. La longitud de onda en el espectro verde, el valor de b* y pureza del color correlacionaron en forma inversa con la concentración de N en hojas. Es posible determinar con precisión, con algunas propiedades ópticas de las hojas la concentración de N, en poco tiempo y sin un análisis químico en pimiento.

Palabras clave: *Capsicum annuum* L., firma espectral, reflectancia

ABSTRACT

To generate a simple, reliable and economical nutritional diagnosis in pepper (*Capsicum annuum* L.), established a greenhouse study and assessed changes in leaf reflectance and its relationship to the content of N. Nutrient solutions were used without N and 4, 12 and 20 meq L⁻¹. In the fruiting stage digital images were obtained recently mature leaves with a scanner. Each image was removed with the Visual Basic program on primary colors of visible light, blue (450 - 495 nm), green (495-570) and red (620 - 750 nm) and extracted dimensions CIELAB L^{*}, a^{*} and b^{*}, color purity (chroma) and hue angle (hue). In the same leaves concentration was determined by the method of N microkjeldahl. The wavelength in the green spectrum, the value of b^{*} color purity and inversely correlated with the concentration of N sheets. It is possible to determine precisely, with some optical properties of leaves N concentration in a short time and without a chemical analysis in pepper.

Key words: *Capsicum annuum* L., spectral signature, reflectance

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial para el desarrollo de los cultivos, debido a que cumple una función estructural en coenzimas, nucleótidos, amidas, ureidos y en la molécula de clorofila; participa en todas las reacciones enzimáticas y en todo el metabolismo de la planta, y es también esencial en la división y expansión celular (Pérez y Castro, 2010). Además, el N es constituyente de una multitud de alcaloides, que no son metabolitos esenciales y sirven como compuestos que almacenan N (Jones *et al.*, 1991).

Las plantas con exceso de N tienen follaje más abundante de color verde oscuro y tienden a ser más susceptibles a enfermedades y a la invasión de insectos debido a que su savia contiene gran cantidad de aminoácidos libres, azúcares y nitratos que las vuelven más atractivas (Cisneros y Godfrey, 2001; Ortega-Arenas *et al.*, 2006).

Es necesario mantener un nivel adecuado de N y su balance con otros nutrientes, debido a que correlaciona positivamente con el crecimiento de los cultivos y su rendimiento. Las técnicas convencionales para detectar anomalías nutrimentales en los cultivos intensivos, como el pimiento, son muy lentas (muestreo, traslado, preparación de la muestra, análisis químico e interpretación), además de que existen pocos laboratorios comerciales que entregan resultados confiables (Alcántar y Sandoval, 1999).

Existen varios métodos de diagnóstico nutrimental; algunos usan un balance entre demanda y suministro de N (Palma *et al.*, 2002) y requieren de análisis químicos en laboratorio, mientras que otros métodos utilizan equipos portátiles como el medidor de nitratos en savia (Rangel *et al.*, 2002), el medidor de clorofila portátil (Varvel *et al.*, 2007), y los sensores remotos (Solari *et al.*, 2008).

La evaluación del estado nutrimental en cultivos intensivos, mediante imágenes digitales es una alternativa prometedora para llevar a cabo estrategias del manejo nutricional de los cultivos (Ma *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 2008), ya que los cambios en el espectro de reflectancia de las hojas sirven como indicadores de deficiencias nutricionales; este método es rápido, no destructivo y relativamente económico (Adams *et al.*, 2000).

Desde 1960 se han realizado estudios acerca de los fenómenos que ocurren en la interacción de la luz con el tejido vegetal (Gates *et al.*, 1965; Thomas *et al.*, 1967).

Debido a que aproximadamente 10% del N total de las plantas se encuentra almacenado en las moléculas de clorofila, hay buena correlación entre la reflectancia espectral y el contenido de N en las hojas (Cho y Skidmore, 2006).

La percepción remota implica la medición de energía reflejada o emitida por objetos, sin entrar en contacto con ellos. Cada objeto examinado por percepción remota refleja un único espectro de longitudes de onda. Los sensores remotos se usan para detectar problemas como el estrés hídrico o estrés por deficiencias nutrimentales, el rendimiento y los índices de cosecha, además de ser incorporados a la agricultura de precisión. Una reducción de clorofila aumenta la reflectancia de la luz fotosintéticamente activa (Gitelson *et al.*, 2005).

La reflectancia de la luz en la longitud de onda del espectro visible (400±700 nm) se incrementa con la deficiencia de N por la reducción de clorofila (Walburg *et al.*, 1982; Blackmer *et al.*, 1994). Una reducción en la concentración de clorofila aumenta la reflectancia de la luz fotosintéticamente activa (Gitelson *et al.*, 2005). En otros estudios el objetivo ha sido la medición indirecta del verdor de las hojas a través de la medición de la reflectancia para estimar el contenido de N en la hoja de manera visual o con imágenes digitales (Gitelson *et al.*, 2005; Brizuela *et al.*, 2007; Solari *et al.*, 2008).

El análisis químico de tejido vegetal es el método de diagnóstico nutrimental más usado en los cultivos intensivos, desarrollados en condiciones protegidas; sin embargo, en la mayoría de los casos, se recurre a éste cuando el síntoma ya se detecta visualmente. De tal manera que el desarrollo de nuevos métodos de diagnósticos nutrimentales rápidos, económicos y confiables como el uso de las propiedades físicas de la hoja, adquieren cada vez mayor importancia en la agricultura de precisión.

El uso de dispositivos para la captura de imágenes digitales y el desarrollo de programas para su procesamiento y análisis se ha utilizado para la evaluación de enfermedades, alimentos y nutrimentos (Martin y Rybicki, 1998; Niemira *et al.*, 1999; Olmstead *et al.*, 2000). Diversas investigaciones han mostrado que la precisión y la exactitud de las mediciones hechas a través del análisis de imágenes con computadoras son mejores que las obtenidas por el método de análisis visual (Lindow y Webb, 1983; Martin y Rybicki, 1998). Actualmente los métodos de análisis digital no requieren programas de computadora especiales para evaluar imágenes obtenidas con diversos dispositivos (Bock, 2010).

Para llevar a cabo el análisis digital de la reflectancia de las hojas es necesario tener una medida del color de éstas, para lo cual se debe medir el color de cada píxel en la superficie de la lámina foliar. Un escáner de cama puede considerarse un espectrómetro capaz de obtener información espectral concentrada en el espectro de la luz visible. En este espacio los colores se representan como una mezcla de rojo, verde y azul (RGB) en una escala de 8-bit, esto es, en un rango donde las intensidades de estos colores varían de 0 a 255 (Leon *et al.*, 2006).

El espacio de color es un sistema en el que se describen los colores de forma numérica como CIE Lab, HSB, HSL, RGB, etc. Para superar las limitaciones de cromaticidad en diagramas como RGB, la CIE recomienda utilizar una escala de colores uniforme como es CIE 1976 ($L^*a^*b^*$). Estas escalas de colores se basan en la teoría de visión de los colores opuestos, la cual dice que dos colores no pueden ser verdes y rojos o azules y amarillos al mismo tiempo. Por lo cual, un solo valor debe utilizarse para describir los atributos rojo/verde y amarillo/azul. El CIE Lab es un modelo que utiliza ejes para la brillantez (L) y valores en rojo-verde (a) y azul-amarillo (b). En la Figura 2 de Poce-Fatou *et al.* (2011), la escala de color CIELAB es una escala de color aproximadamente uniforme.

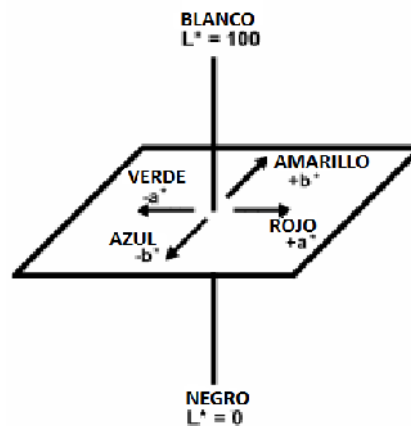


Figura 2. Escala de color CIELAB

En una escala de color uniforme, las diferencias entre puntos trazados en el espacio de color corresponden a diferencias visuales entre los colores trazados. El espacio de color CIELAB es organizado en una forma de cubo. El eje L^* corre de arriba abajo. El máximo valor para L^* es 100, que representa un difusor de reflejado perfecto. El mínimo para L^* es el cero, que representa el negro. El eje a^* y b^* no tienen límites específicos

numéricos. Positivo a^* es rojo, negativo a^* es verde, positivo b^* es amarillo y negativo b^* es azul.

Actualmente no existe un software comercial para medir el color con L^*a^*b en píxeles. Debido a que los escáneres proveen información en el sistema de color RGB en píxeles se requiere generar un programa de computo en Visual Basic basado en la transformación de las coordenadas espaciales de color RGB en coordenadas espaciales L^*a^*b .

El objetivo del presente estudio consistió en correlacionar las propiedades físicas de la hoja, obtenidas mediante un escáner comercial, con el contenido de N en hojas de pimiento para generar un método sencillo, confiable y económico que permita establecer un diagnóstico rápido en cultivos intensivos, desarrollados en condiciones protegidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en un invernadero de plástico tipo túnel en la Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, Estado de México. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos y diferentes niveles de N en forma de NO_3^- : 0, 4, 12 y 20 meq L^{-1} , de acuerdo con Steiner (Steiner, 1984) (Cuadro 1) y cuatro repeticiones. Las plantas de pimiento variedad CANNON que es un pimiento rojo de tipo blocky de alto rendimiento, frutos de excelente calidad, con amplia adaptabilidad a diversas zonas de producción, tiene pared gruesa y calibre grande, planta vigorosa, demanda poca poda, excelente sabor, resistencia: TM2 de la casa comercial ZERAIM MÉXICO se colocaron en un saco de cultivo de polietileno blanco calibre 600 μm y de 100 x 35 cm de largo y ancho, y a una distancia de 1.5 m entre hileras y 0.3 m entre plantas. Como sustrato se utilizó una mezcla de tezontle rojo con fibra de coco (50% y 50%, v/v) **Figura 3**. La unidad experimental consistió en una planta de pimiento.



Figura 3. Saco de cultivo de con tezontle rojo y fibra de coco como sustrato (50% y 50%, v/v).

Cuadro 1. Diseño de tratamientos

Nitrógeno	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	CO ₃ ²⁻	CE
				meq L ⁻¹					dS m ⁻¹
0	9	4	7	0	0	1	11	8	1.6
4	9	4	7	0	4	1	11	4	1.7
12	9	4	7	0	12	1	7	0	2.0
20	9	4	7	4	16	1	7	0	2.5

CE = conductividad eléctrica.

Muestreo de hojas y análisis químico del tejido vegetal

En la etapa de fructificación, a los 180 días después del trasplante (ddt), se seleccionaron diez hojas al azar en el segundo tercio del dosel de la planta (unidad experimental) y éstas fueron colocadas en el interior de un escáner de escritorio de cama plana con un fondo negro para eliminar las sombras, marca Genius modelo Vivid II 1200XE RGB, con una resolución de 400 puntos por pulgada (dpi) en formato JPG (Figura 4).

Digitalización de imágenes.

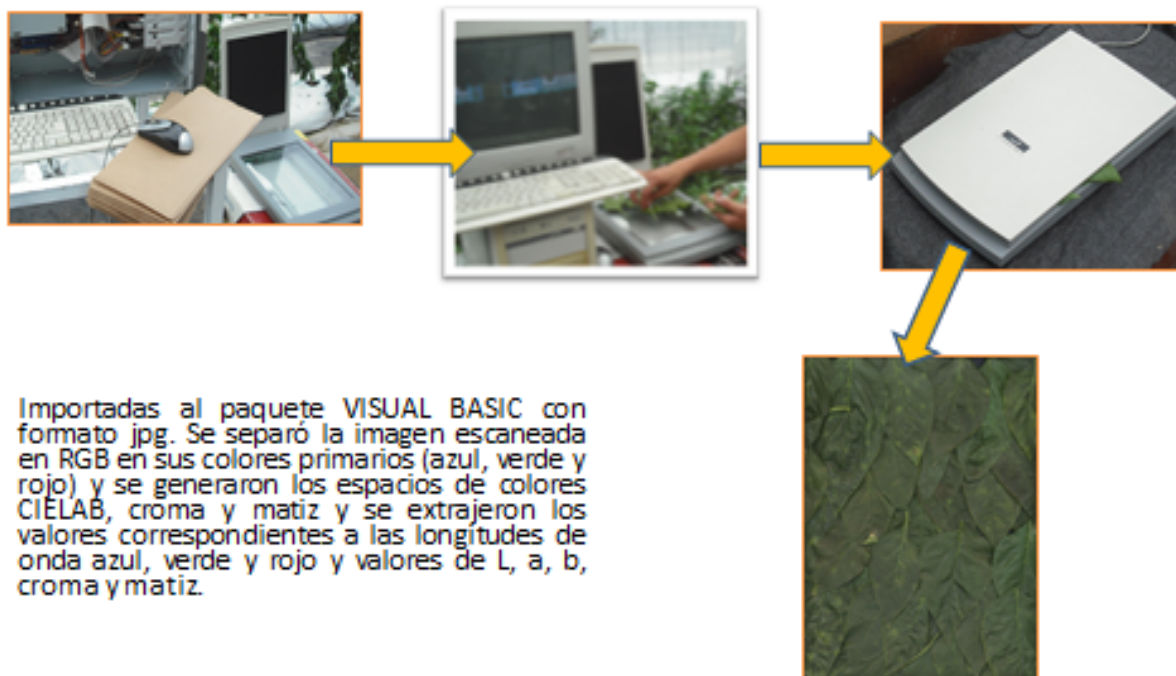


Figura 4. Obtención de las imágenes digitales mediante un escáner plano.

Para la generación del espacio de color CIE $L^*a^*b^*$ se separó la imagen escaneada en el espacio de color RGB (**Figura 5**) en sus colores primarios (espectros de luz azul, verde y rojo) y se generaron los espacios de colores CIELAB, Croma y matiz y se extrajeron los valores correspondientes a las longitudes de onda 450 - 495, 495 - 570 y 620 - 750 nm y L, a, b, cromas y matiz, respectivamente a partir de un programa elaborado en VISUAL BASIC.

ESPACIO DE COLOR RGB

MODELO ABSTRACTO MATEMÁTICO QUE DESCRIBE LA MANERA EN QUE LOS COLORES PUEDEN SER REPRESENTADOS BASÁNDOSE EN UNA LISTA DE ELEMENTOS ORDENADOS POR NÚMEROS TÍPICAMENTE, CON TRES O CUATRO COMPONENTES DEL COLOR.

MODELO RGB

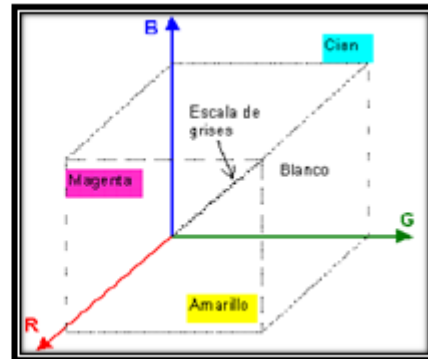


Figura 5. Espacio de color RGB.

El color de las hojas fue expresado en coordenadas en color espaciales (Comisión Internationale d'Eclairage (CIE) L^* , a^* y b^*). La escala CIELAB de coordenadas se relaciona con: L^* (Luminosidad) oscuro - brillante (0 = negro, 100 = blanco); a^* verde - rojo (valor negativo = más verde, valor positivo = más rojo o magenta); b^* azul - amarillo (valor negativo = más azul, valor positivo = más amarillo); Angulo de tono (matiz), grado de marrón (el más alto es el más marrón) y C^* Pureza del color (croma), Intensidad del color (el más alto es el más intenso).

Posteriormente, en las mismas hojas se cuantificó la concentración de N por el método microkjeldahl **ver Figura 6** (Alcántar y Sandoval, 1999). La concentración de N en hoja se relacionó con las reflectancias obtenidas en las bandas azul, verde y roja, L , a , b , ángulo del tono (matiz) y pureza del color (croma), mediante el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS, 2003).

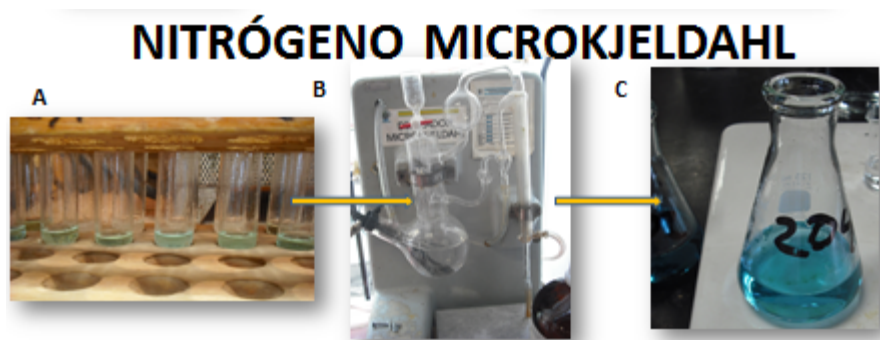


Figura 6. Proceso de obtención de los valores de N mediante el método microkjeldahl, A: Muestras ya predigestadas y digestadas listas para su destilación; B: Instrumento de destilación; C: Muestra ya titulada después de su destilación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 7 se observa que hubo diferencias estadísticas significativas para la concentración de N en hojas de pimiento como respuesta a los niveles crecientes de NO_3^- en la solución nutritiva.

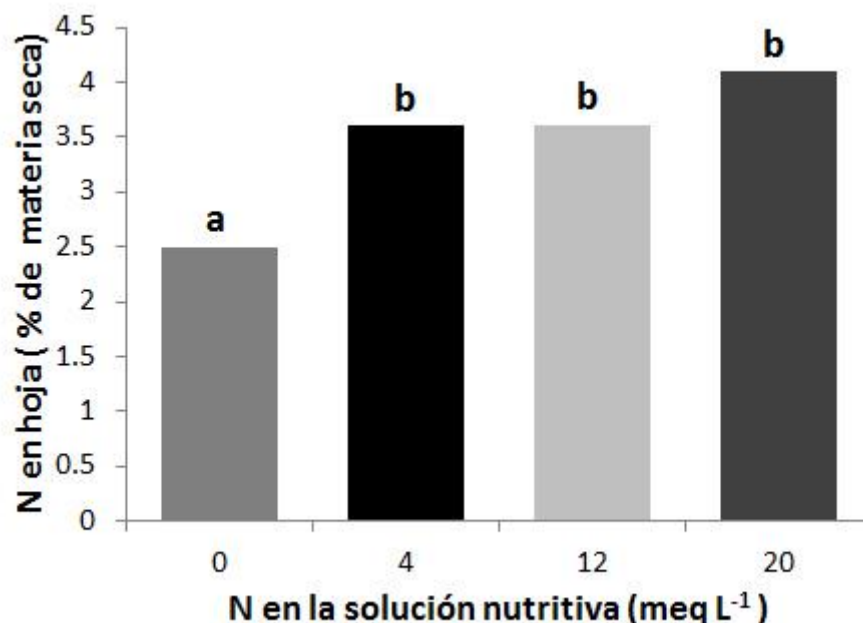


Figura 7. Concentración foliar de N en pimiento en función de la concentración de N en la solución nutritiva. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, (Tukey $\alpha = 0.05$).

Los resultados de la Figura 7 son importantes para la discusión posterior de los parámetros físicos, ya que en ésta se observa que el tratamiento con 0 meq L^{-1} de N fue estadísticamente diferente y menor que aquellos tratamientos en los que se suministraron dosis crecientes de N y esto permitirá establecer que cualquier cambio detectado por el escáner en la reflectancia, CIELAB, croma, matiz, etc., se debió precisamente al N contenido en la planta y no a otro factor.

Como respuesta a los tratamientos con N en la solución nutritiva en la Figura 8 se muestra la cantidad de luz reflejada (en valores digitales) en el espectro de la luz visible en hojas de pimiento.

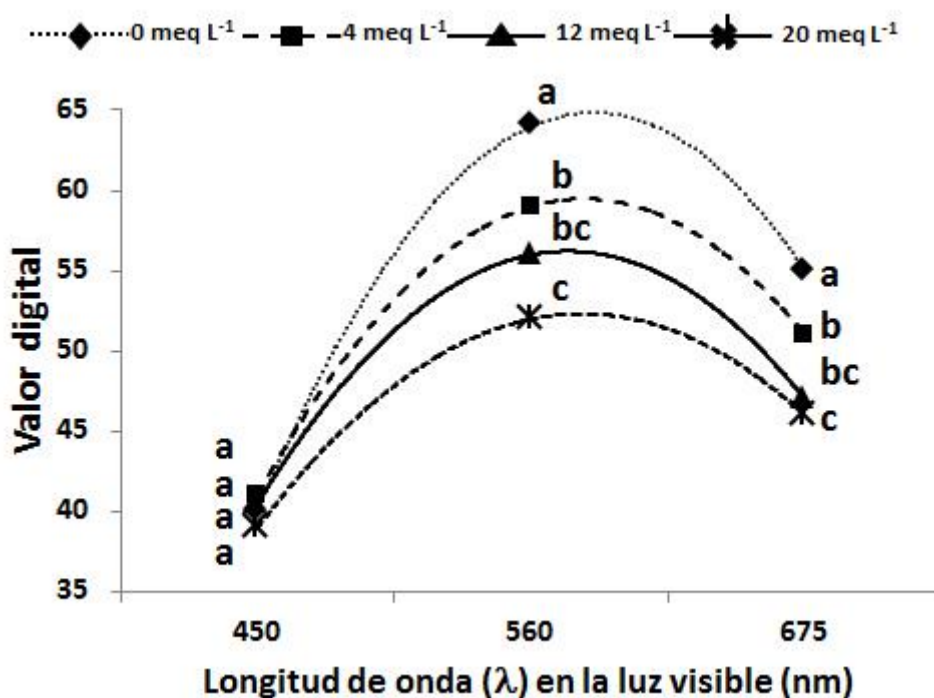


Figura 8. Reflectancia de luz (valores digitales en RGB) en hojas de pimiento, para los diferentes tratamientos con N. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, (Tukey $\alpha = 0.05$).

La prueba de comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) indicó que la reflectancia en hojas fue estadísticamente mayor en las plantas abastecidas con 0 y 4 meq L⁻¹ de NO₃⁻, mientras que aquellas a las que se suministró 12 y 20 meq L⁻¹ de NO₃⁻ la reflectancia fue menor y estadísticamente igual entre ellas (Figura 3). Lo anterior se atribuye a que las unidades experimentales con menores concentraciones de N en su tejido foliar presentan también una menor presencia de clorofila (Curran *et al.*, 2001). Al respecto, Cho y Skidmore (2006) indican que las bajas reflectancias de los cultivos saludables, observadas en la región visible del espectro electromagnético, obedecen principalmente a la intensa absorción de la molécula de clorofila. Ésta absorbe la radiación azul y roja y refleja el verde (Brizuela, 2007; Terashima *et al.*, 2009).

El pico de absorbancia de la banda azul por la clorofila se traslapa con la absorción de los carotenoides, por lo que la reflectancia azul no es usada para la estimación de la clorofila. Asimismo, la máxima absorbancia del espectro rojo ocurre entre 660 y 680 nm, pero las altas concentraciones de clorofila saturan esta región de absorción (Sims y Gamon, 2002), por lo que la concentración de clorofila se predice a partir de

reflectancias entre los 550 y 700 nm y, por consiguiente, la concentración de N en las hojas, ya que este nutrimento es un componente principal de la molécula de clorofila (Taiz y Zeiger, 2002; Zebarth *et al.*, 2002; Varvel *et al.*, 2007). Así el N y el contenido de clorofila están estrechamente correlacionados, de tal manera que una deficiencia de N incrementa la reflectancia de la radiación del espectro verde (Noh *et al.*, 2006).

De acuerdo con el análisis de regresión entre el N en la parte aérea y los valores digitales para el espectro azul, verde y rojo, además de CIELAB, croma y matiz (Cuadro 2) se observa que existió una asociación negativa y altamente significativa ($\alpha \leq 0.01$) entre la reflectancia en las bandas verde y rojo y la concentración de N en parte aérea.

Cuadro 2. Relación entre los valores digitales, obtenidos mediante digitalización de imágenes con un escáner, en las bandas azul, verde, roja, L, a, b, croma y matiz y la concentración de N en hojas de pimiento.

X	Modelo	R²
Banda azul	N(%)= -0.0716X+6.3155	0.01
Banda verde	N(%)= -0.1189X+10.351	0.74
Banda rojo	N(%)= -0.1675X+11.826	0.72
CIE-L	N(%)= -0.2774X+9.908	0.74
CIE-a	N(%)= 0.344X+5.9352	0.61
CIE-b	N(%)= -0.2392X+5.8536	0.75
croma	N(%)= -0.2038X+5.9801	0.75
matiz	N(%)= 0.2935X-33.712	0.57

X = Valor digital; N = concentración de nitrógeno en hoja; R² = coeficiente de determinación.

Estos resultados coinciden con Peñuelas *et al.* (1994) quienes identificaron un incremento en reflectancia entre los 500 y 600 nm en hojas de girasol estresadas por N. Un patrón similar fue reportado por Gamon *et al.* (1992) en la reflectancia de la cubierta foliar en girasol; específicamente observaron cambios entre 8:00 y 12:00 h en reflectancia entre plantas estresadas y no estresadas. De igual manera Lihong *et al.* (2004), encontraron que la reflectancia a los 560 nm correlacionaba de manera negativa con la concentración de N en el follaje del cultivo de arroz. Con estas observaciones

Lihong *et al.* (2004) generaron un modelo matemático lineal para predecir las concentraciones de N en el follaje a partir de las reflectancias a 560 nm con un coeficiente de ajuste del 85% ($R^2 = 0.85$), muy parecido al obtenido en el presente trabajo en la banda verde (495-570 nm), que fue del 74% ($R^2 = 0.74$). Al respecto, Mirik *et al.* (2007) mencionan que el espectro de reflectancia en plantas adultas y sanas se caracteriza por una fuerte absorción (baja reflectancia) en el azul, un incremento en la reflectancia en el verde y fuerte absorción en el rojo, dentro del espectro visible. Además, indican que la respuesta en reflectancia en la región visible del espectro electromagnético está gobernada en las plantas por el efecto y comportamiento de las clorofilas, carotenos y antocianinas.

La concentración de N en la solución nutritiva tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre los valores de CIE-L (Figura 9).

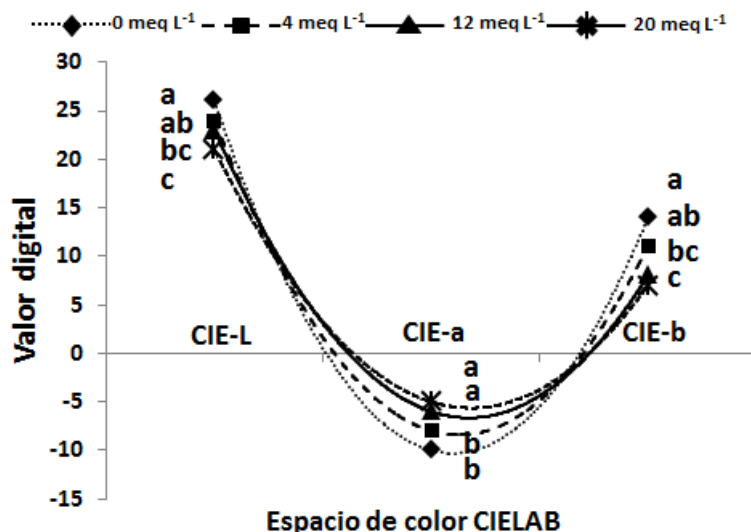


Figura 9. Relación entre los valores de CIELAB (L, a y b) y la concentración de N en hoja de pimiento en tratamientos con diferentes niveles de N en la solución nutritiva. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, (Tukey $\alpha = 0.05$).

Las hojas de pimiento de los tratamientos con 0 y 4 meq L⁻¹ de N presentaron los niveles más altos de CIE-L. Caso contrario, los valores estadísticamente mayores de CIE-a se observaron en hojas de los tratamientos con 20 y 12 meq L⁻¹ de N (Figura 9). Los tratamientos tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre los valores de

CIE-b, en donde los menores valores se detectaron en los tratamientos 20 y 12 meq L⁻¹ de N (Figura 9).

De acuerdo con el análisis de regresión (Cuadro 2), existió una asociación negativa altamente significativa ($\alpha \leq 0.01$) entre los valores de CIE-L y CIE-b y negativa, para el caso de CIE-a.

Con estas observaciones se pudo generar un modelo matemático lineal para predecir las concentraciones de N en el follaje a partir de los valores de CIE-L y CIE-b con coeficientes de ajuste del 74% ($R^2 = 0.74$) y del 60% ($R^2 = 0.60$) para CIE-a.

Al respecto, Mirik *et al.* (2007) mencionan que el espectro de reflectancia en plantas adultas y sanas se caracteriza por una fuerte absorción (baja reflectancia) en el espectro azul, como se observa en los valores de CIE-b, y una planta enferma absorbe más en el espectro verde, como se demuestra con los valores de CIE-a, aunque la reflectancia es mayor en comparación con los espectros azul y rojo, con una fuerte absorción en el rojo, dentro del espectro visible. Además, éstos indican que la respuesta en reflectancia en la región visible del espectro electromagnético está gobernada en las plantas por el efecto y comportamiento de las clorofilas, carotenos y antocianinas.

En las Figuras 5A y 5B se observa un efecto significativo sobre los valores de pureza del color (croma) y ángulo de tono o matiz. Los tratamientos con 0 y 4 meq L⁻¹ de NO₃⁻ tuvieron los niveles más altos de pureza de color (Figura 10A). Caso contrario, los mayores resultados de hue se observaron en hojas de los tratamientos con 20 y 12 meq L⁻¹ de N (Figura 10B).

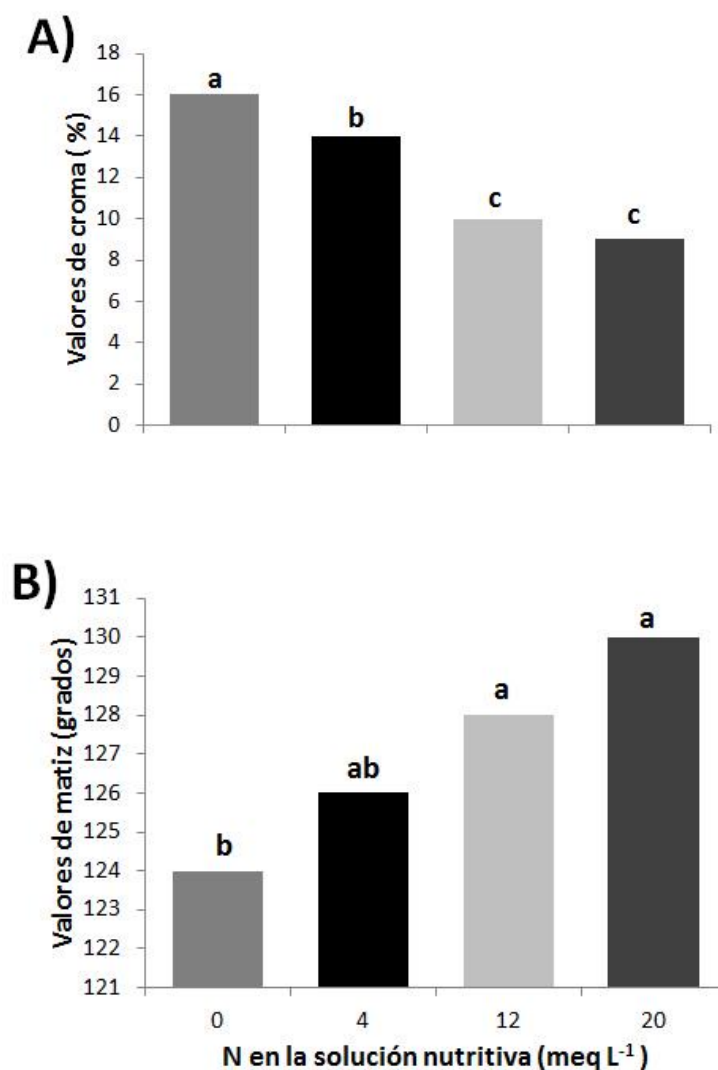


Figura 10. Relación entre los valores de croma (A) y matiz (B) con los niveles de N en la solución nutritiva. Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales, (Tukey $\alpha = 0.05$).

De acuerdo con el análisis de regresión, existió una asociación negativa altamente significativa ($\alpha \leq 0.01$) entre los valores de pureza de color o saturación también llamado croma con la concentración de N en parte aérea de pimiento y para el caso del matiz esta asociación fue positiva (Cuadro 2).

Con estos resultados se pudo generar un modelo matemático lineal para predecir las concentraciones de N en el follaje de pimiento a partir de los valores de croma con un coeficiente de ajuste del 74% ($R^2 = 0.74$).

CONCLUSIONES

La concentración de N en hojas que se puede calcular en poco tiempo con la medición de algunas propiedades ópticas de la reflectancia en las bandas verde y roja de la luz visible, además de en el espacio de color CIELAB, valores de croma y matiz, lo cual permitirá generar estrategias de manejo de este nutriente en las soluciones fertilizantes tanto en suelo como en sustrato para la producción intensiva de pimiento en invernadero.

LITERATURA CITADA

- Adams M. L., W. A. Norvell, W. D. Philpot, and J. H. Peverly. 2000. Spectral detection of micronutrient deficiency in 'Bragg' soybean. *Agron. J.* 92:261-268.
- Alcántar G. G. y V. M. Sandoval. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, México. 156 p.
- Blackmer T. M., J.S. Schepers, and G.E. Varvel. 1994. Light Reflectance Compared with Other Nitrogen Stress Measurements in Corn Leaves. *Agron. J.* 86:934-938.
- Bock C. H., G. H. Poole, P. E. Parker, and T. R. Gottwald. 2010. Plant Disease Severity Estimated Visually, by Digital Photography and Image Analysis, and by Hyperspectral Imaging. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29:59-107.
- Brizuela A. B., G. G. Alcántar, G. P. Sánchez, Y. Kalra, J. Crumbaugh, C. Olive, C. L. Tijerina y T. R. Maldonado. 2007. Establecimiento de índices espectrales en el diagnóstico nutrimental de N en maíz. *Agrociencia* 41: 827-835.
- Cho M. A. and A. K. Skidmore. 2006. A new technique for extracting the red edge position from hyperspectral data: The linear extrapolation method. *Remote Sensing of Environment* 101:181-193.
- Cisneros J. J. and L. D. Godfrey. 2001. Midseason pest status of the cotton aphid (Homoptera: *Aphididae*) in California cotton: is nitrogen a key factor? *Environmental Entomology* 30: 501-510.
- Curran P. J., J. L. Dungan, and D. L. Peterson. 2001. Estimating the foliar biochemical concentration of leaves with reflectance spectrometry: Testing the Kokaly and Clark Methodologies. *Remote Sensing of Environment* 76:349-359.
- Gamon J. A., J. Peñuelas, and C. B. Field. 1992. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing Environmental* 41:35-44.
- Gates D. M., H. J. Keegan, J. C. Schleiter, and V. R. Weidner. 1965. Spectral properties of plants. *Applied Optics* 4:11-20.
- Gitelson A. A., A. Viña, V. Ciganda, D. C. Rundquist, and T. J. Arkebauer. 2005. Remote estimation of canopy chlorophyll content in crops. *Geophysical Research Letters* 32:1-4.

- Huber S., M. Kneubühler, A. Psomas, K. Itten, and N. E. Zimmermann. 2008. Estimating foliar biochemistry from hyperspectral data in mixed forest canopy. *Forest Ecology and Management* 256:491-501.
- Jones J. B. Jr., B. Wolf, and H. A. Mills. 1991. *Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide.* Micro-Macro-Publishing, Athens, GA, USA. 213 p.
- Leon A. K., M. B. Domingo, P. C. Franco, and C. A. Jorge Leon. 2006. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images *Food Research International* 39: 1084–1091.
- Lihong X., C. Weixing, L. Weihong, D. Tingbo, and Z. Yan. 2004. Monitoring leaf nitrogen status in rice with canopy spectral reflectance. *Agron. J.* 96:135-142.
- Lindow S. E. and R. R. Webb. 1983. Quantification of foliar plant disease symptoms by microcomputer-digitized video image analysis. *Phytopathology* 73:520-524.
- Ma B. L., M. J. Morrison, and L. M. Dwyer. 1996. Canopy light reflectance and field greenness to assess nitrogen fertilization and yield of maize. *Agron. J.* 88:915-920.
- Martin D. P. and E. P. Rybicki. 1998. Microcomputer-based quantification of maize streak virus symptoms in *Zea mays*. *Phytopathology* 88:422–427.
- Mirik M., G. J. Michels Jr., M. S. Kassymzhanova, and N. C. Elliott. 2007. Reflectance characteristics of Russian wheat aphid (Hemiptera: *Aphididae*) stress and abundance in winter wheat. *Computers and Electronics in Agriculture* 57:123-134.
- Noh H., Q. Zhang, B. Shin, S. Han, and L. Feng. 2006. A neural network model of maize crop nitrogen stress assessment for a multi-spectral imaging sensor. *Biosystems Engineering* 94:477-485.
- Niemira B. A., W. W. Kirk, and J. M. Stein. 1999. Screening for late blight susceptibility in potato tubers by digital analysis of cut tuber surfaces. *Plant Dis.* 83:469–473.
- Olmstead J. W., G. A. Lang, and G. G. Grove. 2000. Assessment of severity of powdery mildew infection of sweet cherry leaves by digital image analysis. *HortScience* 36:107-111.
- Ortega A. L. D., A. D. A. Miranda y V. M. Sandoval. 2006. Densidad de huevos y ninfas de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (WEST.) en *Gerbera jamesonii* H. Bolus con diferentes regímenes de fertilización nitrogenada. *Agrociencia* 40: 363-371.

- Palma L. D. J., G. S. Salgado, O. J. J. Obrador, N. A. Trujillo, E. L. del C. Lagunes., C. J. Zavala, B. A. Ruiz y M. M. A. Carrera. 2002. Sistema integrado para recomendar dosis de fertilización en caña de azúcar (SIRDF). *Terra* 20: 347-358.
- Peñuelas J., J. A. Gamon, A. L. Fredeen, J. Merino, and C. B. Field. 1994. Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen -and water- limited sunflower leaves. *Remote Sensing Environment* 48:135-146.
- Pérez G. M. y B. R. Castro. 2010. El chile manzano. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 128 p.
- Poce F. J. A., M. Bethencourt, D. F. J. Moreno, and S. J. M. Palacios. 2011. Using a Flatbed Scanner To Measure Detergency: A Cost-Effective Undergraduate Laboratory j. *Chem. Educ.*, 88:1314–1317.
- Rangel L. J.A., G. G. Alcántar, R. J. Z. Castellanos, M. E. García, L. C. Trejo y H. H. Vaquera. 2002. Comparación de dos pruebas para diagnosticar N en sorgo. *Terra* 20: 383-390.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT user's guide. Release 9.1 SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Sims D. A. y J. A. Gamon. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81:337-354.
- Solari F., J. Shanahan, R. Ferguson, J. Schepers, and A. Gitelson. 2008. Active sensor reflectance measurements of corn nitrogen status and yield potential. *Agron. J.* 100: 571–579.
- Steiner A. 1984. The universal nutrient solution. pp. 633–649. *In*: Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture. ISOSC. Wageningen. The Netherlands.
- Taiz L. and E. Zeiger. 2002. Plant physiology. The Benjamin /Cummings Publishing Company, INC. California, USA. 565 p.
- Terashima I., T. Fujita, T. Inoue, C. W. Soon, and R. Oguchi. (2009) Green Light Drives Leaf Photosynthesis More Efficiently than Red Light in Strong White Light: Revisiting the Enigmatic Question of Why Leaves are Green. *Plant Cell Physiol.* 50: 648 – 697.
- Thomas J. R., C. L. Wiegand, and V. I. Myers. 1967. Reflectance of cotton leaves and its relation to yield. *Agron. J.* 59:551-554.

- Varvel G. E., W. W. Wilhelm, J. F. Shanahan, and J. S. Schepers. 2007. An algorithm for corn nitrogen recommendations using a chlorophyll meter based sufficiency index. *Agron. J.* 99: 701-706.
- Walburg G., M. E. Bauer, C. S. T. Daughtry, and T. L. Housley. 1982. Effect of nitrogen nutrition on growth, yield and reflectance characteristics of corn canopies. *Agron. J.* 74:677-683.
- Zebarth B. J., M. Younie, J. W. Paul, and S. Bittman. 2002. Evaluation of leaf chlorophyll index for making fertilizer nitrogen recommendations for silage corn in a high fertility environment. *Com. Soil Sci. Plant Anal.* 33: 665–684.

V. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO EN PIMIENTO POR ESPECTRORADIOMETRÍA

ESTIMATING THE NITROGEN CONCENTRATION IN SWEET PEPPER
BY SPECTRORADIOMETRY

Jairo Aarón de la Cruz-Durán¹, Prometeo Sánchez-García^{1*}, Manuel Sandoval-Villa¹, Libia I. Trejo-Téllez¹, Enrique Ojeda-Trejo¹, María A. Goytia-Jiménez²

¹Edafología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. C.P. 56230 Montecillo, Estado de México. ²Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.

* Autor para correspondencia (promet@colpos.mx)

RESUMEN

Con la finalidad de generar un método rápido y confiable de diagnóstico de concentración de N en hojas de pimiento (*Capsicum annuum* L.), se estableció un experimento en invernadero de plástico. La unidad experimental consistió en una planta de pimiento, la cual se trasplantó en un saco de cultivo que contenía una mezcla de fibra de coco y tezontle como sustrato (50/50). Se utilizaron soluciones nutritivas con diferentes niveles de N: 0, 4, 12 y 20 meq L⁻¹, a partir de la solución nutritiva universal de Steiner. Se empleó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. En la etapa de fructificación (180 días después del transplante), se colectaron hojas maduras y se colocaron sobre una base de madera de color negro para obtener las lecturas. Mediante el uso de un espectroradiómetro y su respectivo programa CROPSCAN, se obtuvieron los datos de reflectancia para cada una de las longitudes de onda: azul (460 y 485 nm), verde (510 y 560 nm), rojo (610 y 660 nm), infrarrojo cercano (710 y 760 nm), infrarrojo medio (810 y 830 nm) e infrarrojo lejano (1650 nm). En las mismas hojas se determinó la concentración de N total mediante el método microkjeldahl. Se estimaron las correlaciones de Pearson de la concentración de N con los valores de reflectancia obtenidos en las bandas mencionadas mediante el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS, 2003). La longitud de onda en el espectro de 610 nm correlacionó inversamente con el contenido de N en plantas de pimiento ($r = -0.724$). Se encontró una relación estrecha entre el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) y la concentración de N en hojas de pimiento ($\%N = 9.1417 \text{ NDVI} - 2.9395$; $R^2 = 0.5409$ y $r = 0.729$).

Palabras clave: *Capsicum annuum* L., CROPSCAN, reflectancia, NDVI.

SUMMARY

With the purpose of generating a reliable method for nitrogen concentration diagnosis in bell pepper leaves, an experiment was established in a plastic greenhouse. The experimental unit consisted of a sweet pepper plant, which was transplanted into a slab containing coconut fiber and volcanic gravel (50/50) as substrate. Four levels of N: 0, 4, 12 and 20 meq L⁻¹ were used, starting from Steiner's universal nutrient solution. A completely randomized design with four replications was used. At the fruiting stage (180 days after transplanting), mature leaves were collected and placed on a base of wood of black color to obtain reflectance readings. With help of the program CROPSCAN and a spectroradiometer, the information of reflectance was recorded for each wavelength: blue (460 and 485 nm), green (510 and 560 nm), red (610 and 660 nm), nearby infrared (710 and 760 nm), middle infrared (810 and 830 nm) and distant infrared (1650 nm). In the same leaves N concentration was determined by microkjeldahl method. With N concentration values and wavelength results, Pearson correlations were obtained with Statistical Analysis System Program (SAS, 2003). An inverse correlation between N concentration and 610 nm spectrum in bell pepper plants was observed ($r = -0.724$). A close relationship between normalized difference vegetation index (NDVI) and N concentration in pepper leaves was found ($\%N = 9.1417 \text{ NDVI} - 2.9395$; $R^2 = 0.5409$ y $r = 0.729$).

Key words: *Capsicum annuum L.*, reflectancy, remote sensor, CROPSCAN.

INTRODUCCIÓN

El uso de grandes cantidades de N como fertilizante en la agricultura moderna ha generado altos niveles de productividad, que habría parecido improbable hace unas décadas. Lamentablemente, estos avances tecnológicos, si no son manejados con cuidado pueden, en algunos casos, incurrir en daños ambientales. El N en forma de nitrato es un contaminante de la tierra y las aguas superficiales por todo el mundo (Keeney, 1986). Además, la lixiviación de N-nitrato se ha encontrado en puntos diferentes de su origen y han podido exceder el estándar de agua potable en los Estados Unidos de América de 10 mg L^{-1} de N-nitratos (Keeney, 1986; Gold *et al.*, 1990).

Un método novedoso empleado en la agricultura de precisión son los sensores remotos multiespectrales e hiperespectrales, los cuales evalúan las condiciones del cultivo por medio de su firma espectral, una medida de energía electromagnética reflejada del cultivo (Curran *et al.*, 2001).

El nitrógeno es un elemento constituyente de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Por esta razón, la materia seca vegetal puede alcanzar hasta 6% de N, y el rango de concentración en el tejido normalmente varía desde 0.5 hasta 6%. Las grandes cantidades requeridas por las plantas, en combinación con la baja disponibilidad del N en los suelos agrícolas, hacen del N el nutrimento limitante más frecuente para los cultivos (Epstein y Bloom, 2005). De acuerdo con Alcántar *et al.* (2007) el N está presente en coenzimas, nucleótidos, amidas, ureidos y en la molécula de clorofila y participa en todas las reacciones enzimáticas y en todo el metabolismo. El N es esencial en la división y expansión celular, también es constituyente de una multitud de alcaloides, que no son metabolitos esenciales y se cree, sirven como compuestos que almacenan N (Jones *et al.*, 1991). Una deficiencia de N limita la división y expansión celular, el desarrollo de los cloroplastos, por lo que se producen plantas débiles y enanas, con crecimiento lento, que maduran precozmente, con rendimiento y calidad significativamente bajos. Los síntomas de deficiencia se ven en las hojas más antiguas, donde las proteínas se hidrolizan y el N es translocado como aminoácido de los tejidos viejos a las porciones en crecimiento activo de la planta. La proteólisis resulta en un colapso de cloroplastos, con una disminución en el contenido de clorofila y el amarillamiento de las hojas (Marschner, 1995). El estrés nutrimental por

deficiencia de N está involucrado en la producción de los compuestos nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) y adenosin trifosfato (ATP). Estos compuestos son utilizados por la ribulosa-1-5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) para la fijación de CO₂. Las plantas con exceso de N tienen follaje más abundante de color verde oscuro y tienden a ser más susceptibles a enfermedades y a la invasión de insectos debido a que su savia contiene gran cantidad de aminoácidos libres, azúcares y nitratos que las vuelven más atractivas (Cisneros y Godfrey, 2001; Ortega-Arenas *et al.*, 2006). Por lo anterior, es indispensable conocer el estado nitrogenado en los cultivos pues contribuye en gran medida al crecimiento y desarrollo óptimo de la planta durante su ciclo fisiológico y como consecuencia, se ve reflejado en el rendimiento.

Existen diversos métodos de diagnóstico nutrimental, desde aquellos que emplean un balance entre demanda y suministro de N (Palma-López *et al.*, 2002) y requieren de análisis químicos en laboratorio; otros métodos utilizan equipos portátiles, como el medidor de nitratos en savia (Rangel-Lucio *et al.*, 2002), el estimador portátil de la concentración de clorofila (Varvel *et al.*, 2007), hasta los sensores remotos (Solari *et al.*, 2008).

Actualmente, las técnicas para detectar anomalías nutrimentales en los cultivos son muy lentas (muestreo, traslado, preparación, análisis e interpretación) y el costo del análisis es alto, aunado a lo anterior, la escasez de laboratorios que expidan resultados confiables (Alcántar y Sandoval, 1999). Por lo tanto, la evaluación del estado nutrimental en cultivos intensivos, mediante su reflectancia es una alternativa prometedora para llevar a cabo estrategias del manejo nutricional de los cultivos (Ma *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 2008). La medición de los cambios en el espectro de reflectancia de las hojas permite identificar deficiencias nutricionales de manera rápida y de forma no destructiva (Adams *et al.*, 2000). La percepción remota implica la medición de energía reflejada o emitida por objetos, sin entrar en contacto con ellos. Cada objeto examinado por percepción remota refleja un único espectro de longitudes de onda, conocido como huella espectral. Los sensores remotos se han utilizado para detectar diferentes problemas tales como el estrés hídrico, estrés por deficiencias nutrimentales, el rendimiento y los índices de cosecha, además de ser incorporados a la agricultura de precisión (Brizuela-Amador, 2007). Una reducción en la concentración de clorofila aumenta la reflectancia de la luz fotosintéticamente activa (Gitelson *et al.*, 2005). Por

todo esto, las estrategias de fertilización se pueden apoyar en el uso de sensores y sistemas de fertilización de respuesta inmediata que sean capaces de valorar la necesidad de N de la planta para aplicar la dosis precisa, por lo menos en zonas de manejo uniformes. Gracias a que aproximadamente el 10% del N total de las plantas se encuentra almacenado en las moléculas de clorofila, hay buena correlación entre la reflectancia espectral y el contenido de N en las hojas (Cho y Skidmore, 2006).

Desde 1960 se han realizado estudios acerca de los fenómenos que ocurren en la interacción de la luz con el tejido vegetal (Thomas *et al.*, 1967). Dichos trabajos han dado la pauta para la realización de investigaciones recientes y alentadoras que relacionan la reflexión de radiaciones electromagnéticas por los cultivos y el estrés de tipo hídrico y nutricional, principalmente N.

Cuando las hojas se hacen más cloróticas, aumenta la reflectancia y el pico de reflectancia normalmente está centrado en los 550 nm, y la absorción de luz incidente disminuye por bajo contenido de clorofila. Estos cambios son percibidos visualmente como un amarillamiento de la hoja. Anteriormente, la clorosis en hojas se relacionó con longitudes de onda de la luz visible contra el contenido de clorofila (Thomas y Oerther 1972, Tsay *et al.*, 1982). Kanemasu (1974) relacionó exitosamente la reflectancia en los espectros verde/rojo con la clorosis.

Aunque los cambios espectrales en el visible sean fácilmente evidentes en la vegetación estresada (Baret *et al.*, 1987; Adams *et al.*, 1993), el efecto es sutil comparado con los cambios del aumento drástico de reflectancia entre el rojo e infrarrojo cercano. La robustez y la proporción de señal-ruido buena, en combinación con su sensibilidad frente a la vegetación, parecen haber proporcionado un poco del ímpetu para el desarrollo de índices vegetativos basados en los rasgos del borde rojo antes que la gama de longitud de onda visible.

El borde rojo es producido por la combinación de fuerte absorción por la clorofila en la región roja y la fuerte reflectancia en el IR debido a la dispersión en el mesófilo de la hoja y la ausencia de absorción por pigmentos (Gausman, 1985). El contraste de la reflectancia es único en la reflectancia de vegetación. Esto es también el rasgo más prominente en el espectro de reflectancia de vegetación y es sensible al estrés y relativamente insensible al ruido.

Las medidas espectrales comúnmente usadas en vegetación, son en la región del borde rojo y estas se utilizaron para estimar la biomasa, la productividad, índice de área foliar, la actividad fotosintética o el contenido de clorofila (Tucker, 1979).

Rouse *et al.* (1974) propusieron otra medida, el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) para reducir al mínimo la sensibilidad frente al ruido.

Una de las medidas del borde rojo más extensamente usadas son el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) ($NDVI = (IR-Red) / (IR+Red)$).

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en obtener la firma espectral en hojas de pimiento mediante un espectroradiómetro (CROPSCAN) y su relación con la concentración de N, para estimar el estado nutricional en etapas tempranas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en un invernadero de plástico en la Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, estado de México. La unidad experimental consistió en una planta de pimiento, la cual se trasplantó en un saco de cultivo de polietileno blanco calibre 600 μm y de 100 x 35 cm de largo y ancho, respectivamente y a una distancia de 1.5 m entre hileras y 0.3 m entre plantas. Como sustrato se utilizó una mezcla de tezontle rojo con fibra de coco (50/50). El diseño de tratamientos consistió en cuatro soluciones nutritivas con diferentes niveles de N: 0, 4, 12 y 20 meq L^{-1} , de acuerdo con Steiner (Steiner, 1984). Se empleó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones.

Muestreo de hojas y análisis químico del tejido vegetal

En la etapa de fructificación (180 días después del trasplante (ddt)) se seleccionaron ocho hojas al azar en el segundo tercio del dosel de la planta (unidad experimental). Estas fueron colocadas en una base de madera de color negro de 0.5 X 0.5 m. y se tomó su reflectancia a una altura de 0.8m con un espectroradiómetro CROPSCAN, modelo MSR16R, Figura 11.



Figura 11. Muestreo de hojas con el CROPSCAN.

La reflectancia de las hojas fue obtenida en la banda azul (460 y 485 nm), verde (510 y 560 nm), rojo (610 y 660 nm), infrarrojo cercano (710 y 760 nm), infrarrojo medio (810 y 830 nm) e infrarrojo lejano (1650 nm), expresada en porcentaje de reflectancia.

En laboratorio se cuantificó la concentración de N por el método microkjeldahl (Alcántar y Sandoval, 1999) en las mismas hojas. La concentración de N se relacionó con las reflectancias obtenidas en las diferentes bandas. Se estimaron las correlaciones de Pearson de la concentración de N contra los valores obtenidos en las bandas obtenidas, mediante el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 12 se muestra la firma espectral del cultivo de pimiento en respuesta al gradiente de concentración de N en la solución nutritiva. La prueba de comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) indicó que la reflectancia en hojas fue estadísticamente mayor en las plantas abastecidas con 0 y 4 meq L⁻¹ de N en la parte visible, mientras que aquellas a las que se suministró 12 y 20 meq L⁻¹ de N la reflectancia fue menor y estadísticamente igual entre ellas en el espectro visible (Figura 13a). Lo anterior se atribuye a que las unidades experimentales con menores concentraciones de N en su tejido foliar presentan también una menor presencia de clorofila (Curran *et al.*, 2001). Al respecto, Cho y Skidmore (2006) indican que las bajas reflectancias de los cultivos saludables, observadas en la región visible del espectro electromagnético, obedecen principalmente a la intensa absorción de la molécula de clorofila. Ésta absorbe la radiación azul y roja y refleja el verde (Brizuela-Amador, 2007). El pico de absorbancia de la banda azul por la clorofila se traslapa con la absorción de los carotenoides, por lo que la reflectancia azul no es usada para la estimación de la clorofila (Sims y Gamon, 2002). Asimismo, la máxima absorbancia del espectro rojo ocurre entre 660 y 680 nm, pero las altas concentraciones de clorofila saturan esta región de absorción (Sims y Gamon, 2002), por lo que la concentración de clorofila se predice a partir de reflectancias entre los 550 y 700 nm y, por consiguiente, la concentración de N en las hojas, ya que este nutriente es un componente principal de la molécula de clorofila (Taiz y Zeiger, 2002; Zebarth *et al.*, 2002; Varvel *et al.*, 2007) y están estrechamente correlacionados, de tal manera que una deficiencia de N incrementa la reflectancia de la radiación del espectro verde (Noh *et al.*, 2006).

De acuerdo con el análisis de regresión se observó una asociación negativa y altamente significativa ($\alpha \leq 0.01$) entre la reflectancia en la banda 610 nm y la concentración de N en parte aérea (Figura 14c).

El grado de asociación entre la concentración de N en parte aérea y la reflectancia en la banda 510, 560 y 610 nm, resultó significativo con una correspondencia negativa (Figuras 14a, b y c). El mayor coeficiente de correlación se presentó con la banda 610 nm ($r = -0.724$). De acuerdo con el coeficiente de correlación (r) se tiene que la reflectancia en la banda 610 nm es la que estima de manera adecuada la concentración de N en las hojas de pimiento (Figura 14c). Estos

resultados coinciden con Peñuelas *et al.* (1994) quienes identificaron un incremento en reflectancia entre los 500 y 600 nm en hojas de girasol estresadas por N. Patrón similar notaron Gamon *et al.* (1992) en la reflectancia de la cubierta foliar en girasol, y específicamente observaron cambios entre 8:00 y 12:00 hrs en reflectancia entre plantas estresadas y no estresadas. De igual manera Lihong *et al.* (2004), trabajando con arroz, encontraron que la reflectancia a los 560 nm correlacionaba de manera negativa con la concentración de N en el follaje. Con estas observaciones Lihong *et al.* (2004) generaron un modelo matemático lineal para predecir las concentraciones de N en el follaje a partir de las reflectancias a 560 nm con un coeficiente de ajuste del 85% ($R^2 = 0.85$), en comparación con el obtenido en el presente trabajo que fue del 51% ($R^2 = 0.51$), en la banda verde (610 nm). Al respecto, Mirik *et al.* (2007) mencionan que el espectro de reflectancia en plantas adultas y sanas se caracteriza por una fuerte absorción (baja reflectancia) en el azul, un incremento en la reflectancia en el verde y una fuerte absorción en el rojo, dentro del espectro visible. Además, estos autores indican que la respuesta en reflectancia en la región visible del espectro electromagnético está gobernada en las plantas por el efecto y comportamiento de las clorofilas, carotenos y antocianinas.

El mejor modelo de regresión (banda 610 nm) y N en parte aérea con una relación inversa es $N (\%) = -0.9555 (610nm) + 9.9866$, $r^2 = 0.508$. Aunque el valor de r^2 es bajo, se encontró una relación significativa entre las dos variables ($r=0.724$), implicando que la reflectancia multispectral, específicamente en la banda 610 nm, puede ser usada predecir la concentración de N en la hoja.

Los valores de correlación bajos pueden ser atribuidos a los errores comunes en la toma de datos de la reflectancia multispectral mediante el CROPSCAN y la concentración de N en hoja. Por ejemplo, la concentración de N de las hojas fue obtenida solo de una pequeña muestra del total de las hojas del tercio medio, mientras los datos multispectrales son obtenidos del número total de hojas del tercio medio, que podría incluir pequeñas porciones de la base de madera negra. Esto por lo general, causa una disminución de la exactitud de datos de reflectancia multispectrales y su correlación con la concentración de N en las hojas (Campbell, 1996). Otro factor que contribuye a la baja exactitud de los datos colectados de reflectancia multispectrales son aquellas pequeñas áreas de vegetación que se llegan a traslapar, su variación en la

forma, la orientación de las hojas, y luz en el medio. La reflectancia total espectral registrada según el instrumento multiespectral es en última instancia una combinación de estos factores, que pueden causar un valor de reflectancia medio que no puede ser representativo de la hoja individual de una planta.

Para tener las mediciones del borde rojo, se obtuvieron valores de NDVI, con las bandas 610 y 830 nm, las cuales son obviamente sensibles a concentraciones de clorofila, pero también sensibles a cambios de la estructura de la célula, ya que estos conducen a modificaciones de la reflectancia IR. Es posible que las mediciones del borde rojo puedan cambiar independientemente de la pigmentación.

En la Figura 15 se observa una fuerte relación entre el NDVI y la concentración de N en hojas de pimiento, en comparación con las bandas individuales ($\%N = 9.1417$ (NDVI) $- 2.9395$; $R^2 = 0.5409$ y $r = 0.729$).

CONCLUSIONES

Las plantas de pimiento con deficiencia de N presentaron mayor reflectancia en la banda 510, 560 y 610 nm. Las reflectancias de hojas en los espectros 510, 560 y 610 nm, obtenidas con el espectralradiómetro, correlacionaron negativamente con la concentración de N. El modelo matemático generado ($N\% = -0.9555$ (reflectancia 610 nm) + 9.9866) a partir de la reflectancia en el espectro rojo 610 nm fue el que mejor correlacionó con la concentración de N en hojas de pimiento ($r = -0.724$).

Los valores de reflectancia en el espectro verde 510 nm correlacionaron negativamente con la concentración de N en hojas de pimiento ($r = -0.593$).

El grado de asociación entre la concentración de N en parte aérea y los valores de reflectancia del verde 510 nm, fue significativo con una correspondencia negativa ($N\% = -0.8774$ (reflectancia 510nm) + 8.8554).

Se observó una relación estrecha entre el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) y la concentración de N en hojas de pimiento ($\%N = 9.1417$ (NDVI) – 2.9395; $R^2 = 0.5409$ y $r = 0.729$).

El empleo de datos de reflectancia multiespectrales permite evaluar la concentración de N en hoja. De tal manera que los sensores remotos multiespectrales sirven como un apoyo para la agricultura de precisión, lo cual genera un amplio campo de investigación en la nutrición de cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams M L, W A Norvell, W D Philpot, J H Peverly (2000) Spectral detection of micronutrient deficiency in 'Bragg' soybean. *Agron. J.* 92:261-268.
- Adams M L, W A Norvell, J H Peverly, W D Philpot (1993) Fluorescence and reflectance characteristics of manganese deficient soybean leaves: Effects of leaf age and choice of leaflet. *In: Plant Nutrition - from genetic engineering to field practice*, edited by N. J. Barrow. Dordrecht, The Netherlands, : Kluwer Academic Publishers, pp. 261-264.
- Alcántar G G, L I Trejo-Téllez, P L Fernández, N Rodríguez-Mendoza (2007) Elementos esenciales. pp. 7-48. *In: Nutrición de cultivos*. Editorial Mundi-Prensa. México.
- Alcántar G G, M V Sandoval (1999) Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, México. 156 p.
- Baret F, I Champion, G Guyot, A Podaire (1987) Monitoring wheat canopies with a high spectral resolution radiometer. *Remote Sensing of Environment* 22: 367- 378.
- Brizuela-Amador B, G Alcántar-González, P Sánchez-García, Y Kalra, J Crumbaugh, C Olive, L Tijerina-Chávez, R Maldonado-Torres (2007). Establecimiento de índices espectrales en el diagnóstico nutrimental de nitrógeno en maíz. *Agrociencia* 41: 827-835.
- Campbell J B (1996) Introduction to remote sensing. The Guilford Press. New York, NY.
- Cho M A, A K Skidmore (2006) A new technique for extracting the red edge position from hyperspectral data: The linear extrapolation method. *Remote Sensing of Environment* 101:181-193
- Cisneros J J, L D Godfrey (2001) Midseason pest status of the cotton aphid (Homoptera: *Aphididae*) in California cotton: is nitrogen a key factor? *Environmental Entomology* 30: 501- 510.
- Curran P J, J L Dungan, D L Peterson (2001) Estimating the foliar biochemical concentration of leaves with reflectance spectrometry: Testing the Kokaly and Clark Methodologies. *Remote Sensing of Environment* 76:349-359.
- Epstein E, A J Bloom (2005) Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives. Sinauer Associates Sunderland, MA, USA. 412 p.

- Gamon J A, J Peñuelas, C B Field (1992) A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing Environmental* 41:35-44.
- Gausman H W (1985) Plant leaf optical parameters in visible and near-infrared light, Graduate studies No. 29. Texas Tech Press. Lubbock, TX, USA.
- Gitelson A A, A Viña, V Ciganda, D C Rundquist, T J Arkebauer (2005) Remote estimation of canopy chlorophyll content in crops. *Geophysical Research Letters* 32:1-4. doi:10.1029/2005GL022688.
- Gold A J, W R DeRagon, W M Sulliva, J L Lemunyon (1990) Nitrate-nitrogen losses to groundwater from rural and suburban land uses. *Journal Soil Water Conservation* 45:305-310.
- Huber S, M Kneubühler, A Psomas, K Itten, N Zimmermann (2008) Estimating foliar biochemistry from hyperspectral data in mixed forest canopy. *Forest Ecology and Management* 256:491-501.
- Jones J B Jr., B Wolf, H A Mills (1991). *Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide.* Micro-Macro-Publishing, Athens, GA, USA. 213 p.
- Kanemasu E T (1974) Seasonal canopy reflectance patterns of wheat, sorghum, and soybean. *Remote Sensing of Environment* 3:43- 47.
- Keeney D R (1986) Sources of nitrate to groundwater. *CRC Crit. Rev. Environment Control* 16:257-304.
- Lihong X, C Weixing, L Weihong, D Tingbo, Z Yan (2004) Monitoring leaf nitrogen status in rice with canopy spectral reflectance. *Agronomy J.* 96:135-142.
- Ma B L, M J Morrison, L M Dwyer (1996) Canopy light reflectance and field greenness to assess nitrogen fertilization and yield of maize. *Agronomy J.* 88:915-920.
- Marschner H (1995) *Mineral nutrition of higher plants.* Academic Press. San Diego, CA, USA. 889 p.
- Mirik M, G J Michels Jr., S Kassymzhanova-Mirik, N C Elliott (2007) Reflectance characteristics of Russian wheat aphid (Hemiptera: *Aphididae*) stress and abundance in winter wheat. *Computers and Electronics in Agriculture* 57:123-134.

- Noh H, Q Zhang, B Shin, S Han, L Feng (2006) A neural network model of maize crop nitrogen stress assessment for a multi-spectral imaging sensor. *Biosystems Engineering* 94:477-485.
- Ortega-Arenas L D, D A Miranda-Aragón, M Sandoval-Villa (2006) Densidad de huevos y ninfas de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (WEST.) en *Gerbera jamesonii* H. Bolus con diferentes regímenes de fertilización nitrogenada. *Agrociencia* 40: 363-371.
- Palma-López D J, S Salgado-García, J J Obrador-Olán, A Trujillo-Narcia, L del C Lagunes-Espinoza, J Zavala-Cruz, A Ruiz-Bello, M A Carrera-Martel(2002) Sistema integrado para recomendar dosis de fertilización en caña de azúcar (SIRDF). *Terra* 20:347-358.
- Peñuelas J, J A Gamon, A L Fredeen, J Merino, C B Field (1994) Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen -and water- limited sunflower leaves. *Remote Sensing Environment* 48:135-146.
- Rangel-Lucio J A, G Alcántar-González, J Z Castellanos-Ramos, E García-Moya, C Trejo-López, H Vaquera-Huerta (2002) Comparación de dos pruebas para diagnosticar nitrógeno en sorgo. *Terra* 20:383-390.
- Rouse J W, R H Haas, J A Schell, D W Deering, J C Harlan (1974) Monitoring the vernal advancement and retrogradation (greenwave effect) of natural vegetation (Type III Final Report), NASA Goddard Space Flight Center, Greenbelt, Maryland, USA.
- SAS Institute (2003) SAS/STAT user's guide. Release 9.1 SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Sims D A, J A Gamon (2002) Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* 81:337-354.
- Solari F, J Shanahan, R Ferguson, J Schepers, A Gitelson (2008) Active sensor reflectance measurements of corn nitrogen status and yield potential. *Agronomy J.* 100:571–579.
- Steiner A (1984) The universal nutrient solution. pp. 633–649. *In: Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture. ISOSC. Wageningen, The Netherlands.*
- Taiz L, E Zeiger (2002) *Plant physiology.* The Benjamin /Cummings Publishing Company, CA, USA. 565 p.

- Thomas J R, G F Oerther (1972) Estimating nitrogen content of sweet pepper leaves by reflectance measurements. *Agronomy J.* 64:11-13.
- Thomas J R, C L Wiegand, V I Myers (1967) Reflectance of cotton leaves and its relation to yield. *Agronomy J.* 59:551-554.
- Tsay M-L, D H Gjerstad, G R Glover (1982) Tree leaf reflectance: a promising technique to rapidly determine nitrogen and chlorophyll content. *Canadian Journal of Forest Research* 12:788-792.
- Tucker C J (1979) Red and photographic infrared linear combinations for monitoring vegetation. *Remote Sensing of Environment* 8:127-150.
- Varvel G E, W W Wilhelm, J F Shanahan, J S Schepers (2007) An algorithm for corn nitrogen recommendations using a chlorophyll meter based sufficiency index. *Agronomy J.* 99:701-706.
- Zebarth B J, M Younie, J W Paul, S Bittman (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* 33:665–684.

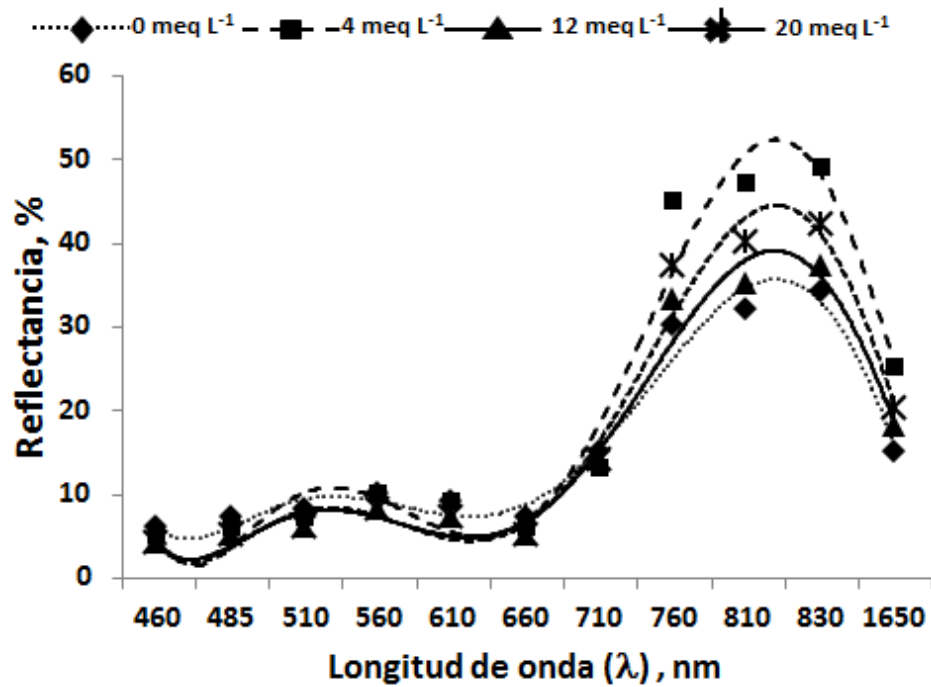


Figura 12. Firma espectral en hojas de pimienta a los 180 días después del transplante, en función de la concentración de NO_3^- en la solución nutritiva.

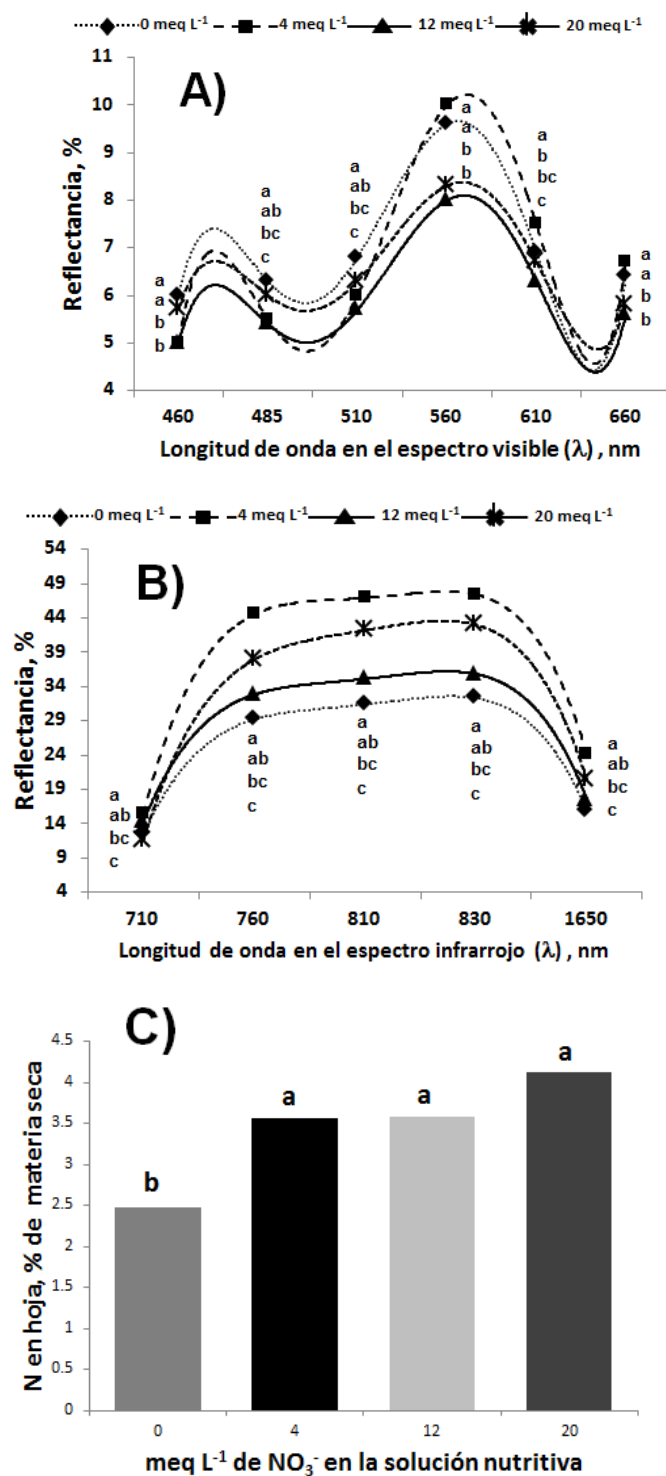


Figura 13. (A) Firma espectral visible, (B) firma espectral infrarroja y (C) concentración de N en follaje del cultivo de chile pimentero (*Capsicum annuum* L.) en función de la concentración de N en la solución nutritiva.

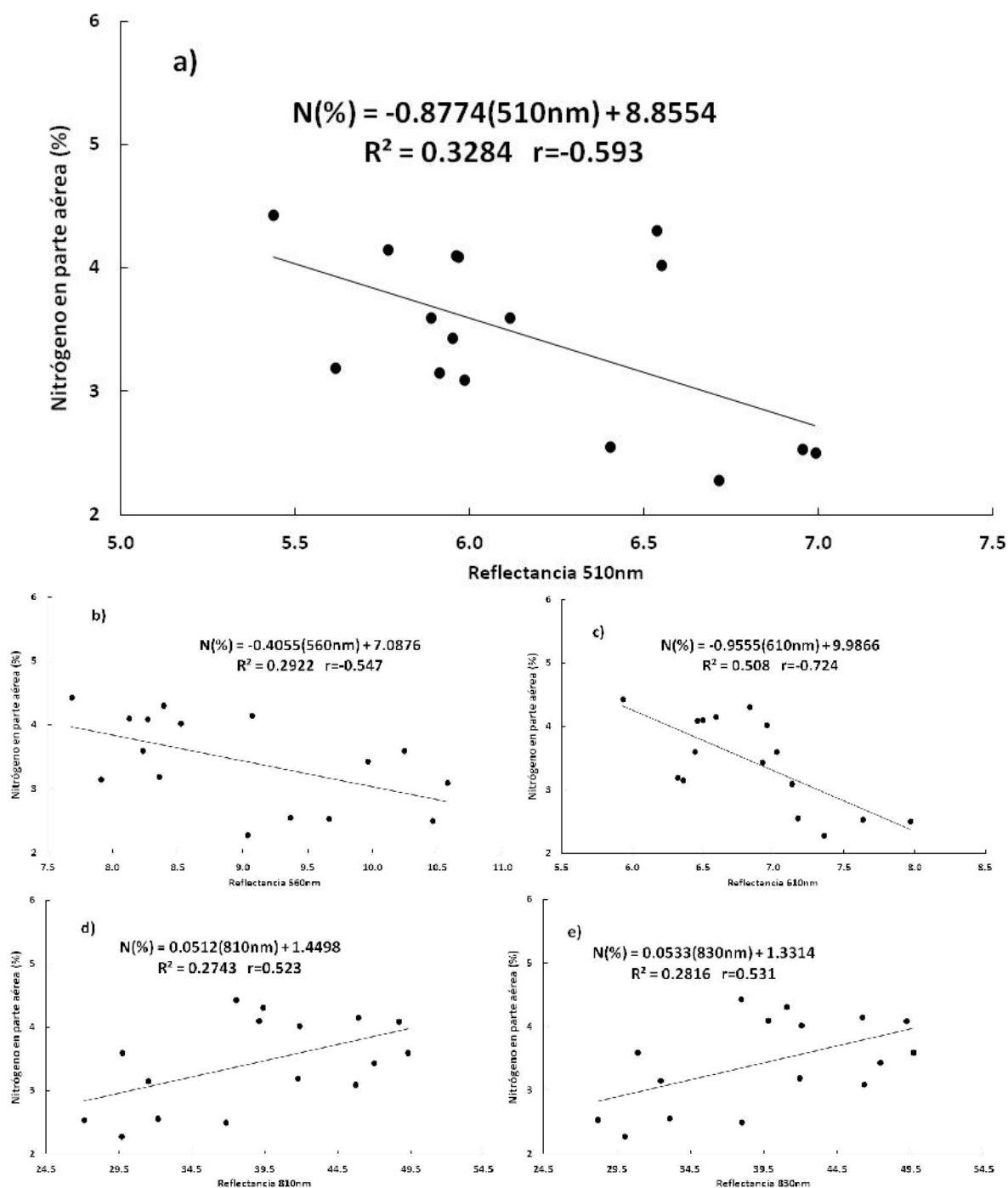


Figura 14. Relación entre los valores de reflectancia de la banda verde-510nm (a), verde-560nm (b), roja-610nm (c), infrarrojo-810nm (d) y infrarrojo-830nm (e) con la concentración de nitrógeno (N) en la parte aérea de plantas de pimiento. N = nitrógeno en hoja; R² = coeficiente de determinación; r = coeficiente de correlación.

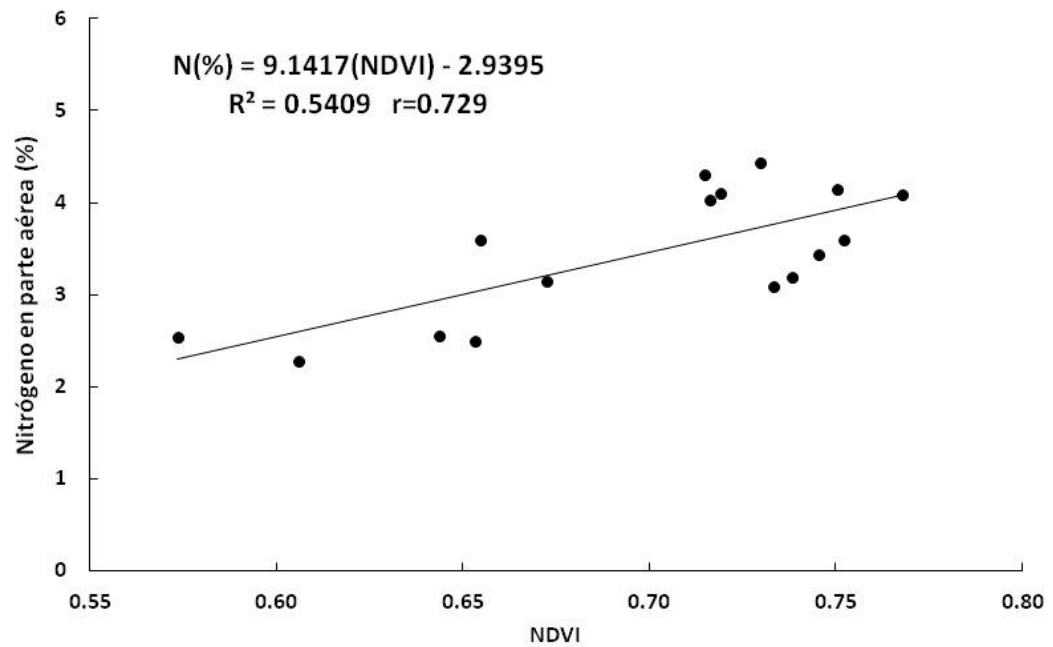


Figura 15. Relación entre los valores NDVI con las bandas roja-610 nm e infrarroja-830 nm, con la concentración de N en la parte aérea de plantas de pimiento. N = nitrógeno en hoja; R^2 = coeficiente de determinación; r = coeficiente de correlación.

VI. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO EN FRESA MEDIANTE UN ESCÁNER DIGITAL

ESTIMATION OF CONCENTRATION OF NITROGEN IN STRAWBERRY BY DIGITAL SCANNER

de la Cruz-Durán Jairo Aarón¹, Sánchez-García Prometeo^{1‡}, Sandoval-Villa Manuel¹, Trejo-Téllez Libia Iris¹, Ojeda-Trejo Enrique¹, Goytia-Jiménez María Antonieta²

RESUMEN

Con el propósito de generar un método sencillo, confiable y económico de diagnóstico nutricional en fresa, se estableció un experimento en invernadero para examinar los cambios de reflectancia de hojas y su relación con la concentración de N. Se emplearon soluciones nutritivas con diferentes concentraciones de N: 0, 4, 12 y 20 mol_c m⁻³. En la etapa de fructificación se recolectaron hojas recientemente maduras y se colocaron sobre un escáner para obtener una imagen digital. Con el programa VISUAL BASIC, se separó cada imagen en colores primarios de luz visible: azul (450 – 495 nm), verde (495 – 570) y rojo (620 – 750 nm). También se obtuvieron dimensiones CIELAB L*, a* y b*, pureza del color (croma) y ángulo de tono (hue). En las mismas hojas se determinó concentración de N con el método microkjeldahl. La longitud de onda en el espectro azul y rojo, el valor de L* correlacionaron en forma negativa con la concentración de N en hojas de fresa, y el ángulo de tono (hue) de forma positiva. Se concluyó que es posible estimar, mediante la medición de algunas propiedades ópticas de las hojas de fresa, la concentración de N de manera rápida y confiable.

Palabras clave: *Fragaria x annanassa*, firma espectral, reflectancia, escáner.

ABSTRACT

A greenhouse experiment was established in order to generate a simple, reliable and economical nutritional diagnosis in strawberry, to evaluate changes in reflectance of leaves and its relationship with nitrogen (N) concentration. Nutrient solutions at different levels of N were used: 0, 4, 12 and 20 mol_c m⁻³. At the fruit stage recently mature leaves were collected and placed into a scanner to obtain a digital image. Each image was separated with the Visual Basic Program into primary colors of visible light: blue (450-495 nm), green (495-570) and red (620-750 nm). We also obtained dimensions CIELAB L*, a* b*, color purity (chroma) and hue angle (hue). In the same leaves N concentration was determined with microkjeldahl method. Regressions were estimated with N concentration versus digital values obtained in blue, green and red bands, as well as CIELAB L*, a* b* color purity (chroma) and hue angle, using SAS. Wavelength in the blue and red spectrum, value of L* inversely correlated with N concentration in strawberry plants, and chroma in positive way. In conclusion, it is possible to estimate N concentration in strawberry leaves by measuring of several optical properties.

Key words: *Fragaria x annanassa*, reflectance, spectral signature.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial para el desarrollo de los cultivos. Este está presente en coenzimas, nucleótidos, amidas, ureidos y en la clorofila; participa en todas las reacciones enzimáticas y en todo el metabolismo de la planta, y es también esencial en la división y expansión celular (Pérez y Castro, 2010). Además es constituyente de una multitud de alcaloides, que sirven como compuestos de almacenamiento de N.

Las plantas con exceso de N tienen follaje más abundante de color verde oscuro y tienden a ser más susceptibles a enfermedades y a la invasión de insectos debido a que su savia contiene gran cantidad de aminoácidos libres, azúcares y nitrato que las vuelven más atractivas (Cisneros y Godfrey, 2001; Ortega-Arenas *et al.*, 2006).

Por lo anterior es necesario mantener un nivel adecuado de N y su balance con otros nutrientes, debido a que éste correlaciona positivamente con el crecimiento de los cultivos y su rendimiento. Las técnicas convencionales para detectar anomalías nutrimentales en los cultivos intensivos, como la fresa, son muy lentas (muestreo, traslado, preparación de la muestra, análisis químico e interpretación), además de que existen pocos laboratorios comerciales que entregan resultados confiables (Alcántar y Sandoval, 1999).

Existen varios métodos de diagnóstico nutrimental, algunos usan un balance entre demanda y suministro de N (Palma-López *et al.*, 2002) y requieren de análisis químicos en laboratorio; otros métodos utilizan equipos portátiles, como el medidor de nitratos en savia (Rangel-Lucio *et al.*, 2002), el estimador de clorofila portátil (Varvel *et al.*, 2007), y los sensores remotos (Solari *et al.*, 2008).

La evaluación del estado nutrimental en cultivos intensivos, mediante imágenes digitales es una alternativa prometedora para llevar a cabo estrategias del manejo nutricional de los cultivos (Ma *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 2008), ya que los cambios en el espectro de reflectancia de las hojas sirven como indicadores de deficiencias nutricionales; este método es rápido, no destructivo y relativamente económico (Adams *et al.*, 2000).

Por otra parte la percepción remota implica la medición de energía reflejada o emitida por objetos, sin entrar en contacto con ellos. Cada objeto examinado por percepción remota refleja un único espectro de longitudes de onda. Los sensores remotos se usan para detectar problemas tales como el estrés hídrico o estrés por deficiencias nutrimentales, el rendimiento y los índices de cosecha, además de ser incorporados a la agricultura de precisión. Una reducción de clorofila aumenta la reflectancia de la luz fotosintéticamente activa (Gitelson *et al.*, 2005).

La reflectancia de la luz en la longitud de onda del espectro visible (400±700 nm) se incrementa con la deficiencia de N por la reducción de clorofila (Walburg *et al.*, 1982; Blackmer *et al.*, 1994). Una reducción en la concentración de clorofila aumenta la reflectancia de la luz fotosintéticamente activa (Gitelson *et al.*, 2005). En otros estudios el objetivo ha sido la medición indirecta del verdor de las hojas a través de la medición de la reflectancia para estimar el contenido de N en la hoja de manera visual o con imágenes digitales (Gitelson *et al.*, 2005; Brizuela Amador *et al.*, 2007; Solari, 2008).

El uso de dispositivos para la captura de imágenes digitales y el desarrollo de programas computacionales para procesamiento y análisis se ha utilizado para la evaluación de enfermedades, alimentos y nutrimentos (Martin y Rybicki, 1998; Niemira *et al.*, 1999; Olmstead *et al.*, 2000). Lindow y Webb (1983) y Martin y Rybicki (1998) han mostrado que la precisión y exactitud de las mediciones hechas a través del análisis de imágenes con las computadoras son mejores que las obtenidas por el método de análisis visual.

El objetivo del presente estudio consistió en correlacionar las propiedades ópticas de la hoja, obtenidas mediante un escáner comercial, con la concentración de N en hojas de fresa para generar un método sencillo, confiable y económico que permita establecer un diagnóstico rápido en cultivos intensivos, desarrollados en condiciones protegidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en un invernadero de plástico tipo túnel en la Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, Estado de México. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de N en forma de NO_3^- : 0, 4, 12 y 20 $\text{mol}_c \text{m}^{-3}$, de acuerdo con Steiner (Steiner, 1984) (Cuadro 3) y cuatro repeticiones, esto con la finalidad de obtener plantas con diferente suministro de N. Se trasplanto en un saco de cultivo de polietileno blanco calibre 600 μm y de 100 x 35 cm de largo y ancho, y a una distancia de 1.5 m entre hileras y 0.3 m entre plantas, Figura 16. Como sustrato se utilizó una mezcla de tezontle rojo con fibra de coco (50:50, v/v). La unidad experimental consistió en una planta de fresa.



Figura 16. Sacos de cultivo con fresas

Las plantas fueron llevadas con nutrición óptima ($12 \text{ mol}_c \text{m}^{-3}$ de NO_3^-) hasta que se comenzaron a implementar los tratamientos, para este muestreo tenían 5 semanas de implementarse los tratamientos respectivos.

Cuadro 3. Diseño de tratamientos.

N	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	NH_4^+	NO_3^-	H_2PO_4^-	SO_4^{2-}	CO_3^{2-}	CE
----- $\text{mol}_c \text{m}^{-3}$ -----									dS m^{-1}
0	9	4	7	0	0	1	11	8	1.6
4	9	4	7	0	4	1	11	4	1.7
*12	*9	*4	*7	0	*12	*1	*7	0	*2.0
20	9	4	7	4	16	1	7	0	2.5

*Solución nutritiva universal de Steiner al 100%, CE = conductividad eléctrica.

Muestreo de hojas y análisis químico del tejido vegetal

En la etapa de fructificación, correspondiente a la fase fenológica 8.5 que es cuando los frutos comienzan a adquirir el color varietal típico a los 180 días después del trasplante (ddt), se seleccionaron hojas recientemente maduras al azar por unidad experimental y éstas fueron colocadas en el interior de un escáner de escritorio de cama plana con un fondo negro para eliminar las sombras, marca Genius modelo Vivid II 1200XE, RGB con una resolución de 400 puntos por pulgada (dpi) en formato JPEG, Figura 17.



Figura 17. Imágenes obtenidas con escáner

Para la generación del espacio de color CIE $L^* a^* b$ se separó la imagen escaneada en RGB en sus colores primarios (espectros de luz azul, verde y rojo) y se generaron los espacios de colores CIELAB, Croma y Hue y se extrajeron los valores correspondientes a las longitudes de onda 450 - 495, 495 - 570 y 620 - 750 nm y L , a , b , Croma y Hue, respectivamente a partir de un programa elaborado en VISUAL BASIC.

El color de las hojas se expresó en coordenadas en color espaciales (Comisión Internationale d'Eclairage (CIE) L^* , a^* , b^*). La escala CIELAB de coordenadas se relaciona con: L^* (luminosidad) oscuro-brillante (0=negro, 100=blanco); a^* verde-rojo (valor negativo=más verde, valor positivo=más rojo o magenta); b^* azul-amarillo (valor negativo=más azul, valor positivo=más amarillo); ángulo de tono (hue) grado de marrón (el más alto es el más marrón) y C^* pureza del color (croma) intensidad del color (el más alto es el más intenso). Posteriormente, en las mismas hojas se cuantificó la concentración de N por el método microkjeldahl (Alcántar y Sandoval, 1999).

La concentración de N en hoja se relacionó con las reflectancias obtenidas en las bandas azul, verde y roja, L , a , b , ángulo del tono (hue) y pureza del color (chroma), se realizaron pruebas de comparación de medias por la prueba de tukey con un α de 0.05 y análisis de varianza mediante el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 18 se muestra la cantidad de luz reflejada (reflectancia numérica) en el espectro de la luz visible en hojas de fresa como respuesta a los tratamientos con N en la solución nutritiva.

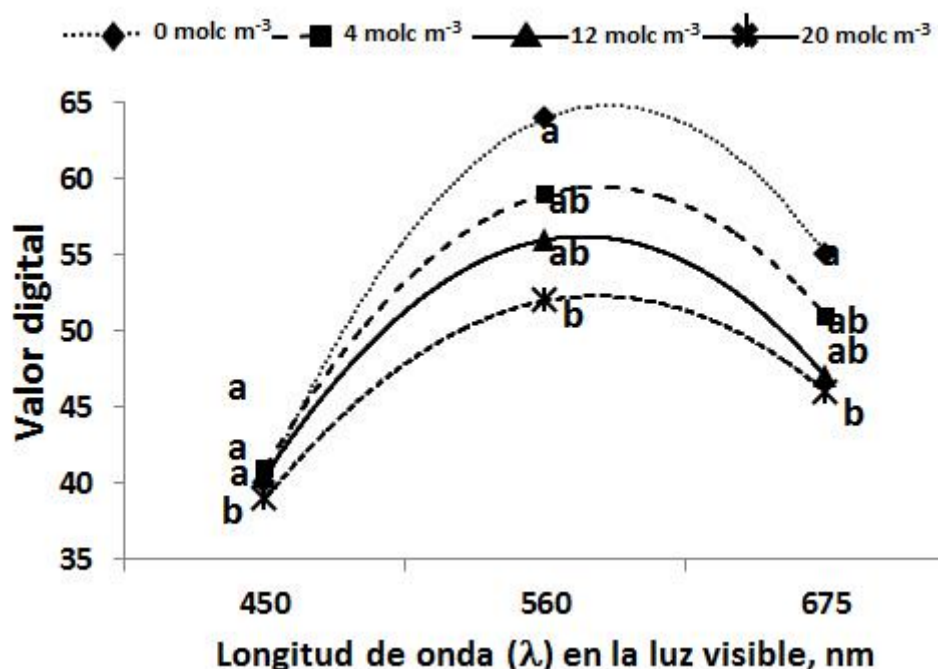


Figura 18 Reflectancia de luz (valores digitales en RGB) en hojas de fresa, para los diferentes tratamientos con nitrógeno a los 180 ddt en la etapa fenológica 8.5 después de 5 semanas de tratamientos. Valores con la misma letra en cada longitud de onda son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.05$).

La prueba de comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) indicó que la reflectancia en hojas fue estadísticamente mayor en las plantas sin suministro de NO_3^- , mientras que aquellas a las que se suministraron 20 molm^{-3} de NO_3^- la reflectancia fue menor y las que se suministró 4 y 12 molm^{-3} de NO_3^- fueron estadísticamente iguales (Figura 18). Lo anterior se atribuye a que las unidades experimentales con menores concentraciones de N en su tejido foliar presentan también una menor presencia de clorofila (Curran *et al.*, 2001). Al respecto, Cho y Skidmore (2006) indican que las bajas reflectancias de los cultivos saludables, observadas en la región visible del espectro electromagnético, obedecen principalmente a la intensa absorción de la molécula de clorofila. Ésta absorbe la radiación azul y roja y refleja el verde (Brizuela-Amador, 2007 y Terashima *et al.*, 2009).

El pico de absorbancia de la banda azul por la clorofila se traslapa con la absorción de los carotenoides, por lo que la reflectancia azul no es usada para la estimación de la clorofila. Asimismo, la máxima absorbancia del espectro rojo ocurre entre 660 y 680 nm, pero las altas concentraciones de clorofila saturan esta región de absorción (Sims y Gamon, 2002), por lo que la concentración de clorofila se predice a partir de reflectancias en los 550 y 700 nm y, por consiguiente, la concentración de N en las hojas, ya que este nutriente es un componente principal de la molécula de clorofila (Taiz y Zeiger, 2002; Zebarth *et al.*, 2002; Varvel *et al.*, 2007). Así el N y la clorofila están estrechamente correlacionados, de tal manera que una deficiencia de N incrementa la reflectancia de la radiación del espectro verde (Noh *et al.*, 2006).

La Figura 18 indica que para el color azul los valores digitales son bajos para todas las aplicaciones de NO_3^- de 38.0 a 42.7 y no se presentan diferencias significativas excepto el tratamiento que se suministró con 20 molm^{-3} de NO_3^- por lo cual no se observa relación con la concentración de N. Para los colores verde y rojo los valores son mayores entre 44.5 y 63 y son diferentes desde el punto de vista estadístico para los tratamientos de 0 y 20 molm^{-3} .

De acuerdo con el análisis de regresión entre el N en la parte aérea y los valores digitales para el espectro azul, verde y rojo, además de CIELAB, chroma y hue (Cuadro 4) se observa que existió una asociación negativa y altamente significativa ($\alpha \leq 0.05$) entre la reflectancia en las bandas azul y rojo y la concentración de N en parte aérea.

Cuadro 4. Relación entre los valores digitales, obtenidos mediante digitalización de imágenes con escáner, en las bandas azul, verde, roja, L, a, b, cromina y hue y la concentración de N en hojas de fresa.

X	ECUACIÓN	R ²
BANDA AZUL	$N(\%) = -0.2137X + 11.03$	0.69
BANDA VERDE	$N(\%) = -0.1033X + 8.1536$	0.54
BANDA ROJO	$N(\%) = -0.1143X + 7.9683$	0.70
CIE-L	$N(\%) = -0.2426X + 7.7961$	0.62
CIE-a	$N(\%) = -0.0171X + 2.1756$	0.00
CIE-b	$N(\%) = -0.2082X + 4.0999$	0.27
Chroma	$N(\%) = -0.2047X + 4.5458$	0.26
Hue	$N(\%) = 0.2008X - 23.247$	0.92

X = valor digital; N = concentración de nitrógeno en hoja; R² = coeficiente de determinación.

Las hojas de fresa de los tratamientos con 0 y 4 mol m⁻³ de N presentaron los niveles más altos de CIE-L. Los tratamientos no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre los valores de CIE-a y CIE-b.

De acuerdo con el análisis de regresión (Cuadro 4), existió una asociación negativa altamente significativa ($\alpha \leq 0.05$) entre los valores de CIE-L y las concentraciones de N.

De la misma forma existió una asociación negativa altamente significativa ($\alpha \leq 0.05$) entre los valores de CIE-L y la concentración de N en parte aérea, para el caso de CIE-a no se observó una asociación con los niveles de N en parte aérea (Cuadro 4).

Con estas observaciones se pudo generar un modelo matemático lineal para predecir las concentraciones de N en el follaje a partir de los valores de CIE-L con coeficientes de ajuste del 62% ($R^2 = 0.62$).

De acuerdo con los análisis de regresión, para el caso de ángulo de tono (hue) esta asociación fue positiva y significativa (Cuadro 4). Estos resultados permiten afirmar que el ángulo de tono (hue) es un indicador que estima la concentración de N en las hojas de fresa.

Estos resultados coinciden con Peñuelas *et al.* (1994) quienes identificaron un incremento en reflectancia entre los 500 y 600 nm en hojas de girasol estresadas por N. Un patrón similar fue reportado por Gamon *et al.* (1992) en la reflectancia de la cubierta foliar en girasol; específicamente observaron cambios entre 8:00 y 12:00 h en reflectancia entre plantas estresadas y no estresadas. De igual manera Lihong *et al.* (2004), encontraron que la reflectancia a los 560 nm correlacionaba de manera negativa con la concentración de N en el follaje del cultivo de arroz. Con estas observaciones Lihong *et al.* (2004) generaron un modelo matemático lineal para predecir las concentraciones de N en el follaje a partir de las reflectancias a 560 nm con un coeficiente de ajuste del 85% ($R^2 = 0.85$), muy parecido al obtenido en el presente trabajo en la banda verde (495-570 nm), que fue del 54% ($R^2 = 0.54$). Al respecto, Mirik *et al.* (2007) mencionan que el espectro de reflectancia en plantas adultas y sanas se caracteriza por una fuerte absorción (baja reflectancia) en el azul, un incremento en la reflectancia en el verde, fuerte absorción en el rojo, dentro del espectro visible. Además, indican que la respuesta en reflectancia en la región visible del espectro electromagnético está gobernada en las plantas por el efecto y comportamiento de las clorofilas, carotenos y antocianinas.

La concentración de N en la solución nutritiva tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre los valores de CIE-L (Figura 20).

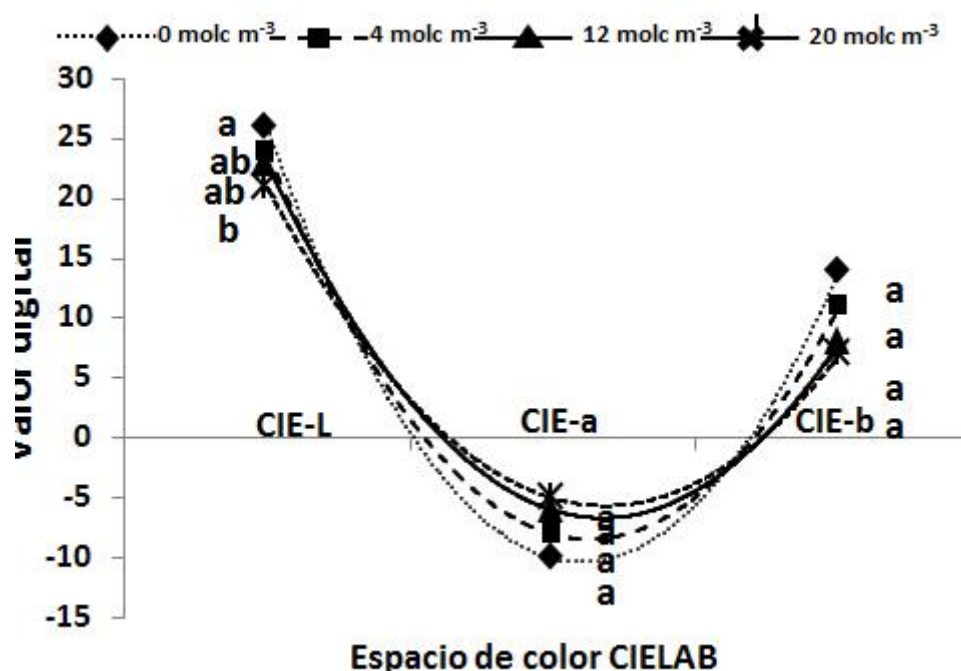


Figura 18 Relación entre los valores de CIELAB (L, a y b) y la concentración de N en la solución nutritiva. Valores con la misma letra en cada parámetro del espacio de color son estadísticamente iguales, (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Al respecto Mirik *et al.* (2007), mencionan que el espectro de reflectancia en plantas adultas y sanas se caracteriza por una fuerte absorción (baja reflectancia) en el espectro azul, como se observa en los valores de CIE-b, y una planta enferma absorbe más en el espectro verde, como se demuestra con los valores de CIE-a, aunque la reflectancia es mayor en comparación con los espectros azul y rojo, con una fuerte absorción en el rojo, dentro del espectro visible. Además, éstos indican que la respuesta en reflectancia en la región visible del espectro electromagnético está gobernada en las plantas por el efecto y comportamiento de las clorofilas, carotenos y antocianinas.

En las Figura 21B se observa un efecto significativo de la concentración de N sobre los valores de ángulo de tono (hue), los mayores valores de hue se observaron en hojas de los tratamientos con 20 mol m⁻³ de N. Los tratamientos con 0 y 4 mol m⁻³ de NO₃⁻ tuvieron los niveles más altos de pureza de color (Figura 21A).

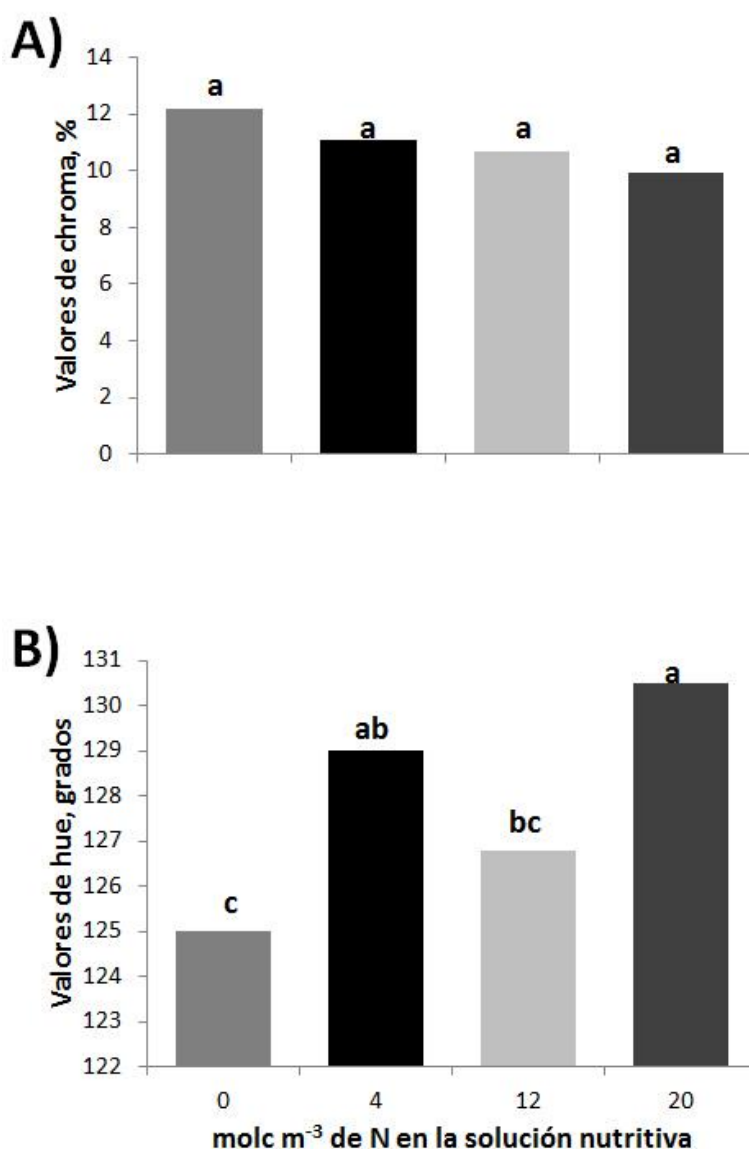


Figura 19. Relación entre los valores de chroma (A) y hue (B) con los niveles de N

en la solución nutritiva. Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$).

Con estos resultados se pudo generar un modelo matemático lineal para predecir las concentraciones de N en el follaje de fresa a partir de los valores de hue con un coeficiente de ajuste del 92% ($R^2 = 0.92$) $N(\%) = 0.2008X - 23.247$; donde X=reflectancia en valor digital.

CONCLUSIONES

Los resultados discutidos en el presente escrito permiten concluir que se puede estimar de manera rápida y confiable la concentración de N en hojas, con la medición de algunas propiedades ópticas de éstas, tales como la reflectancia en las bandas azul y roja de la luz visible, además de CIEL, y hue, lo cual permitirá generar estrategias de manejo de este nutriente en las soluciones fertilizantes tanto en suelo como en sustrato para la producción intensiva de fresa en invernadero.

LITERATURA CITADA

- Adams M. L., W. A. Norvell, W. D. Philpot, and J. H. Peverly. 2000. Spectral detection of micronutrient deficiency in 'Bragg' soybean. *Agron. J.* 92:261-268.
- Alcántar G. G. y V. M. Sandoval. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, México. 156 p.
- Blackmer T. M., J.S. Schepers, and G.E. Varvel. 1994. Light Reflectance Compared with Other Nitrogen Stress Measurements in Corn Leaves. *Agron. J.* 86:934-938.
- Bock C. H., G. H. Poole, P. E. Parker, and T. R. Gottwald. 2010. Plant Disease Severity Estimated Visually, by Digital Photography and Image Analysis, and by Hyperspectral Imaging. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29: 59-107
- Brizuela A. B., G. G. Alcántar, G. P. Sánchez, Y. Kalra, J. Crumbaugh, C. Olive, C. L. Tijerina y T. R. Maldonado. 2007. Establecimiento de índices espectrales en el diagnóstico nutrimental de N en maíz. *Agrociencia* 41: 827-835.
- Cho M. A. and A. K. Skidmore. 2006. A new technique for extracting the red edge position from hyperspectral data: The linear extrapolation method. *Remote Sensing of Environment* 101:181-193
- Cisneros J. J. and L. D. Godfrey. 2001. Midseason pest status of the cotton aphid (Homoptera: *Aphididae*) in California cotton: is nitrogen a key factor? *Environmental Entomology* 30: 501-510.
- Curran P. J., J. L. Dungan, and D. L. Peterson. 2001. Estimating the foliar biochemical concentration of leaves with reflectance spectrometry: Testing the Kokaly and Clark Methodologies. *Remote Sensing of Environment* 76:349-359.
- Gamon J. A., J. Peñuelas, and C. B. Field. 1992. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing of Environment* 41:35-44.
- Gates D. M., H. J. Keegan, J. C. Schleter, and V. R. Weidner. 1965. Spectral properties of plants. *Applied Optics* 4(1):11-20.
- Gitelson A. A., A. Viña, V. Ciganda, D. C. Rundquist, and T. J. Arkebauer. 2005. Remote estimation of canopy chlorophyll content in crops. *Geophysical Research Letters* 32:1-4. doi:10.1029/2005GL022688.

- Huber S., M. Kneubühler, A. Psomas, K. Itten, and N. E. Zimmermann. 2008. Estimating foliar biochemistry from hyperspectral data in mixed forest canopy. *Forest Ecology and Management* 256:491-501.
- Leon A. K., M. B. Domingo, P. C. Franco, and C. A. Jorge Leon. 2006. Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images *Food Research International* 39: 1084–1091.
- Lihong X., C. Weixing, L. Weihong, D. Tingbo, and Z. Yan. 2004. Monitoring leaf nitrogen status in rice with canopy spectral reflectance. *Agron. J.* 96:135-142.
- Lindow S. E. and R. R. Webb. 1983. Quantification of foliar plant disease symptoms by microcomputer-digitized video image analysis. *Phytopathology* 73:520-524.
- Ma B. L., M. J. Morrison, and L. M. Dwyer. 1996. Canopy light reflectance and field greenness to assess nitrogen fertilization and yield of maize. *Agron. J.* 88:915-920.
- Martin D. P. and E. P. Rybicki. 1998. Microcomputer-based quantification of maize streak virus symptoms in *Zea mays*. *Phytopathology* 88:422–427.
- Mirik M., G. J. Michels Jr., M. S. Kassymzhanova, and N. C. Elliott. 2007. Reflectance characteristics of Russian wheat aphid (Hemiptera: *Aphididae*) stress and abundance in winter wheat. *Computers and Electronics in Agriculture* 57:123-134.
- Noh H., Q. Zhang, B. Shin, S. Han, and L. Feng. 2006. A neural network model of maize crop nitrogen stress assessment for a multi-spectral imaging sensor. *Biosystems Engineering* 94:477-485.
- Niemira B. A., W. W. Kirk, and J. M. Stein. 1999. Screening for late blight susceptibility in potato tubers by digital analysis of cut tuber surfaces. *Plant Dis.* 83:469–473.
- Olmstead J. W., G. A. Lang, and G. G. Grove. 2000. Assessment of severity of powdery mildew infection of sweet cherry leaves by digital image analysis. *HortScience* 36:107-111.
- Ortega A. L. D., A. D. A. Miranda y V. M. Sandoval. 2006. Densidad de huevos y ninfas de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (WEST.) en *Gerbera jamesonii* H. Bolus con diferentes regímenes de fertilización nitrogenada. *Agrociencia* 40: 363-371.
- Palma L. D. J., G. S. Salgado, O. J. J. Obrador, N. A. Trujillo, E. L. del C. Lagunes., C. J. Zavala, B. A. Ruiz y M. M. A. Carrera. 2002. Sistema integrado para recomendar dosis de fertilización en caña de azúcar (SIRDF). *Terra* 20: 347-358.
- Peñuelas J., J. A. Gamon, A. L. Fredeen, J. Merino, and C. B. Field. 1994. Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen -and water- limited sunflower leaves. *Remote Sens Environ* 48:135-146.

- Pérez G. M. y B. R. Castro. 2010. El chile manzano. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 128 p.
- Poce F. J. A., M. Bethencourt, D. F. J. Moreno, and S. J. M. Palacios. 2011. Using a Flatbed Scanner To Measure Detergency: A Cost-Effective Undergraduate Laboratory J. Chem. Educ., 88:1314–1317 DOI: 10.1021/ed100635z
- Rangel L. J.A., G. G. Alcántar, R. J. Z. Castellanos, M. E. García, L. C. Trejo y H. H. Vaquera. 2002. Comparación de dos pruebas para diagnosticar N en sorgo. Terra 20: 383-390.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT user's guide. Release 9.1 SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Sims D. A. y J. A. Gamon. 2002. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. Remote Sensing of Environment 81:337-354.
- Solari F., J. Shanahan, R. Ferguson, J. Schepers, and A. Gitelson. 2008. Active sensor reflectance measurements of corn nitrogen status and yield potential. Agron. J. 100: 571–579.
- Steiner A. 1984. The universal nutrient solution. pp. 633–649. In: Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture. ISOSC. Wageningen. The Netherlands.
- Taiz L. and E. Zeiger. 2002. Plant physiology. The Benjamin /Cummings Publishing Company. CA, USA. 565 p.
- Terashima I., T. Fujita, T. Inoue, C. W. Soon, and R. Oguchi. 2009. Green Light Drives Leaf Photosynthesis More Efficiently than Red Light in Strong White Light: Revisiting the Enigmatic Question of Why Leaves are Green. Plant Cell Physiol. 50: 648 – 697.
- Thomas J. R., C. L. Wiegand, and V. I. Myers. 1967. Reflectance of cotton leaves and its relation to yield. Agron. J. 59:551-554.
- Varvel G. E., W. W. Wilhelm, J. F. Shanahan, and J. S. Schepers. 2007. An algorithm for corn nitrogen recommendations using a chlorophyll meter based sufficiency index. Agron. J. 99: 701-706.
- Walburg G., M. E. Bauer, C. S. T. Daughtry, and T. L. Housley. 1982. Effect of nitrogen nutrition on growth, yield and reflectance characteristics of corn canopies. Agron. J. 74:677-683.
- Zebarth B. J., M. Younie, J. W. Paul, and S. Bittman. 2002. Evaluation of leaf chlorophyll index for making fertilizer nitrogen recommendations for silage corn in a high fertility environment. Com. Soil Sci. Plant Anal. 33: 665–684.

VII. CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los objetivos e hipótesis planteados se establecen las siguientes conclusiones:

La aplicación del NDVI en la interpretación de las firmas espectrales obtenidas mediante el espectrómetro de reflectancia pasiva, es una herramienta que permite diagnosticar el estado nutrimental de nitrógeno, en tiempo real, de manera sencilla, rápida, económica y antes de que se manifiesten síntomas visuales.

Se observó una relación positiva y altamente significativa en la región del infrarrojo cercano y negativa en el visible entre las lecturas del radiómetro CROPSCAN y la concentración de nitrógeno en follaje.

Las variaciones del espectro de reflectancia visible 610 nm, en hojas recientemente maduras de pimiento, fueron ocasionadas por alteraciones en el contenido de nitrógeno total. Por tanto, estos cambios se pueden usar para identificar clorosis en tiempo real y antes de ser percibidos visualmente.

Los resultados discutidos en el presente escrito permiten concluir que se puede estimar de manera rápida y confiable la concentración de nitrógeno en hojas, con la medición de algunas propiedades ópticas de éstas, tales como la reflectancia en las bandas azul, verde y roja de la luz visible, presentes en el espacio de color RGB de las imágenes digitales obtenidas mediante un escáner. Ya que se observó una relación negativa altamente significativa entre la reflectancia y la concentración de nitrógeno en el follaje de pimiento y fresa, en las bandas del espectro visible (azul, verde y roja), obtenidas mediante el programa Visual Basic, en el que se utilizaron imágenes digitales provenientes de un escáner de escritorio.

Los resultados discutidos en el presente escrito también permiten concluir que se puede estimar de manera rápida y confiable la concentración de nitrógeno en hojas, con la medición de algunas propiedades de las imágenes digitales presentes en el espacio de color CIE-Lab de las imágenes digitales obtenidas mediante un escáner, como CIEL, CIEb.

Otras propiedades ópticas de las imágenes como es el croma y hue obtenidos de imágenes digitales, permitirán generar estrategias de manejo de nitrógeno en las soluciones fertilizantes tanto en suelo como en sustrato para la producción intensiva de fresa y pimiento en invernadero.

Los modelos matemáticos que mejor estimaron la concentración de nitrógeno en el follaje de las plantas de pimiento se obtuvieron en la banda verde y rojo utilizando escáner de escritorio, ya que presentaron mayor coeficiente de determinación y en fresa, se obtuvieron en la banda azul y rojo; utilizando escáner de escritorio, ya que presentaron mayor coeficiente de determinación.

El porcentaje de reflectancia del espectro visible, propiedades de las imágenes de diferentes espacios de color, así como otras propiedades de las imágenes pueden ser utilizadas como un indicador confiable para diagnosticar el estado de nitrógeno total en el tejido vegetal, confirmando que no son las mismas bandas ni propiedades de las imágenes las que pueden ser usadas para diferentes cultivos y que nos sirvan para su diagnóstico.