

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



## **Sensores ópticos proximales: aplicación al estado nutricional de la viña**

Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural

Trabajo Fin de Grado

Alumna: Blanca García Canet

Tutor: Antonio Luis Lidón Cerezuela

CURSO ACADÉMICO 2019 - 2020

Valencia, julio de 2020



## **Sensores ópticos proximales: aplicación al estado nutricional de la viña.**

### **Resumen**

Conocer el estado nutricional de los cultivos y, en concreto del nitrógeno (N), permite ajustar los aportes fertilizantes a las necesidades del cultivo y asegurar altas producciones minimizando el impacto ambiental producido por las emisiones de N. Tradicionalmente se han empleado métodos útiles como el del Nmin y el análisis foliar, pero estos procedimientos son costosos en tiempo y en recursos. Por ello una alternativa a estos análisis de suelo y planta son los sensores ópticos proximales que, colocados en contacto o cerca de la planta, proporcionan información útil del estado de los cultivos y su manejo, siendo de especial interés como apoyo a la fertilización nitrogenada. Por ello, estos sensores constituyen una herramienta que posee un elevado potencial con vistas al futuro de la fertilización en una agricultura de precisión, pero para que eso ocurra se deben superar las limitaciones de estos sensores mediante investigaciones promovidas por la presión ambiental y social para la gestión sostenible del N.

En este trabajo se ha realizado una revisión de los sensores ópticos proximales como sistemas de apoyo en las recomendaciones de abonado describiendo los tipos de sensores existentes, sus características, y la situación actual en la que se encuentran; ello ha servido para aportar una visión general del funcionamiento de estos sensores y entender la evaluación de los medidores de clorofila MCL502, CCM-300 y Apogee MC-100, realizada en una parcela de vid situada en Caudete de las Fuentes, en la Plana de Utiel-Requena. Para realizar la evaluación y comparación de los tres medidores de clorofila primero se calibraron los dispositivos mediante las medidas realizadas in situ que fueron contrastadas con las medidas de clorofila obtenidas en el laboratorio, esto permitió establecer las ecuaciones y los modelos que relacionan las lecturas SPAD de los dispositivos con la clorofila del cultivo y que se emplearon para evaluar el correcto funcionamiento de estos sensores. Esos modelos a su vez permitieron realizar una caracterización del contenido de clorofila a lo largo del ciclo del cultivo del viñedo para un transecto en la misma zona y cuyos resultados coinciden con los trabajos realizados por otros autores en el cultivo de vid. Por último, se emplearon las medidas realizadas para estimar el contenido de N en diferentes estados fenológicos a partir de las relaciones encontradas por otros autores.

**Palabras clave:** Clorofila, nitrógeno, fertilización, SPAD, vid, teledetección, calibración.

## **Proximal optical sensors: application to the nutritional state of the vineyard.**

### **Abstract**

Knowing the nutritional state of the crops, and in particular of the nitrogen (N), makes it possible to adjust the fertilizer contributions to the needs of the crop and to ensure high production while minimizing the environmental impact produced by N emissions. Traditionally, useful methods such as Nmin and leaf analysis have been used, but these procedures are costly in terms of time and resources. Therefore, an alternative to these soil and plant analyses are the proximal optical sensors that are placed in contact with or near the plant and provide useful information for crop management and, specifically, for nitrogen fertilization. Therefore these sensors are a tool that has a high potential for the future of fertilization in precision agriculture, but for that to happen the limitations of these sensors must be overcome through research promoted by environmental and social pressure for sustainable management of N.

In this work, a review of the proximal optical sensors as support systems in fertilizer recommendations has been carried out describing the types of existing sensors, their characteristics, and the current situation in which they are found. This has served to provide an overview of the operation of these sensors and to understand the evaluation of the MCL502, CCM-300 and Apogee MC-100 chlorophyll meters, carried out in a vineyard plot located in Caudete de las Fuentes, in Utiel-Requena region. To carry out the evaluation and comparison of the three chlorophyll meters, the devices were first calibrated by means of the measurements made in situ which were contrasted with the real chlorophyll measurements obtained in the laboratory. This allowed the establishment of the equations and models that relate the SPAD readings of the devices with the chlorophyll of the crop and which were used to evaluate the correct functioning of these sensors. These models, in turn, made it possible to characterize the chlorophyll content throughout the grapevine cultivation cycle for a transect in the same area, the results of which coincide with the work carried out by other authors on vine cultivation. Finally, the N content in different phenological states was estimated from the SPAD- N relationships found by other authors.

**Keywords:** Chlorophyll, nitrogen, fertilization, SPAD, grapevine, remote sensing, calibration.

**Alumna:** Blanca García Canet

**Tutor Académico:** Prof. D. Antonio Luis Lidón Cerezuela

Valencia, Julio 2020

*Expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor Antonio, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y sobre todo por su gran ayuda y dedicación.*

*A mi familia, en particular a mis hermanos Sara y Jose, a Nacho, a mi tía Elena y a Alfredo por haber sido mi máximo apoyo durante la realización de este trabajo.*

# ÍNDICE GENERAL

1.	ANTECEDENTES .....	1
2.	OBJETIVOS .....	3
3.	USO DE SENSORES ÓPTICOS PROXIMALES COMO SISTEMA DE APOYO A LAS RECOMENDACIONES DE ABONADO .....	4
3.1	Tipos y características de los sensores ópticos proximales .....	4
3.1.1	Medidores de clorofila .....	6
3.1.2	Medidores de reflectancia .....	9
3.1.3	Medidores de flavonoides basados en fluorescencia .....	11
3.2	Situación actual de los sensores ópticos proximales .....	12
4.	EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIDORES DE CLOROFILA .....	13
4.1	INTRODUCCIÓN.....	13
4.2	MATERIAL Y MÉTODOS .....	13
4.2.1	Equipos de medición utilizados .....	13
4.2.2	Medidas realizadas.....	15
4.2.3	Análisis de datos .....	17
4.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.3.1	Descripción de los valores obtenidos .....	18
4.3.2	Análisis de las medidas obtenidas con los sensores y las medidas de laboratorio 20	
4.3.3	Comparación de equipos MCL502, CCM-300 y MC-100.....	21
4.3.4	Obtención de ecuaciones específicas para cada equipo.....	23
4.4	CONCLUSIONES .....	25
5.	CONTENIDO DE CLOROFILA Y NITRÓGENO DURANTE EL CICLO VEGETATIVO EN UN VIÑEDO .....	26
5.1	INTRODUCCIÓN.....	26
5.2	MATERIAL Y MÉTODOS .....	27
5.2.1	Descripción de la zona de estudio .....	27
5.2.2	Descripción del área de estudio y medidas realizadas .....	28
5.2.3	Análisis de datos .....	29
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
5.3.1	Relación entre el contenido de clorofila y las medidas SPAD .....	30
5.3.2	Distribución de la clorofila a lo largo del ciclo de cultivo del viñedo.....	31
5.3.3	Contenido de nitrógeno a lo largo del ciclo de cultivo del viñedo .....	34
5.4	CONCLUSIONES .....	37
6.	CONCLUSIONES FINALES DEL TRABAJO .....	38
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de algunos sensores ópticos proximales con potencial de uso para el manejo del nitrógeno (N) en cultivos de hortalizas (adaptado de Padilla et al., 2018b). .....	5
Tabla 2. Análisis estadístico para evaluar la regresión de MCL502 y MC-100 frente al contenido total de clorofila. ....	22
Tabla 3. Relaciones obtenidas entre las medidas de los sensores y el contenido total de clorofila para cada uno de los dispositivos empleados.....	24
Tabla 4. Contenido medio de clorofila ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) y desviación estándar obtenido para cada fecha con los tres modelos empleados a partir de los valores de las tres hojas de cada vid del transecto ( $n=48$ ). .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Funcionamiento de medidores de clorofila basados en la transmitancia utilizados para estimar el contenido de clorofila foliar (adaptado Padilla et al., 2018b).	6
Figura 3.2. Evaluación de medidores de clorofila como indicadores del estado de N en melón y tomate (Padilla et al., 2016).....	8
Figura 3.3. Esquema de funcionamiento de los medidores de reflectancia en la cubierta vegetal. Fuente: Padilla et al., 2018b.....	9
Figura 3.4. Comparación de la radiación (visible y NIR) de una vegetación a) en su estado óptimo y b) con deficiencias. Fuente: Simmon, 2009.....	9
Figura 3.5. Evaluación de medidores de reflectancia como indicadores del estado de N en melón y tomate (Padilla et al., 2015.).....	10
Figura 4.1. Medidor de clorofila MCL502, CCM-300 y ApogeeMC-100, respectivamente. ....	13
Figura 4.2. Disposición de las hojas muestreadas en una cepa de vid: P (hoja pequeña, situada en la parte superior de la cepa), M (hoja mediana, situada en la parte central de la cepa) y G (hoja grande situada en la parte baja de la rama). ....	15
Figura 4.3. Estado de una de las vides muestreadas para las fechas a) 4 de abril, b) 23 de mayo, c) 18 de junio, d) 30 de julio, e) 3 de septiembre y f) 3 de octubre.....	16
Figura 4.4. Valores medios para cada vid de a) clorofila total obtenida en laboratorio, b) clorofila CCM-300, c) unidades SPAD del MCL50D y d) unidades SPAD del Apogee MC-100. ....	18
Figura 4.5. Tendencia de las medidas de clorofila obtenida en laboratorio respecto al tipo de hoja y vid que se puede generalizar para los tres dispositivos (n=81). ....	19
Figura 4.6. Comparación de los tres equipos con el contenido de clorofila obtenido en laboratorio (n=24). ....	20
Figura 4.7. Relación entre las medidas de clorofila en mg/m <sup>2</sup> y las lecturas SPAD-502 para el año 2017. Fuente: González, 2018. ....	21
Figura 4.8. Comparación de las medidas tomadas con MCL502 y con Apogee MC-100 (n=24). ....	21
Figura 4.9. Comparación de las rectas de regresión obtenidas con los valores de MCL502 y MC-100 frente al contenido de clorofila total determinado en el laboratorio. ....	22
Figura 4.10. Comparación de las rectas de regresión del dispositivo CCM-300 frente al MCL502 (azul) y el Apogee MC-100 (naranja), respectivamente. ....	22
Figura 4.11. Comparación entre MCL502 y CCM-200. Fuente: Taskos et al., 2014.....	23

Figura 4.12. Relación entre las lecturas tomadas con MCL502 (unidades SPAD) y el contenido de clorofila total ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) para a) un modelo lineal y b) un modelo logarítmico ( $n=27$ ).....	23
Figura 4.13. Modelo doble inverso que recoge la relación entre las medidas de MCL502 y el contenido de clorofila ( $n=27$ ).....	24
Figura 5.1. Disposición de la parcela a unos 900 metros del núcleo urbano de Caudete de las Fuentes. ....	27
Figura 5.2. Climograma de Requena para el año 2019. Fuente: Riegos IVIA. ....	28
Figura 5.3. Zona de estudio que se corresponde con la superficie medida por el satélite Sentinel 3A de $900 \times 900 \text{ m}^2$ y donde se presentan a) los centros de los 9 cuadrados de $300 \times 300 \text{ m}$ y b) la distribución de las 16 cepas de vid seleccionadas a lo largo del transecto. Fuente Victoria González 2018. ....	28
Figura 5.4. Contenido medio de clorofila ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) en el transecto a lo largo del ciclo de cultivo obtenido con a) modelo lineal, b) modelo logarítmico y c) modelo doble inverso (para cada fecha $n=48$ ).....	30
Figura 5.5. Distribución de la clorofila en $\text{mg}/\text{m}^2$ a lo largo del ciclo de cultivo de la vid en la zona seleccionada. Las barras representan la desviación estándar ( $n=48$ ).....	31
Figura 5.6. Distribución de las unidades SPAD a lo largo de los estadios fenológicos de a) las 16 cepas del transecto y b) los datos obtenidos para <i>Vitis vinifera</i> L. cv. 'Riesling Becker'. Fuente: Castañeda et al., 2018. ....	32
Figura 5.7. Representación de los valores de clorofila en función del tipo de hoja. Statgraphics Centurion XVII).....	32
Figura 5.8. Representación de los datos de clorofila obtenidos en función del tipo de hoja para a) las 16 cepas de vid que forman el transecto y b) las tres cepas de vid medidas en el apartado 4.....	33
Figura 5.9. Representación de los valores de clorofila en función del tipo de conducción (espaldera o vado). Statgraphics Centurion XVII. ....	33
Figura 5.10. Contenido medio de clorofila ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) según el tipo de conducción (espaldera o vaso) para cada fecha de muestreo. ....	34
Figura 5.11. Relación entre los valores SPAD obtenidos con el medidor de clorofila y los porcentajes de N en peso seco para a) los datos del transecto y b) los datos obtenidos en vid por Porro et al., 2000. El año 1 se corresponde con Fruit-set 96, el año 2 con Fruit-set 96 y el año 3 con Fruit-set 99.....	35

# 1. ANTECEDENTES

La fertilización de los cultivos es una práctica agrícola consistente en la reposición de los elementos nutritivos que las plantas extraen del suelo, o que los suelos pierden por lavado, transformación y erosión, poniendo a disposición de los cultivos los nutrientes que precisan en cada momento. Los fertilizantes representan uno de los principales insumos de la producción agraria, de modo que un manejo eficiente constituye una importante fuente de ahorro y de reducción de los impactos medioambientales (García-Serrano et al., 2009).

Dentro de los fertilizantes empleados comúnmente en la agricultura el más utilizado es el nitrógeno (N), ya que éste afecta directamente a los rendimientos de los cultivos, y en la mayoría de los casos, se relaciona con una mejor calidad de los productos cosechados (Villar et al., 2002). Es por ello que conocer el estado nutricional de los cultivos y, en concreto el del nitrógeno, permite ajustar los aportes de fertilizantes a las necesidades del cultivo y asegurar altas producciones (Cameron et al., 2013).

La aplicación de grandes cantidades de fertilizantes nitrogenados, con el fin de conseguir altos rendimientos puede reducir la fertilidad del suelo y el rendimiento de la planta, y lleva asociada una serie de pérdidas de nitrógeno que pueden causar daños ambientales y en la salud humana. Las pérdidas de nitrógeno pueden ser por lixiviación, por debajo de la zona de las raíces, o por escorrentía, dando lugar a una acumulación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en las aguas superficiales y/o subterráneas, que está asociada a problemas de eutrofización y de salud humana en el caso de su consumo. Además, el exceso de N aplicado puede llegar a la atmósfera a través de las emisiones de óxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}$ ), que contribuyen al calentamiento global, y a través de la volatilización del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), que contribuye al enriquecimiento de N de los ecosistemas naturales (Padilla et al., 2018b). Como consecuencia, aparece la necesidad de realizar una adecuada fertilización, que permita alcanzar rendimientos máximos sin comprometer el medio ambiente, convirtiéndose hoy día la protección del medio ambiente en una consideración imprescindible, en general, para la agricultura y, en particular, para la producción intensiva.

Con el fin de realizar una óptima fertilización es necesario determinar el estado de N de los cultivos, pudiendo emplearse diferentes sistemas de recomendación de abonado nitrogenado. Estos sistemas de recomendación se clasifican en tres grupos: modelos de simulación, sistemas en los que se realizan medidas del suelo o sistemas en los que se realizan medidas de la planta.

Los sistemas basados en modelos de simulación pueden emplearse como herramienta de apoyo a la fertilización nitrogenada, realizando predicciones sobre escenarios de fertilización y estimando los requerimientos de N del cultivo (Jongschaap, 2006). Estos modelos suelen requerir bastantes parámetros y necesitan ser calibrados y validados en diferentes condiciones para poder usarse con garantías.

Haciendo referencia a los sistemas basados en medidas del suelo se encuentran: el método del Nmin, el sistema KNS, el sistema del Índice de suministro de N del suelo (SNS) y sistemas basados en el balance de nitrógeno.

En el método del Nmin se realizan una serie de muestreos de suelo y un posterior análisis para determinar el contenido de nitrógeno en forma de amonio y de nitrato. En

este método es necesario tomar entre 10 y 20 muestras de suelo para obtener un valor representativo debido a la variabilidad que presenta el nitrato en el suelo. Este método se ha venido utilizando para cultivos hortícolas en Europa central (Igual, 2010).

El sistema KNS considera el N mineral de la zona de raíces, al inicio y durante el crecimiento del cultivo, realizándose como mínimo dos muestreos de suelo a lo largo del ciclo del cultivo. Este sistema de recomendación se basa en el Nmin y se utiliza, por ejemplo, en Bélgica y en el norte de Europa (Ziegler et al. 1996).

En el sistema del Índice de suministro de N del suelo (SNS) a partir de determinada información de la parcela, de la precipitación y del cultivo anterior, se emplean tablas de consulta que permiten obtener un índice SNS que indica la dosis de nitrógeno a emplear en la fertilización. Este sistema se aplica en Inglaterra (Rahn, 2012).

En los sistemas basados en el balance de N se restan las fuentes de suministro de N y las fuentes de demanda de N, siendo la diferencia entre ambas la cantidad de fertilizante que se debe aplicar. Implica conocer algunos componentes del balance que son difíciles de cuantificar, como por ejemplo el aporte de N por mineralización.

Por último, los sistemas basados en medidas de la planta se fundamentan en la relación existente entre el N en la hoja y el contenido general de N en el cultivo (Thompson et al., 2017). Entre ellos se encuentran el análisis de nitrato en la savia y los sensores ópticos proximales. El análisis de nitrato en la savia se realiza, dependiendo del cultivo, sobre los peciolo de las hojas o sobre los nervios centrales de las hojas y es el método más empleado para determinar el estado nutritivo de las plantas.

Tradicionalmente los sistemas de recomendación de abonado se han basado en los análisis de suelo, como por ejemplo el método del Nmin, y en el análisis foliar, utilizado fundamentalmente para el diagnóstico de carencias. Estos procedimientos son muy útiles pero los muestreos y los análisis son costosos en tiempo y en recursos y, para ciertos cultivos, los resultados no son tan rápidos como para hacer recomendaciones sobre la aplicación de fertilizantes a tiempo.

Una alternativa a estos análisis de suelo y planta mencionados es el uso de sensores ópticos proximales, que son equipos portátiles que se colocan en contacto o cerca del cultivo y miden las propiedades ópticas de la cubierta vegetal, proporcionando una información que puede ser útil para el manejo de los cultivos y, concretamente, para la fertilización nitrogenada. Estos sensores no miden directamente el contenido de N sino que miden índices relacionados con la reflectancia de la radiación o indirectamente compuestos indicadores que son sensibles al estado de N del cultivo (clorofilas y flavonoles, fundamentalmente). Tienen la ventaja de determinar el estado nutricional de forma indirecta y no destructiva, son rápidos y, en general, de fácil manejo, lo que facilita la obtención de los datos de interés para el manejo de la fertilización. Pero su uso requiere de una calibración con determinaciones directas en laboratorio, que son contrastadas con las medidas realizadas in situ. Por todo ello los sensores ópticos proximales constituyen una herramienta respetuosa con el medio ambiente, que puede utilizarse como apoyo a la fertilización, ya que podrían proporcionar de forma rápida y eficaz el estado nutricional de los cultivos contribuyendo a una fertilización más eficiente y asegurando una producción rentable de los mismos.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Final de Grado es contribuir a un mejor conocimiento de los sensores ópticos proximales y valorar su posible uso como herramienta de apoyo a la fertilización, estimando de forma rápida y eficaz, el estado de N de los cultivos con el fin de obtener un manejo eficiente de la fertilización y una óptima producción.

Los objetivos concretos de este Trabajo Final de Grado son:

- Revisar el uso actual de sensores ópticos proximales como sistemas de apoyo a las recomendaciones de abonado.
- Evaluar el funcionamiento de diferentes medidores de clorofila.
- Caracterizar el contenido de clorofila durante el ciclo vegetativo en un viñedo de la zona de Utiel – Requena y estimar el contenido de N de la planta en diferentes estados fenológicos del cultivo.

### **3. USO DE SENSORES ÓPTICOS PROXIMALES COMO SISTEMA DE APOYO A LAS RECOMENDACIONES DE ABONADO**

#### **3.1 Tipos y características de los sensores ópticos proximales**

Los sensores ópticos proximales son equipos portátiles de teledetección que al colocarse en contacto o cerca del cultivo, miden propiedades ópticas de las plantas (transmitancia, reflectancia y fluorescencia) que permiten determinar el estado del N de los cultivos. Se trata de técnicas no destructivas que proporcionan información a través de una evaluación en tiempo real e “in situ” (Padilla, 2016).

La monitorización mediante sensores ópticos proximales se ha venido utilizando desde hace varios años en explotaciones extensivas de EE. UU. y norte de Europa (principalmente en trigo (*Triticum spp.*) y maíz (*Zea mays L.*)) (Padilla et al., 2018b). Sin embargo, la aplicación de los sensores ópticos proximales en cultivos hortícolas es escasa, aunque recientemente se han realizado diversos experimentos que han puesto de relieve el potencial de estos sensores como apoyo para la fertilización nitrogenada de algunos cultivos hortícolas intensivos como: pimiento (*Capsicum annuum L.*), pepino (*Cucumis sativus L.*), tomate (*Solanum lycopersicum L.*), patata (*Solanum tuberosum L.*) y melón (*Cucurbita melo L.*); demostrando la sensibilidad y capacidad de estos dispositivos para detectar el estado del N de ciertos cultivos (Cartelat et al., 2005; de Souza et al., 2019; Gianquinto et al., 2004; Hurtado et al., 2017; Padilla et al., 2018a; Suárez-Rey et al., 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, los sensores ópticos proximales se basan en medidas realizadas sobre la planta, y dentro de ellos se pueden encontrar tres tipos diferentes: los medidores de clorofila, los medidores de reflectancia y los medidores de flavonoides (Padilla et al., 2018b). En la tabla 1 se muestran las características de los principales sensores ópticos proximales que se han utilizado en diferentes cultivos. En este apartado se revisan estos tres tipos de sensores describiendo para cada tipo de sensor el principio de funcionamiento, las consideraciones de medición, y se revisan las principales aplicaciones realizadas con estos equipos. Al final del apartado se realiza una visión global de la situación actual de los sensores ópticos proximales.

Tabla 1. Características de algunos sensores ópticos proximales con potencial de uso para el manejo del nitrógeno (N) en cultivos de hortalizas (adaptado de Padilla et al., 2018b).

Tipo de sensor	Dispositivos	Principio de medición	Longitud de onda (nm)	Escala
<b>Medidor de clorofila</b>	SPAD-502	Transmitancia	650,940	Hoja
	N-tester	Transmitancia	650,960	Hoja
	AtLEAF+	Transmitancia	660,940	Hoja
	MC-100	Transmitancia	653,931	Hoja
	CCM-200	Transmitancia	653,931	Hoja
	DUALEX	Transmitancia	710,850	Hoja
	MULTIPLEX	Fluorescencia	516,685,735	Hoja
<b>Sensor de reflectancia</b>	MRSR5/87/16R	Reflectancia (pasiva)	460,510,560,610,660,710,760,810	Cubierta
	CropSpec	Reflectancia (pasiva)	760,810	Cubierta
	Spectral Reflectance Sensor	Reflectancia (activa)	730-740,800-810	Cubierta
	OptRx Crop Sensor	Reflectancia (activa)	532,570,650,810	Cubierta
	N-sensor ALS	Reflectancia (activa)	670,728,775	Cubierta
	Crop Circle ACS 430	Reflectancia (activa)	670,730,780	Cubierta
	Crop Circle ACS 470	Reflectancia (pasiva)	450,550,650,670,730,760	Cubierta
	RapidScan CS-45	Reflectancia (activa)	670,730,780	Cubierta
	GreenSeeker	Reflectancia (activa)	650,770	Cubierta
GreenSeeker Handheld	Reflectancia (activa)	660,780	Cubierta	
<b>Medidor de flavonoides</b>	DUALEX	Fluorescencia	375,650	Hoja
	MULTIPLEX	Fluorescencia	590,735,985	Hoja

### 3.1.1 Medidores de clorofila

Estos sensores ópticos estiman el contenido de clorofila en hoja mediante la transmitancia (o en algún caso mediante fluorescencia) a diferentes longitudes de onda, e indican el estado nutritivo de la planta basándose en la relación existente entre el contenido foliar de clorofila y el contenido foliar de nitrógeno (Scheppers et al., 1992).

Para entender esta relación hay que hacer referencia a la fuerte correlación positiva existente entre el contenido de nitrógeno foliar y la capacidad fotosintética (Santos et al., 2008). La mayor parte del N de la hoja está contenida en el aparato fotosintético y las enzimas involucradas en la fotosíntesis (Padilla et al., 2018b). Evans (1989) estableció en sus investigaciones que el nitrógeno implicado en la fotosíntesis se dividía en dos partes: una en forma de proteínas solubles (fase oscura de la fotosíntesis), y otra en los complejos proteína-pigmentos contenidos en los tilacoides de los cloroplastos (fase luminosa de la fotosíntesis). En los tilacoides, solamente se invierten 4 moles de nitrógeno por mol de clorofila, mientras que en el complejo pigmentos-proteínas se invierten 40 moles de nitrógeno por mol de clorofila. Como consecuencia de esta relación fisiológica, se han encontrado fuertes correlaciones entre la clorofila y el nitrógeno foliar, lo que permite afirmar que el nitrógeno es necesario para la síntesis de clorofila y que, por tanto, el nitrógeno se relaciona también con el verdor de las hojas y con la eficiencia fotosintética (Santos et al., 2008; Villar et al., 2002).

Todo ello indica la capacidad de los medidores de clorofila de estimar el contenido de nitrógeno foliar y, por tanto, la capacidad de reducir las pérdidas de nitrógeno mediante la realización de una fertilización razonada apoyada en el uso de estas medidas (Villar et al., 2002). Las mediciones se realizan con equipos portátiles que estiman indirectamente el contenido relativo de clorofila por unidad de superficie foliar, sin llegar a dañar el tejido (Monje y Bugbee, 1992). Según Padilla y colaboradores (2018) la mayoría de los medidores de clorofila estiman el contenido relativo de clorofila de la hoja midiendo la absorbancia y la transmitancia de: la radiación roja que la clorofila absorbe, y la radiación cercana al infrarrojo (NIR) que la clorofila transmite (Figura 3.1).

A mayor cantidad de N en la planta, mayor es el contenido de clorofila, y la absorción de la radiación roja aumenta; por el contrario, cuanto menor cantidad de clorofila la absorción de radiación roja es menor y la transmisión es mayor (Padilla, 2016). Estos sensores se denominan medidores de clorofila basados en la transmitancia (Tabla 1) y algunos de los ejemplos que se pueden encontrar en el mercado son: el MCL502, el N-tester, el Apogee MC-100 y el atLEAF+ que es el más nuevo y económico.

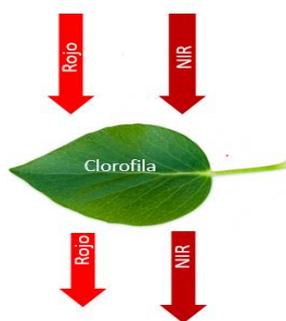


Figura 3.1. Funcionamiento de medidores de clorofila basados en la transmitancia utilizados para estimar el contenido de clorofila foliar (adaptado de Padilla et al., 2018b).

Otro tipo de medidores de clorofila son los basados en la fluorescencia, un ejemplo de ellos es el sensor MULTIPLEX (Tabla 1). Estos se basan en la relación de emisión de fluorescencia de clorofila de la radiación roja y roja lejana (Padilla et al., 2018b).

Generalmente los medidores de clorofila son rápidos, fáciles de usar y no necesitan ninguna capacitación especial para ser empleados. Las lecturas de los medidores de clorofila se pueden ver afectados por numerosos factores como: el cultivar, la anatomía de la hoja, la hora del día, enfermedades de los cultivos, deficiencias nutricionales y estrés hídrico (Shapiro et al., 2006; Xiong et al., 2015). Por todo ello, para conseguir una medición representativa se deben realizar repeticiones y seguir protocolos estrictos en las campañas de medida (Padilla et al., 2018). Algunas de las recomendaciones a seguir son: seleccionar hojas al azar del centro de la parcela; realizar las mediciones sobre la hoja más reciente, expandida y bien iluminada; realizar las medidas al mediodía, siempre a la misma hora y bajo cielos despejados; evitar realizar las medidas en los nervios de las hojas y evitar las hojas dañadas o con humedad (Padilla et al., 2018b). De esta manera algunos autores establecen propuestas para estimar el contenido de clorofila, como por ejemplo para tomate: realizar las medidas entre las 10:00 y las 12:00 horas para asegurar que la hoja este expandida, seca y de este modo evitar el rocío de la mañana (Hurtado et al., 2017).

En relación con estos aspectos que influyen en la medida se han realizado numerosos experimentos comparando diferentes medidores de clorofila, así como comprobando su funcionamiento y sus limitaciones (de Souza et al., 2019; Padilla et al., 2018a; Padilla et al., 2019; Santos et al., 2008; Suárez-Rey et al., 2012). Como resultado de estos trabajos se pone de manifiesto su potencial para ser empleados en ciertos cultivos, aunque también existen ciertas limitaciones en cultivos como la escarola (Suárez-Rey et al., 2012); esto muestra que esta tecnología, hoy en día no es apta para su utilización en todos los cultivos.

Una de las limitaciones que se ha observado es que la diversa anatomía de las hojas puede suponer una dificultad para la medición de clorofila. Así pues, las mediciones sobre las hojas de la col, la cebolla y la zanahoria pueden presentar alteraciones en las mediciones (Westerveld et al., 2004).

Otra limitación es la influencia de la hora del día en la medición de clorofila; con relación a ello, Padilla y colaboradores (2019) evaluaron los efectos de la hora del día en los medidores de clorofila MCL502 y Apogee MC-100 (Tabla 1) y concluyeron que existe cierto efecto de la hora del día sobre las medidas realizadas con estos dispositivos, pero que estas variaciones eran insignificantes para el pimiento de invernadero (*Capsicum annuum* L). Sin embargo, Hoel (1998) señala que los valores de las medidas tomadas con el MCL502 en el trigo (*Triticum* spp.) fueron más altos con una baja irradiación (al atardecer y al amanecer) y más bajos con una alta irradiación (mediodía). Martínez y Guiamet (2004) observan resultados similares a los de Hoel para el maíz; por tanto, se concluye que siempre que se empleen medidores de clorofila la irradiación debe tenerse en cuenta (Hoel, 1998; Martínez y Guiamet, 2004).

Por último, en lo que se refiere a las limitaciones de los medidores de clorofila cabe destacar que algunos experimentos han puesto de manifiesto respuestas de saturación frente a elevados contenidos de N y clorofila. Padilla y colaboradores (2018a) evaluaron la respuesta de cuatro medidores de clorofila distintos al aumento de suministro de nitrógeno en el pimiento; los resultados que se obtuvieron señalaron al sensor Apogee MC-100 como el mejor de los cuatro medidores de clorofila, ya que estimó con mayor

precisión el nitrógeno foliar de la hoja y además, no presentó respuesta de saturación; por el contrario, los sensores MCL502, atLEF+ y MULTIPLEX si tendieron a saturarse a contenidos elevados de clorofila (Padilla et al., 2018a).

En cuanto a la relación de las medidas de estos sensores y el contenido de N, en la figura 3.2 se muestran los resultados de la evaluación de estos medidores de clorofila como indicadores del estado nutricional de dos cultivos hortícolas, donde se puede observar la estrecha relación existente entre el N y la clorofila del cultivo en el caso de melón y tomate (Padilla et al., 2016).

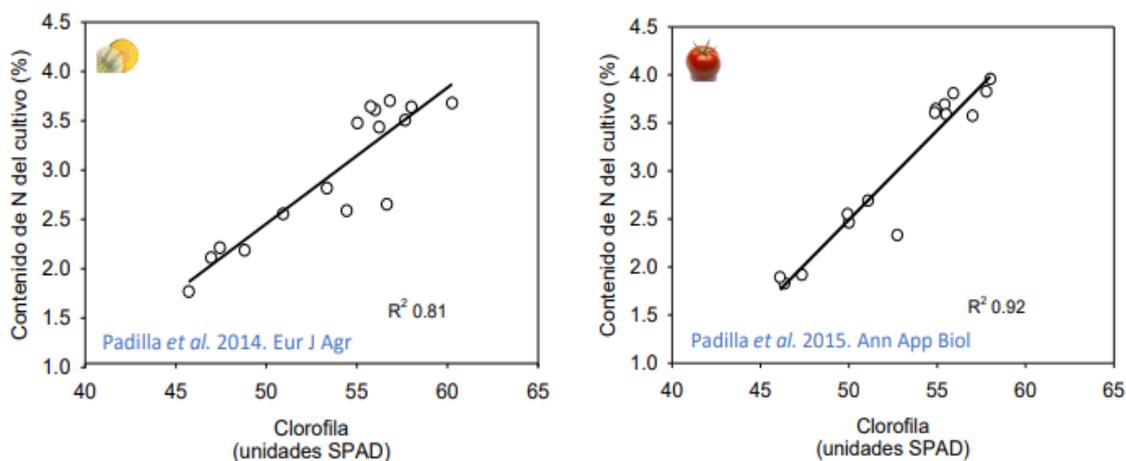


Figura 3.2. Evaluación de medidores de clorofila como indicadores del estado de N en melón y tomate (Padilla et al., 2016).

Por todo lo expuesto, los medidores de clorofila son una herramienta útil que puede emplearse con éxito como recomendación de abonado nitrogenado en un gran número de cultivos extensivos y hortícolas, siempre teniendo en cuenta las recomendaciones generales para su uso.

Del mismo modo, se han realizado diversos trabajos en cultivos frutícolas como la vid (Brunetto et al., 2012; Callejas et al., 2013; Friedel et al., 2020; Taskos et al., 2014). Friedel y colaboradores (2020) obtuvieron buenos resultados en la predicción de clorofila y de N mediante el dispositivo Dualex (Tabla 1) que consiguió proporcionar información valiosa a cerca del cultivo de la vid. Brunetto y colaboradores (2012) consiguieron determinar el contenido total de N mediante el MCL502 para el cultivar Cabernet Sauvignon, aunque la precisión fue baja. Taskos (2014) y colaboradores comprobaron en dos cultivares distintos de vid el funcionamiento de los medidores SPAD y CCM-200 y concluyeron que mejores estimaciones de clorofila y N dependían del cultivar; además, encontraron un modelo de regresión único y efectivo para la clorofila. En las investigaciones realizadas se ha demostrado el funcionamiento de estos sensores, así como también sus limitaciones, que con los futuros avances en la tecnología de los sensores ópticos podrían llegar a superarse (Taskos et al., 2014).

### 3.1.2 Medidores de reflectancia

Estos sensores ópticos se basan en la relación existente entre los valores de la radiación absorbida y reflejada por la cubierta vegetal, y las diferentes longitudes de onda que permiten su obtención (Figura 3.3). Las medidas de reflectancia se relacionan con el índice de área foliar, el contenido foliar de N, la clorofila y la biomasa (Lemaire et al., 2008). Estos medidores de reflectancia ofrecen información del estado de N del cultivo mediante la obtención de una serie de índices de vegetación que se calculan utilizando la radiación visible y la radiación cercana al infrarrojo (NIR) (Padilla et al., 2018b). El índice de vegetación más ampliamente utilizado es el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) (Sellers, 1985; Thompson et al., 2017). El tejido vegetal normalmente absorbe sobre el 90% de la radiación visible (390 a 750 nm) y refleja alrededor del 50% de la radiación cercana al infrarrojo o NIR (750 a 1300 nm) (Knipling, 1970); a medida que varía el contenido de N varía también el grado de absorbancia y reflectancia; teniendo esto en cuenta se puede obtener información sobre el estado del N del cultivo; un ejemplo de ello es que los cultivos con deficiencia de N reflejan más radiación visible y menos NIR que los cultivos bien provistos de N (Padilla et al., 2018b; Schepers et al., 1996).

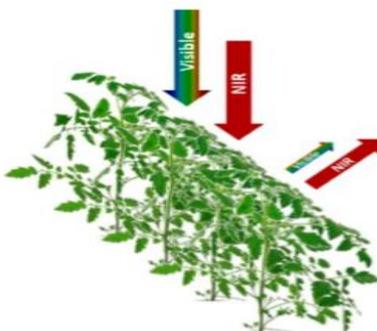


Figura 3.3. Esquema de funcionamiento de los medidores de reflectancia en la cubierta vegetal. Fuente: Padilla et al., 2018b.

La reflectancia también se ha utilizado como una medida del tipo de vegetación; así, se hace referencia a la capacidad del índice NDVI para conocer el estado de los cultivos, ya que si hay una cantidad NIR bastante superior a la radiación visible probablemente se trate de una vegetación densa (Figura 3.4.a); sin embargo, si hay poca diferencia entre la radiación visible y NIR es posible que se trate de una vegetación escasa propia de tundras o desiertos (Figura 3.4.b) (NASA Earth Observatory, 2000).

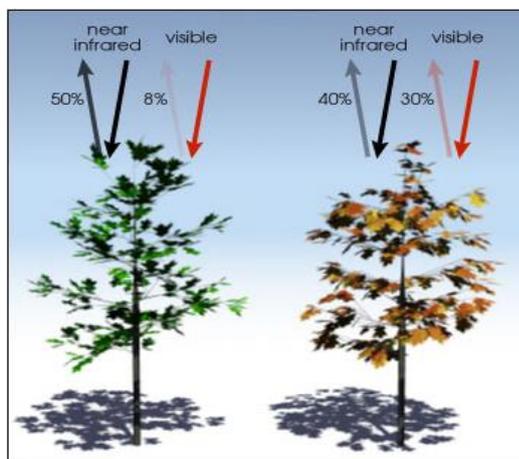


Figura 3.4. Comparación de la radiación (visible y NIR) de una vegetación a) en su estado óptimo y b) con deficiencias. Fuente: Simmon, 2009.

El hecho de que estos dispositivos permitan realizar medidas sobre la cubierta vegetal supone la ventaja de obtener valores de un área de medición mucho mayor a la permitida con los medidores de clorofila, que realizan medidas a nivel foliar (Padilla et al., 2018b) y esto, a su vez, permite también la posibilidad de integrar estos medidores sobre otros dispositivos como tractores, drones, avionetas o satélites de forma que se obtenga una información más amplia y directa del estado de N del cultivo, constituyendo estos sensores ópticos de reflectancia una herramienta útil y con vistas al futuro de la agricultura de precisión, especialmente en grandes superficies cultivadas. Algunos de los equipos más empleados son el CropScan, GreenSeeker, CropSpec, Crop Circle y Multiplex (Tabla 1).

Los sensores de reflectancia pueden clasificarse en pasivos o activos. Los sensores pasivos suelen tener dos fotodetectores, uno que mide la radiación incidente sobre la cubierta vegetal y el otro mide la radiación reflejada desde la cubierta vegetal de los cultivos; sin embargo, los sensores activos tienen su propia fuente de iluminación que emite radiación visible y NIR; y pueden distinguir la radiación reflejada de su propia fuente de luz de la derivada de la radiación solar, por lo que los sensores activos tienen la ventaja de poder utilizarse en cualquier condición de irradiación (Padilla et al., 2018b).

Algunas de las recomendaciones sobre la realización de las mediciones son: excluir los factores que puedan afectar a las medidas (plagas, enfermedades, irradiación) y establecer zonas de referencia en las que el cultivo no tenga déficit de N, y de este modo poder comparar los valores con los obtenidos en la zona sin déficit (Padilla et al., 2018; Scharf y Lory, 2009).

Estos sensores son ampliamente utilizados en cultivos herbáceos, como por ejemplo en maíz, donde se han observados beneficios económicos derivados de su uso (Roberts et al., 2010). En los cultivos hortícolas también se han realizado numerosas investigaciones que ponen de manifiesto su potencial de uso. Según Padilla y colaboradores (2018b) las mediciones de reflectancia de los cultivos son uno de los sistemas más prometedores para controlar el estado del N de los cultivos hortícolas. En la figura 3.5 se muestran los resultados obtenidos con medidores de reflectancia donde se pone de relieve la estrecha relación existente entre el N y el índice NDVI.

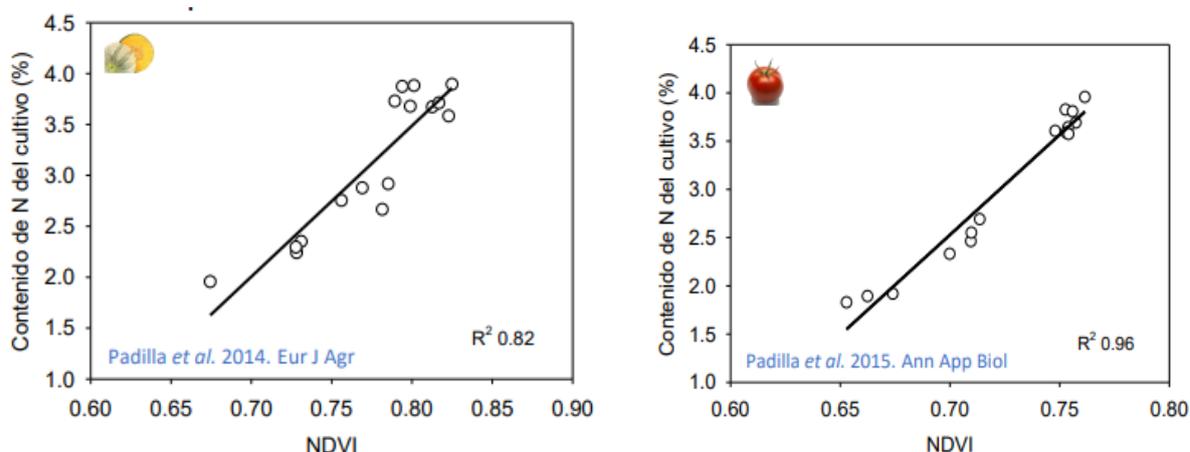


Figura 3.5. Evaluación de medidores de reflectancia como indicadores del estado de N en melón y tomate (Padilla et al., 2015).

En lo que respecta a la vid, los trabajos realizados demuestran que los índices de vegetación obtenidos con el sensor Crop Circle ACS-430 estaban fuertemente correlacionados con la clorofila y el nitrógeno en la hoja, pero esta información es insuficiente para llevar a cabo una fertilización práctica debido a que los modelos de regresión empleados predijeron sólo la mitad de la varianza de N y para un único cultivar; también se demostró que el rendimiento del sensor Crop Circle ACS-210 fue pobre comparado con otros sensores. Estos experimentos demuestran que los sensores ópticos proximales pueden proporcionar información sobre el estado de la vid, pero tienen algunas limitaciones que restringen su uso y que tienen que ser investigadas (Taskos et al., 2014).

### **3.1.3 Medidores de flavonoides basados en fluorescencia**

Otros sensores que realizan medidas sobre la planta son los medidores de flavonoides mediante fluorescencia. Estos sensores se basan en la estimación del contenido relativo de flavonoides a partir de mediciones de fluorescencia (Padilla et al., 2018b; Tremblay et al., 2012). Los flavonoides son compuestos polifenólicos cuyo contenido en las hojas está inversamente relacionado con la clorofila (Cartelat et al., 2005), de forma que si disminuye el contenido de N aumenta el contenido de flavonoides en las hojas y viceversa (Bragazza y Freeman, 2007). Los medidores de flavonoides miden un valor adimensional que está fuertemente relacionado con la cantidad real de flavonoides (Tremblay et al., 2012). Los más utilizados son el Dualex y el Multiplex (Tabla 1) (Padilla et al., 2018b).

La ventaja de la utilización de estos medidores es que el suelo no interfiere en la señal de fluorescencia que recibe el sensor (Tremblay et al., 2012), a diferencia de los sensores de reflectancia donde si puede interferir la zona de suelo desnudo; sin embargo, la desventaja de estos medidores es que al realizarse la medida a nivel foliar se necesitan varias muestras de hojas para obtener valores representativos. Algunas recomendaciones para las medidas son: seleccionar plantas representativas del centro de la parcela; realizar las mediciones sobre la hoja más reciente, expandida y bien iluminada, entre el tallo y la punta de la hoja, y evitar la medición de hojas dañadas (Cartelat et al., 2005; Cerovic et al., 2012; Padilla et al., 2018b).

Aunque los medidores de flavonoides son un enfoque recientemente desarrollado para determinar el estado de N en parcelas, se están acumulando evidencias que demuestran su potencial para la gestión del N de los cultivos (Cerovic et al., 2012). Se han realizado numerosas investigaciones con diferentes cultivos extensivos, como el maíz y trigo (Cartelat et al., 2005), así como en algunos cultivos hortícolas como brócoli, patata y pepino, y en cultivos leñosos como viña, almendro y algunos árboles ornamentales.

### 3.2 Situación actual de los sensores ópticos proximales

En los puntos anteriores se ha analizado la capacidad de los tres tipos de sensores ópticos proximales como herramientas útiles para el manejo de la fertilización nitrogenada; sin embargo, la interpretación de los resultados y su aplicación encaminada a una fertilización óptima de N requiere todavía de investigación (Samborski et al., 2009). Se han realizado considerables trabajos con los medidores de clorofila y con los medidores de reflectancia para conseguir aplicaciones prácticas a los cultivos; y también, aunque en menor medida, con los medidores de flavonoides basados en fluorescencia. Para interpretar los valores de las mediciones se han propuesto dos enfoques: la utilización de parcelas de referencia y el uso de valores de suficiencia.

El primer enfoque consiste en dividir los valores medidos con los sensores ópticos por otros medidos en un diagrama sin limitaciones de N, de esta forma se obtiene el Índice de Suficiencia de Nitrógeno (NSI). Este enfoque se basa en que las mediciones obtenidas con los sensores se saturan cuando no hay limitación de N, pero las pruebas han demostrado que no siempre se produce una saturación en las mediciones de los sensores ópticos (Padilla et al., 2018b). El segundo enfoque consiste en la determinación de valores de suficiencia. Estos valores de suficiencia facilitan considerablemente la interpretación de los resultados, pero son específicos de cada especie y variedad por lo que se necesita seguir investigando con el fin de obtener los valores para cada una de las especies y variedades cultivadas (Peña-Fleitas et al., 2015).

En definitiva, los sensores ópticos proximales son herramientas útiles con vistas al futuro de la agricultura de precisión que hoy en día todavía requieren de investigación para superar algunas limitaciones. En la actualidad, una gran parte de los sensores ópticos se consideran “instrumental científico” y son económicamente poco asequibles para el agricultor; pero están comenzando a aparecer sensores más económicos que facilitarán la utilización de estos dispositivos. Del mismo modo se han realizado y se esperan realizar importantes progresos en este campo, promovidos por la presión ambiental y social de la gestión sostenible del N (Padilla et al., 2018a; Peña-Fleitas et al., 2015).

## 4. EVALUACIÓN DE DIFERENTES MEDIDORES DE CLOROFILA

### 4.1 INTRODUCCIÓN

Como se ha venido diciendo, las pérdidas de nitrógeno suponen una serie de problemas ambientales y de salud que han motivado una conciencia social por el manejo sostenible de la fertilización nitrogenada. Esto, ligado al potencial que poseen los sensores ópticos proximales como herramienta para la fertilización, ha derivado en la realización de numerosas investigaciones en este campo, sobre todo en lo que se refiere a medidores de clorofila donde, se han conseguido muchos avances (apartado 3.1.1). Algunos de estos trabajos han consistido en la realización de evaluaciones y comparaciones entre diferentes medidores de clorofila (Castañeda et al., 2018; Padilla et al., 2018a; Padilla et al., 2018b).

En este apartado se analizan las mediciones obtenidas con tres medidores portátiles de clorofila (CCM-300, MCL502 y Apogee MC-100) en una zona de cultivo de vid. En primer lugar, se realiza una evaluación de las medidas obtenidas con estos medidores de clorofila, analizando la relación existente entre esas medidas tomadas en campo y el contenido de clorofila total medido en el laboratorio y, por último, se realiza una comparación entre los diferentes equipos de medida.

Por tanto, el objetivo general de este apartado es testar tres medidores de clorofila con vistas al futuro de su aplicación práctica en el campo. Los objetivos concretos de este apartado son: (1) analizar la relación existente entre las medidas de los sensores realizadas en hojas de vid y su contenido en clorofila determinado en laboratorio, y (2) realizar una comparación entre tres medidores de clorofila evaluando y comprobando su funcionamiento.

### 4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 4.2.1 Equipos de medición utilizados

Para este trabajo se han empleado tres medidores de clorofila portátiles para evaluar el contenido de clorofila en campo: el MCL502, el CCM-300, y el Apogee MC-100 (Figura 4.1), todos ellos con similar funcionamiento.



Figura 4.1. Medidor de clorofila MCL502, CCM-300 y ApogeeMC-100, respectivamente.

#### **4.2.1.1 MCL502 o SPAD-502**

El medidor de clorofila MCL502 (Konica Minolta) es un espectrofotómetro de mano que mide la absorbancia de dos anchos de banda; en las regiones roja y cercanas al infrarrojo. La luz roja es absorbida por la clorofila y la fracción correspondiente al infrarrojo es utilizada como una longitud de onda de referencia (Markwell, et al., 1995). Mediante estas dos transmisiones el medidor es capaz de calcular unas unidades SPAD (Soil Plant Analysis Development) que son proporcionales a la cantidad de clorofila en la hoja; que a su vez también se relacionan con la cantidad de N y el nivel de verdor de la hoja (Aquateknica, s.f.). El medidor MCL502 mide la diferencia de luz transmitida por la hoja a 650 nm (pico de absorción de la clorofila) y 940 nm (no absorción de la clorofila). El área de medición es de 2x3 mm y el grosor máximo de hoja es de 1,2 mm. Utiliza fuentes de luz LED, su precisión es de  $\pm 1,0$  unidad SPAD, y es un equipo ligero (225 g) y de fácil manejo. La serie de medidores SPAD de Minolta se ha establecido como una referencia en las mediciones de clorofila en todo el mundo. Ha sido empleada por numerosos investigadores y agricultores, permitiendo realizar pruebas de campo en diversos cultivos de forma rápida y eficaz (Aquateknica, s.f.).

#### **4.2.1.2 CCM-300**

El CCM-300 es un fluorómetro de mano que mide el contenido de clorofila utilizando longitudes de onda de 700 y 735 nm (Opti-Sciences, s.f.). La medida se basa en la correlación del ratio F735/F700 con el contenido de clorofila (Gitelson, 1999). La lectura se puede obtener tanto en unidades SPAD como en contenido de clorofila en  $\text{mg/m}^2$  y los datos obtenidos se pueden almacenar de forma casi indeterminada. En la obtención de los datos, al no ser necesario que la rendija de medición este completamente llena, este dispositivo presenta la ventaja de medir hojas que hasta ahora habían sido difíciles de medir como consecuencia de su pequeño tamaño, de su forma curvada o de su gran espesor. Es por ello que este dispositivo permite obtener datos relativos al contenido de N en especies cespitosas, acículas de pino, algas, musgos y líquenes entre otros (Opti-Sciences, s.f.). Tiene un amplio rango de medida ( $41 - 675 \text{ mg/m}^2$ ), con una resolución de  $0,01 - 1 \text{ mg/m}^2$ . Posee una fuente de luz tipo LED azul de 460 nm y ancho medio de banda de 15 nm, con doble detección a longitudes de onda entre  $700 - 710 \text{ nm}$  y  $730 - 740 \text{ nm}$ . Área de medida de 3 mm de diámetro.

#### **4.2.1.3 Apogee MC-100.**

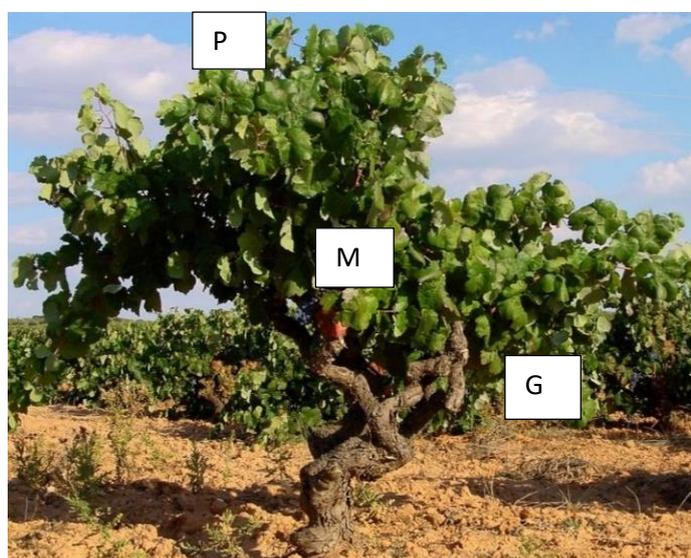
Este medidor mide la relación de transmisión de la radiación de dos longitudes de onda diferentes (rojo e infrarrojo cercano). Produce una estimación de la concentración real de clorofila en unidades de  $\mu\text{mol m}^{-2}$  de superficie foliar mediante el empleo de longitudes de onda de 653 y 931 nm, utilizando el índice de contenido de clorofila (CCI, cociente entre el porcentaje de luz transmitida a 931 nm y el porcentaje de luz transmitida a 653 nm) y el contenido de clorofila medido en 25 especies de plantas diferentes (Parry et al., 2014). Los medidores poseen dos diodos emisores de luz (uno que emite radiación roja y una que emite radiación infrarroja cercana) con detectores emparejados, pantalla de cristal líquido (LCD), y un circuito de procesamiento de señales en una carcasa de plástico, lo que resulta un equipo ligero de unos 210 g. Posee una capacidad de almacenamiento de 8 Mb (160000 datos), un puerto USB para descarga de datos, y la posibilidad de referenciar las medidas mediante GPS interno. El área de medida es  $63,6 \text{ mm}^2$  (9 mm de diámetro) con una resolución de  $\pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}$  ó  $0,1$  unidades CCI (Apogee instruments, 2020).

## 4.2.2 Medidas realizadas

Se realizaron medidas periódicas a lo largo del ciclo de cultivo en tres hojas de tres plantas de vid con los medidores portátiles de clorofila: MCL502, CCM-300 y MC-100; en cada hoja se realizaban entre cuatro y cinco medidas y se obtenía el valor medio. En cada fecha de muestreo se recogían las hojas medidas con los sensores y se llevaban al laboratorio, donde se realizaban las extracciones para la determinación del contenido de clorofila a, b y xantofilas y carotenos. Tras la obtención de las medidas realizadas en el campo, con los medidores portátiles y las medidas reales de clorofila, obtenidas en el laboratorio, se realizó una comparación para observar la relación existente entre la clorofila total y las medidas obtenidas por los medidores portátiles.

### 4.2.2.1 Muestreo de la planta

A lo largo del ciclo de cultivo del año 2019 se fueron obteniendo muestras de hojas de vid de una parcela situada en Caudete de las Fuentes, en la plana de Utiel-Requena. En total, se realizaron medidas y muestreos de hoja en 9 fechas, transcurridas entre los meses de mayo (inicio de la brotación) y octubre (agostamiento y caída de hoja). Para el muestreo se fueron recogiendo progresivamente hojas de tres vides seleccionadas a lo largo de un transecto; en estas plantas seleccionadas, se midió además la fracción absorbida de la radiación fotosintéticamente activa (fAPAR) de forma continua. En cada una de las tres vides se realizó el mismo procedimiento: se recogían, se clasificaban y se almacenaban tres hojas de acuerdo con su posición en la planta y su tamaño: hoja pequeña, mediana y grande (P, M, G, respectivamente) (Figura 4.2), coincidiendo con hojas nuevas, menos nuevas y viejas.



*Figura 4.2. Disposición de las hojas muestreadas en una cepa de vid: P (hoja pequeña, situada en la parte superior de la cepa), M (hoja mediana, situada en la parte central de la cepa) y G (hoja grande situada en la parte baja de la rama).*

Para su transporte se mantenían en una nevera portátil, y una vez en el laboratorio se pesaban en fresco, se escaneaban y se conservaban en el frigorífico si la determinación de clorofila se hacía al día siguiente, o en congelador (-21°C) si la determinación se retrasaba en el tiempo.

#### 4.2.2.2 Medidas in situ

Las medidas con el MCL502 y el Apogee MC-100 se realizaron en la parcela y siempre en la misma franja horaria (entre 9 y 11 a.m.), antes de la recogida de las muestras, mientras que las medidas con CCM-300 se realizaron a la llegada al laboratorio, sobre las hojas muestreadas. Para los tres dispositivos las medidas se tomaron realizando una leve presión sobre la hoja, que permite detectar la transmitancia de la hoja a la luz roja y la luz cercana al infrarrojo; consiguiendo de esta forma, una medida del nivel de verdor de la hoja. El medidor aporta un exceso de luz para estimular la fotosíntesis y con los nutrientes que contiene la hoja se cuantifica el potencial de la fotosíntesis de una pequeña porción de esta (Meisinger et al., 2008). Las medidas se obtuvieron en unidades SPAD para el MCL502 y el Apogee CCM-100, y en  $\text{mg}/\text{m}^2$  para el CCM-300.

Las mediciones se hicieron siguiendo las recomendaciones ya mencionadas acerca de la selección de hojas recientes, completamente expandidas y bien iluminadas, en zonas no dañadas de la hoja, evitando nervios y repartiendo las 4-5 medidas sobre el conjunto de la hoja. En la figura 4.3 se pueden observar el estado del viñedo en diferentes fechas, cinco de ellas coincidiendo con fechas de muestreo y medidas realizadas in situ.



Figura 4.3. Estado de una de las vides muestreadas para las fechas a) 4 de abril, b) 23 de mayo, c) 18 de junio, d) 30 de julio, e) 3 de septiembre y f) 3 de octubre.

### 4.2.2.3 Medidas en el laboratorio

En las hojas muestreadas se determinó para cada fecha el contenido de clorofila (a y b) y el contenido de xantofilas y carotenos, según el método descrito por Garrat y colaboradores (2005), mediante extracción con acetona y una posterior determinación espectrofotométrica a tres longitudes de onda: 470, 647 y 663 nm. La clorofila total se obtuvo como suma de la clorofila a y la clorofila b. Según estos autores, se deben pesar 50 mg de muestra fresca para luego añadirle 1 mL de acetona. Al no disponer en el laboratorio de microcentrifugadora y espectrofotómetro para pequeños volúmenes, se adaptó el método para obtener volúmenes superiores. Para poder expresar el contenido de clorofila en unidades de masa por superficie foliar, se extrajeron dos discos de 1.84 cm de diámetro cada uno, equivalentes a una superficie de 5.32 cm<sup>2</sup> (aproximadamente unos 100 mg de hoja fresca), que fueron triturados manualmente con 10 mL de acetona al 70%. De cada hoja se hicieron dos extracciones para la determinación de los pigmentos fotosintéticos.

### 4.2.3 Análisis de datos

Para el análisis de los datos se empleó estadístico *Statgraphics Centurion XVII*. Se comprobó la normalidad y homogeneidad de los datos y fue precisa la transformación de los datos obtenidos con MCL502 y CCM-300 para cumplir con la condición de normalidad. Se realizó un análisis de la varianza multifactorial a las medidas obtenidas con los sensores y al contenido de clorofila con dos factores: tipo de hoja (P, M y G) y posición de la vid en la parcela (Vid 1, Vid 2 y Vid 3), para comprobar el efecto que ejerce la posición de la hoja muestreada y la vid seleccionada. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas se utilizó el test múltiple de rangos con intervalos LSD al 95% para diferenciar entre medias. Se utilizó la función de regresión de Statgraphics para ver el modelo o correlación más adecuada entre las medidas realizadas con cada uno de los aparatos y el contenido de clorofila obtenido en el laboratorio. La opción de comparación de líneas de regresión fue utilizada en aquellos casos en que fue posible dicha comparación (MCL502 vs MC-100).

## 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1 Descripción de los valores obtenidos

El período de medida abarcó desde el mes de mayo hasta el mes de octubre. En la figura 4.4 se pueden observar cómo los valores de clorofila total obtenidos en laboratorio para esos meses oscilaron entre 163 y 523 mg/m<sup>2</sup> mientras que los valores registrados con el CCM-300 variaron entre 230 y 613 mg/m<sup>2</sup>, entre 22 y 47 unidades SPAD los medidos con el MCL502, y entre 19 y 42 unidades SPAD los registrados con el MC-100. En los cuatro casos mencionados coincide la forma de la curva de los registros en el tiempo, y los valores máximos y mínimos de clorofila y unidades colorimétricas para las mismas fechas.

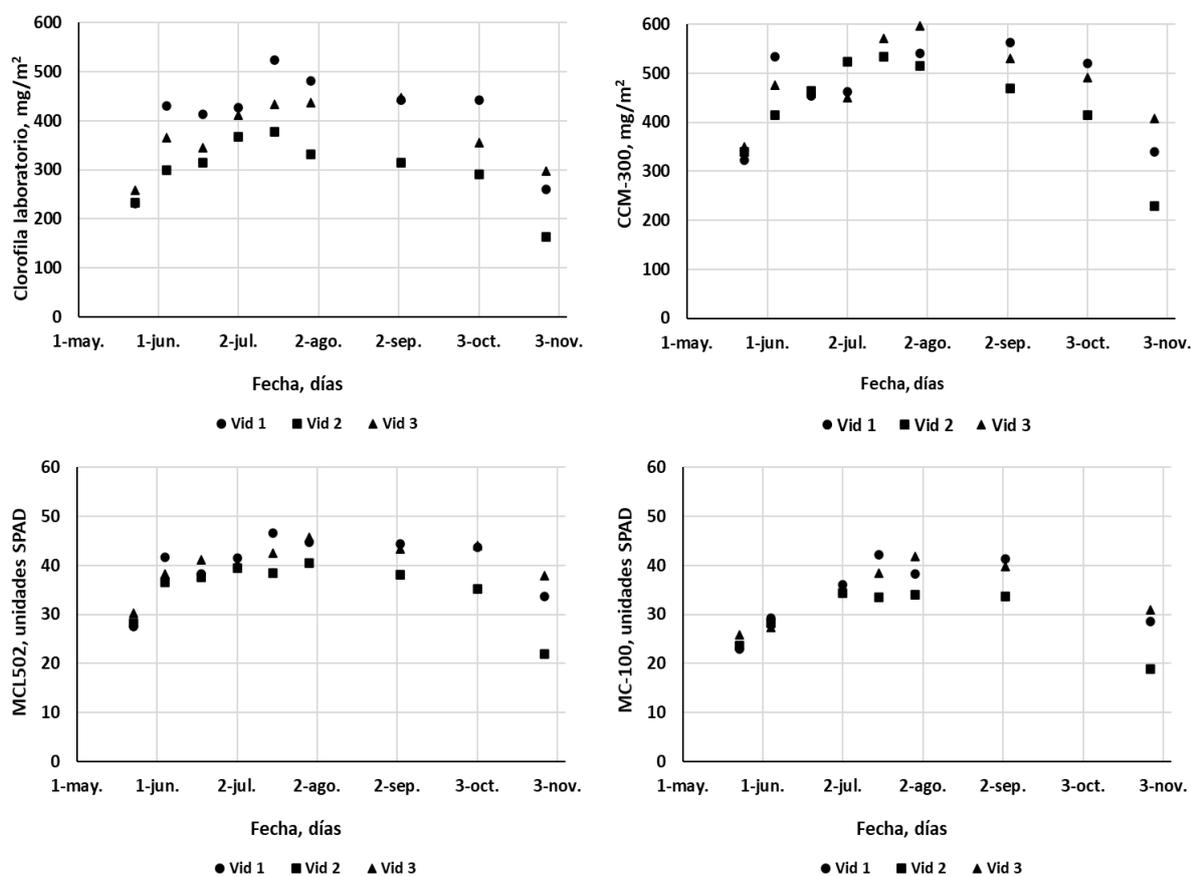


Figura 4.4. Valores medios para cada vid de a) clorofila total obtenida en laboratorio, b) clorofila CCM-300, c) unidades SPAD del MCL50D y d) unidades SPAD del Apogee MC-100.

Haciendo referencia al ciclo del cultivo de la vid, cabe destacar que las primeras muestras se tomaron 15-20 días después de la brotación de la viña (mayo) y, por tanto, los valores son todavía bajos (250 mg/m<sup>2</sup>). A partir de esta fecha los valores van incrementándose hasta llegar a mitad de julio, donde se mide el máximo de clorofila en mg/m<sup>2</sup> y unidades SPAD, descendiendo posteriormente los valores hasta llegar al valor mínimo que se produce a finales de octubre, justo antes de la caída de las hojas.

Aunque en la figura 4.4 se presentan los valores medios de clorofila en  $\text{mg}/\text{m}^2$  y unidades de transmitancia, el análisis de varianza mostró que la posición de la hoja (P, M y G) (Figura 4.2) y la cepa seleccionada (Vid 1, Vid 2, Vid 3) tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre las medidas de laboratorio y las medidas obtenidas con el medidor MCL502. Del mismo modo, este análisis demostró que para las medidas obtenidas con el equipo Apogee MC-100 solo presentaba un efecto estadísticamente significativo la posición de la hoja mientras que para las medidas registradas con el CCM-300 ninguno de los dos factores tuvo un efecto estadísticamente significativo. Se ha observado también, que cuando se hizo el ajuste para cada tipo de hoja, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos para las hojas pequeñas (arriba) fueron más elevados que para las hojas medianas o grandes (medio y abajo); es decir las hojas más jóvenes, más tiernas y de un color verde claro, han dado un mejor ajuste y, por tanto, una menor variabilidad en las medidas que las hojas medianas o grandes, que son más viejas o menos recientes. Esto coincide con la recomendación por parte de Padilla (2018b) de realizar las mediciones sobre la hoja más reciente. Sin embargo, el hecho de que haya un efecto significativo del tipo de hoja y de la vid seleccionada hace necesaria la obtención de un valor promedio del contenido de clorofila de la vid, puesto que si se muestrean solo hojas de una determinada posición se estaría introduciendo un sesgo en la medida y el valor obtenido no correspondería a un valor medio de la planta.

El análisis de la varianza muestra que para los tres medidores de clorofila y las medidas de laboratorio la tendencia es la misma para el tipo de hoja y para la vid seleccionada (Figura 4.5). De modo que en todos los casos la hoja 1 y la viña 2 presentan valores más bajos de clorofila respecto a las demás; aunque en el caso del CCM-300 estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

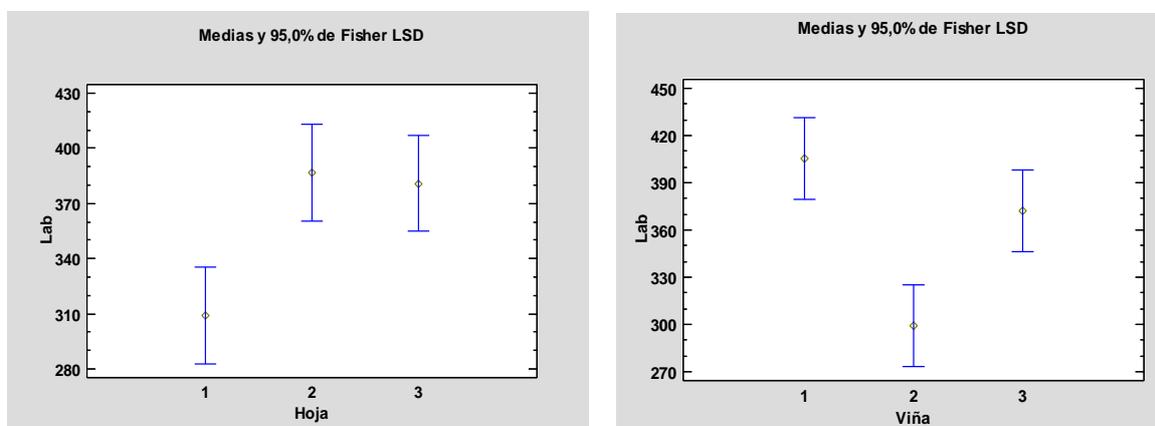


Figura 4.5. Tendencia de las medidas de clorofila obtenida en laboratorio respecto al tipo de hoja y vid que se puede generalizar para los tres dispositivos ( $n=81$ ).

En el análisis estadístico también se observaron diferencias significativas entre las tres vides para las medidas de laboratorio y el MCL502. Esto puede deberse a diversos factores de entre los cuales podemos destacar el azar, ya que las tres vides están dispuestas a lo largo de un transecto conformado por la diagonal de un cuadrado de 900 x 900 m, de forma aleatoria y no tienen por qué ser ni del mismo cultivar, ni de la misma edad, ni estar plantadas en el mismo tipo de suelo. A pesar de ello, este no sería un inconveniente para la incorporación de estos medidores en equipos aéreos (dron, avioneta o satélite), ya que lo que se pretende con las medidas tomadas con estas plataformas es dar un valor promedio de toda una zona en general y no supondría un problema que existan viñas con valores más altos o más bajos de clorofila.

### 4.3.2 Análisis de las medidas obtenidas con los sensores y las medidas de laboratorio

La medida de clorofila en hojas de vid realizada en laboratorio da una certeza del contenido real de clorofila total de la planta, permitiendo así, relacionar los valores obtenidos por los medidores de clorofila con el contenido real de la clorofila del cultivo. Al comparar los resultados de los medidores de clorofila con la medida real (Figura 4.6), se observa que para el MCL502 la regresión lineal da un valor de  $R^2$  de 0,833 mientras que el ajuste logarítmico da un valor de  $R^2$  ligeramente superior, de 0,888; en cambio, para el CCM-300 estos valores son ligeramente más bajos y la regresión lineal y logarítmica dan valores de  $R^2$  de 0,815 y 0,850, respectivamente; por último, al comparar el Apogee MC-100 con las medidas de laboratorio los valores vuelven a disminuir y la regresión lineal da un  $R^2$  de 0,8799 y la logarítmica un  $R^2$  de 0,804.

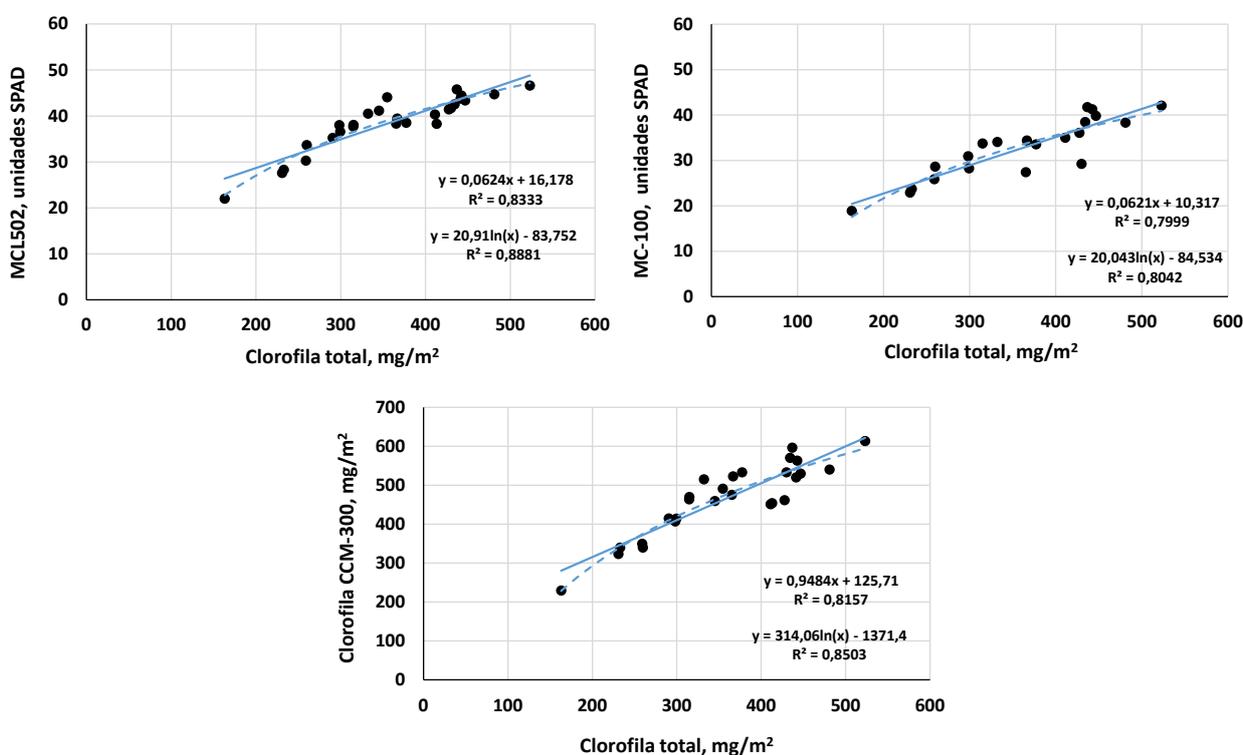


Figura 4.6. Comparación de los tres equipos con el contenido de clorofila obtenido en laboratorio (n=24).

Estas regresiones simples permiten concluir que los tres aparatos han funcionado de manera correcta puesto que se han obtenido buenas correlaciones con la clorofila de laboratorio. Los mejores resultados fueron ofrecidos por el MCL502 debido a que sus valores se ajustaron muy bien a los valores reales de clorofila medidos en laboratorio. El hecho de que en algunos casos el ajuste logarítmico sea mejor que el lineal, estaría indicando cierto grado de saturación de la medida a contenidos altos de clorofila.

Cabe destacar también que la calibración de las medidas SPAD con el contenido de clorofila en laboratorio, ha producido una curva de calibración similar a la de otros trabajos similares realizados en vid. Así, en la figura 4.7 se puede observar la curva de calibración del MCL502 obtenida por González (2018) para el cultivo de vid en la misma

parcela; si se compara la curva de calibración de González para las mismas vides pero en años anteriores, los resultados son similares a los obtenidos en este trabajo, siendo el ajuste incluso mejor (mayor  $R^2$ ).

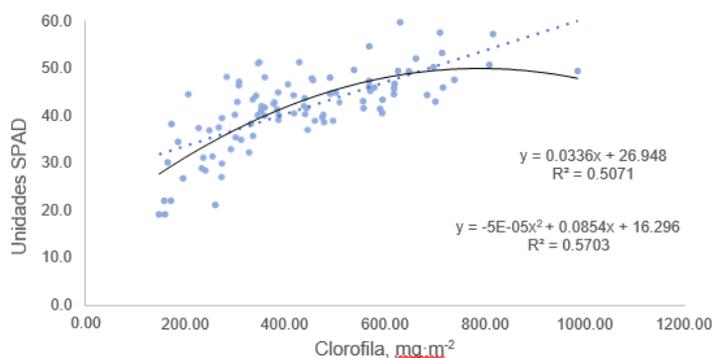


Figura 4.7. Relación entre las medidas de clorofila en  $\text{mg}/\text{m}^2$  y las lecturas SPAD-502 para el año 2017. Fuente: González, 2018.

### 4.3.3 Comparación de equipos MCL502, CCM-300 y MC-100

Como se ha mencionado en el apartado 4.2.2.2, las medidas se obtuvieron en unidades SPAD para el MCL502 y para el MC-100; sin embargo, para el CCM-300 los valores obtenidos se expresaron en  $\text{mg}/\text{m}^2$  utilizando la ecuación de conversión propia de este equipo.

#### 4.3.3.1 Comparación MCL502 y Apogee MC-100

El hecho de que las medidas de MCL502 y Apogee MC-100 sean equivalentes, permite su comparación utilizando la línea 1:1 para observar mejor la distribución de unas medidas frente a otras (Figura 4.8).

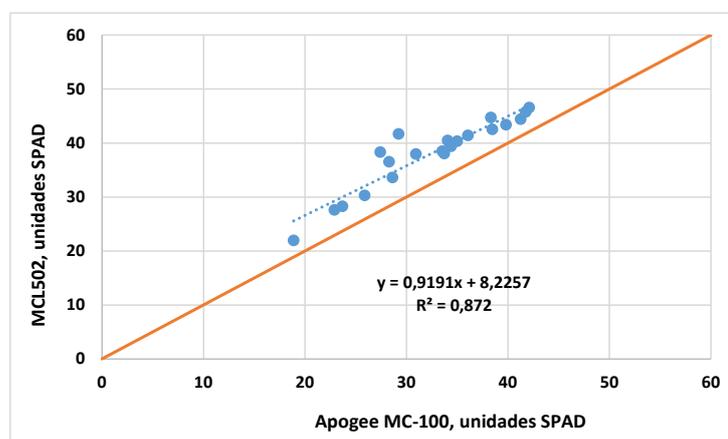


Figura 4.8. Comparación de las medidas tomadas con MCL502 y con Apogee MC-100 ( $n=24$ ).

En la figura (4.8) se aprecia que la línea de regresión obtenida al comparar las medidas de ambos equipos queda por encima de la línea 1:1, lo que indicaría en este caso que el medidor MCL502 da una medida de SPAD superior a la medida del MC-100. Al ser la pendiente de la recta próxima a 1 (0,9191), el MCL502 estaría midiendo en torno a 8 unidades más que el MC-100.

La comparación estadística de las rectas de regresión de las medidas de cada equipo con el contenido de clorofila (Tabla 2) muestra que la pendiente para los dos dispositivos

es la misma, pero que el punto de corte para cada aparato difiere estadísticamente, con un nivel de confianza del 99% ( $P \leq 0,01$ ). Como consecuencia de ello, se concluye que el dispositivo MCL502 (aparato 1) mide por encima del MC-100 (aparato 2) (Figura 4.9).

Tabla 2. Regresión de MCL502 y MC-100 frente al contenido total de clorofila.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Punto de corte	422,318	1	422,318	56,34	<b>0,0000</b>
Pendientes	0,00910118	1	0,009108	0,00	<b>0,9724</b>

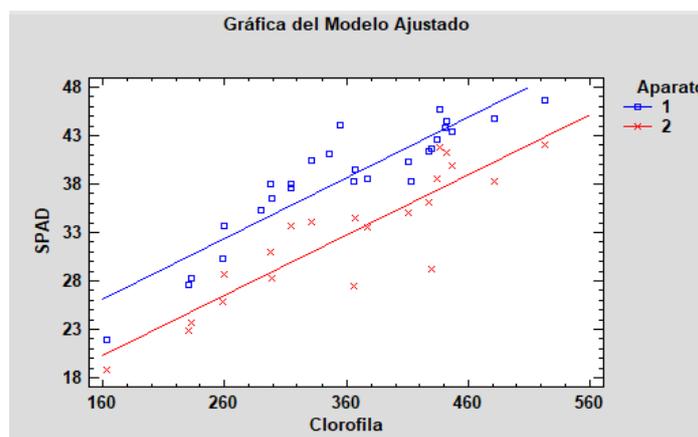


Figura 4.9. Comparación de las rectas de regresión obtenidas con los valores de MCL502 y MC-100 frente al contenido de clorofila total determinado en el laboratorio.

#### 4.3.3.2 Comparación del CCM-300 con el Apogee MC-100 y el MCL502

Al comparar las medidas obtenidas con el dispositivo CCM-300 con las del MCL502 y MC-100 (Figura 4.10) se observa que pese a ser las rectas muy parecidas, el ajuste es mejor para CCM-300 con MCL502 ( $R^2=0,871$ ) que para CCM-300 con MC-100 ( $R^2=0,8046$ ). Esto puede deberse a que, como se ha visto anteriormente, el MCL502 es el dispositivo que mejores resultados ha obtenido al ajustarse mejor a las medidas reales de clorofila medidas en laboratorio.

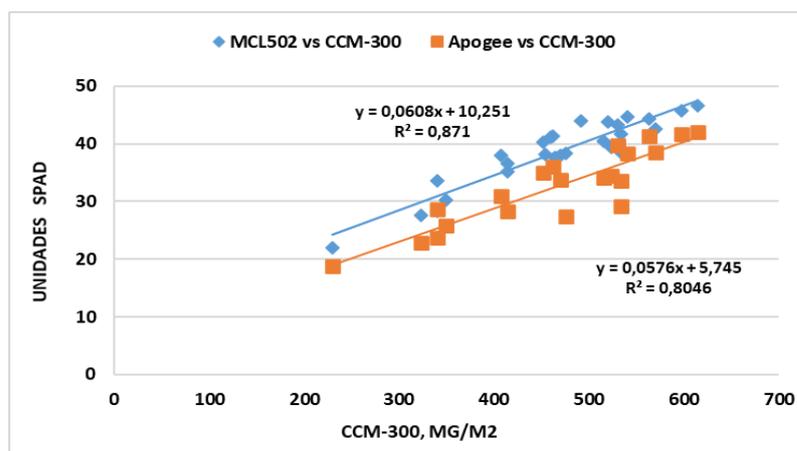


Figura 4.10. Comparación de las rectas de regresión del dispositivo CCM-300 frente al MCL502 (azul) y el Apogee MC-100 (naranja), respectivamente.

En relación con otros autores, Taskos y colaboradores (2014) realizaron una comparación entre el dispositivo CCM-200 y el MCL502 para dos cultivares de vid diferentes y obtuvieron una línea de regresión que mostró una relación curvilínea que refleja la saturación de los sensores a elevadas cantidades de clorofila (Figura 4.11). Para el cultivar Cabernet Sauvignon (CS) la ecuación que relaciona los dos dispositivos fue:  $y = 10.4349 + 1.8094x - 0.0226x^2$ ,  $R^2 = 0.91$ , y para el cultivar Xinomavro (XM)  $y = 9.2624 + 2.0717x - 0.0327x^2$ ,  $R^2 = 0.84$ , valores del coeficiente de determinación que son similares a los obtenidos en el presente trabajo. Calleja y colaboradores (2013) también encontraron un ajuste polinomial de segundo grado en la comparación entre el MCL502 y el CCM-200 en los cultivares Red Globe y Thompson Seedles, con un  $R^2$  de 0.95.

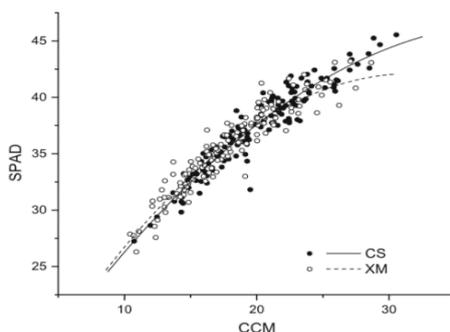


Figura 4.11. Comparación entre MCL502 y CCM-200.  
Fuente: Taskos et al., 2014.

#### 4.3.4 Obtención de ecuaciones específicas para cada equipo

Para relacionar las medidas de los sensores ópticos proximales con el contenido total de clorofila se han venido utilizando los modelos de regresión lineal y logarítmico (Padilla et al., 2018a; Taskos et al., 2014). Otros autores como Steele y colaboradores (2008) establecen como mejor relación entre SPAD y clorofila un polinomio de segundo grado en hojas de viña Edelweiss. Esto se debe a que, en ciertos cultivos, los modelos logarítmico y polinomial reflejan mejor la saturación que en ocasiones sufren los medidores ópticos, cuando el contenido de clorofila es alto. En el caso de la vid, el modelo lineal no recoge bien esta saturación, ya que al representar los valores se observa un ligero aplanamiento conforme van aumentando los valores de clorofila; por ello, es lógico emplear un modelo de regresión como el logarítmico o polinomial que refleje ese aplanamiento que se produce en la curva. Steele et al. (2008) encontraron una dispersión significativa de las medidas respecto de la línea polinómica de segundo orden cuando el contenido en clorofila supera los 300 mg/m<sup>2</sup>. En la figura 4.12 se

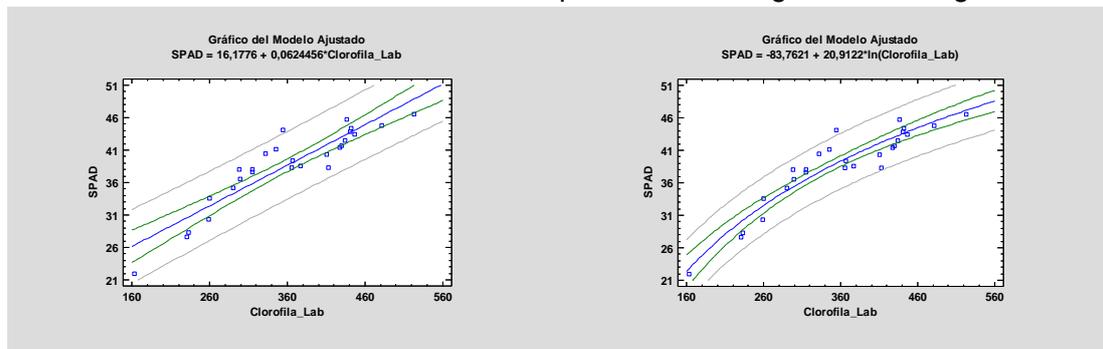


Figura 4.12. Relación entre las lecturas tomadas con MCL502 (unidades SPAD) y el contenido de clorofila total (mg/m<sup>2</sup>) para a) un modelo lineal y b) un modelo logarítmico (n=27).

observan los datos del dispositivo MCL502 representados para un modelo lineal y otro logarítmico, respectivamente.

La herramienta de Statgraphics que analiza diferentes modelos de regresión permite además la comparación de éstos, en términos de variabilidad explicada por cada modelo. Los resultados muestran como modelo más adecuado, un modelo doble inverso (Figura 4.13), ya que es el modelo que mejor representa la relación entre las medidas de los sensores y el contenido de clorofila total. De forma general, en los dispositivos MCL502 y CCM-300, este modelo doble inverso explicaría en torno al 92% de la variabilidad de los datos frente al 82% que explicaría el modelo lineal y el 89% que explicarían los modelos logarítmico y polinomial de segundo grado; sin embargo, para el Apogee MC-100 el modelo doble inverso explicaría el 87% de los datos frente al 80% que explicaría el modelo lineal. Una posible explicación de este modelo doble inverso se debería a que, al abrirse los intervalos conforme el contenido de clorofila aumenta (Figura 4.13), se recogerían más datos que en el caso del modelo lineal o del logarítmico; es decir, parece ser que mediante el modelo doble inverso se representa mejor la saturación de los sensores que mediante los modelos lineal o logarítmico. En la tabla 3 se presentan los tres tipos de ajuste para cada uno de los dispositivos empleados. Puesto que para los tres modelos el valor-P para la carencia de ajuste en el ANOVA es menor que 0,05, se considera que son adecuados para los datos observados con un nivel de confianza del 95,0%. Estos modelos permiten relacionar las medidas realizadas con los sensores empleados con el contenido de clorofila.

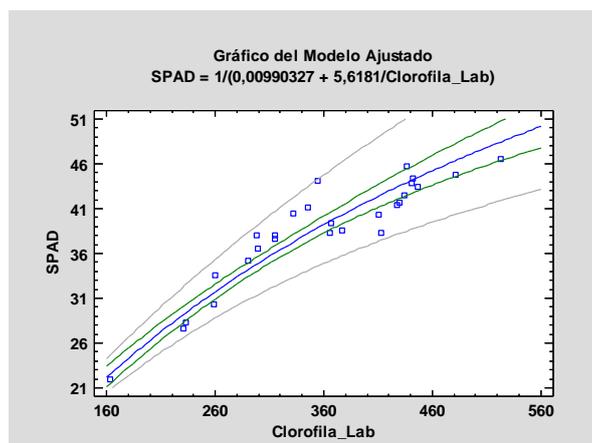


Figura 4.13. Modelo doble inverso que recoge la relación entre las medidas de MCL502 y el contenido de clorofila (n=27).

Tabla 3. Relaciones obtenidas entre las medidas de los sensores y el contenido total de clorofila para cada uno de los dispositivos empleados.

Dispositivo	Modelo lineal	Modelo logarítmico	Modelo doble inverso
	$Y = a + b \cdot X$	$Y = a + b \cdot \ln(X)$	$Y = 1 / (a + b/X)$
MCL502	SPAD=16,1776+0,0624456*Chl	SPAD=-83,7621+20,9122*ln(Chl)	SPAD=1/(0,00990327+5,6181/Chl)
CCM-300	SPAD=125,665+0,948539 *Chl	SPAD=-1371,75+314,122*ln(Chl)	SPAD=1/ (0,00043365+ 0,608013/Chl)
Apogee MC-100	SPAD=10,3096+0,0621356 *Chl	SPAD=-84,5869+20,0522*ln(Chl)	SPAD=1/ (0,0111582+ 6,90771/Chl)

#### 4.4 CONCLUSIONES

En este apartado se ha establecido la relación existente entre tres medidores ópticos portátiles y el contenido de clorofila en hojas de vid. Se ha evaluado el funcionamiento de estos sensores y se ha realizado una comparación entre ellos con vistas al futuro de su aplicación práctica en campo.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. El contenido de clorofila de las vides medidas osciló entre 163 y 523 mg·m<sup>-2</sup> a lo largo del ciclo del cultivo con valores máximos a finales de julio y mínimos a finales de octubre, justo antes de la caída de las hojas.
2. La posición de la hoja y la vid seleccionada han tenido un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de clorofila determinado en laboratorio y medido con MCL502.
3. Es necesario muestrear hojas en diferentes posiciones de la cepa para obtener un valor promedio de clorofila en la vid.
4. Los tres dispositivos han demostrado un buen funcionamiento puesto que se han obtenido buenas correlaciones con los valores de clorofila de la planta.
5. En las condiciones de este trabajo, el MCL502 es el equipo de medida que mejor se ha ajustado a los contenidos reales de clorofila, proporcionando mejores ajustes que Apogee MC-100 a contenidos bajos de clorofila, mientras que a contenidos elevados parece que los dos dispositivos tienden a saturarse.

## **5. CONTENIDO DE CLOROFILA Y NITRÓGENO DURANTE EL CICLO VEGETATIVO EN UN VIÑEDO**

### **5.1 INTRODUCCIÓN**

El nitrógeno es uno de los macronutrientes esenciales en los cultivos vegetales, ya que forma parte de la composición de la clorofila (Santos et al., 2008). En la vid, particularmente este nutriente favorece el crecimiento y el vigor de la planta; de tal forma que un exceso de nitrógeno puede repercutir en un gran desarrollo vegetativo ligado a un excesivo sombreado o una mala ventilación que favorece el desarrollo de enfermedades como mildiu o botrytis. Este exceso de fertilización nitrogenada puede afectar también a la calidad de la fruta cosechada, produciendo bayas con un pH elevado, bajo aroma y menos color. Sin embargo, una carencia de nitrógeno repercutiría en un escaso desarrollo, un deficiente cuajado y un descenso de producción, así como también en una caída prematura de hojas y un crecimiento inadecuado de las levaduras (Oltra, 2017). Por todo ello, es necesaria una aplicación óptima de nitrógeno en el cultivo de la vid que podría llegar a lograrse, en un futuro, con la monitorización del cultivo usando sensores ópticos proximales, mediante la medida del contenido de clorofila y su relación con el contenido de N.

En este apartado del trabajo se pretende caracterizar el contenido de clorofila durante el ciclo de cultivo de una serie de cepas de vid distribuidas a lo largo de un transecto cuya superficie (900 x 900 m) coincide con el tamaño de pixel del satélite Sentinel-3A, el cual ofrece entre sus productos un índice de clorofila terrestre (OTCI) que debería ser validado con medidas tomadas en superficie.

## 5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.2.1 Descripción de la zona de estudio

#### 5.2.1.1 Localización

El transecto evaluado se encuentra situado en la comarca de Utiel-Requena; esta comarca forma una meseta relativamente llana y tiene una altura media de 750 metros sobre el nivel del mar. Concretamente, el transecto evaluado pertenece al término de Caudete de las Fuentes (Figura 5.1), una localidad ubicada en un entorno rural con una economía basada en la agricultura de secano donde destaca el cultivo de la vid. Esta localidad se encuentra a 5 minutos de la A-3, lo que facilita la comunicación con Utiel, Valencia y Madrid.



Figura 5.1. Disposición de la parcela a unos 900 metros del núcleo urbano de Caudete de las Fuentes.

#### 5.2.1.2 Tipo de suelo

En lo que respecta al tipo de suelo, se trata de suelos de textura franca, con un contenido medio del 29% en arcilla, un 37% de limo y un 34% de arena. Su pH medido en extracto acuoso es de 8; por tanto, este se corresponde a un suelo de carácter básico que favorece la absorción de calcio, magnesio, potasio y fosfatos por parte de los cultivos y favorece una adecuada estructura. El contenido de carbonatos totales es elevado, concretamente del 52%; este valor se relaciona con el de la caliza activa con valores altos en torno al 12,4%. El contenido en materia orgánica es bajo, del 1,89%. En lo que respecta a la salinidad, los valores en la capa superficial se sitúan en torno a  $0,78 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$  y va aumentando con la profundidad. Estos valores se han obtenido del Mapa de Suelos de la Comunidad Valenciana correspondiente a la hoja 693 (Utiel) (Proyecto LUCDEME, 1995).

### 5.2.1.3 Clima

De acuerdo con la clasificación de Köppen-Geiger el clima de Caudete de las Fuentes se caracteriza como Ca (templado con veranos calurosos) y corresponde al mediterráneo continentalizado caracterizado por su clima templado. El régimen de precipitaciones es propio del mediterráneo típico, con una precipitación media anual de 441 mm, mientras que las temperaturas son más extremas. La temperatura media anual es de 13.1°C. El mes más cálido es julio y el más frío enero. Las máximas precipitaciones se encuentran en primavera y verano (Climate-Data, s.f.). Los inviernos son largos, fríos y al inicio de la primavera presentan heladas frecuentes que en algunas ocasiones han llegado a alcanzar los -15°C. Sin embargo, los veranos son cortos con temperaturas altas durante el día y con una inversión térmica diaria muy acusada; durante el verano son frecuentes las tormentas con granizo (Ajuntament Caudete de las Fuentes, s.f.). En la figura 5.2 se aprecia el climograma para el año 2019 en el que se recogieron los datos de este trabajo.

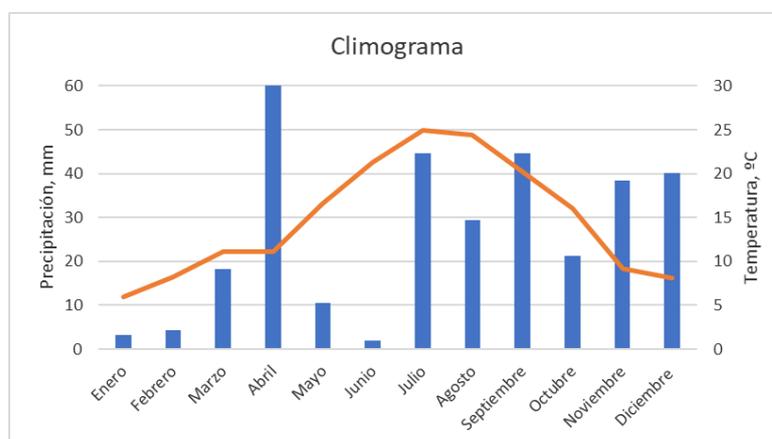


Figura 5.2. Climograma de Requena para el año 2019. Fuente: Riegos IVIA.

### 5.2.2 Descripción del área de estudio y medidas realizadas

La zona de estudio presenta una superficie total de 81 ha que se corresponde con el tamaño de pixel del satélite Sentinel 3A. Sobre esta superficie, compuesta por un conjunto de parcelas situadas al norte del municipio de Caudete de las Fuentes se sitúan 9 cuadrados de 300 x 300 metros correspondientes a la unidad mínima de trabajo del satélite (Figura 5.3a). En esta superficie se seleccionaron 16 cepas de vid

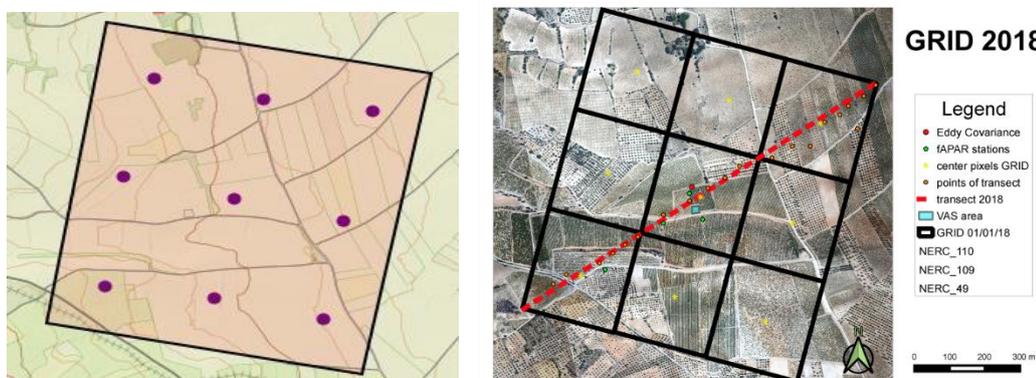


Figura 5.3. Zona de estudio que se corresponde con la superficie medida por el satélite Sentinel 3A de 900 x 900 m<sup>2</sup> y donde se presentan a) los centros de los 9 cuadrados de 300x300 m y b) la distribución de las 16 cepas de vid seleccionadas a lo largo del transecto. Fuente González, 2018.

distribuidas a lo largo de un transecto que recorre la diagonal del cuadrado de 900 x 900 metros de lado (Figura 5.3b).

La mayoría de las vides del transecto están situadas en espaldera y solo cinco de ellas están en vaso. Los cultivares presentes en el transecto eran Tempranillo y Bobal. Además, se seleccionaron cuatro puntos más de medida en el transecto, para un total de 20, pero estos puntos correspondían a tres almendros y un olivo, que no fueron considerados en este trabajo.

A lo largo del periodo de cultivo de 2019 se fueron tomando medidas en todos los puntos del transecto con los medidores de clorofila MCL502 y Apogee MC-100. Las medidas se realizaron siempre en el mismo intervalo horario (9:00 – 13:00h) y siguiendo el mismo recorrido, desde el punto 1 al 20 del transecto. En cada punto se midieron tres hojas (P, M y G) y en cada hoja se hicieron cuatro medidas (una por cuadrante de hoja). Se realizaron nueve muestreos entre los meses de mayo y octubre, con el objeto de caracterizar el contenido medio de clorofila de la vid en la zona establecida, y poder compararlo con el producto de clorofila ofrecido por el satélite, cuando dicho índice esté disponible. Estas medidas fueron realizadas por integrantes del grupo Re-Forest del Instituto de Ingeniería del Agua y Medio Ambiente de la UPV.

### **5.2.3 Análisis de datos**

El contenido de clorofila de cada hoja se ha calculado utilizando las relaciones entre la clorofila total y las medidas ópticas obtenidas en el apartado 4.4, dependiendo del equipo de medida utilizado en cada caso. Para cada vid y fecha de muestreo se calcula el contenido de clorofila en las tres hojas muestreadas y a partir de estos valores se obtiene el contenido medio de cada una de las vides del transecto. Con los 16 valores se calcula el contenido medido de clorofila del transecto, valor que sería representativo del contenido de clorofila del área de 900 x 900 m<sup>2</sup>. También se ha realizado un análisis de la varianza multifactorial del contenido de clorofila con dos factores: tipo de hoja (P, M y G) y conducción de la vid en la parcela (espaldera o vaso) consiguiendo así ver el efecto que ejerce la posición de la hoja muestreada y el tipo de estructura del cultivo.

## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.3.1 Relación entre el contenido de clorofila y las medidas SPAD

Cada medidor de clorofila proporciona un tipo de ajuste que permite relacionar la clorofila con las unidades SPAD. En este punto se aplican los modelos obtenidos en el apartado 4.3.4 para el dispositivo MC-100 y para el MCL502, con el fin de determinar la clorofila en  $\text{mg}/\text{m}^2$  de las 16 cepas de vid del transecto a lo largo del ciclo del cultivo.

En la figura 5.4 se representan los datos obtenidos con los modelos lineal, logarítmico y doble inverso (Tabla 5) a lo largo del ciclo de cultivo. Se observa que prácticamente no existen diferencias entre los datos y que, aunque estadísticamente el modelo doble inverso ha resultado un mejor ajuste frente a los modelos de regresión más empleados por los autores (logarítmico y lineal), estos establecen valores muy parecidos a los del doble inverso que permiten su uso. En general el modelo lineal proporciona valores más bajos que los otros dos modelos, siendo el porcentaje de desviación para el conjunto de las medidas del 6.5% con respecto al modelo logarítmico y del 7.3% respecto del doble inverso. Las desviaciones estándar son altas debido a que se miden los tres tipos de hojas de las 16 vides seleccionadas; los coeficientes de variación a lo largo del ciclo de cultivo oscilan para el conjunto del transecto entre 18-45% en el modelo lineal, entre 23-36% en el modelo logarítmico y doble inverso.

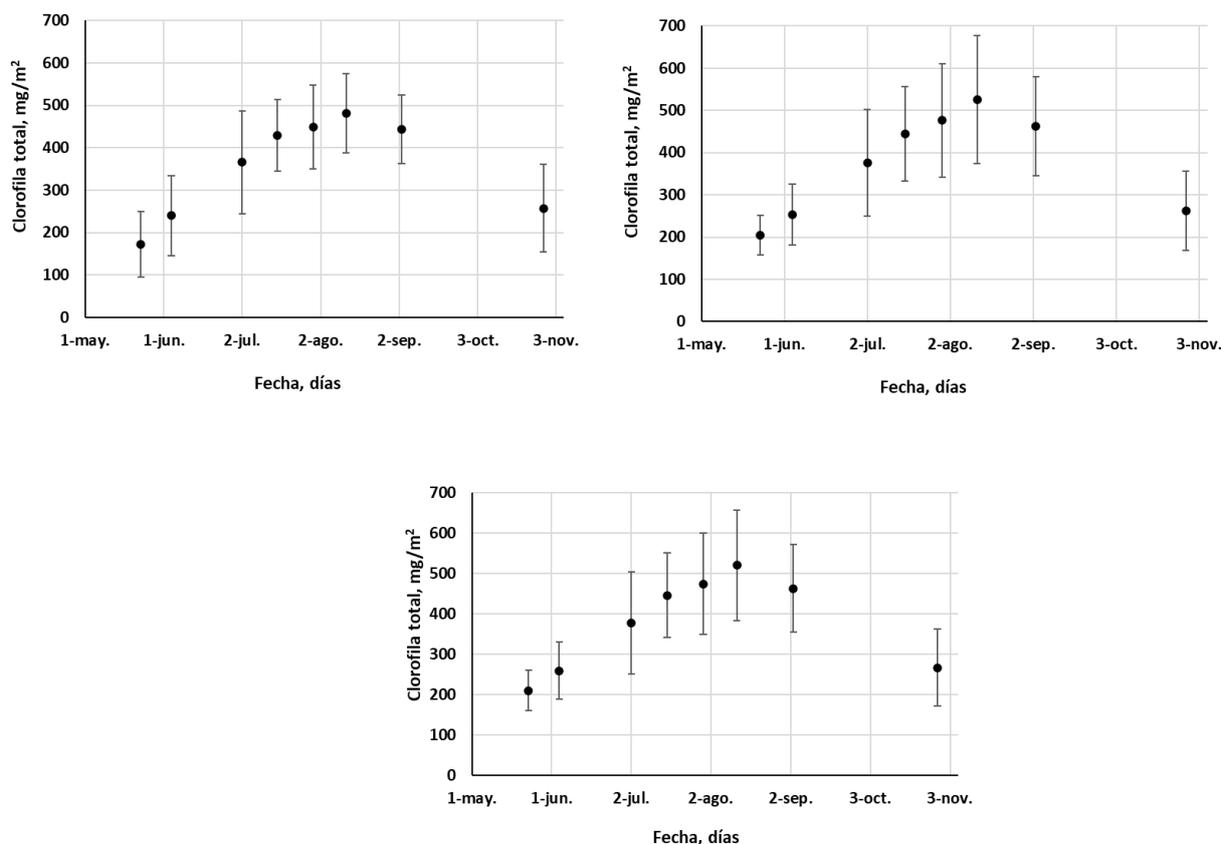


Figura 5.4. Contenido medio de clorofila ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) en el transecto a lo largo del ciclo de cultivo obtenido con a) modelo lineal, b) modelo logarítmico y c) modelo doble inverso (para cada fecha  $n=48$ ).

Tabla 4. Contenido medio de clorofila ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) y desviación estándar obtenido para cada fecha con los tres modelos empleados a partir de los valores de las tres hojas de cada vid del transecto ( $n=48$ ).

Fecha	Modelo lineal	Modelo logarítmico	Modelo doble inverso
23/05/2019	$173 \pm 77$	$205 \pm 47$	$210 \pm 51$
04/06/2019	$240 \pm 95$	$253 \pm 71$	$259 \pm 71$
02/07/2019	$366 \pm 122$	$376 \pm 126$	$378 \pm 126$
16/07/2019	$430 \pm 85$	$444 \pm 112$	$446 \pm 105$
30/07/2019	$449 \pm 99$	$476 \pm 135$	$474 \pm 125$
12/08/2019	$481 \pm 94$	$526 \pm 152$	$520 \pm 137$
03/09/2019	$443 \pm 81$	$462 \pm 118$	$463 \pm 108$
29/10/2019	$257 \pm 104$	$262 \pm 94$	$266 \pm 95$

Puesto que se ha observado que los datos obtenidos para los tres modelos ofrecen valores de clorofila muy similares, se emplea el modelo doble inverso por ser este el que mejor ajuste estadístico ha proporcionado.

### 5.3.2 Distribución de la clorofila a lo largo del ciclo de cultivo del viñedo

El 1 de mayo se produjo la brotación de la vid en la zona, a partir de ahí los valores de clorofila fueron incrementándose junto con la floración o cierna (principio de junio) y el cuajado (finales de junio); 105 días después de la brotación se registró el contenido más elevado de clorofila en las hojas ( $520 \text{ mg}/\text{m}^2$ ), que se produjo en agosto coincidiendo con el enverado o cambio de color de los racimos, a partir de ahí los valores fueron descendiendo a lo largo del periodo de maduración hasta finales de octubre, justo antes de la caída fisiológica de las hojas que se produce en el mes de noviembre (Figura 5.5).

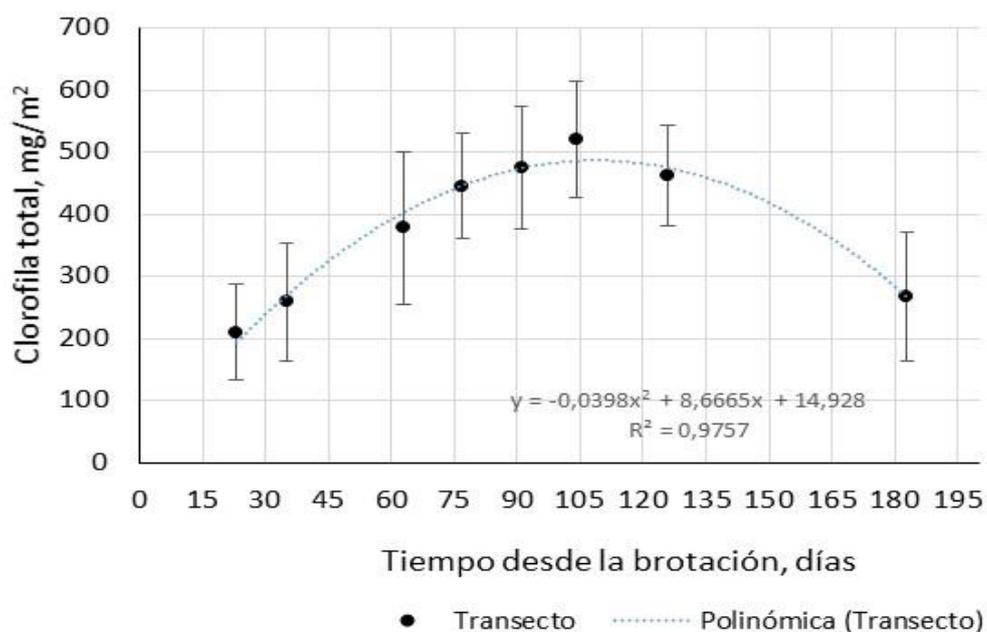


Figura 5.5. Distribución de la clorofila en  $\text{mg}/\text{m}^2$  a lo largo del ciclo de cultivo de la vid en la zona seleccionada. Las barras representan la desviación estándar ( $n=48$ ).

Del mismo modo, Porro y colaboradores (2000) coinciden en que los valores de SPAD y el contenido de clorofila disminuyen desde el envero hasta la cosecha, donde obtuvieron los datos más bajos.

Estos resultados obtenidos en unidades SPAD (Figura 5.6a) concuerdan con los de Castañeda y colaboradores (2018) al establecer la relación entre las unidades SPAD, obtenidas con el MCL502, para los diferentes estadios fenológicos de un cultivo de *Vitis vinifera* L. cv. 'Riesling Becker' (Figura 5.6b). Sus resultados indican que el contenido de clorofila aumenta a medida que la hoja se hace madura y decae tras el envero, ajustándose a lo largo del ciclo a un polinomio de segundo grado. Los resultados obtenidos en el transecto de Caudete con las medidas SPAD coinciden con lo obtenido

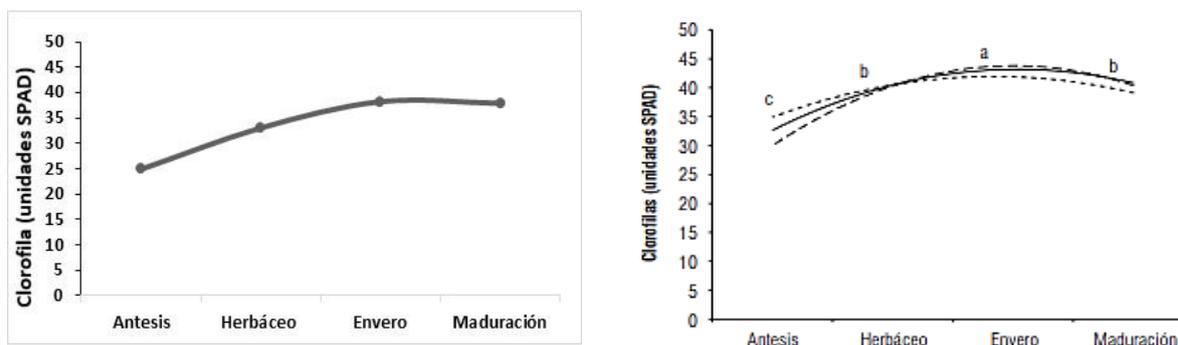


Figura 5.6. Distribución de las unidades SPAD a lo largo de los estadios fenológicos de a) las 16 cepas del transecto y b) los datos obtenidos para *Vitis vinifera* L. cv. 'Riesling Becker'. Fuente: Castañeda et al., 2018.

por estos autores (Figura 5.6); a pesar de que las fechas de muestreo, los cultivares, el tipo de suelo y el clima son diferentes para cada trabajo, se obtuvo un ajuste similar al obtenido por Castañeda et al. (2018), incluso con un  $R^2$  superior (0.98 frente a 0.90). Los distintos coeficientes en las ecuaciones de ajuste obtenidos en ambos casos serían achacables a las diferencias mencionadas en cuanto a cultivares, clima, etc.

### 5.3.2.1 Fuentes de variabilidad

Al reflejar los valores de clorofila en  $mg/m^2$  en función del tipo de hoja (arriba, medio, bajo), se observa que existen diferencias estadísticamente significativas para cada tipo de hoja (Figura 5.7); es decir, existe una variabilidad del contenido de clorofila según el tipo de hoja, de forma que las hojas de arriba (jóvenes) ofrecen valores de clorofila más bajos respecto a las hojas medianas y grandes hasta que se llega al pico máximo de

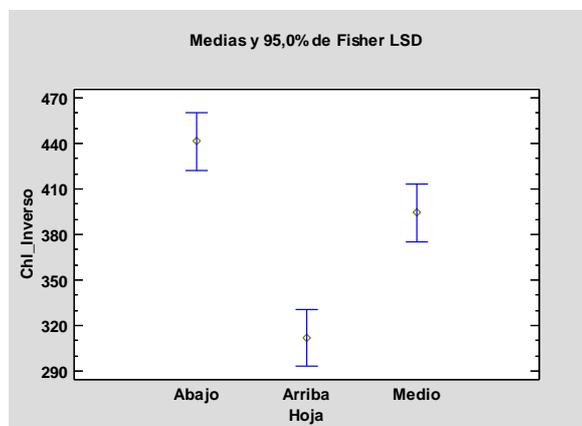


Figura 5.7. Representación de los valores de clorofila en función del tipo de hoja.

clorofila, a partir del cual las diferencias se hacen menores. Esto es lógico debido a que generalmente, las hojas de arriba son más jóvenes y presentan un color verde claro respecto a las del medio y las de abajo, que tienen un color más oscuro, son más viejas y acumulan un mayor contenido de clorofila.

Si se comparan estos valores representativos de las 16 cepas del transecto (Figura 5.8a) con los obtenidos para las tres vides del apartado 4 (Figura 5.8b), se observa que existe la misma tendencia en ambos casos a que las hojas pequeñas tengan un contenido menor de clorofila; sin embargo, en este caso existe menos variabilidad entre las hojas situadas en la parte central y baja, ya que estas últimas contienen menos clorofila y su contenido es más parecido a los de las hojas del medio, en comparación con lo observado en el transecto. Ello puede ser debido a que las tres cepas utilizadas en el apartado 4 están próximas, son del mismo cultivar y presentan la misma estructura, mientras que en el transecto hay diferentes cultivares y tipos de estructura y es probable que las condiciones edáficas sean también variables.

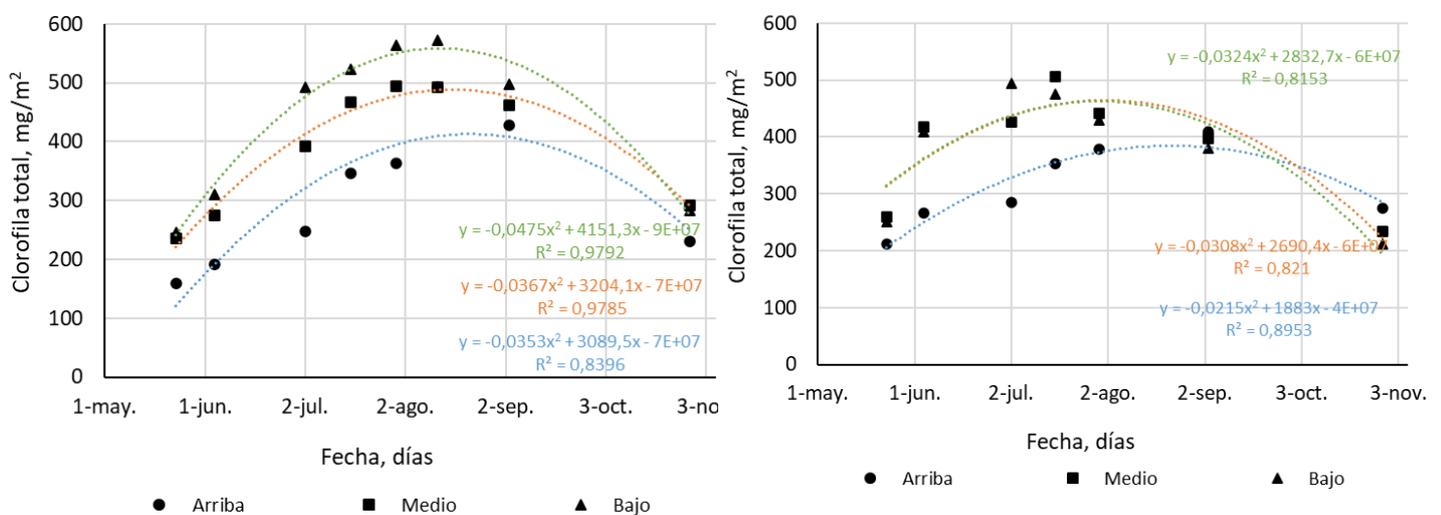


Figura 5.8. Representación de los datos de clorofila obtenidos en función del tipo de hoja para a) las 16 cepas de vid que forman el transecto y b) las tres cepas de vid medidas en el apartado 4.

Por otra parte, la arquitectura de las cepas es otro factor a considerar para el cual se ha comprobado que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la estructura en espaldera y en vaso para el promedio de los valores medidos.

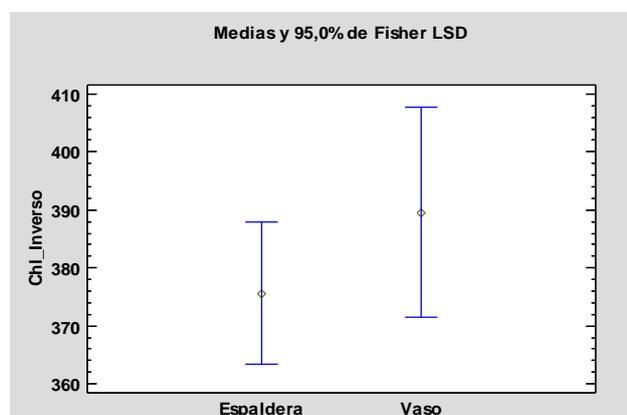


Figura 5.9. Representación de los valores de clorofila en función del tipo de conducción (espaldera o vaso).

A pesar de ello, al establecer las medidas de clorofila para cada tipo de conducción en función de la fecha de muestreo, se observó que, para el pico máximo de clorofila producido en agosto, las vides en vaso tuvieron un contenido más elevado de clorofila respecto a las de espaldera (Figura 5.9).

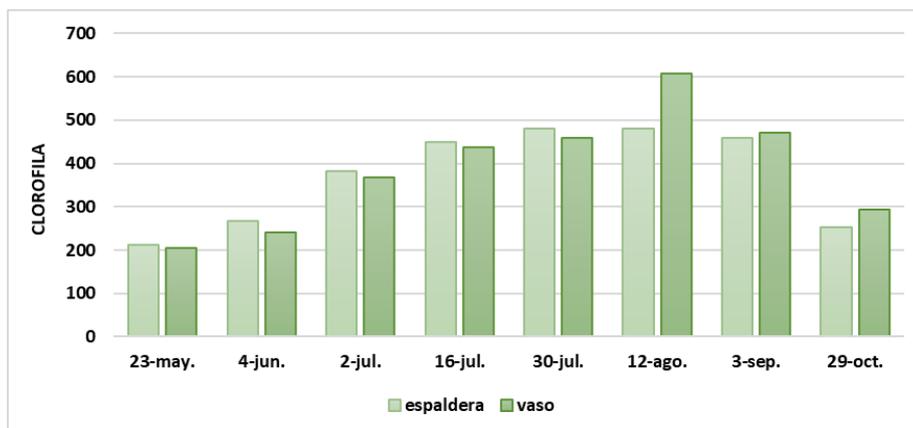


Figura 5.10. Contenido medio de clorofila ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) según el tipo de conducción (espaldera o vaso) para cada fecha de muestreo.

Esto puede deberse a que las cepas en vaso corresponden a plantaciones más antiguas que pueden acumular más clorofila y a que las cepas en espaldera están expuestas a un despunte mecánico lateral que se realiza en la parcela, con el fin de que la hoja no consuma reservas al fruto, y que no se realiza en las cepas en vaso.

Respecto a la relación entre estos dos factores (tipo de hoja y tipo de conducción) se observa que no existe una interacción estadísticamente significativa; es decir, el contenido de clorofila varía por igual en la hoja de arriba, medio y abajo tanto si se trata de una cepa de vid con conducción en espaldera o en vaso. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las 16 cepas de vid, pero si en las fechas de muestreo.

El estudio de las posibles fuentes de variabilidad a lo largo del transecto, indica que se puede aceptar como valor medio de clorofila la medida global obtenida en la superficie seleccionada ( $900 \times 900 \text{ m}$ ), siempre que se tomen muestras representativas de la zona evaluada y en cantidad suficiente.

### 5.3.3 Contenido de nitrógeno a lo largo del ciclo de cultivo del viñedo

Una vez determinado el contenido de clorofila, se establece la relación entre esta clorofila y el N total en planta, de tal forma que se puedan determinar las necesidades del cultivo para una aplicación práctica en campo. Algunos autores han establecido para la vid relaciones que determinan el contenido de N a partir del contenido de clorofila medido en unidades SPAD. Brunetto y colaboradores (2012) obtuvieron una serie de ecuaciones, según la textura del suelo, basadas en mediciones realizadas en el momento de la floración y en el envero, ya que, según ellos, estos son los dos puntos donde tendría un interés práctico la fertilización. Otros autores como Porro y colaboradores (2000) estimaron el contenido de N foliar en vid para tres años diferentes y establecieron tres modelos lineales que relacionan las lecturas del MCL502 con el porcentaje de nitrógeno en peso seco para cada año. A diferencia de Brunetto y colaboradores estos autores establecen que el momento idóneo para determinar el nivel

de N en planta y poder utilizar este nivel para programar la fertilización es en el cuajado del fruto; también estudiaron las relaciones entre las mediciones ópticas y el contenido foliar de potasio, calcio, magnesio y boro. Las relaciones entre SPAD y concentración de N foliar que obtuvieron para el cv. Chardonnay son las siguientes:

$$\text{Año 1: Concentración de N (\% peso seco hoja)} = 1.84 + 0.023 \cdot \text{SPAD} \quad R^2 = 0.76 \quad [1]$$

$$\text{Año 2: Concentración de N (\% peso seco hoja)} = 1.435 + 0.034 \cdot \text{SPAD} \quad R^2 = 0.80 \quad [2]$$

$$\text{Año 3: Concentración de N (\% peso seco hoja)} = 1.648 + 0.025 \cdot \text{SPAD} \quad R^2 = 0.75 \quad [3]$$

Se han empleado esas ecuaciones para determinar el nitrógeno foliar del transecto en la fecha de muestreo más próxima al cuajado (muestreo del 02/07/2019) y se ha observado que los valores de N obtenidos en el transecto han sido ligeramente más elevados, oscilando para este momento del cultivo entre el 2,5 y 3,0% de N, mientras que para Porro y colaboradores (2000) los contenidos variaron entre el 2,2 y el 3,0% de nitrógeno en materia seca (Figura 5.10). Esto puede deberse a que las muestras de datos para cada trabajo han sido tomadas en momentos diferentes. El momento de cuajado en las cepas del transecto se estima que ocurrió a finales de junio y la fecha de muestreo se realizó a principios de julio, esto podría explicar porque las concentraciones de nitrógeno son más elevadas para el transecto. Además, como señala Porro, es muy importante calibrar la estimación del vigor de las plantas para determinar la gestión de la fertilización ya que existen muchas diferencias en las prácticas culturales según zonas y cultivares.

Utilizando las expresiones de Brunetto et al. (2012) para diferentes texturas de suelo y diferentes estados fenológicos, y seleccionando las lecturas tomadas con MCL502 en las fechas más próximas a dichos estados, el contenido medio de N (expresado como porcentaje sobre peso seco) en el momento de la floración en el transecto osciló entre  $2,07 \pm 1,15$  y  $2,46 \pm 0,69$ , mientras que en el momento del envero el contenido medio estimado fue de  $3,10 \pm 0,15$ . De acuerdo a las expresiones de Porro et al. (2000) en el momento de la floración, el contenido medio de N estimado fue de  $2,73 \pm 0,07$ ,  $2,75 \pm 0,11$  y  $2,61 \pm 0,08$  % utilizando las expresiones [1], [2] y [3], respectivamente. Estos resultados, pese a ser estimaciones, muestran la potencialidad de estas medidas de fácil adquisición para su uso en la gestión de la fertilización en el cultivo de vid.

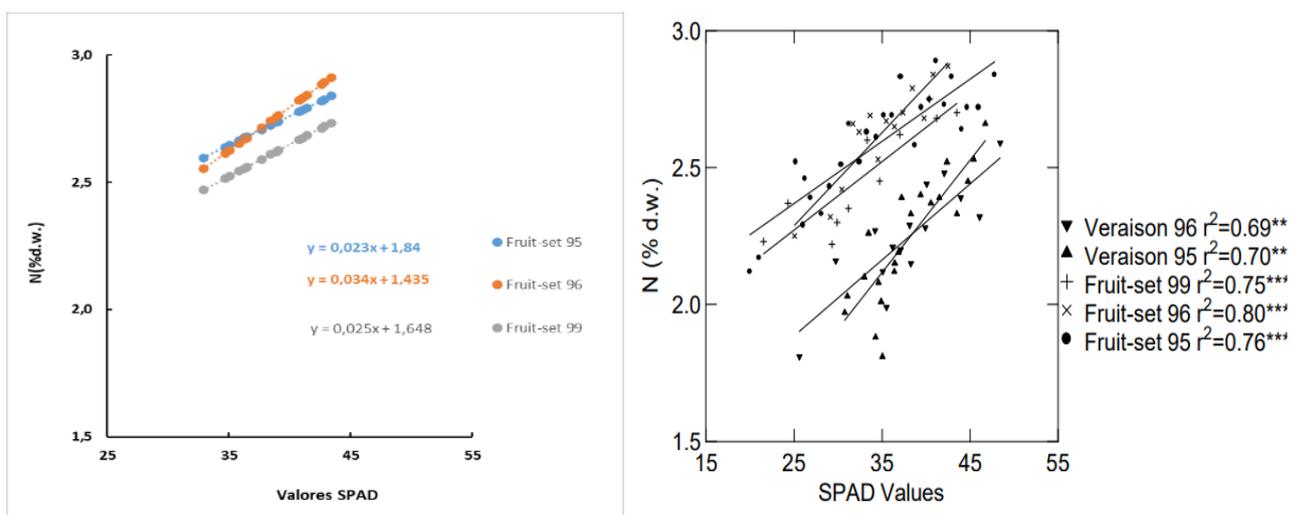


Figura 5.11. Relación entre los valores SPAD obtenidos con el medidor de clorofila y los porcentajes de N en peso seco para a) los datos del transecto y b) los datos obtenidos en vid por Porro et al., 2000. El año 1 se corresponde con Fruit-set 96, el año 2 con Fruit-set 96 y el año 3 con Fruit-set 99.

La idea inicial de este trabajo era establecer la relación entre el contenido de clorofila, el contenido de N en planta y las medidas obtenidas con los sensores ópticos proximales, realizando el correspondiente análisis de las hojas muestreadas para determinar el contenido de nitrógeno y relacionarlo con datos disponibles, pero como consecuencia de la situación actual del COVID-19 no se ha podido acceder al laboratorio para llevarlo a cabo. No obstante, puesto que en estas relaciones influyen muchos aspectos culturales, edáficos y climáticos es preciso realizar la calibración de las medidas para la zona de Utiel-Requena, si se quiere emplear este tipo de medidas como apoyo al manejo de la fertilización.

## 5.4 CONCLUSIONES

En este apartado se han caracterizado los valores de clorofila para el ciclo de cultivo de unas cepas de vid distribuidas a lo largo de un transecto de 900 x 900 m<sup>2</sup>, se han revisado las fuentes de variabilidad que pueden influir en las medidas del transecto y se ha estimado el contenido de porcentaje foliar de nitrógeno con las ecuaciones obtenidas por diferentes autores.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. Los tres modelos utilizados para calcular el contenido de clorofila en la hoja a partir de las medidas ópticas, han ofrecido datos muy similares que permiten su uso.
2. El contenido más elevado de clorofila en las hojas en el período evaluado se produce en agosto coincidiendo con el cambio de color de los racimos, a partir de ahí los valores descienden a lo largo del periodo de maduración hasta finales de octubre, coincidiendo con la caída de hoja.
3. El contenido de clorofila varía según la posición de la hoja muestreada, de forma que las hojas situadas en la parte baja y media de la cepa contienen más clorofila que las situadas en la parte de arriba.
4. El tipo de conducción de la vid no influye en la media de los valores de clorofila.
5. El porcentaje de N medio de las vides del transecto estimado en diferentes estados fenológicos utilizando las relaciones obtenidas por otros autores indica que, con una calibración propia en la zona, las medidas tomadas con los sensores ópticos proximales pueden ser una herramienta útil como apoyo a la toma de decisiones en el manejo de la fertilización.

## 6. CONCLUSIONES FINALES DEL TRABAJO

En este trabajo se ha realizado una revisión del uso actual de los sensores ópticos proximales para realizar recomendaciones de abonado. También se evaluó el funcionamiento de tres medidores de clorofila en un cultivo de vid y se ha caracterizado el contenido de clorofila durante el ciclo vegetativo.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. Los sensores ópticos proximales son herramientas útiles con vistas al futuro de la agricultura de precisión y para la gestión sostenible del N. Actualmente se consideran instrumental científico, puesto que hoy en día todavía requieren de investigación para superar algunas limitaciones, pero están apareciendo sensores más económicos, que junto con los avances en este campo facilitarían su utilización por los agricultores.
2. Los tres medidores de clorofila evaluados (MCL502, CCM-300 y MC-100) han demostrado un buen funcionamiento ya que se han obtenido buenas correlaciones con los valores de clorofila medidos en laboratorio. De ellos, el MCL502 es el equipo de medida rápido y útil que mejor se ha ajustado a los contenidos reales de clorofila en el cultivo de vid, pero éste y el Apogee MC-100 tienden a saturarse a contenidos elevados de clorofila, lo que puede limitar su uso.
3. En el transecto evaluado se observa que el contenido más elevado de clorofila en las hojas se produce en agosto coincidiendo con el cambio de color de los racimos, a partir de ahí los valores fueron descendiendo a lo largo del periodo de maduración hasta finales de octubre como han encontrado otros autores.
4. El porcentaje de N en planta requiere de una calibración específica en la zona de estudio para que las relaciones obtenidas sean de utilidad en el apoyo de la fertilización nitrogenada en el cultivo de la vid.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Ajuntament Caudete de las Fuentes (s.f.). *Ajuntament Caudete de las Fuentes*. Recuperado el 6 de julio de 2020, de <http://www.caudetedelasfuentes.es>
- Apogee instruments (2020). *Medidor de concentración de clorofila MC-100*. Recuperado el 6 de julio de 2020. Obtenido de <https://www.apogeeinstruments.com/mc-100-chlorophyll-concentration-meter/#manuals-downloads-tab-description>
- Aquateknica (s.f.). *Medidor de clorofila SPAD-502Plus*. Recuperado el 10 de julio de 2020. Obtenido de Aquateknica: <https://www.aquateknica.com/product/medidor-de-clorofila-spad-502plus/>
- Bragazza, L., Freeman, C. (2007). High nitrogen availability reduces polyphenol content in Sphagnum peat. *Science of the Total Environment*, 377(2-3), 439-443.
- Brunetto, G., Trentin, G., Ceretta, C. A., Giroto, E., Lorensini, F., Miotto, A., Moser, G., de Melo, G. W. (2012). Use of the SPAD-502 in estimating nitrogen content in leaves and grape yield in grapevines in soils with different texture. *Embrapa Pecuaría Sul-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Callejas, R., Kania, E., Contreras, A., Peppi, C., Morales, L. (2013). Evaluación de un método no destructivo para estimar las concentraciones de clorofila en hojas de variedades de uva de mesa. *Idesia (Arica)*, 31(4), 19-26.
- Cameron, K. C., Di, H. J., Moir, J. L. (2013). Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of applied biology*, 162(2), 145-173.
- Cartelat, A., Cerovic, Z. G., Goulas, Y., Meyer, S., Lelarge, C., Prioul, J. L., Barbottin, A., Jeuffroy, M.H., Gate, P., Agati, G., Moya, I. (2005). Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field crops research*, 91(1), 35-49.
- Cerovic, Z. G., Masdoumier, G., Ghazlen, N. B., Latouche, G. (2012). A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiologia plantarum*, 146(3), 251-260.
- Climate-Data. (s.f.). Climate-Data.org. Recuperado el 10 de julio de 2020 . Obtenido de <https://es.climate-data.org/europe/espana/comunidad-valenciana/caudete-de-las-fuentes-122915/#climate-table>.
- de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Thompson, R. B., Gallardo, M., Grasso, R., Padilla, F. M. (2019). The use of chlorophyll meters to assess crop N status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. *Sensors*, 19(13), 2949.
- Evans, J. R., Seemann, J. R. (1989). The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: costs, consequences, and control. *Photosynthesis*, 8, 183-205.
- Friedel, M., Hendgen, M., Stoll, M., Löhnertz, O. (2020). Performance of reflectance indices and of a handheld device for estimating in-field the nitrogen status of grapevine leaves. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 26(2), 110-120.
- García-Serrano, P. J., Lucena, J., Sebastián, M., Criado, R., García, M. N., López Bellido, L., Betrán, J., Álvaro, A., Monreal, R., López, H., Prudencio, C., Fuster, L., Luis, J., Corrales, B., Urbano, P., Juan, T., Andión, P., Castro, J., (2008). *Guía práctica de*

*la fertilización racional de los cultivos en España*. Recuperado el 8 de junio de 2020. Obtenido de Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones/Publicaciones-fertilizantes.aspx>

- Garratt, L., Linforth, R., Taylor, A., Lowe, K., Power, J., Davey, M. (2005). Metabolite fingerprinting in transgenic lettuce. *Plant Biotechnology Journal* 3, 165-174.
- Gianquinto, G., Goffart, J. P., Olivier, M., Guarda, G., Colauzzi, M., Dalla Costa, L., Delle Vedove, G., Vos, J., Mackerron, D. K. L. (2004). The use of hand-held chlorophyll meters as a tool to assess the nitrogen status and to guide nitrogen fertilization of potato crop. *Potato Research*, 47, 35-80.
- Gitelson, A.A., Buschmann, C., Lichtenthaler, H., 1999. The Chlorophyll Fluorescence Ratio F735/F700 as an Accurate Measure of the Chlorophyll Content in Plants. *Remote Sensing of Environment*, 69, 296-302.
- González, V. (2018) Caracterización edáfica y contenido en clorofila de un viñedo de la comarca de Utiel – Requena para su uso en la calibración de medidas de interés agronómico obtenidas por teledetección. Trabajo Final de Grado. Universitat Politècnica de València.
- Hoel, B. O., Solhaugh, K. A. (1998). Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Annals of Botany*, 82(3), 389-392.
- Hurtado, E., González-Vallejos, F., Roper, C., Bastías, E., Mazuela, P. (2017). Propuesta para la determinación del contenido de clorofila en hojas de tomate. *Idesia (Arica)*, 35(4), 129-130.
- Igual Crespo, F. (2010). El Nmin como herramienta para una fertilización nitrogenada eficiente en el cultivo de maíz (*Zea mays*) en la zona de la Ribera de Navarra.
- Jongschaap, R. E. (2006). Run-time calibration of simulation models by integrating remote sensing estimates of leaf area index and canopy nitrogen. *European Journal of Agronomy*, 24(4), 316-324.
- Knipling, E. B. (1970). Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-infrared radiation from vegetation. *Remote Sensing of Environment*, 1(3), 155–159.
- Lemaire, G., Jeuffroy, M.H., Gastal, F. (2008). Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. *European Journal of Agronomy*, 28(4), 614–624.
- Martínez, D. E., Guiamet, J. J. (2004). Distortion of the SPAD 502 chlorophyll meter readings by changes in irradiance and leaf water status. *Agronomie*, 24(1), 41–46.
- Markwell, J., Osterman, J., Mitchell, J. (1995). Calibration of the Minolta SPAD 502 leaf chlorophyll meter. *Photosynth* 46, 467-472.
- Medellín, L. A. C., Rozo, A. M. B., Trujillo, M. M. P. (2011). Ensayo preliminar sobre la utilización de un medidor portátil de clorofila para estimar el nitrógeno foliar en orégano (*Origanum vulgare* L.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 7(2), 150-165.
- Monje, O. A., Bugbee, B. (1992). Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. *HortScience*, 27(1), 69-71.
- NASA Earth Observatory. (2000). *Measuring Vegetation (NDVI & EVI)*. Obtenido de

[https://earthobservatory.nasa.gov/features/MeasuringVegetation/measuring\\_vegetation\\_2.php](https://earthobservatory.nasa.gov/features/MeasuringVegetation/measuring_vegetation_2.php)

- Oltra, M. A. (2017). *¿Qué relación existe entre la fertilización y la calidad del vino?* Recuperado el 1 de julio de 2020. Obtenido de Fertirrigación: <https://www.fertirrigacion.com/relacion-fertilizacion-calidad-del-vino/>
- Opti-Sciences. (s.f.). *CCM-300*. Obtenido de Opti-Sciences: <https://www.optisci.com/ccm-300.html>
- Padilla, F. M. (2016). *Medida del estado de N del cultivo mediante sensores ópticos proximales*. Recuperado el 16 de junio de 2020. Obtenido de Cajamar: <http://www.ual.es/GruposInv/nitrogeno/index.shtmlf.padilla@ual.es>.
- Padilla, F. M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Gimenez, C., Thompson, R. B. (2018a). Different responses of various chlorophyll meters to increasing nitrogen supply in sweet pepper. *Frontiers in plant science*, 9, 1752.
- Padilla, F. M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Grasso, R., Gallardo, M., Thompson, R. B. (2019). Influence of time of day on measurement with chlorophyll meters and canopy reflectance sensors of different crop N status. *Precision Agriculture*, 20(6), 1087-1106.
- Padilla, F. M., Gallardo, M., Peña-Fleitas, M. T., De Souza, R., Thompson, R. B. (2018b). Proximal optical sensors for nitrogen management of vegetable crops: A review. *Sensors*, 18(7), 2083.
- Parry, C.J., Blonquist, J.M., Bugbee B. 2014. In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship. *Plant, Cell and Environment* 37, 2508-2520.
- Peña-Fleita, M. T., Thompson, R., Gallardo, M., Padilla, F. M. (2015). *Optimización de la fertilización nitrogenada en cultivos de invernadero con técnicas de monitorización en suelo y planta*. Recuperado el 2 de julio de 2020. Obtenido de Interempresas: <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/148125-Optimizacion-fertilizacion-nitrogenada-cultivos-invernadero-tecnicas-monitorizacion-suelo.html>.
- Porro, D., Dorigatti, C., Stefanini, M., Ceschini, A. (2000). Use of SPAD meter in diagnosis of nutritional status in apple and grapevine. In: IV International Symposium on Mineral Nutrition of Deciduous Fruit Crops 564, pp. 243-252.
- Proyecto LUCDEME. (1995). Mapa de suelos de la Comunidad Valenciana. Hoja 693 (Utiel) Generalitat Valenciana.
- Rahn C. (2012) Soil nitrogen supply for field vegetable crops. Fact sheet 09/12 Published by Horticultural Development Company, Kenilworth, UK.
- Roberts, D. F., Kitchen, N. R., Sudduth, K. A., Drummond, S. T., Scharf, P. C. (2010). Economic and environmental implications of sensor-based nitrogen management. *Better Crops*, 94(1).
- Samborski, S. M., Tremblay, N., Fallon, E. (2009). Strategies to make use of plant sensors-based diagnostic information for nitrogen recommendations. *Agronomy Journal*, 101(4), 800-816.
- Santos, M. A., Lorenzo, M. J. R., Quinteiro, M. F. I., Ortiz, V. R., Pose, S. L., Rodríguez, D. C., Llitas, M. T. F. (2008). Nitrógeno foliar como estimador de clorofila en una

- población de "Laurus nobilis" del Parque Nacional de las Islas Atlánticas, Galicia (NO España). *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales*, (25), 61-66.
- Scharf, P. C., Lory, J. A. (2009). Calibrating reflectance measurements to predict optimal sidedress nitrogen rate for corn. *Agronomy Journal*, 101(3), 615-625.
- Schepers, J. S., Blackmer, T. M., Wilhelm, W. W., Resende, M. (1996). Transmittance and reflectance measurements of cornleaves from plants with different nitrogen and water supply. *Journal of Plant Physiology*, 148(5), 523-529.
- Sellers, P. J. (1985). Canopy reflectance, photosynthesis and transpiration. *International Journal of Remote Sensing*, (8), 1335-1372.
- Shapiro, C. A., Schepers, J. S., Francis, D. D., Shanahan, J. F. (2006). Using a chlorophyll meter to improve N management. *Ext. Publ. G*, 1632.
- Simons, E. M. (2009). Influences of past and future forest management on the spatiotemporal dynamics of habitat supply for Canada lynx and American martens in northern Maine. The University of Maine.
- Suárez-Rey, E. M., Carrión, M. T., Leyva, R., Romero-Gámez, M., Pérez-López, L., Soriano, T., Castilla, N., Hernández, J. 2012. Evaluación del SPAD para el asesoramiento del abonado nitrogenado en un cultivo de escarola. *Acta de Horticultura*, 60: 847-851.
- Taskos, D. G., Koundouras, S., Stamatiadis, S., Zioziou, E., Nikolaou, N., Karakioulakis, K., Theodorou, N. (2015). Using active canopy sensors and chlorophyll meters to estimate grapevine nitrogen status and productivity. *Precision Agriculture*, 16(1), 77-98.
- Thompson, R. B., Incrocci, L., Voogt, W., Pardossi, A., Magán, J. J. (2015). Sustainable irrigation and nitrogen management of fertigated vegetable crops. *In: VIII International Symposium on Irrigation of Horticultural Crops 1150*, pp. 363-378.
- Tremblay, N., Wang, Z., Cerovic, Z. G. (2012). Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review. *Agronomy for sustainable development*, 2(2), 451-464.
- Villar, D., Ortega, R. (2002). Bases teóricas y su aplicación para la fertilización nitrogenada en cultivos. Medidor de clorofila. Centro de Agricultura de Precisión. Departamento de Ciencias Vegetales. *Agronomía y Forestal*, 4-8.
- Westerveld, S. M., McKeown, A. W., McDonald, M. R., Scott-Dupree, C. D. (2004). Assessment of chlorophyll and nitrate meters as field tissue nitrogen tests for cabbage, onions, and carrots. *HortTechnology*, 14(2), 179-188.
- Xiong, D., Chen, J., Yu, T., Gao, W., Ling, X., Li, Y., Peng, S., Huang, J. (2015). SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics. *Scientific reports*, 5, 13389.
- Ziegler, J., Strohmeier, K., Brand, T. (1995). Nitrogen supply of vegetables based on the "KNS-system". *Ecological aspects of Vegetable Fertigation in Integrated crop Production in the Field* 428, 223-234.