



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Recursos y Tecnologías Agrícolas

Predicción de macro y micronutrientes en hojas de cítricos y caqui utilizando métodos ópticos no destructivos

**Tesis Doctoral**

Presentada por:

**Maylin Oristela Acosta Tello**

Dirigida por:

Dr. José Blasco Ivars

Dr. José Miguel de Paz

Dra. Ana Quiñones Oliver



Tutor académico:

Dr. Bernardo Pascual España

**Valencia, Mayo de 2024**



**ivia**  
instituto valenciano  
de investigaciones agrarias



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

JOSE BLASCO IVARS, Doctor en Informática, profesor de investigación y coordinador del Centro de Agroingeniería, JOSÉ MIGUEL DE PAZ, Doctor Ingeniero Agrónomo, Investigador del Centro para el Desarrollo de la Agricultura Sostenible y ANA QUIÑONES OLIVER, Doctora Ingeniera Agrónoma, profesora de investigación y coordinadora del Centro para el Desarrollo Sostenible de la Agricultura Sostenible, del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias,

Informan:

Que el trabajo "Predicción de macro y micronutrientes en hojas de cítricos y caqui, utilizando métodos ópticos no destructivos" ha sido desarrollado por Maylin Oristela Acosta Tello, bajo su supervisión, en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, como Proyecto de Tesis para la obtención del grado de Doctora Ingeniera Agrónoma, en la Universitat Politècnica de València.

Valencia, Mayo de 2024

Fdo. D. José Blasco Ivars

Fdo. D. José Miguel de Paz

Fdo. D<sup>a</sup> Ana Quiñones Oliver



## **AGRADECIMIENTOS**



*“a mi hija Camila y a mi mamá Oris”*





Unas pequeñas notas ...

*Agradezco a Dios, por darme la sabiduría y la fuerza en este recorrido.*

A mis directores, especialmente a la Dra. Ana Quiñones, quien fue mi primer contacto y con quien se inició esta historia, al Dr. José Miguel de Paz y al Dr. José Blasco, gracias de igual manera. Gracias a todos por haberme dado la oportunidad de hacer el doctorado. Gracias por su tesón y convicción de querer sacar lo mejor de mí. Gracias, por estar ahí, confiar, apostar por mí y permitirme alcanzarlo juntos. Gracias por el apoyo con las publicaciones de los resultados mediante los proyectos de sus equipos de investigación.

Al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) por permitirme realizar la estancia para la realización de los ensayos experimentales. A Fernando Visconti, Enrique Peiró y a Sandra Munera, por brindarme su apoyo. Gracias a todo el equipo de investigación del Centro para el Desarrollo de la Agricultura Sostenible (CDAS) y al Centro de Agroingeniería, por su disposición.

Agradezco a la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) en convenio con Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos (IFARHU), por haberme otorgado una beca de excelencia profesional para el estudio del Doctorado.

A mi familia, en especial a mi hija Camila Isabella, porque ha sido el motor por quién lucho cada día, en todos los aspectos de mi vida, para ser mejor. A mis padres por creer en mí y motivarme siempre a salir adelante. A mi hermano, para demostrarte que en este mundo puedes lograr todo cuando te lo propones, siempre colocando a Dios en primer lugar y esforzándote. Y a ti Cesar, porque una decisión tuya fue mi motivación para sacar el doctorado. Gracias a todas las personas que, de una u otra manera, estuvieron conmigo en esta gran aventura.

*Porque el señor da la sabiduría, Y de su boca viene la ciencia y la inteligencia .*

*Proverbios 2:6*



## INDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUM.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVII</b>
<b>PREFACIO.....</b>	<b>XIX</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. OPTIMIZACIÓN DEL USO DE LOS RECURSOS NATURALES.....</b>	<b>3</b>
1.1. Pacto Verde Europeo .....	3
1.2. Estrategia de la Granja a la Mesa .....	4
1.3. Situación actual de los fertilizantes .....	5
<b>2. LA NUTRICIÓN DE LAS PLANTAS .....</b>	<b>7</b>
2.1. Elementos minerales esenciales .....	7
2.2. Absorción y movilización de los nutrientes .....	9
2.2. Plan de abonado .....	10
<b>3. DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL .....</b>	<b>10</b>
3.1. Diagnóstico por métodos cualitativos no destructivos.....	11
3.2. Análisis cuantitativos para el diagnóstico nutricional (destructivos).....	13
3.2.1. Órganos adecuados para el diagnóstico .....	14
3.2.2. Métodos de análisis de la ionómica.....	15
3.2.3. Herramientas para la interpretación del análisis foliar.....	17
3.3. Métodos ópticos para el diagnóstico nutricional en las plantas .....	18
3.3.1. Medidores de clorofila .....	21
3.3.2. Espectroscopia Vis/NIR .....	22
3.3.3. Sistema Hiperespectral (HSI).....	23
<b>4. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS.....</b>	<b>24</b>

4.1. Pre-Tratamiento .....	25
4.1.1. Detección y eliminación de valores atípicos .....	25
4.1.2. Centrado y autoescalado.....	25
4.1.3. Suavizado.....	26
4.2. Métodos de exploración .....	28
4.3. Métodos de regresión .....	29
4.4. Métodos de clasificación.....	30
<b>5. IMPORTANCIA ECONOMICA DE LOS CULTIVOS .....</b>	<b>33</b>
5.1. Cultivo de caqui ( <i>Diospyros kaki</i> ) cv. 'Rojo Brillante' .....	33
5.2. Cítricos: mandarinas cv. 'clementina de Nules ' .....	34
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
1. OBJETIVO GENERAL.....	39
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO 1.</b>	
Estimation of macro and micronutrients in persimmon ( <i>Diospyros kaki</i> L.) cv. 'Rojo Brillante' leaves through Vis-NIR reflectance spectroscopy .....	43
<b>CAPÍTULO 2.</b>	
Non-Destructive Appraisal of Macro-and Micronutrients in Persimmon Leaves Using Vis-NIR Hyperspectral Imaging.....	61
<b>CAPÍTULO 3.</b>	
Rapid Prediction of Nutrient Concentration in Citrus Leaves Using Vis-NIR Spectroscopy .....	81
<b>CAPÍTULO 4.</b>	
Estimating the concentration of macro- and micronutrients in spring citrus leaves using Vis-NIR hyperspectral imaging .....	101
Resumen de la producción científica.....	125
<b>IV. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>127</b>

<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>135</b>
<b>VI. REFERENCIAS.....</b>	<b>139</b>



## RESUMEN

El conocimiento del estado nutricional de los cultivos permite corregir o ajustar cualquier exceso o deficiencia nutricional en los mismos, a lo largo de su ciclo vegetativo, asegurando un alto rendimiento en la producción y una óptima calidad del fruto. Tradicionalmente, para la realización del diagnóstico nutricional se ha utilizado el análisis de la ionómica de diferentes órganos de la planta, especialmente las hojas, por su facilidad de muestreo y por ser el órgano fotosintético de excelencia en las plantas. Estos análisis se realizan mediante costosos métodos convencionales de laboratorio que son destructivos, contaminantes y, además consumen mucho tiempo y dinero. Por ello es necesario implementar estrategias sostenibles que nos permitan ajustar la dosis de fertilización según las necesidades del cultivo con el mínimo riesgo de contaminación. El objetivo de esta tesis doctoral es desarrollar métodos y modelos que permitan el diagnóstico nutricional en cultivos mediante métodos ópticos no destructivos, como la espectroscopia y la imagen hiperespectral en el rango Vis-NIR, en combinación con técnicas de quimiometría. Con este fin se realizaron cuatro ensayos en los que se evaluó el potencial de estas tecnologías para la predicción del estado nutricional en dos cultivos de gran importancia socioeconómica en la Comunidad Valenciana, como lo son el caqui, en el cv. 'Rojo Brillante' y los cítricos, en la mandarina cv. 'clementina de Nules'.

De este modo, el primer bloque centrado en el cultivo de caqui cv. 'Rojo Brillante', comprende los estudios publicados en dos artículos científicos. En el primero de estos artículos se estudió el potencial de la espectroscopia Vis-NIR (430-1040 nm), con el objetivo de predecir macros y micronutrientes utilizando modelos de regresión PLS. Los resultados mostraron que es posible predecir de forma precisa macronutrientes como, fósforo (P), calcio (Ca) y magnesio (Mg), con un coeficiente de determinación en la predicción ( $R^2_p$ ) de 0,78 a 0,63. En los micronutrientes, el boro (B) y el manganeso (Mn) fueron los que obtuvieron mejores coeficientes de predicción, con  $R^2_p$  de 0,79 y 0,69, respectivamente. En el segundo artículo se ha evaluado, para la estimación de la concentración de nutrientes, el uso de imágenes hiperespectrales en el rango entre 500 y 980 nm. Los resultados mostraron la predicción de los macronutrientes como N, P, potasio (K), Ca y Mg con  $R^2_p$  de 0,80 a 0,62 y, para los micronutrientes, solo en el B se obtuvo un valor aceptable para la estimación ( $R^2_p = 0,69$ ). Además, utilizando el método de reducción de variables de influencia en la proyección (VIP) se obtuvo una predicción fiable para los nutrientes de N ( $R^2_p = 0,76$ ) y B ( $R^2_p = 0,61$ ).

En el segundo bloque, se ha estudiado otro cultivo emblemático en la Comunidad Valenciana por su importancia social y económica, como son los cítricos. En este caso, se desarrollaron herramientas de estimación del cv. 'clementina de Nules', descritas en otros dos artículos científicos. En el tercer artículo se ha estudiado la capacidad de la espectroscopía para determinar la concentración de nutrientes en las hojas de los cítricos en un ciclo vegetativo completo. Los resultados mostraron una predicción con un  $R^2_P$  de 0,70 a 0,65 para el P, K Ca y B. Utilizando el coeficiente de regresión de ponderado (BW) se determinó un subconjunto de bandas importantes para determinar la concentración de P, K y B. Los resultados mostraron que las bandas de mayor relevancia para estos nutrientes se situaron en la región del visible (430-750 nm), asociada a la absorción de pigmentos fotosintéticos. Finalmente, en el cuarto artículo se ha estudiado el potencial de la imagen hiperespectral para discriminar entre hojas jóvenes y hojas de ciclos vegetativos anteriores, lo que mejoraría el diagnóstico dado que las tablas de referencia en este cultivo están realizadas en hojas de la brotación de primavera. Partiendo de esa hipótesis, se obtuvo que es posible realizar la discriminación entre ambos tipos de hojas. Se realizó un análisis exploratorio mediante análisis de componentes principales (PCA) y se construyó un modelo de discriminación basado en la regresión de mínimos cuadrados parciales discriminante (PLS-DA), obteniendo una clasificación exitosa del 99,4 %. Posteriormente se realizó la predicción de concentración de nutrientes de hojas jóvenes, utilizando 49 bandas espectrales, obteniendo mejores resultados para los nutrientes P, K, Ca, hierro (Fe) y Mn con  $R^2_P$  de 0,69 a 0,60. Además, se realizó la predicción de estos nutrientes minimizando el número de bandas a diez, con el BW y se obtuvo un  $R^2_P$  de 0,67 a 0,57.

La presente tesis doctoral demuestra que la espectroscopia y la imagen hiperespectral Vis-NIR se potencian como herramientas alternativas a los métodos convencionales de laboratorio, en el diagnóstico nutricional de cultivos, pudiendo ser de gran ayuda para la corrección de forma rápida y fiable del plan de abonado de diferentes cultivos.



## RESUM

El coneixement de l'estat nutricional dels cultius permet corregir o ajustar qualsevol excés o deficiència nutricional en estos, al llarg del seu cicle vegetatiu, assegurant un alt rendiment en la producció i una òptima qualitat del fruit. Tradicionalment, per a la realització del diagnòstic nutricional s'han utilitzat l'anàlisi de la ionòmica de diferents òrgans de la planta, especialment les fulles, per la seua facilitat de mostreig i per ser l'òrgan fotosintètic d'excel·lència en les plantes. Estes anàlisis es realitzen mitjançant costosos mètodes convencionals de laboratori que són destructius, contaminant i, a més consumixen molt temps i diners. Per això és necessari implementar estratègies sostenibles que ens permeten ajustar la dosi de fertilització segons les necessitats del cultiu amb el mínim risc de contaminació. L'objectiu d'esta tesi doctoral és desenvolupar mètodes i models que permeten la predicció del diagnòstic nutricional en cultius mitjançant mètodes òptics no destructius, com l'espectroscòpia Vis-NIR, en combinació amb tècniques químic-mètriques. A este efecte es van realitzar quatre assajos en els quals s'avalua el potencial de l'espectroscòpia Vis-NIR per a la predicció de nutrients, en dos cultius d'importància socioeconòmica a la Comunitat Valenciana, com el caqui, en el cv. 'Rojo Brillante' i els cítrics, en la mandarina cv. 'clementina de Nules'.

D'esta manera, el primer capítol de publicacions es centra en el cultiu del caqui cv. Rojo Brillante, comprés per dos articles (I i II). En el primer d'estos articles es va estudiar el potencial de l'espectroscòpia Vis-NIR (430-1040 nm), amb l'objectiu de predir macros i micronutrients utilitzant models de regressió PLS. En este estudi es van aplicar tractaments diferencials per als nutrients de N (0 %, 33 %, 50 % i 100 %) i per a K<sub>2</sub>O (0 %, 50 % i 100 %) de la demanda del cultiu. Els resultats van mostrar que, sí que és possible predir de manera precisa macronutrients com, fòsfor (P), calci (Ca) i magnesi (Mg), amb un coeficient de determinació en la predicció (R<sup>2</sup><sub>P</sub>) de 0,78 a 0,63. En els micronutrients, com el bor (B) i el manganés (Mn) van ser els que van obtindre millors coeficients de predicció, amb R<sup>2</sup><sub>P</sub> de 0,79 i 0,69, respectivament. En el segon article s'ha avaluat, per a l'estimació de la concentració de nutrients, l'ús d'imatges hiperespectrals en un rang (500-980 nm). Els resultats van mostrar la predicció dels macronutrients com a nitrogen (N), P, potassi (K), Ca i Mg amb R<sup>2</sup><sub>P</sub> de 0,80 a 0,62 i, per als micronutrients, només en el B es va obtindre un valor acceptable per a l'estimació (R<sup>2</sup><sub>P</sub> 0,69). A més, utilitzant el mètode de reducció de variables d'influència en la projecció (VIP) es va obtindre una predicció fiable per als nutrients de N (R<sup>2</sup><sub>P</sub> 0,76) i B (R<sup>2</sup><sub>P</sub> 0,61).

En el segon capítol, s'ha estudiat un altre cultiu emblemàtic a la Comunitat Valenciana d'importància econòmica, com són els cítrics. En este cas, es van desenvolupar ferramentes d'estimació del cv. 'clementina de Nules' compreses en dos

articles (III i IV). De tal manera, que en el tercer article s'ha estudiat la capacitat de les tècniques espectromètriques per a determinar la concentració de nutrients en un cicle vegetatiu complet. Els resultats van mostrar una predicció amb un  $R^2_p$  de 0,70 a 0,65 per al P, K, Ca i B. Utilitzant el coeficient de regressió de pes (BW) es va determinar un subconjunt de bandes més influents per als nutrients P, K i B. Els resultats van mostrar que les bandes de major importància, per a estos nutrients, es situen a la regió del Vis (430-750 nm), el qual està associada a l'absorció de pigments fotosintètics. Finalment, en el quart article s'ha estudiat el potencial de les HSI per a discriminar fulles joves de fulles de cicles vegetatius anteriors, la qual cosa milloraria el diagnòstic atés que les taules de referència en este cultiu estan realitzades en fulles de la brotada de primavera. Partint d'eixa hipòtesi, es va obtindre que, és possible discriminar fulles joves de cicles anteriors, fent una anàlisi exploratòria PCA prèviament i utilitzant el model de discriminació (PLS-DA), obtenint una classificació exitosa del 99,4 %. Posteriorment es va realitzar la predicció de concentració de nutrients de fulles joves, utilitzant 49 bandes espectrals, obtenint millors resultats per als nutrients P, K, Ca, ferro (Fe) i Mn amb  $R^2_p$  de 0,69 a 0,60. A més, es va realitzar la predicció d'estos nutrients minimitzant el nombre de bandes a deu, amb el BW i es va obtindre un  $R^2_p$  de 0,67 a 0,57.

En resum, la present tesi doctoral demostra que l'espectroscòpia Vis-NIR es presenta com una ferramenta alternativa als mètodes convencionals de laboratori, en el diagnòstic nutricional de cultius, podent-se de gran ajuda per a la correcció del pla d'adobament de diferents cultius de manera ràpida i fiable.

## ABSTRACT

Knowledge of the nutritional status of crops allows for correcting or adjusting any nutritional excess or deficiency throughout their vegetative cycle, ensuring high yields in production and optimal fruit quality. Traditionally, the analysis of the ionomics of different plant organs has been used for nutritional diagnosis, especially the leaves, due to their ease of sampling and being the photosynthetic organ par excellence in plants. These analyses are carried out by expensive conventional laboratory methods that are destructive, polluting, time-consuming and costly. Therefore, it is necessary to implement sustainable strategies that allow the fertilisation dose to be adjusted according to the crop's needs with the minimum risk of contamination. This doctoral thesis aims to develop methods and models for nutritional diagnosis prediction in crops using non-destructive optical methods, such as Vis-NIR spectroscopy, combined with chemometric techniques. For this purpose, four trials have been carried out to evaluate the potential of Vis-NIR spectroscopy for nutritional prediction in two crops of socioeconomic importance in the Valencian Community, such as persimmon cv. 'Rojo Brillante', and citrus cv. 'Clementina de Nules'.

Thus, the first chapter of the publications focuses on cultivating persimmon cv. 'Rojo Brillante', comprising two articles (I and II). In the first of these articles, the potential of Vis-NIR spectroscopy (430-1040 nm) was studied to predict macronutrients and micronutrients using PLS regression models. This study applied differential treatments for N nutrients (0 %, 33 %, 50 % and 100 %) and K<sub>2</sub>O (0 %, 50 % and 100 %) of crop demand. The results showed that it is possible to accurately predict macronutrients such as phosphorus (P), calcium (Ca) and magnesium (Mg), with a coefficient of determination in the prediction ( $R^2_p$ ) of 0.78 to 0.63. Boron (B) and manganese (Mn) obtained the best micronutrient prediction coefficients, with  $R^2_p$  of 0.79 and 0.69, respectively. The second article evaluated hyperspectral imaging (HSI) in the range (500-980 nm) for nutrient concentration estimation. The results showed the prediction of macronutrients such as nitrogen (N), P, potassium (K), Ca and Mg with  $R^2_p$  from 0.80 to 0.62 and, for micronutrients, only in B, an acceptable value for the estimation was obtained ( $R^2_p$  0.69). In addition, using the projection influence variable reduction (VIP) method, a reliable prediction was obtained for N ( $R^2_p$  0.76) and B ( $R^2_p$  0.61) nutrients.

In the second chapter, another emblematic crop of economic importance in the Valencian Community, citrus, was studied. Estimation tools were developed for citrus cv. 'Clementina de Nules' and the results were published in two articles (III and IV). Thus, in the third article, the capacity of spectrometric techniques to determine the concentration of nutrients in a complete vegetative cycle was studied. The results showed prediction with an  $R^2_p$  of 0.70 to 0.65 for P, K Ca and B. Using

the weight regression coefficient (BW), a subset of more influential bands was determined for P, K and B nutrients. The results showed that the bands of greatest importance for these nutrients are located in the Vis region (430-750 nm), which is associated with photosynthetic pigment uptake. Finally, in the fourth article, the potential of HSI to discriminate young leaves from leaves of previous vegetative cycles has been studied, which would improve the diagnosis given that the reference tables in this crop are made on leaves of spring sprouting. Based on this hypothesis, it was obtained that it is possible to discriminate young leaves from previous cycles, previously performing an exploratory PCA analysis and using the discrimination model (PLS-DA), obtaining a successful classification of 99.4%. Subsequently, the prediction of nutrient concentration of young leaves was carried out using 49 spectral bands, obtaining better results for the nutrients P, K, Ca, iron (Fe) and Mn with  $R^2_P$  from 0.69 to 0.60. In addition, these nutrients were predicted by minimizing the number of bands to ten, with the BW and an  $R^2_P$  of 0.67 to 0.57.

In summary, this doctoral thesis demonstrates that Vis-NIR spectroscopy can be used as an alternative tool to conventional laboratory methods in the nutritional diagnosis of crops. This can be very helpful in quickly and reliably correcting the fertilization plans of different crops.

## PREFACIO

### Marco de Investigación

La presente Tesis Doctoral es el resultado de un trabajo de investigación, realizado por la autora durante el período 2019-2024, como estudiante de Doctorado del Programa de Recursos y Tecnologías Agrícolas de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). La tesis se ha desarrollado en el Centro para el Desarrollo de la Agricultura Sostenible (CDAS) y el Centro de Agroingeniería, ambos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).

La tesis está financiada por los proyectos MICIN - AEI TED2021-130117B-C31, IVIA-GVA 51920 y 52204, y la Unión Europea a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Generalitat Valenciana 2014 -2020. Los gastos de alojamiento y manutención se han financiados por IFARHU-SENACYT (PANAMÁ), a través de Becas de Excelencia Profesional de estudios de Doctorado, contrato n. 270-2021-020.

### Estructura de la Tesis Doctoral

La tesis doctoral se ha organizado en cinco apartados: Introducción, Objetivos, Publicaciones, Discusión general y Conclusiones

La **Introducción** se centra en la situación actual de la agricultura en el mundo y específicamente en España, concretamente en el tema de nutrición vegetal y el buen uso de una fertilización racional y equilibrada. En este apartado se describen métodos alternativos a los métodos convencionales para el diagnóstico nutricional, como lo son los métodos ópticos no destructivos, para el cultivo de cítricos y caqui, de gran importancia por su interés comercial, en la Comunitat Valenciana. La sección **Objetivos** presenta los objetivos generales y específicos de la tesis. Los resultados obtenidos se presentan a través de las cuatro **Publicaciones** científicas derivadas de esta tesis, mientras que la cuarta sección presenta la **Discusión general** de la tesis y la quinta recopila las **Conclusiones generales** de los artículos de la tesis.



## **I. INTRODUCCIÓN**





# 1. OPTIMIZACIÓN DEL USO DE LOS RECURSOS NATURALES

El uso sostenible de los recursos naturales está ganando importancia a nivel mundial, debido a que el uso inadecuado de los recursos naturales ocasiona grandes daños al medioambiente y afecta al potencial productivo de la agricultura. La agricultura, entre otras actividades, depende, en gran medida, de la disponibilidad de recursos para su óptimo desarrollo, como son el agua y el suelo (Villalobos, 2008). Si nos fijamos en los nueve límites de sostenibilidad planetaria identificados por Rockström et al. (2023), destacan como superados la interferencia en el ciclo del nitrógeno (N) y el fósforo (P), el uso y la contaminación del agua y el uso y la degradación de los suelos. En relación con los nutrientes de N y P, la producción agrícola convencional, generalmente, los aplica en exceso provocando impactos negativos en los ecosistemas, como la lixiviación de nitratos que origina la contaminación (Desmit et al. 2018; Gu et al. 2021). Por tanto, es indispensable desarrollar sistemas productivos con una menor dependencia de los insumos o que los usen con mayor eficiencia logrando una mejora de la sostenibilidad en la producción agrícola (Cayuela et al. 2017; Thompson et al. 2019).

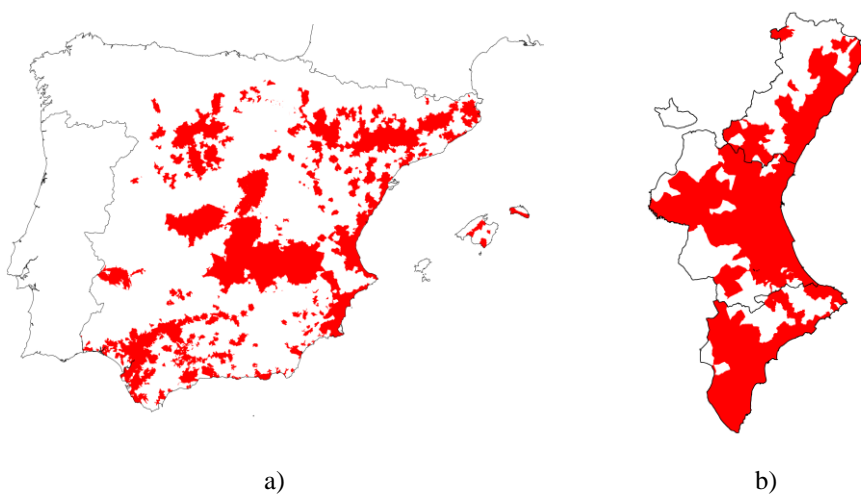
## 1.1. Pacto Verde Europeo

La Unión Europea (UE), en su compromiso con una vida saludable y libre de contaminación, ha impulsado el Pacto Verde Europeo (UE 24 de junio de 2021), que es una estrategia de crecimiento sostenible e integrador para impulsar la economía, mejorar la salud, la calidad de vida de las personas y cuidar de la naturaleza (Bélanger & Pilling, 2019b).

Uno de los objetivos de este pacto es la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero en un 55 % para el 2030 con compromiso de alcanzar la neutralidad climática en el año 2050, siendo vinculante para todos los estados miembros. Para lograr sus objetivos, la comisión europea propuso en el año 2021, el paquete de medidas del Objetivo 55, que incluye 13 leyes revisadas y 6 propuestas relacionadas con el clima y la energía. En este objetivo se plantean medidas referentes a la creación de un sistema alimentario sostenible, aprobando la estrategia de la “Granja a la Mesa” como una de las iniciativas clave en el marco del Pacto Verde Europeo.

## 1.2. Estrategia de la Granja a la Mesa

La estrategia “de la Granja a la Mesa”, plantea garantizar un sistema alimentario justo, saludable y respetuoso con el medio ambiente, al tiempo que asegurar los medios de vida de los agricultores. Su importancia radica en que pretende lograr la resiliencia ante grandes desafíos, como la sostenibilidad de los sistemas agroalimentarios ante el cambio climático o el aumento de la población. Para que un sistema agrario sea sostenible es necesario garantizar la seguridad alimentaria y la nutrición para toda la población, sin comprometer las bases económicas, sociales y ambientales para las futuras generaciones. Entre los objetivos incluidos en esta estrategia se encuentran: i) reducir las pérdidas de nutrientes al menos un 50 %, sin deteriorar la fertilidad del suelo. Para esto se reducirá el uso de fertilizantes al menos un 20 %; ii) conseguir que, al menos, un 25 % de las tierras agrícolas de la UE se dediquen a la agricultura ecológica y que se incremente significativamente la acuicultura ecológica.



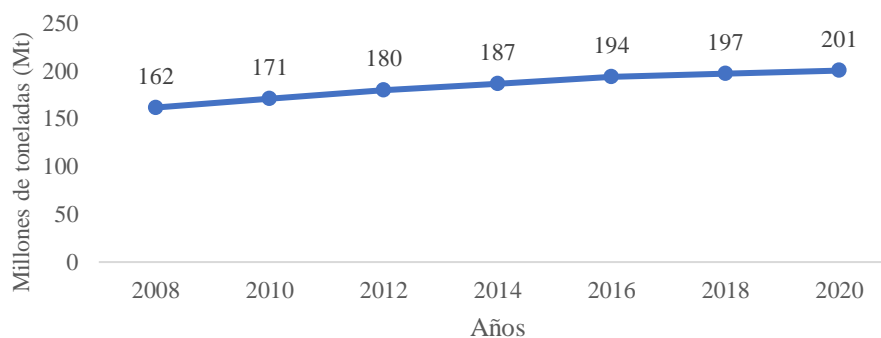
**Figura 1.** Zonas Vulnerables por contaminación de nitrato en a) España y b) Comunidad Valenciana. Actualizado a Julio 2022.

La aplicación de esta estrategia europea se traslada a España en el real decreto sobre nutrición sostenible 1051/2022, de 27 de noviembre de 2022. Estas normas básicas pretenden conseguir un aporte sostenible de nutrientes en los suelos agrarios, aplicando códigos de buenas prácticas agrícolas comunes al territorio nacional para minimizar uno de los problemas medioambientales más importantes que genera la actividad agraria como es la contaminación de las aguas por lixiviación de nitratos. Según esto, se aprueba el real decreto 47/2022, en donde se establecen los criterios a seguir para designar las zonas vulnerables a la contaminación por nitrato en el

territorio nacional (Ministerio de la Presidencia, 2022). En la Comunitat Valenciana la designación de zona vulnerable se extiende a más del 60 % de su territorio en el año 2022 (Decreto 81 de 10 de junio de 2022) (figura 1).

### 1.3. Situación actual de los fertilizantes

Los fertilizantes restituyen los elementos nutritivos que las plantas extraen del suelo o que se pierden por lavado, retrogradación y erosión, poniendo a disposición de los cultivos los elementos que precisan en cada etapa fenológica. El aporte de fertilizantes es indispensable para mejorar las características propias del suelo y para el desarrollo y la producción de los cultivos agrícolas.

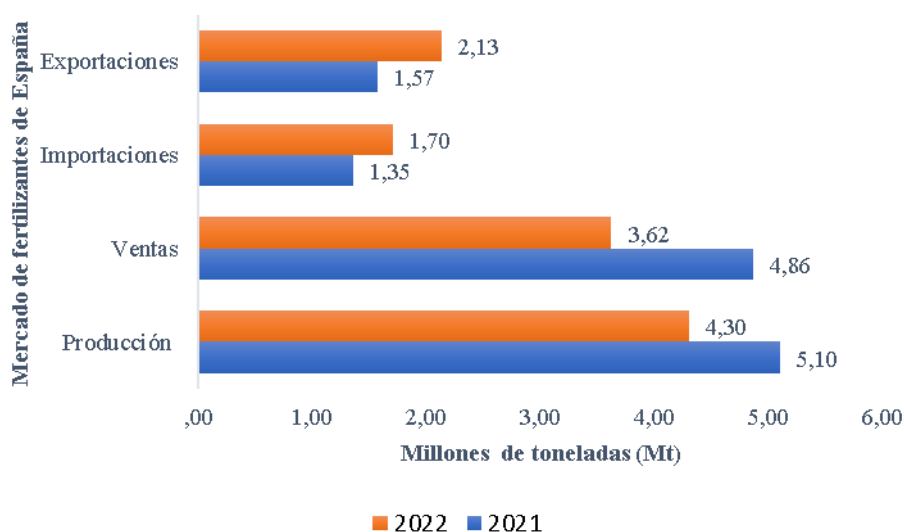


**Figura 2.** Consumo global de fertilizantes sintéticos por año. Adaptada de FAOSTAT, 2021

De acuerdo con la FAOSTAT (2021), el consumo global de fertilizantes alcanzó los 200 millones de toneladas (Mt) en el año 2020 (figura 2). Según el MAPA (2023), el consumo nacional de fertilizantes en España se situó en 3,6 Mt en el año 2022. La producción nacional de fertilizantes descendió el 3,4 % en los últimos años, mientras que el mercado exterior estuvo marcado por subidas de las importaciones en un 25 % (1,6 Mt) y de las exportaciones en un 35 % (2,1 Mt). La figura 3 muestra la situación del comercio de fertilizantes en España en la campaña 2021- 2022.

En los últimos años, ante el incremento de precios de los fertilizantes y la situación de la contaminación, es necesario realizar manejos racionales del abonado empleando técnicas que aumenten la eficiencia de uso a la vez que respeten el medio ambiente. Las prácticas actuales están incorporando la fertilización orgánica, de forma que se mejore la fertilidad del suelo, potenciando su función protectora al incrementar la capacidad de secuestro de carbono del sistema agrario y mejorando la salud del suelo (Zhang et al. 2020, 2021).

La fertilización racional de los cultivos persigue aportar los nutrientes en los momentos y forma que la planta los necesite, disminuyendo las pérdidas del sistema e incrementando la eficiencia de uso. De esta forma se lograría una nutrición equilibrada, capaz de generar un desarrollo adecuado y una producción óptima, con el mínimo riesgo de contaminación ambiental (Havlin, 2014).



**Figura 3.** Mercado de fertilizantes en la agricultura española, expresado en millones de toneladas) Adaptada de MAPA (2023).

Para optimizar el uso de los fertilizantes se aplica la estrategia de la gestión 4R (*Right source, Right rate, Right time and Right place*) (INTAGRI, 2017). Es decir, en el establecimiento de un plan de abonado se debe decidir cuál es el fertilizante adecuado, su dosis ajustada, el tiempo de aplicación correcta, y el lugar de aplicación apropiado. La fuente correcta se refiere al empleo de los fertilizantes más adecuados en función de las propiedades bioquímicas del suelo de forma que, una vez aplicados, se encuentren en forma disponible para las plantas. Para conocer la dosis correcta a aportar, es esencial realizar un diagnóstico nutricional preciso del cultivo, que permita conocer las reservas de nutrientes en la planta, y un análisis de suelo, para conocer los aportes de nutrientes de este. Además, el momento correcto de aporte de nutrientes es muy importante, siendo aquel que se produce cuando el cultivo lo requiere en mayor cantidad. Por último, la localización es un aspecto esencial para lograr un uso eficiente de los fertilizantes y, el empleo del fertirriego nos permitirá aplicarlo cercano a las raíces absorbentes.

Por lo tanto, el marco 4R se debe adaptar y permitir al productor una toma de decisiones informada sobre la gestión de nutrientes en función de las condiciones

específicas de la parcela, como el tipo de cultivo, el clima y el historial de cultivo, entre otros (Flis, 2018, 2019).

## **2. LA NUTRICIÓN DE LAS PLANTAS**

La nutrición vegetal se define como los procesos mediante los cuales las plantas absorben y utilizan los nutrientes necesarios para su crecimiento, desarrollo y reproducción (Mengel & Kirkby, 2012). Los nutrientes esenciales son elementos que las plantas necesitan durante un ciclo vegetativo completo (Marschner, 2012). Diecisiete elementos son considerados nutrientes esenciales para las plantas (Brown et al. 1987; Malavolta, 2007). El carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O), que constituyen aproximadamente el 90 % de la biomasa de los árboles, son proporcionados por la naturaleza. El C y el O se absorben por las hojas como dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) del aire, y se combinan con el H, que es absorbido por las raíces a través de la absorción de agua, para producir carbohidratos durante la fotosíntesis. El resto de los elementos esenciales para la planta son los denominados nutrientes minerales (Rahman et al. 2005).

### **2.1. Elementos minerales esenciales**

Una planta sólo puede completar su ciclo vital si se le suministra, en cantidad suficiente, todos y cada uno de los elementos minerales esenciales (Malavolta, 2007; Marschner, 1995). Estos se clasifican en dos grandes grupos: los macronutrientes, que son elementos que las plantas requieren en grandes cantidades (N, P, K, Ca, Mg, S), y se encuentran en el tejido de las plantas en concentraciones superiores a 0,1 %, y los micronutrientes, que solo se necesitan en cantidades pequeñas (Fe, Zn, Mn, B, Cu, Mo, Ni, Cl) y se hallan en concentraciones inferiores a 100 µg/g (Clarkson, 1980; de Mello Prado & Rozane, 2020). La falta de cualquiera de ellos, o su presencia en una cantidad o concentración insuficiente, provoca la reducción en el crecimiento y ciclo de vida y alteraciones metabólicas en la planta, ya que todos los elementos minerales juegan un papel específico en la nutrición vegetal (Fageria, 2009). A continuación, se describen, someramente, cada uno de ellos:

Nitrógeno (N): forma parte de compuestos básicos del metabolismo vegetal como aminoácidos, proteínas, clorofila, ácidos nucleicos, enzimas y hormonas. De ahí que este nutriente se considere como el más importante en la nutrición mineral de los cultivos, desempeñando un papel crucial tanto en el desarrollo vegetativo como en la floración y en la producción (rendimiento y calidad de los frutos).

Fósforo (P): interviene en los procesos metabólicos de transferencia de energía como en el metabolismo de los azúcares y en la síntesis de los ácidos nucleicos. Como consecuencia de estas funciones, el P ejerce una acción estimuladora del desarrollo radicular, de la floración y el desarrollo de los frutos.

Potasio (K): desempeña una función importante en los procesos del metabolismo vegetal como la fotosíntesis y la síntesis de los hidratos de carbono, además de ser crucial en los intercambios gaseosos de la planta, al controlar la apertura y cierre de estomas.

Magnesio (Mg): su principal función es ser átomo central de la molécula de la clorofila e interviene en la síntesis de carotenos y xantofilas. Actúa, también, como activador de diferentes enzimas.

Calcio (Ca): este nutriente tiene una gran importancia en algunas funciones fisiológicas como el desarrollo del polen, la senescencia y forma parte de la pared y la membrana celular. Además, participa en la división y elongación celular. Por este motivo los síntomas de deficiencia son observados en órganos en crecimiento (meristemas apicales y frutos en crecimiento).

Azufre (S): es un constituyente de los aminoácidos azufrados (cisteína y metionina) y forma parte de algunas enzimas, vitaminas y aceites esenciales.

Hierro (Fe): sin ser constituyente de la clorofila, desempeña un papel fundamental en la fotosíntesis y respiración de las plantas al formar parte de algunos compuestos transportadores de electrones (ferredoxina y citocromos).

Manganeso (Mn): contribuye al funcionamiento de varios procesos biológicos incluyendo la fotosíntesis, la respiración y la asimilación de nitrógeno. También interviene en la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico y el alargamiento celular en la raíz.

Zinc (Zn): interviene en la síntesis de las hormonas como el ácido indolacético (AIA), la síntesis de las proteínas y participa en la formación de clorofila y en la conversión de almidones en azúcares.

Boro (B): este nutriente desempeña un papel fundamental en el desarrollo de los tejidos meristemáticos de crecimiento activo como los brotes y la parte apical de las raíces.

Cobre (Cu): participa en los procesos de fotosíntesis, el metabolismo de proteínas e hidratos de carbono y ayuda a formar lignina en las paredes celulares.

Molibdeno (Mo): constituyente esencial de las enzimas que tienen que ver con la fijación biológica de nitrógeno y con la reducción de nitrato a amonio.

Cloro (Cl): elemento que participa en la transferencia de electrones a la clorofila, por lo que es clave, aunque en pequeñas concentraciones, para la fotosíntesis y participa en la activación de enzimas como amilasa, asparagina sintetasa y ATPasa del tonoplasto.

Níquel (Ni): anexado a la lista de nutrientes esenciales en el año 2004 (Malavolta, 2007). Este elemento juega un papel importante en el metabolismo de la urea y de los ureidos, la absorción del hierro, la viabilidad de las semillas, la fijación del N y el desarrollo reproductivo.

## **2.2. Absorción y movilización de los nutrientes**

La asimilación de los nutrientes por las plantas depende de dos factores fundamentalmente, de la capacidad de las raíces para absorber nutrientes y de la disponibilidad de estos en el medio. Por lo que, el conocimiento de la forma en que la planta absorbe los nutrientes ayudará a interpretar correctamente el diagnóstico nutricional y al establecimiento de diferentes formas de manejo de aplicación de los fertilizantes (Jones, 2012).

La planta absorbe los nutrientes de forma activa y pasiva. La absorción activa es el proceso por el cual un ion es movido en contra de un gradiente de potencial electroquímico, que se lleva a cabo a través del plasma de la célula más externa continuando el transporte mediante los plasmodesmos, hasta la endodermis; posteriormente se lleva a los vasos de conducción xilema y floema (Havlin, 2014). Dentro de la planta, algunos nutrientes se movilizan desde la raíz hasta las zonas en crecimiento. Si la concentración de un elemento nutriente esencial en el tejido vegetal está por debajo del nivel necesario para un óptimo crecimiento, la planta es deficiente en ese elemento, lo que genera una alteración en la ruta metabólica en la que participa dicho elemento, afectando otros procesos involucrados (Mengel & Kirkby, 2012).

Una vez absorbidos por la planta, los nutrientes según su translocación de un órgano a otro se clasifican en elementos móviles, N, P, K, Mg, Cl, Na, Mo, Zn y los nutrientes considerados inmóviles Ca, S, Fe, Cu y B (Marschner, 1995). La diferente movilidad de los nutrientes en la planta afecta al diagnóstico visual de problemas de fertilización. Los síntomas que aparecen en hojas viejas suelen deberse a deficiencias en elementos móviles, como el N, P, K y Mg, que se han trasladado hacia los nuevos órganos en desarrollo. Sin embargo, si los síntomas de deficiencia aparecen en un

órgano de nuevo crecimiento, la carencia será debida a elementos poco móviles o inmóviles como el Ca, Mg, Fe, Zn y Mn (Kumar et al. 2021). En especies anuales la concentración de nutrientes en hojas, desde una edad temprana hasta la senescencia de la planta disminuyen a lo largo del ciclo vegetativo, excepto los nutrientes inmóviles (Smith, 1962). En cultivos perennes la concentración de nutrientes en hojas y otros órganos fluctúan con los rebrotes estacionales, crecimiento y desarrollo de los frutos y también varían entre hojas de ramas vegetativas y fructíferas (Barbazán, 1998). Estas características influyen en aspectos de la fertilización como dosis, frecuencia y tipo de fertilizante, así como del método de aplicación correcto.

## **2.2. Plan de abonado**

Un plan de abonado, obligatorio en plantaciones en regadío de más de una hectárea de superficie (RD 1051/22), debe contemplar las necesidades que hay que cubrir de las plantas y el momento de aplicación de los fertilizantes. Una vez conocidas las necesidades nutricionales de las plantas (dosis) hay que corregirlas según el estado nutricional de la planta (deficiencia o exceso). Posteriormente el momento adecuado de aportar los elementos minerales esenciales debe de coincidir con los periodos de máximas necesidades nutricionales de las plantas (Marschner, 1995).

Las plantas absorben los nutrientes de manera diferencial a lo largo de su ciclo vegetativo (curva de absorción), variando la concentración en el que estos se encuentran en los diferentes órganos (Bertsch, 1995). Estas curvas de absorción, que deben coincidir con los momentos de aplicación de los nutrientes, son diferentes para cada cultivo y elemento mineral (Bustan & Goldschmidt, 1998). Por este motivo, el conocimiento de estas curvas (medidas a través de la concentración foliar, o de cualquier otro órgano, de nutrientes) en etapas fenológicas clave de los cultivos permite, no sólo definir las épocas de aplicación de los fertilizantes, sino conocer el estado nutricional de las plantaciones. Posteriormente, el diagnóstico nutricional es una herramienta necesaria para la corrección de las dosis de fertilizantes a aplicar (Quaggio, 2010).

## **3. DIAGNÓSTICO NUTRICIONAL**

El diagnóstico nutricional informa de la carencia o exceso de nutrientes en un momento determinado del ciclo de cultivo y permite corregir el suministro adecuado de nutrientes de las plantas (Campisi-Pinto et al. 2017; Parent et al. 2013). Un correcto diagnóstico es la manera de incrementar la eficiencia de uso de los recursos



e insumos involucrados en la nutrición de las plantas, objetivo esencial de la *Estrategia de la Granja a la Mesa*.

Este diagnóstico se puede realizar de forma visual (cualitativa) o a través del análisis de diferentes órganos (cuantitativo), analizando la concentración de un nutriente dado (Rozane et al. 2015). La concentración dependerá de diferentes factores que afectan al desarrollo de las plantas como el suelo, las condiciones climáticas, tiempo, la producción, el manejo y, fundamentalmente, la disponibilidad de ese nutriente en el suelo (Correndo, 2017).

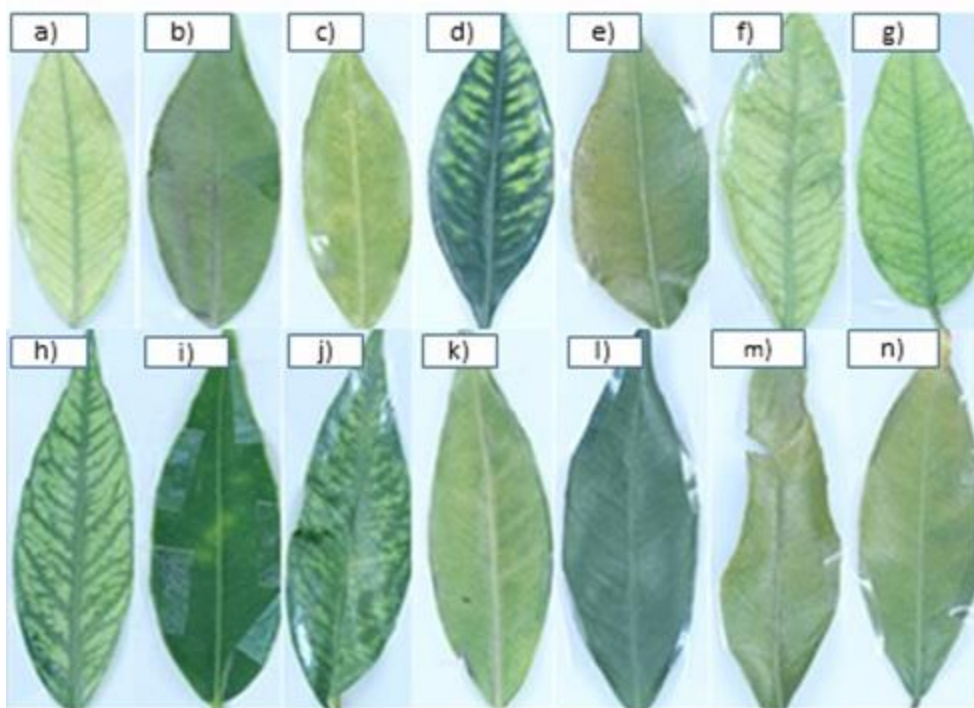
En algunas ocasiones, debido a aportes insuficientes o excesivos o en determinadas condiciones del suelo, las plantas no logran cubrir de forma adecuada las necesidades de uno o varios nutrientes. Se produce, por tanto, un desbalance metabólico dentro de la planta, asociado con la función específica de un determinado nutriente que participa como elemento esencial en un proceso fisiológico, ya sea activando o regulando la velocidad de un proceso enzimático, o bien porque el elemento es un constituyente estructural de un metabolito esencial o de una estructura molecular (Rehman et al. 2021). Sin embargo, es extremadamente importante poder distinguir entre deficiencia y toxicidad. Deficiencia indica una absorción de un nutriente inferior a la necesaria que causa desviaciones en el desarrollo del cultivo. Por el contrario, la toxicidad o exceso tiene lugar cuando uno o más nutrientes están presentes en la planta, en cantidad superior a lo que necesita, lo cual puede impedir la absorción adecuada de otros elementos pudiendo, en algunos casos, ocasionar la muerte de la planta (Torres-Beltrán et al. 2023). Las deficiencias o toxicidades de cada nutriente se manifiestan mediante diferentes síntomas que pueden llegar a ser reconocibles.

### **3.1. Diagnóstico por métodos cualitativos no destructivos**

La sintomatología visual es la primera herramienta disponible para conocer el estado nutricional de los cultivos. Este método de diagnóstico se basa en los cambios y en los rasgos morfológicos de las plantas causados por una deficiencia o un exceso de nutrientes. Se suele realizar revisando un gran número de plantas para que sea representativo y se basa en la experiencia subjetiva del agricultor para interpretar los síntomas y asociarlos con carencias o excesos de nutrientes concretos (Bertoni et al. 1992). En la figura 4 se muestran los síntomas asociados con deficiencias de la mayor parte de los nutrientes en hojas de cítricos cv. 'clementina de Nules'.

Este método de diagnóstico presenta serias desventajas. Entre ellas, que es subjetivo y distintos observadores pueden interpretar los síntomas de formas diferentes. No

obstante, el mayor inconveniente es que, cuando un síntoma aparece, ya es tarde para actuar, impidiendo una corrección del plan de abonado cuando esta es necesaria. La planta ya ha necesitado el aporte de ese nutriente y, por lo tanto, va a reducir el rendimiento (Vashisth & Kadyampakeni, 2020).



**Figura 4.** Deficiencia visual en cítricos en hojas de clementina de Nules: a) N, b) P, c) K, d) Mg, e) Ca, f) S, g) Fe, h) Mn, i) Zn, j) Mo, k) Ni, l) Cu, m) B, n) Cl. Fuente propia de muestreo de cítricos cv. clementina de Nules, año 2020-2021

A continuación, se describe, de forma somera, la sintomatología visual en las hojas de los cultivos en general asociada a las carencias nutricionales. En ocasiones, esta sintomatología no resulta decisiva para identificar un único elemento deficiente, ya que la carencia podría no limitarse a un solo elemento esencial (Almeida et al. 2020; de Bang et al. 2021; Uchida, 2000). Además, la deficiencia o exceso también se asocia con la modificación en el crecimiento o desarrollo normal de las plantas, la producción y atributos de calidad del fruto que pueden ayudar a diagnosticar el elemento que se encuentra en concentración inadecuada.

La deficiencia de N se manifiesta con una decoloración amarillenta general en la planta, incluidas los nervios, el envés y las hojas, los cuales toman colores rojizos. En cuanto al P, las plantas deficientes manifiestan coloración verde oscuras azuladas,

moradas y parduscas en las hojas. Con la carencia de K, los márgenes de las hojas se vuelven marrones o moteados y se curvan hacia abajo. La clorosis comienza en las puntas y los márgenes de las hojas hasta avanzar al pecíolo.

En relación con los macronutrientes secundarios, las plantas deficientes en Mg muestran color pálido de las hojas, incluyendo los nervios. En cítricos y caquis, la deficiencia de este elemento forma una V invertida en la hoja, que también puede observarse en el Ca. Además, las hojas que presentan carencia de este último elemento manifiestan clorosis y necrosis de las hojas. El síntoma característico de la deficiencia de S es la clorosis, sobre todo en hojas jóvenes, con las venas más pálidas que el tejido intervenal, siendo las hojas más delgadas.

Entre los micronutrientes, la carencia de Fe se observa en los nervios de las hojas que permanecen de color verde oscuro mientras que los tejidos se vuelven cloróticos tornándose de verde claro a amarillo. La deficiencia de Mn se manifiesta con una aparición de bandas de color amarillento internerviales. Muy similar a la observada en Zn, donde el limbo amarillea en las zonas comprendidas entre las nerviaciones secundarias, las hojas suelen tener menor tamaño, con una forma más estrecha y puntiaguda y, además, suelen caerse prematuramente. En cuanto al Cu, su deficiencia provoca la aparición de manchas amarillas y marrones en las hojas y se vuelven rígidas y, en el ápice, comienzan a curvarse hacia abajo. Por otro lado, la carencia de B afecta al crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas, lo que provoca la inhibición de la expansión celular, la muerte del meristemo y la reducción de la fertilidad. La falta de Mo da lugar a la aparición de manchas necróticas en los márgenes de las hojas debido a la acumulación de nitrato, dado que este nutriente forma parte de las reacciones redox y actividad enzimática y su ausencia evita la correcta transformación del N en aminoácidos. La deficiencia de Ni reduce el crecimiento y la producción de las plantas, presentando las hojas lesiones necróticas en los ápices. Por último, la deficiencia de Cl, aunque es difícil de detectar, provoca clorosis en las hojas más jóvenes y un marchitamiento general en toda la lámina foliar (necrosis), bronceado y reducción de su crecimiento.

### **3.2. Análisis cuantitativos para el diagnóstico nutricional (destruictivos)**

Para determinar el estado nutricional de las plantas de una manera objetiva y precisa se realizan análisis de la concentración de nutrientes en el tejido vegetal mediante técnicas cuantitativas destructivas (Plaza et al. 2012). Entre las principales ventajas destacan su precisión en la estimación de deficiencias o excesos nutricionales, identificar deficiencias asintomáticas e indicar interacciones entre nutrientes (Kalaji

et al. 2017), por el contrario, requiere un adecuado muestro de los órganos a analizar, el transporte al laboratorio y además es caro y complejo. El órgano de la planta a muestrear debe ser aquel que manifieste mejor la relación entre el contenido de un nutriente y el rendimiento de un cultivo (Barbazán, 1998). De entre aquellos que se pueden utilizar para el diagnóstico nutricional de las plantas, los más utilizados son la hoja, el tallo (a través del análisis de savia), las flores y los frutos (Siedliska et al. 2021).

### **3.2.1. Órganos adecuados para el diagnóstico**

#### **Análisis foliar**

El análisis foliar es el método más adecuado para diagnosticar el estado nutricional de las plantas, ya que la hoja es el órgano con mayor actividad metabólica y, en la mayor parte de los cultivos, el que proporciona más información acerca de las reservas de la planta. Además, las variaciones de los nutrientes se pueden observar con más facilidad en este órgano, ya que manifiesta con mayor claridad la presencia de estados carenciales o excesivos e indica la existencia de antagonismos entre nutrientes (Menino, 2012). Aunque se pueden utilizar otros tejidos vegetales, como pecíolo, flores o frutos, los nutrientes no se acumulan uniformemente en estos, especialmente los inmóviles o ligeramente móviles (de Mello Prado & Rozane, 2020).

No obstante, este análisis posee limitaciones ya que el contenido de un elemento mineral depende de factores como la edad de la hoja, el momento de toma de muestra y la presencia de elementos beneficiosos o tóxicos, entre otros (Lucena, 2002). Por otro lado, la aplicabilidad de esta herramienta depende de la existencia de tablas de referencia realizadas en el mismo tipo de hoja, y a ser posible, en el mismo momento de muestreo. Por otro lado, por sí solo no es suficiente para realizar una correcta recomendación de fertilización, siendo necesario complementarlo con el historial del cultivo, incluyendo dosis de fertilizante aplicado, prácticas de manejo y rendimientos obtenidos en campañas anteriores.

#### **Análisis de Savia**

El análisis de savia extraída de los tejidos conductores de la planta (mezcla de xilema, floema y contenido vacuolar), permite cuantificar la cantidad de nutrientes existentes en la savia (Rodríguez et al. 2021) e interpretar el estado nutricional de una planta (Hernando, 1973). La ventaja principal del análisis de savia es su sensibilidad a los cambios que sufre la planta (Cadahía, 2008). Esta sensibilidad

facilita la identificación de deficiencias o excesos nutricionales, ya que la savia es capaz de mostrar valores muy diferentes entre una nutrición por exceso, óptima o deficiente. Además, la concentración de los nutrientes en savia se ve afectada de forma casi instantánea por las aplicaciones de fertilizantes, como también por una serie de factores que incluyen la edad de la planta, la posición de la hoja, las condiciones climáticas previas al muestreo, las interferencias iónicas, las prácticas de abonado y la concentración de nitrato en planta, el cual puede también fluctuar a lo largo del día. Todos estos factores se deben caracterizar antes de establecer guías para interpretar los datos cuando se utiliza la savia para el diagnóstico nutricional.

### **Análisis de flores y frutos**

Otros órganos utilizados son las flores (Pestana et al. 2001) y los frutos (Lacertosa, 2001). Para este análisis aún no existen valores de referencia establecidos, ni consenso sobre cuál es la preferencia por uno de esos órganos (flores o frutos) como base más adecuada para la corrección de un análisis nutricional (Menino, 2012). Por ello, son actualmente poco utilizados.

### **3.2.2. Métodos de análisis de la ionómica**

Para cuantificar la concentración de nutrientes mediante análisis de ionómica, la primera fase es extraer los elementos o nutrientes de la muestra. La digestión ácida es uno de los métodos tradicionales más utilizado para este proceso (Valdés, 2018) y se puede realizar de dos formas.

- a) Digestión o mineralización por vía húmeda, donde se mezcla el material vegetal con ácido sulfúrico, o con una combinación de ácidos nítrico y perclórico. En las muestras digeridas con ácido sulfúrico se determina el N total. En las muestras digeridas con la mezcla de ácidos se analiza K, Ca, Mg, S, Na y micronutrientes.
- b) Digestión por vía seca o cenizas. Este método se utiliza para analizar bases (K, Mg, Ca, Na) y P. La muestra seca y molida se incinera a cenizas mediante altas temperaturas en una mufla y luego se disuelven en ácido clorhídrico. Por medio de esta metodología no se pueden analizar elementos volátiles (N, S, B).

En una segunda fase, la cuantificación o análisis de la concentración de los nutrientes se realiza mediante técnicas instrumentales de análisis (De La Calle et al. 2013; Martínez et al. 2008).

### **Análisis de espectroscopia de absorción atómica (AAS)**

Esta técnica mide la radiación electromagnética absorbida o emitida por átomos libres del elemento de interés, cuando sus electrodos experimentan transiciones entre niveles de energía atómica. Durante este análisis, el átomo del elemento o nutriente a cuantificar absorbe la energía en forma de fotones, provocando que sus electrones se promuevan a un estado excitado (Herrera, 2013).

### **Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)**

La espectrometría de masas con fuente plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), es una técnica de análisis inorgánico elemental e isotópico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica. El ICP-MS realiza un análisis simultáneo de los elementos en tiempo real, además de poder llevar a cabo la determinación de uno o varios elementos a la vez que provee la composición de la muestra analizada. Por una parte, obtiene una matriz libre de interferencias debido a la eficiencia de ionización del plasma de argón. Su principal ventaja son sus bajos límites de detección lo que la hace ideal para el análisis de elementos traza (Matsuoka et al. 2019; Pepi et al. 2016).

### **Método de electrodo selectivo de iones (ISE)**

Los electrodos selectivos de iones (ISE) son sensibles a la concentración de un ion específico presente en la muestra. Se utilizan junto con un electrodo de referencia para medir la concentración de los iones (Rosenberg et al. 2018). Los ISE pueden medir una amplia gama de iones, lo que permite la detección multiplexada de iones en un análisis. Los ISE se construyen con un electrodo de entrada y un electrodo de referencia llenos de soluciones electrolíticas. Los iones objetivo que se miden con mayor frecuencia en las pruebas son: nitrato, fosfato, potasio, magnesio y micronutrientes como cobre y zinc (Cho et al. 2019).

### **Análisis por inyección en flujo (FIA)**

El análisis por inyección en flujo (Flow Injection Analysis, FIA) es una modalidad avanzada de análisis en flujo continuo desarrollado para el análisis automatizado de muestras. El FIA consiste en un analizador de flujo continuo en el que se introducen las muestras de forma secuencial en intervalos regulares en una corriente líquida que las transporta a un detector (Zagatto & Rocha, 2020).

### **3.2.3. Herramientas para la interpretación del análisis foliar**

El resultado del diagnóstico se utiliza para evaluar el estado nutricional de los cultivos. Un mismo diagnóstico puede resultar en un estado diferente dependiendo de las características del cultivo o la parcela. Existen diferentes herramientas para evaluar el estado nutricional de los cultivos, como el nivel crítico o rango adecuado o el sistema integrado de diagnóstico y recomendación o DRIS (por sus siglas en inglés) (de Mello Prado & Rozane, 2020).

#### **Nivel crítico**

Se define el nivel crítico como el contenido de un elemento nutritivo en un tejido vegetal, por debajo del cual se afecta el crecimiento del cultivo (Gregoire & Fisher, 2004). El diagnóstico foliar, basado en el nivel crítico, es uno de los criterios más difundidos de interpretación del análisis de plantas y requiere valores de concentración de nutrientes como estándar u óptimo para un determinado nutriente, estado fenológico y órgano establecido (Bates, 1971). Concretamente, el valor óptimo o crítico para cada elemento es aquel con el cual se obtiene el 90 % del rendimiento relativo máximo y se compara con el valor determinado en la muestra a diagnosticar (Gregoire & Fisher, 2004). Las calibraciones de niveles críticos consideran, como tal, a la concentración mínima del nutriente con la que se logra 90 a 95 % del rendimiento máximo. Una de las desventajas del criterio de niveles críticos radica en que estos valores pueden variar entre un 25 % o más en función de diferentes condiciones (estado fenológico u órgano muestreado) (Lucena, 2002; Reussi Calvo, 2015).

#### **Rango de suficiencia**

El rango de suficiencia se define como el rango de concentración entre el nivel crítico y una concentración en exceso que da lugar a una toxicidad (de Mello Prado & Rozane, 2020). Los rangos se clasifican en: exceso, alto, óptimo, bajo y deficiente. A cada una de estas categorías corresponde un rango de suficiencia. Esta herramienta se basa en que los valores foliares se deben encontrar dentro del rango de suficiencia, para no ser limitante del rendimiento del cultivo (Amissah et al. 2023). Cuando el valor crítico para un nutriente se determina, este suele constituir el límite inferior del rango de suficiencia (Barker, 2015), mientras que el límite superior se sitúa en un valor correspondiente a un valor alto o tóxico (Sumner, 1979). Los criterios anteriores (nivel crítico y rangos de suficiencia), dependen del estado fisiológico del muestreo y, por otra parte, no consideran interacciones entre los nutrientes (Torri, 2015).

### **Sistema integrado de recomendación (DRIS)**

El DRIS es el método más utilizado para el diagnóstico nutricional mediante el análisis de tejido (Morales et al. 2022). Está compuesto de un conjunto de normas que hacen el diagnóstico más completo, clasificando en orden de importancia los elementos que requiere la planta, tomando en cuenta la interacción entre nutrientes y detectando deficiencias y excesos relativos a la planta en cualquier etapa de desarrollo, enfatizando la importancia del balance de nutrientes (Oliveira et al. 2020).

Un DRIS expone los resultados del diagnóstico nutricional de las plantas mediante índices, que se expresan por valores positivos o negativos que indican si el nutriente referido se encuentra en exceso o deficiencia. Cuanto más cercanos a cero sean los índices de todos los nutrientes, más cerca estará la planta del equilibrio nutricional adecuado (Bhaduri, 2013). Los índices negativos indican deficiencias relativas, mientras que los positivos, excesos respecto a los nutrientes considerados en el diagnóstico (Landriscini, 2001).

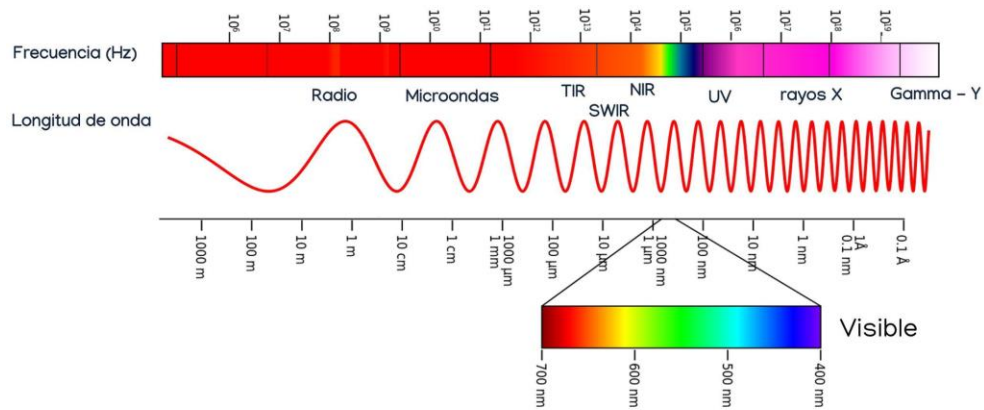
### **3.3. Métodos ópticos para el diagnóstico nutricional en las plantas**

Los métodos de laboratorio destructivos descritos son lentos y con un alto coste, que muchas veces el agricultor no está dispuesto a pagar. Además, la representatividad del diagnóstico depende, en gran medida, de un diseño de muestreo adecuado, ya que el número de muestras que se realizan es reducido por la complejidad y al coste de los análisis (Malmir et al. 2020a). Como alternativa, se presentan los métodos de diagnóstico basados en las propiedades ópticas de las plantas. Dicho de otro modo, en la interacción de las radiación electromagnética con los tejidos de la planta.

El espectro electromagnético está constituido por el conjunto de radiaciones electromagnéticas que se propagan a través del espacio en forma de ondas. Estas radiaciones se pueden representar en función de la longitud de esas ondas, que es una magnitud inversamente proporcional a la frecuencia y que define la distancia entre dos picos consecutivos de la onda (Fontal, 2005). El espectro, se organiza en diferentes regiones que cubren un intervalo continuo de longitudes de onda o frecuencias. En la figura 5, se muestran las diferentes regiones del espectro



electromagnético.



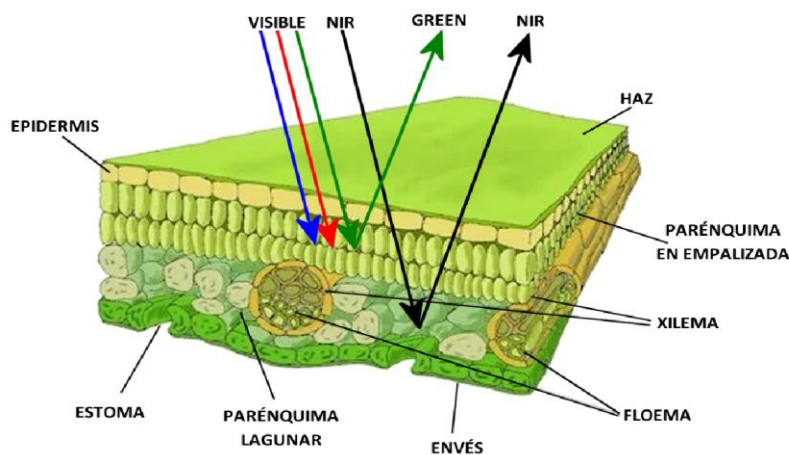
**Figura 5.** Espectro electromagnético (adaptada de Teledetección para Agricultura, <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/ifapa/servifapa/registro-servifapa/bdac6055-21a9-4dd7-8cba-06a3e9d67873>).

La región visible abarca el rango de 400 a 700 nm (Asner, 1998). Los pigmentos, absorben energía en esta región, por lo que las propiedades de absorción se pueden utilizar en la determinación de los pigmentos foliares (Li et al. 2019). Como se ha detallado, algunos nutrientes están fuertemente relacionados con la clorofila, por lo que las carencias o excesos nutricionales ocasionan síntomas visuales en las plantas. Los más frecuentes están relacionados con manchas o decoloraciones formando patrones característicos. Estas decoloraciones se producen por alteraciones en los pigmentos, como la clorofila. Por otro lado, la región NIR, que comprende desde 700 a 2500 nm, está relacionada con la estructura interna de la hoja y se caracteriza por tener una fuerte absorción de agua (Petisco et al. 2005). Una fertilización deficiente o excesiva de nutrientes relacionados con la estructura celular del tejido puede causar deformaciones.

Por ello, una alternativa más rápida y de menor coste es el uso de sensores ópticos que son capaces de determinar la concentración de algunos nutrientes a través de la medición de propiedades ópticas de las plantas (reflectancia, absorbancia y transmitancia) en los rangos visible y NIR (Ollinger, 2011). Los métodos ópticos podrían detectar estas carencias antes de que ocasionaran síntomas visibles en la planta, identificando los nutrientes afectados. Sin embargo, es importante tener en cuenta que muchos de estos síntomas parecen similares y es común que las plantas experimenten una combinación de deficiencias de varios nutrientes simultáneamente.

Los sensores utilizados para este fin, como las cámaras de color, multispectrales, hiperespectrales y térmicas, pueden medir la energía electromagnética emitida, reflejada o absorbida por las plantas a diferentes longitudes de onda. La reflectancia medida está influenciada por varios componentes, bioquímicos estructurales y foliares de las plantas, como el área foliar, el contenido de agua, la concentración de clorofila y nitrógeno, y otros pigmentos (Asner, 1998). Los pigmentos de las hojas (principalmente clorofila, caroteno y xantofila) son un factor esencial en la absorción de energía visible en la región de 400 a 700 nm. Las plantas sanas absorben la energía en longitudes de onda principalmente relacionadas con los picos de absorción de la clorofila (450 nm y 650 nm), mientras que el nivel de absorción en la región de 530 a 600 nm es menor (Arnon, 1971). Este hecho es el responsable de la percepción del color verde en las hojas (figura 6). A partir de 700 nm se observa una transición en la zona de absorción de clorofila con el aumento progresivo del valor del espectro hasta las bandas de 740-750 nm. Este fuerte aumento en la curva entre la región roja y la NIR se conoce como borde rojo.

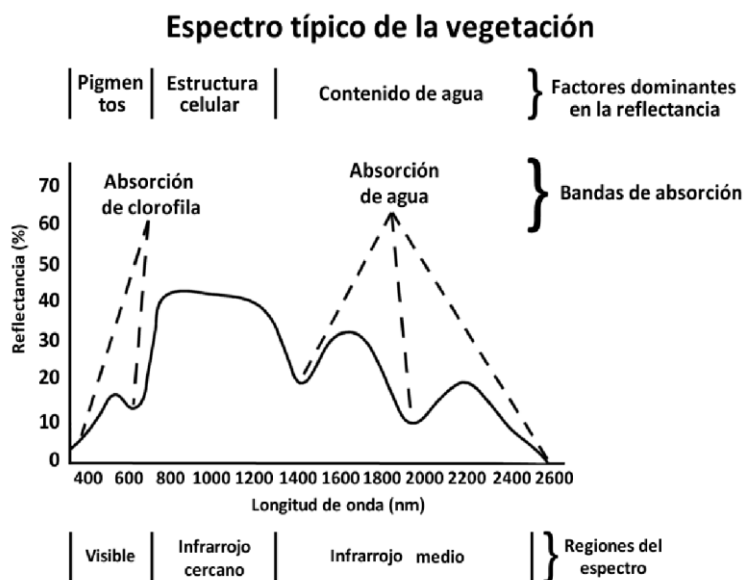
A menudo, las plantas sanas y aquellas con exceso o deficiencia de nutrientes, tienen diferentes firmas espectrales, lo que permite la detección de los efectos fisiológicos y bioquímicos de estas anomalías. La figura 7 muestra el espectro típico de una vegetación sana, junto con los picos de absorción más importantes. Las alteraciones causadas por desequilibrios nutricionales influyen en la absorción de la energía por los pigmentos, afectando a regiones del visible.



**Figura 6.** Estructura interna de la hoja.

Por otra parte, las deformaciones relacionadas con la estructura celular pueden afectar a la región del NIR. Además, la pendiente del espectro y la posición del borde

rojo (zona entre el visible y el NIR) se han correlacionado con las concentraciones de clorofila y, por lo tanto, la posición y la pendiente del borde rojo también cambian en las hojas dañadas porque las sanas continúan teniendo la fotosíntesis activa (Rock et al. 1986).



*Figura 7. Comportamiento espectral de la vegetación, adaptada de (Hoffer, 1978).*

Los sensores ópticos pueden proporcionar una alternativa eficaz para el análisis nutricional de las plantas, de forma no invasiva y no destructiva (Shi et al. 2019). Con el desarrollo y la mejora de las técnicas empleadas en los medidores de clorofila y el empleo de técnicas de espectroscopia Vis-NIR, se ha vuelto factible el uso de esta tecnología para determinar varios componentes bioquímicos de plantas de manera rápida (Luo, 2011; Stenberg et al. 2005). A continuación, se describen diferentes sensores para la medición o estimación de nutrientes.

### 3.3.1. Medidores de clorofila

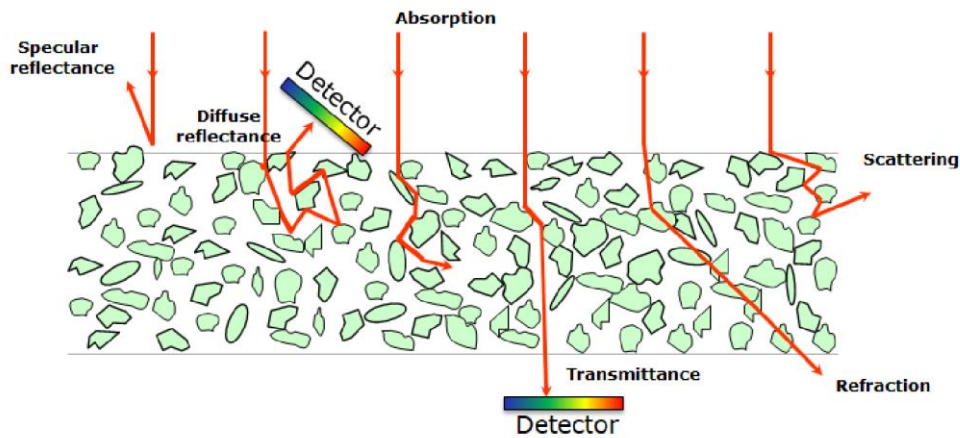
Los medidores de clorofila son dispositivos portátiles que miden la concentración de la clorofila en las hojas. La clorofila es un compuesto que está fuertemente relacionado con la concentración de N de la hoja (Schepers et al. 1996). Uno de los medidores más empleados es el Konica Minolta, modelo SPAD-502 (Konica Minolta Sensing, Inc. Sakai, Osaka, Japón) que mide en dos longitudes de onda de radiación a través de las hojas de las plantas: el rojo a aproximadamente 650 nm, e

infrarrojo cercano (NIR) a aproximadamente 940 nm (Parry et al. 2014). Entre sus ventajas se destaca su sencilla movilidad a campo y precio accesible. Estudios previos han utilizado estos medidores para diagnosticar la concentración de N en cultivos como tomate fresco (Padilla et al. 2015), melón (Padilla et al. 2014), pimiento dulce (Parry et al. 2014), patata (Gianquinto et al. 2004; Olivier et al. 2006), maíz (Dong et al. 2019), uvas (Callejas et al. 2013; Castañeda et al. 2018), y cítricos (Jifon et al. 2005).

### **3.3.2. Espectroscopia Vis-NIR**

El principio de la espectroscopia para analizar vegetación se basa en la detección de los cambios bioquímicos, que resultan de la actividad fotosintética, la estructura celular y la estabilidad de las variaciones de enlaces químicos, y su influencia en el comportamiento espectral las hojas (Ling et al. 2019). La espectroscopía engloba un conjunto de herramientas de análisis que se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Esta radiación es emitida, absorbida o reflejada por átomos o moléculas (Walsh et al. 2020). La proporción de radiación incidente reflejada por una muestra para distintas longitudes de onda se denomina reflectancia, y puede ser difusa o especular. Por otra parte, la cantidad de radiación que absorbe una muestra (figura 8) se denomina absorbancia y la fracción de radiación incidente que atraviesa una muestra para determinadas longitudes de onda se denomina transmitancia (Díaz et al. 2010).

La espectroscopia Vis-NIR tiene numerosas ventajas frente a los análisis convencionales: es rápida, eficaz, no destructiva, de bajo coste, requiere tiempo mínimo de análisis por muestra, es sencilla y es un método no dañino al medio ambiente e incluso es un procedimiento sustituto a los métodos clásicos de laboratorio (Menesatti et al. 2010).



*Figura 8. Modos de adquisición de espectros. Adaptada de (Shenk, 1992).*

A la hora de obtener el espectro de las muestras, los equipos se deben calibrar para evitar la influencia del espectro de emisión de la luz empleada o de la propia sensibilidad del equipo empleado. Esta calibración se realiza corrigiendo la reflectancia de la muestra frente a patrones de reflectancia conocida. Por otra parte, los espectros se analizan mediante técnicas estadísticas multivariantes, normalmente basadas en quimiometría, especialmente eficaces para el análisis de señales espectrales (Cortés et al. 2017).

Los espectrómetros empleados para obtener los espectros son dispositivos ópticos que miden la intensidad de la luz en las diferentes longitudes de onda del rango espectral de trabajo del equipo. Un espectrómetro típico consta de: a) Fuentes de luz, comúnmente de halógeno de tungsteno, deuterio, arcos de xenón, LED, argón de mercurio, zinc o láser, b) rendija de entrada de la luz, desde 5  $\mu\text{m}$  hasta 800  $\mu\text{m}$  con una altura de 1 a 2 mm c) espejos, planos o esféricos, para dispersar la luz en sus longitudes de onda, d) detectores para recoger la intensidad de las diferentes longitudes de onda, e) interfaz y software (Siesler, 2008). La ventaja de los espectrómetros ópticos es que son sencillos de utilizar y fácilmente portables. Entre sus limitaciones se pueden mencionar que sólo se puede tomar un punto espectral de la muestra.

### **3.3.3. Sistema Hiperespectral (HSI)**

Los sistemas de imagen hiperespectral capturan un gran número de imágenes monocromáticas consecutivas de una misma escena a diferentes longitudes de onda, permitiendo, el análisis simultáneo de la información espacial y espectral. La firma espectral que caracteriza un píxel se puede utilizar para obtener información sobre

compuestos internos que pueden estar relacionados con la bioquímica de la muestra, pero, a la vez, la información espacial permite diferencias en zonas de muestras heterogéneas. Al estar formadas por una gran colección de imágenes, constituyen una fuente de información mucho más extensa que la proporcionada por una única imagen monocromática o una imagen RGB convencional. El número de imágenes depende de la resolución espectral del sistema utilizado y se combinan formando un cubo tridimensional en el que dos dimensiones son espaciales (píxeles) y la tercera es el espectro de cada píxel (Lorente et al. 2012).

Los elementos esenciales de un sistema de imagen hiperespectral incluyen fuentes de luz, dispositivos de selección de longitud de onda y detectores ópticos de área (Lorente et al. 2012). Dependiendo de la tecnología utilizada, la selección de las longitudes de onda se puede realizar dispersando la radiación incidente en su longitud de onda individual o bloqueando la radiación de tal manera que solo la longitud de onda deseada llegue al detector. Los más utilizados suelen ser los espectrógrafos de imágenes, los filtros sintonizables de cristal líquido (LCTF) y, en menor medida, los filtros sintonizables acústico-ópticos (AOTF). Algunos dispositivos para adquirir imágenes hiperespectrales incluso comparten tecnología con la espectrometría, aunque no deben confundirse ambas técnicas. Las imágenes hiperespectrales proporcionan información sobre la distribución espectral y espacial de la muestra, mientras que la espectroscopia proporciona información espectral capturada en un punto particular de la muestra. Esto no indica que una tecnología sea mejor que otra, ya que esto depende de la heterogeneidad de la muestra y la finalidad del estudio.

#### **4. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS**

La elevada cantidad de información contenida en los espectros e imágenes hiperespectrales requiere de una serie de estadísticas multivariantes para desarrollar ecuaciones de calibración que relacionen los datos espectrales con los parámetros de referencia medidos a través de un método estándar de laboratorio (Abdi, 2010). En la actualidad, las técnicas más empleadas para el análisis de datos espectrales se han agrupado bajo una disciplina denominada quimiometría (Walsh et al. 2020), que aplica conocimientos matemáticos, especialmente estadísticos, a procesos químicos para extraer de los datos experimentales la mayor cantidad posible de información y extender el conocimiento del sistema químico. En esta tesis se han utilizado técnicas de quimiometría para preprocesar y analizar los datos, así como para encontrar las longitudes de onda más importantes asociadas a cada problema estudiado. Por lo

tanto, a continuación se repasan sucintamente las técnicas y procesos más usados en la literatura científica para analizar la información espectral.

#### **4.1. Pretratamientos**

Para extraer información útil, a partir de espectros, es muy importante que los datos sean correctos, libres de interferencias debidas a los equipos de medida, a las condiciones de adquisición o a la presencia de datos anómalos. Estas interferencias negativas se deben a ruido electromagnético del equipo, la deficiencia o dispersión de la luz, las diferencias en la geometría de las muestras, etc. Cuando ocurren, es necesario realizar pretratamientos con el objetivo de corregir las anomalías. Estos pretratamientos consisten en transformaciones matemáticas que se aplican antes de cualquier otro tipo de análisis y tratan de anular o reducir fuentes de variabilidad en la señal. Dependiendo de la anomalía a corregir, se deben emplear diferentes técnicas. Los pretratamientos tradicionalmente utilizados son: detección de valores atípicos, centrado medio y escalado, suavizado, corrección de línea base, derivación (D1, D2), corrección multiplicativa del efecto de dispersión (MSC) y variable normal standard (SNV) (Naes, 2002).

##### **4.1.1. Detección y eliminación de valores atípicos**

Por definición, un valor atípico (outlier) es un valor extremadamente alto o bajo en comparación con el resto de los valores de la muestra. Los valores atípicos son fácilmente reconocibles por un crecimiento en la distancia y en el residuo espectral y causan importantes problemas en la modelización, ya que afectan a la estimación de los parámetros del modelo y, en consecuencia, alteran los tamaños de los intervalos de predicción, que están directamente relacionados con la varianza (Everitt, 1991).

##### **4.1.2. Centrado y autoescalado**

El centrado y autoescalado de los espectros asegura que el modelo resultante sea interpretado en términos de variación alrededor de la media, de forma que todas las variables tengan la misma influencia en el cálculo (Nicolai et al. 2007). El centrado resta el valor medio ( $\underline{X}_k$ ) de cada variable  $k$  (longitud de onda) del conjunto de calibración al valor ( $X_{ik}$ ) de cada observación  $i$ . De esta forma, todas las observaciones se convierten en relativas al promedio mediante la ecuación (1).

$$X_{ik}^c = X_{ik} - \underline{X}_k \quad (1)$$

El autoescalado divide los valores centrados por la desviación estándar, de forma que la varianza será igual a 1 (ecuación 2).

$$X_{ik}^a = \frac{X_{ik} - \bar{X}_k}{\sigma} \quad (2)$$

Este método, se suele utilizar porque facilita detectar las diferencias entre las observaciones en términos de la concentración y la respuesta espectral, lo cual proporciona una mayor exactitud en las predicciones (Moros et al. 2010).

#### **4.1.3. Suavizado**

El suavizado es necesario aplicarlo cuando la relación señal/ruido es relativamente pequeña y aparece un espectro irregular, especialmente cuando el promediado de espectros no es suficiente para corregir este efecto (Agelet et al. 2010). En estos casos existen algunos algoritmos matemáticos que, aplicados al espectro, reducen el ruido suavizando la señal (Cozzolino et al. 2011). El método de suavizado más habitual es el basado en filtros de Savitzky-Golay (SG) (Savitzky et al. 1964). El método clásico de SG es una función de suavizado que ajusta un polinomio de orden a cada punto de la señal y a sus  $k$  vecinos.

#### **4.1.4. Corrección de línea base**

La corrección de la línea base corrige determinadas tendencias que aportan ruido a la señal. Según el efecto que se desea conseguir, hay distintos tipos de corrección de la línea base. Uno de los más utilizados es el llamado ajuste de línea base *DeTrending* (DT), que ajusta el espectro original a una función cuadrática, sustrayéndola posteriormente del espectro original, eliminando la característica curvatura ascendente a medida que aumenta la longitud de onda (Rinnan et al. 2009).

#### **4.1.5. Derivadas**

Las derivadas espectrales sirven para eliminar la deriva constante de la línea de base y resolver el solapamiento de picos en los espectros (Brown, 2000). La 1D y 2D mantienen la suavidad de los datos espectrales que desvían la señal de los datos. Por tanto, las ventajas de utilizar métodos de derivadas son su capacidad para separar dos o más componentes en los espectros y eliminar las interferencias de los elementos de las bandas anchas (Brown, 2000). A una mayor relación señal/ruido podría proporcionar una mejor calidad de la señal en el análisis de datos, ya que indica un mayor nivel de señal en comparación con el nivel de ruido.



#### 4.1.6. Normalización

La normalización es una familia de transformaciones en la cual se obtienen todos los datos aproximadamente en la misma escala. Estos pretratamientos eliminan compensaciones de la línea base y variaciones en la intensidad (Teixeira Dos Santos et al. 2013). Las transformaciones más utilizadas son: corrección multiplicativa de la dispersión (MSC) y variante normal estándar (SNV). MSC elimina cualquier efecto indeseable de dispersión antes de modelar los datos. Su principal inconveniente es que, si el conjunto de espectros originales es modificado, el espectro de referencia cambia, por lo que los parámetros de la recta obtenida se deben recalcular de nuevo (Rinnan et al. 2009). Por otro lado, SNV se utiliza con frecuencia para corregir los datos espectrales, como también corregir los efectos lineales y aditivos de los espectros medidos mediante el cálculo de la media y la desviación estándar (Barnes et al. 1989). A diferencia de MSC, SNV se aplica individualmente a cada espectro, sin depender de ningún espectro de referencia (Dhanoa et al. 1994).

#### 4.1.7. Reducción de la dimensionalidad

La reducción de dimensionalidad tiene como objetivo eliminar características redundantes, así como datos irrelevantes, para mejorar la precisión de los modelos y reducir el tiempo de entrenamiento (Velliangiri et al. 2019). Las técnicas utilizadas se pueden dividir en métodos de selección y métodos de extracción de características (Khalid et al. 2014). La elección de la técnica más adecuada depende de las características específicas de los datos, el objetivo del análisis y los recursos computacionales disponibles. Los métodos de selección tienen como objetivo elegir un subconjunto de las características más influyentes del conjunto de variables originales, mientras que los métodos de extracción transforman los datos originales en un espacio de menor dimensionalidad, que mantiene la información más importante. En este trabajo, uno de los objetivos principales es obtener subconjuntos de longitudes de onda relacionadas con la concentración de nutrientes, por lo que se ha utilizado la selección de características. Entre los métodos más utilizados de selección de características en datos espectrales, los siguientes:

**Información mutua (IM):** método que mide cuánto nos dice una variable aleatoria sobre otra. Es una cantidad adimensional, generalmente con unidades de bits, y se puede considerar como un indicador para medir la correlación entre dos variables aleatorias. Una IM elevada indica una mayor correlación mientras que el caso contrario, significa que las variables son independientes. De esta forma, es posible seleccionar aquellas variables con mayor correlación y menor redundancia con la variable bajo estudio (Cover, 1991).

**Variable de importancia en la proyección (VIP):** uno de los métodos de selección de variables más populares en la actualidad es el método de proyección de importancia de las variables en PLS como medida de la influencia de cada una en la proyección. Las puntuaciones VIP (VIP scores) son útiles para conocer las variables predictivas del espacio X que mejor explican la varianza, seleccionando aquellas variables que más contribuyen a la variación subyacente en las variables X (Chong et al. 2005; Mehmood et al. 2012).

**Vector de coeficiente ponderado (BW):** cada longitud de onda tiene un peso, en donde los datos espectrales se ajustan a una misma escala, en el cual el BW indica la importancia relativa de las bandas en relación con el peso y el de mayor peso, indica mayor influencia relativa para esa muestra (Mehmood et al. 2012).

**Algoritmo de proyecciones sucesivas (SPA):** es un método de selección de variables que emplea operaciones de proyección simples sobre longitudes de onda para seleccionar subconjuntos de variables con mínima redundancia y colinealidad (Araújo et al. 2001). SPA selecciona aleatoriamente una variable inicial y la proyecta sobre las variables restantes.

## 4.2. Métodos de exploración

Los métodos de exploración de datos son generalmente aplicados en primer lugar para tener una imagen visual global de la distribución de las muestras, observar agrupamientos, relacionar aquellas de similar procedencia y ayudar en la selección de los métodos apropiados para su tratamiento. Entre los más utilizados, destacan el análisis de componentes principales (PCA), el análisis jerárquico de grupos (HCA) y el análisis de componentes independientes (ICA).

**Análisis de componentes principales (PCA):** es un método para el análisis exploratorio de datos que considera todas las variables y ordena la estructura total de datos (Varmuza, 2009). Es un algoritmo de “machine learning” no supervisado que reduce el conjunto original de variables que forman un conjunto de datos en un menor número de variables relacionadas entre sí e identificando sus características fundamentales conocidas como componentes principales. Estos componentes principales son combinaciones lineales de las variables originales que retienen la información clave y maximizan la explicación de la varianza en todas las variables, lo que lo convierte en un método muy usado de reducción de la dimensionalidad (Jolliffe & Cadima, 2016; Zhang et al. 2018).

**Análisis jerárquico de grupos (HCA):** identifica grupos relativamente homogéneos de casos (o de variables) mediante un algoritmo que comienza con cada

variable en un clúster diferente y combina los clústeres hasta que sólo queda uno. El objetivo es obtener grupos de objetos de forma que, por un lado, los objetos pertenecientes a un mismo grupo sean muy semejantes entre sí, y por el otro, los objetos pertenecientes a grupos diferentes tengan un comportamiento distinto entre sí con respecto a las variables analizadas (Beebe, 1998).

**Análisis de componentes independientes (ICA):** es una generalización del PCA. En ambos casos se realiza una transformación lineal de los datos originales, aunque la diferencia básica es que ICA no requiere que las variables originales tengan una distribución gaussiana (si la curva representa una distribución de probabilidad, se debe cumplir que el área entre ella y el eje de las  $x$  debe ser 1) (Hyvarinen, 2001). El modelo ICA representa un número de variables aleatorias observadas como una combinación lineal de  $n$  variables ocultas, y asume la independencia estadística de estas últimas, denominadas componentes independientes (CI). Así pues, los algoritmos ICA hallarán las CI, así como los coeficientes de su combinación lineal, partiendo únicamente de las observaciones disponibles. ICA puede utilizarse para investigar la estructura de los datos cuando no se dispone de hipótesis adecuadas, o éstas se consideran demasiado restringidas.

### 4.3. Métodos de regresión

La regresión es un enfoque estadístico que busca establecer la intensidad y la naturaleza de la relación entre una variable dependiente (comúnmente representada como  $Y$ ) y un conjunto de otras variables (llamadas variables independientes, normalmente presentadas como  $X$ ). Entre los más utilizados destacan la regresión lineal múltiple (MLR), la regresión por componentes principales (PCR) y la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-R) que es el método que se ha utilizado principalmente en esta tesis.

**Regresión lineal múltiple (MLR):** la regresión lineal múltiple ajusta modelos lineales entre las variables independiente (explicativas) y la variable dependiente (respuesta). El modelo crea una relación en forma de línea recta (lineal) que se aproxima mejor a todos los puntos de datos individuales (Torkashvand et al. 2017). En este modelo más de una variable tiene influencia o está correlacionada con el valor de una tercera variable. La función se define a continuación:

$$y_j = b_0 + b_1 x_{1j} + b_2 x_{2j} + \dots + u_j$$

donde  $y$  es la variable dependiente,  $x$  las variables independientes,  $u$  los residuos y  $b$  representa los coeficientes estimados del efecto marginal entre cada  $x$  e  $y$ .

**Regresión por componentes principales (PCR):** es un método que combina la regresión de mínimos cuadrados con el análisis de componentes principales. Es un método que, en lugar de utilizar todas las características originales para la regresión, sólo se utiliza un subconjunto de los componentes principales. A través del PCA, se puede construir la ecuación de regresión con un conjunto de componentes principales no correlacionados y se obtiene mediante la mejor ecuación según el máximo  $R^2$  y el mínimo error de estimación (RMSE) (Keithley et al. 2009; Liu et al. 2014).

**Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-R):** es una técnica que reduce los predictores a un conjunto más pequeño de componentes no correlacionados y realiza una regresión de mínimos cuadrados en estos componentes, en lugar de en los datos originales (Boulesteix & Strimmer, 2006). PLS-R es especialmente útil cuando los predictores son altamente colineales, o cuando se tiene más predictores que observaciones. Una aplicación común es modelar la relación entre mediciones espectrales, que incluyen muchas variables espectrales que a menudo están correlacionadas entre sí, y la composición química u otras propiedades fisicoquímicas.

## **4.4. Métodos de clasificación**

### **4.4.1. Supervisados**

Los modelos de aprendizaje supervisado abarcan una amplia gama de algoritmos y técnicas que se utilizan para resolver problemas de clasificación y regresión (Alpaydin, 2020). El aprendizaje supervisado abarca aquellas técnicas que permiten deducir una función a partir de datos previamente conocidos. La salida de la función puede ser un valor numérico (regresión) o una etiqueta de clase (clasificación), obtenida mediante a partir del entrenamiento de un modelo partiendo de los datos de partida y el conocimiento que se tiene sobre ellos. Estos modelos varían en complejidad, interpretabilidad y rendimiento, y es esencial compararlos para seleccionar el modelo más adecuado para un problema específico. Los métodos de clasificación supervisados más utilizados son: análisis discriminante lineal, software de análisis de modelado independiente de analogías de clases (SIMCA), análisis discriminantes de mínimo de cuadrados parciales, máquinas de vectores de soporte, vecino más cercano, random forest (RF) y redes neuronales (ANN).

**Análisis Discriminante Lineal (LDA):** es una técnica de aprendizaje para clasificar datos. Como su nombre lo indica, el análisis discriminante ayuda a identificar las características que discriminan a dos o más grupos y crea funciones de probabilidad

capaces de distinguir con la mayor precisión posible a los miembros de un grupo u otro (Henry et al. 2023).

**Modelado independiente de analogías de clases (SIMCA):** es un método de reconocimiento de modelos cuyo objetivo es encontrar la semejanza entre las muestras que pertenecen a un mismo conjunto y emplea las puntuaciones determinadas mediante PCA para el cálculo de las distancias entre los objetos (Otto, 2016).

**Máquinas de vectores de soporte (SVM):** es un clasificador que tiene el objetivo de encontrar un hiperplano lineal que separe dos poblaciones de datos, con el margen más amplio entre ellas. El margen del límite de decisión debe ser el máximo y se calcula como la distancia entre estos dos hiperplanos (Cervantes et al. 2015).

**Clasificación mediante el vecino más cercano ( $k$ -NN):** es un algoritmo de clasificación que se basa en la asignación de una medida de distancia (la euclídea), entre la muestra a clasificar y sus  $k$  muestras más cercanas (vecinos). La muestra se clasifica atendiendo a la clase de la mayoría de esos vecinos (Moujahid, 2019).

**Random Forest (RF):** crea muchos árboles de decisión sobre un conjunto de datos de entrenamiento (Breiman, 2001). La finalidad es obtener un modelo más fuerte o robusto en comparación con los resultados de cada árbol obtenido por separado (Espinosa, 2020). Entre sus características se puede mencionar que es un modelo simple de entrenar con un desempeño muy eficiente y que maneja cientos de predictores, logrando determinar los predictores más importantes, lo que permite, a su vez, reducir la dimensionalidad (Cánovas-García et al. 2017).

**Las redes neuronales artificiales (ANN):** consisten en múltiples capas de neuronas, que contienen una capa de entrada, una o varias capas ocultas y una capa de salida, conectadas entre sí, para transmitir señales (Haykin, 2009). Las ANN presentan características propias del cerebro humano, en donde se procesa la información con la facultad de aprender y crear nuevas situaciones en procesos de entrenamiento (Olabe, 1998; Rojas, 1996). Las ANN tienen una gran capacidad para aprender características de alto nivel y adaptarse a problemas no lineales, pero pueden ser difíciles de entrenar y de interpretar debido a su estructura de "caja negra". Además, suelen requerir una gran cantidad de datos y recursos computacionales para su entrenamiento, lo que puede limitar su aplicabilidad en algunos escenarios (Goodfellow et al. 2016).

#### 4.4.2. No supervisados

El aprendizaje no supervisado se caracteriza por no requerir un entrenamiento, ni un conocimiento previo de los datos. Es decir, realiza su trabajo directamente con los datos a su disposición. Estos algoritmos operan con datos no etiquetados y su objetivo es la exploración, intentando encontrar patrones existentes pero desconocidos en los datos. A continuación, se describen algunos de los algoritmos no supervisados como el  $k$ -medias y el de agrupamientos jerárquicos.

**Algoritmo  $k$ -medias:** separa los datos en distintos clústeres. El agrupamiento se realiza minimizando la suma de distancias entre cada objeto y el centroide de su grupo o clúster, siendo  $k$  el número de clústeres deseados. Los datos se agrupan de tal manera que los puntos en el mismo clúster sean más similares entre sí, acercándose más al centroide de ese grupo, que a los centroides de los otros grupos (Kodinariya, 2013). El objetivo de este método de agrupamiento es agrupar observaciones similares para descubrir patrones que a simple vista se desconocen.

**Agrupamientos jerárquicos:** es una técnica que permite construir estructuras de árbol a partir de similitudes de datos, basándose en la distancia entre cada uno y buscando que los datos dentro de un clúster sean los más similares entre sí. Para la realización de esta jerarquía de grupos se utiliza un dendrograma (Berzal, 2017; Villardón, 2007).

#### 4.4.3. Métricas más utilizadas para evaluar la robustez de los modelos

Las métricas relacionadas con el análisis de regresión que se emplean con más frecuencia son el error absoluto medio (MAE), el error cuadrático medio (MSE), la raíz del error cuadrático medio (RMSE), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), diferencia de porcentaje relativa (RPD) (Hyndman et al. 2006). El MAE es la media de los valores absolutos de los errores entre las predicciones y los valores observados. Es una medida fácil de interpretar y menos sensible a los valores atípicos que otras métricas. El MSE es la media de los errores al cuadrado entre las predicciones y los valores observados. Es más sensible a los valores atípicos que el MAE. El RMSE es la raíz cuadrada del MSE. Es una métrica que se encuentra en la misma escala que los datos originales y por lo tanto es útil para comparar el rendimiento de diferentes modelos.

El coeficiente de determinación, también conocido como  $R^2$ , es una medida que indica la proporción de la varianza en la variable dependiente que es predecible a partir de las variables independientes.  $R^2$  varía entre 0 y 1, donde un valor cercano a 1 indica que el modelo explica una gran proporción de la variabilidad en los datos,

mientras que un valor cercano a 0 sugiere que el modelo no explica adecuadamente la variabilidad (Nagelkerke, 1991). El RPD (Desviación residual predictiva), es otra medida del rendimiento que se define como la relación entre la desviación estándar de la variable respuesta y el RMSEP. Valores de RPD por debajo de 3 corresponden a ecuaciones poco confiables para propósitos de predicción y para valores de 3-5 la calidad de la ecuación es aceptable, valores superiores a 5 indican una muy buena ecuación para fines de predicción.

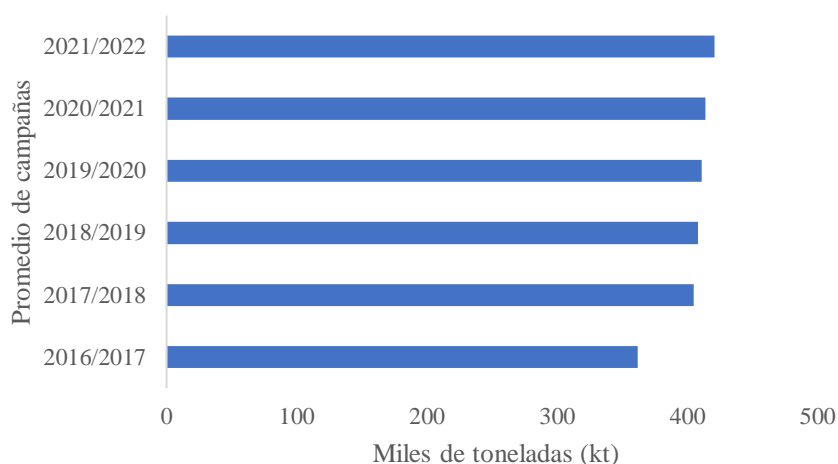
## **5. IMPORTANCIA ECONOMICA DE LOS CULTIVOS**

Este trabajo se ha realizado en dos cultivos de interés en la Comunidad Valenciana. En cítricos, cultivo emblemático del este peninsular, concretamente en mandarinas cv. 'clementina de Nules' y en caqui cv. 'Rojo Brillante', cultivo clave de la Ribera del Xúquer.

### **5.1. Cultivo de caqui (*Diospyros kaki*) cv. 'Rojo Brillante'**

El caqui se encuentra muy extendido en el área mediterránea donde las condiciones agroclimáticas le son muy favorables. A nivel global, Asia es el principal productor de caquis siendo China, Corea del Sur y Japón los principales productores con 2,10, 0,30 y 0,25 Mt, respectivamente, que suponen casi el 75 % de la producción mundial. España es actualmente el segundo productor mundial, con el 10,4 % del volumen total de caqui producido y el principal país europeo en superficie cultivada con 18,601 ha y en producción con 0,42 Mt (FAOSTAT, 2021). Cerca del 85 % de la superficie nacional dedicada a este cultivo se concentra en la Comunitat Valenciana, donde el cultivo está mayoritariamente basado en la variedad astringente 'Rojo Brillante' (figura 9).

La Ribera del Xúquer es el único lugar del mundo donde se cultiva el caqui, bajo la marca comercial "Persimon", propiedad de la Denominación de Origen Kaki Ribera del Xúquer. En 1996 se creó el Consejo Regulador de la Denominación de Origen (CRDO) "Kaki Ribera del Xúquer", cuya misión principal es garantizar la calidad de la producción. En la actualidad, la producción de Persimon en la Ribera del Xúquer representa el 96 % de la producción total en la Comunidad Valenciana y el 83 % de la producción española.



**Figura 9.** Producción de caqui fresco en España. Fuente adaptada de FAOSTAT (2021).

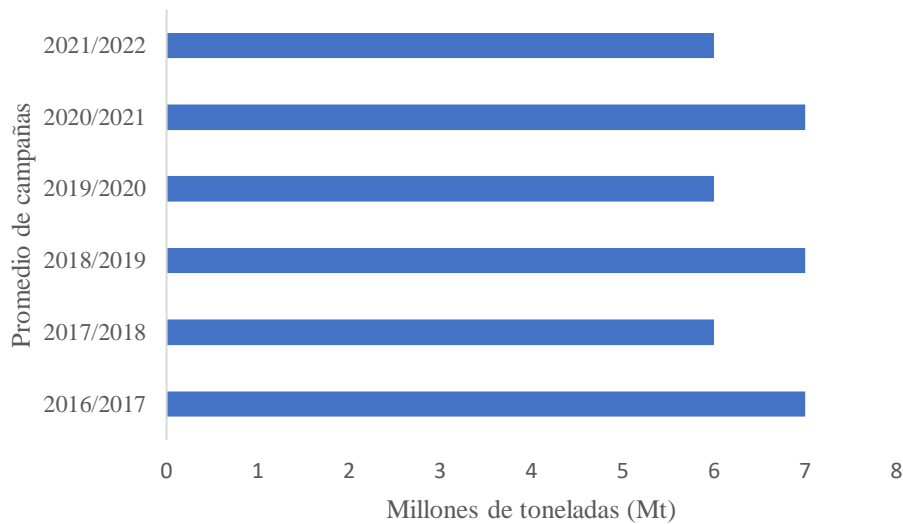
El valor de exportación de esta fruta ha aumentado continuamente en España, alcanzando 244,2 millones de euros, y un volumen de 0,19 Mt de producto fresco para la exportación en el año 2022 (MAPA, 2022). En los últimos 20 años se ha convertido en uno de los cultivos más relevantes a nivel comercial, debido fundamentalmente a la introducción de métodos de desastringencia desarrollados en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), que permitieron su comercialización como fruto no astringente con elevada firmeza. Sin embargo, las últimas campañas de caqui se han visto afectadas por las sucesivas adversidades climáticas en primavera, su sistema de fertilización y los ataques de plagas y enfermedades. Por lo cual, es recomendable establecer un sistema racional de fertilización, que logre maximizar sus rendimientos haciendo un buen uso de prácticas agrícolas.

## 5.2. Cítricos: mandarinas cv. 'clementina de Nules '

La producción mundial de cítricos se cifra en 152 Mt (MAPA, 2023). España, con una superficie de cultivo de cítricos de más de 300 mil ha, en 2022 y una producción media de 6,85 Mt en las campañas 2016 a 2020 (figura 10), se configura como el primer país productor de la UE con el 60 % y el sexto del mundo con el 5 % de la producción. En cuanto a la exportación cítrica, España es el principal exportador mundial de cítricos frescos, representando el 25 % del total mundial. Casi el 60 % de la producción cítrica española se destina al mercado exterior, siendo del 65 % en el caso de los pequeños cítricos y superando al 80 % en el pomelo (MAPA, 2022).



La Comunidad Valenciana es la principal región citrícola a nivel nacional con una superficie dedicada a este cultivo de 154,157 ha, que suponen cerca del 60 % del total nacional, según la campaña 2022/2023. En pequeños cítricos, la mandarina cv. 'clementina de Nules ', es la variedad con una mayor producción con 2,09 Mt en la campaña 2022-2023 (MAPA, 2023).



**Figura 10.** Producción de cítricos en España. Fuente adaptada de MAPA (2022).



## **II. OBJETIVOS**



## **2.1. Objetivo general**

Desarrollo de métodos y modelos que permitan la estimación de la concentración foliar de nutrientes para el diagnóstico nutricional de plantaciones de cítricos cv. 'clementina de Nules' y caqui cv. 'Rojo Brillante' mediante mediciones ópticas no destructivas en diferentes estados fenológicos del cultivo.

## **2.2. Objetivos Específicos**

- Desarrollar modelos predictivos utilizando técnicas de quimiometría para estimar el estado nutricional en cultivos de cítricos y caquis a partir de datos espectrales.
- Estudiar el potencial de las imágenes hiperespectrales (500-980 nm) para determinar la concentración foliar de macro y micronutrientes en hojas de cítricos y caqui.
- Estimar la concentración de nutrientes en cítricos y caquis mediante un espectrómetro (430-1040 nm), como herramienta de diagnóstico rápido para el establecimiento de programas racionales de fertilización.
- Estudiar la importancia de las imágenes hiperespectrales para la discriminación de hojas de diferentes ciclos vegetativos.
- Predecir las bandas de mayor importancia para los nutrientes, utilizando métodos de reducción de variables.



### **III. RESULTADOS**





# CAPÍTULO 1

## **Estimation of macro and micronutrients in persimmon (*Diospyros kaki* L.) cv. 'Rojo Brillante' leaves through Vis-NIR reflectance spectroscopy**

Maylin Acosta<sup>1</sup>, Fernando Visconti<sup>1,2</sup>, Ana Quiñones<sup>1</sup>, José Blasco<sup>3</sup>, José Miguel de Paz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro para el Desarrollo de la Agricultura Sostenible, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315, km 10.7, 46113 Moncada, Valencia, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Ecología y Cambio Global, Centro de Investigaciones Sobre Desertificación-CIDE (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Valencia, Generalitat Valenciana), CV-315, km 10.7, 46113 Moncada, Valencia, Spain

<sup>3</sup> Centro de Agroingeniería, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315, km 10.7, 46113 Moncada, Valencia, Spain

*Agronomy* **2023**, *13*(4), 1105; <https://doi.org/10.3390/agronomy13041105>



**Abstract:** The nutritional diagnosis of crops is carried out through costly elemental analyses of different plant organs, particularly leaves, in the laboratory. However, visible and near-infrared (Vis-NIR) spectroscopy of unprocessed plant samples has a high potential as a faster, non-destructive, environmental-friendly alternative to elemental analyses. In this work, the potential of this technique to estimate the concentrations of macronutrients such as nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), and magnesium (Mg), and micronutrients such as iron (Fe), manganese (Mn) and boron (B), in persimmon (*Diospyros kaki* L.) cv. 'Rojo Brillante' leaves has been investigated. Throughout the crop cycle, variable rates of N and K were applied to obtain six nutritional status levels in persimmon trees in an experimental orchard. Then, leaves were systematically sampled throughout the cropping season from the different nutritional levels and spectral reflectance measurements were acquired in the 430-1040 nm wavelength range. The concentrations of nutrients were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) for P, K, Ca, Mg, Fe, Mn and B after microwave digestion, while the Kjeldahl method was used for N. Then, partial least squares regression (PLS-R) was used to model the concentrations of these nutrients from the reflectance measurements of the leaves. The model was calibrated using 75 % of the samples, while the remaining 25 % were left as the independent test set for external validation. The results of the test set indicated an acceptable validation for most of the nutrients, with determination coefficients ( $R^2$ ) of 0.74 for N and P, 0.54 for K, 0.77 for Ca, 0.60 for Mg, 0.39 for Fe, 0.69 for Mn and 0.83 for B. These findings support the potential use of Vis-NIR spectrometric techniques as an alternative to conventional laboratory methods for persimmon nutritional status diagnosis. However, more research is needed to know how the models developed one year perform in ensuing years.

**Keywords:** nutritional diagnosis; non-destructive; foliar analysis; macronutrients; micronutrients; Vis-NIR spectroscopy

## 1. Introduction

Persimmon (*Diospyros kaki* L.) cv. 'Rojo Brillante' is the most common variety cultivated in Spain, with 95% of the Spanish production. The Valencian Community cultivated around 429,000 tons of this fruit in 2021 under a Protected Designation of Origin (PDO) certified by the Regulatory Council of PDO 'Kaki Ribera del Xúquer'. Additionally, for this variety Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS) norms and standardized tables for Nutritional Optimal Ranges (NOR) have been established (Morales et al. 2022).

Accurately determining the nutritional status of plants in different phenological stages is necessary to achieve adequate fertilization and to tailor fertilizer applications to match their exact needs. A foliar analysis is the most suitable method for assessing nutrient status because it provides precise information about the amount of nutrients absorbed and assimilated by plants (Menino, 2012). Quantifying macro

and micronutrients in leaves is essential for any farmer because they are the primary organ of plant metabolism and the easiest to collect and analyse (Embleton & Reuther, 1973; Güsewell, 2004). Nitrogen (N) is the nutrient that most significantly affects the vegetative development of plants; it is a crucial element for the physiological processes of plants and is required in large amounts (Bondada & Oosterhuis, 2001). N deficiency leads to smaller leaves and noticeable yellowing. Phosphorus (P) is essential for some macromolecules such as nucleic acids, phospholipids and sugar phosphates used by plants to develop new roots, fruits, and flowers (George et al. 2005; Raghothama & Karthikeyan, 2005). Potassium (K) is the element that most influences production and is necessary for enzymatic reactions, maintaining osmotic potential, and water uptake during plant development (Dong et al. 2010). Calcium (Ca) is a secondary macronutrient that promotes the growth and development of roots, driving the absorption of nutrients and water present in the soil. Ca deficiency first appears on young leaves, showing a typical deformation and chlorosis. The primary role of magnesium (Mg) is as a constituent of chlorophyll, involved in the synthesis of carotenoids and xanthophylls. Mg deficiency is characterized by chlorosis on the leaf borders. Micronutrients, such as iron (Fe), manganese (Mn) and boron (B), are essential for plant growth and development as they participate in numerous enzymatic and metabolic processes, as well as in the synthesis of chlorophyll (Das & Avasthe, 2018).

The most appropriate method for determining the nutrient concentration in leaves is through ionic analysis, which provides important information about plant nutritional status and helps to identify nutrient disorders that can guide balanced fertilization programs (Alva et al. 2006; Intrigliolo & Canali, 1998; Obreza et al. 1992). However, reference methods such as inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), atomic absorption spectroscopy (AAS) and X-ray fluorescence spectroscopy (XRFS) require many leaf samples and expensive reagents, and they also have negative environmental impacts (Jones, 2012; Shenk et al. 1979). These characteristics often make it difficult to achieve optimal nutrition for deciduous plants, such as persimmon.

To overcome these drawbacks, visible and near-infrared (Vis-NIR) spectroscopy is a promising alternative for determining leaf nutrient concentration. Vis-NIR spectroscopy is commonly used as a remote, non-destructive method for rapid analysis of many attributes of fresh leaves. The visible region is where photosynthetic pigments, such as carotenoids, chlorophylls, and xanthophyll, strongly absorb energy. However, the reflection in NIR is dominated by the structural reflection of turgid plant cells of the mesophyll (Pandey et al. 2017).

In nutritional deficiency, the plant may be affected by the loss of vegetative, structural, photosynthetic, and enzymatic compounds essential for plant development (Da Fonseca et al. 2010). N is one of the elements associated with chlorophyll, which is why it interacts with electromagnetic radiation (Ge et al. 2017). Other elements, such as P, may not be directly detected when irradiated with Vis-NIR frequencies, but organic compounds and other complex plant components containing these elements can be detected (Zhang et al. 2013). Concerning Mg, this nutrient is part of the structure of the chlorophyll molecule, which presents a strong interaction with electromagnetic radiation (Ferwerda & Skidmore, 2007). The rest of the nutrients, such as K, Ca, Fe, Mn, Zn and Cu, do not present specific spectral absorption characteristics in the Vis-NIR region but can bind electrostatically or act as binders for larger compounds containing carbon (Pandey et al. 2017).

Previous studies have demonstrated the potential of Vis-NIR based technologies to estimate the concentration of several elements in the leaves of different crops. The best predictive model was obtained for potassium (K) in citrus ( $R^2 = 0.982$ ), and the analysed elements showed coefficients of determination ranging from  $R^2 = 0.883$  for magnesium (Mg) to  $R^2 = 0.481$  for phosphorus (P). The calibration curves for all nutrients in sugarcane showed high correlations ( $CV > 0.9$ ) and low standard deviations ( $< 0.15$ ) in all cases with an  $R^2 = 0.90$ .

Menesatti et al. (2012) used Vis-NIR spectroscopy (400-1000 nm) to evaluate the concentration of N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn, and Mn in citrus. To increase variability, they applied five different nitrogen input levels (0, 200, 400, 600 and 800 g N tree<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>) while all treatments received the same amount of P and K. The best predictive model for a single nutrient was achieved for K with an  $R^2$  of 0.982. When all chemical parameters were considered together, coefficients of determination ranged from  $R^2 = 0.883$  for Mg to  $R^2 = 0.481$  for P. Another study performed by Ordonez et al. (2013) used a functional linear regression and non-parametric methods to predict chemical characteristics such as moisture, dry mass, and concentrations of N, P, K, Ca, Fe and Mg in vine leaves from spectral reflectance measurements taken from 350-2500 nm. In sugarcane, Yarce and Rojas (2012) used NIR spectroscopy (NIRS) to study the concentrations of macro and micronutrients. They obtained high correlations ( $>0.9$ ) and low standard deviation ( $<0.15$ ) with an  $R^2$  of 0.90 for all nutrients. Regarding persimmon, Visconti and de Paz (2019) developed a regression model to estimate  $Cl^-$  from foliar reflectance, achieving the best results with an  $R^2$  of 0.78 and a root mean square error (RMSE) of 0.34% for  $Cl^-$  concentrations above 1.5 %, and finding that the most important wavelengths for  $Cl^-$  estimation were between 390-472 nm and 690-692 nm.

Due to the importance of the persimmon cv. 'Rojo Brillante' cropping in Spain is crucial to developing fast, environmentally friendly, non-destructive, and accurate enough nutritional status estimation tools. However, to our knowledge, only one study has been found related to estimating nutrient contents in persimmon leaves using Vis-NIR spectroscopy (Visconti & de Paz, 2019) but focused only on chloride (Cl<sup>-</sup>). Therefore, this work aimed to develop models able to estimate the most relevant macro and micronutrients by Vis-NIR spectroscopy in conjunction with PLS-R, which may be an alternative to the conventional laboratory foliar analyses for the assessment of persimmon nutritional status.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Design

The experiment was conducted on an experimental persimmon cv. 'Rojo Brillante' orchard located at the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia, Spain; 39°32'0" N, 0°23'W). To increase the range of foliar nutrient concentrations and build more accurate models, an experiment was conducted on persimmon trees using six treatments with varying N and K dosage rates (table 1). These treatments included four levels of N (0 %, 33 %, 50 %, and 100 %) and three levels of K (0 %, 50 %, and 100 %). The control doses (100%) were set considering the tree requirements, which were 106 kg·ha<sup>-1</sup> for N and 110 kg·ha<sup>-1</sup> for K. Each treatment was replicated twice with two trees per replicate, resulting in four trees per treatment and a total of 24 trees.

**Table 1.** Doses of nitrogen and potassium fertilization units applied in the treatments of the persimmon tree nutrient experiment.

Treatment	N (kg/ha)	K <sub>2</sub> O (Kg/ha)
T1 (N-0%)	0	110
T2 (N-33%)	35	110
T3 (N-50%)	53	110
T4 (K <sub>2</sub> O-0%)	106	0
T5 (K <sub>2</sub> O-50%)	106	55
Control (N and K <sub>2</sub> O-100%)	106	110

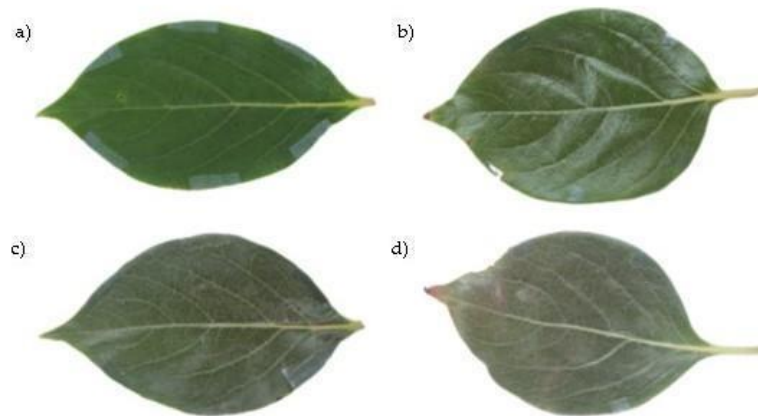
Leaf samples were taken monthly throughout a complete vegetative cycle in April (after flowering), June (fruit enlargement), July (70% fruit size), September (colour break), October and (fruit at harvest) November (lethargy) 2020. Six leaves from

each tree, which were the third or fourth one from the axilla of reproductive sproutings, were collected per treatment, resulting in 144 leaves per sampled month (864 total leaves sampled). Once collected, the leaves were washed with phosphate-free soap and rinsed with milliQ water to remove any remaining dust or contamination. Figure 1 shows four leaves of persimmon in different phenological stages. As they are deciduous leaves, they show slight colour changes.

## 2.2. Vis-NIR Spectral Measurements

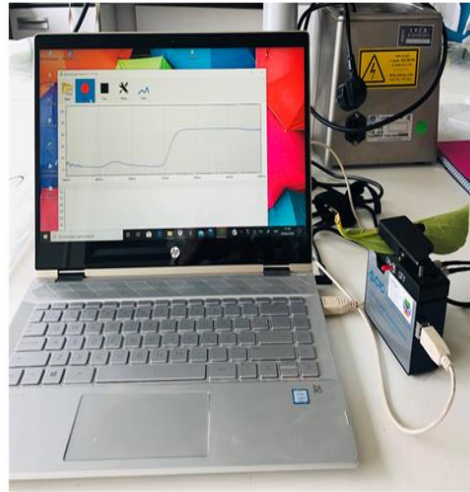
Leaf reflectance measurements were performed in the laboratory, employing a portable CI-710 Miniature Leaf Spectrometer (CID Bio-Science, Inc. Camas, WA, USA), which is shown in figure 2 (left panel).

Two spectral recordings were performed per leaf, one near the tip of the midrib and the other near the petiole, but always at an inter-nervation point. Spectral measurements were taken in the Vis-NIR range from 430 to 1040 nm in steps of 2.6 nm (232 values). Both spectra were averaged to obtain a single representative reflectance spectrum per leaf. Figure 2 shows the arrangement for the spectral recording, highlighting the points of measurement on the leaf.



**Figure 1.** Persimmon leaves collected in (a) April (after flowering), (b) July (70% fruit size), (c) October (fruit at harvest) and (d) November (lethargy).

The reflectance data were acquired using the software Spectra Snap! v1.1.3.150 (CID Bio-Science, Inc. Camas, WA, USA).



**Figure 2.** (Left): Vis-NIR spectral measurements on persimmon leaves, reflectance mode. (Right): measurement points

### 2.3. Chemical Analysis

After the spectral measurements, the leaves were dried in an air-forced oven at 65 °C for at least 72 h until constant weight. Then, they were crushed in a grinder (IKA M 20, IKA Labortechnik, and Staufen, Germany) and stored until analysis. Organic digestion was performed first, using microwave-assisted wet extraction in a microwave digestion system (ETHOS UP, Milestone Inc. Santa Clara, CA, USA). Subsequently, the macro (P, K, Ca, and Mg) and micronutrients (Fe, Mn and B) were measured using inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES 7000; Thermo Scientific, Cambridge, UK) (Cassap, 2016; McQuaker et al. 1979; Romanov, 2014; Steckenmesser et al. 2022). The Kjeldahl method (Kjeltec 8200, Foss Tecator AB, Sweden) was used to determine N contents (Bremner, 2016). Six leaves were necessary to obtain the minimum dry matter weight required for a single ionomic analysis.

### 2.4. Chemometric Analysis

Spectral data were obtained by measuring at two points on the leaf that were averaged to obtain a single value per leaf. However, the accuracy of these measurements can be adversely affected by noise (Bertrand & Dufour, 2006), which can be caused by factors such as electrical currents in the instrument, temperature and humidity changes during measurements, and variations due to the nature of the sample, like texture, size, or geometry. This noise causes unwanted variations in the



spectral data that must be corrected (Grassi et al. 2021). To address these issues, five data pretreatments were used: mean centre (MC) (Ulissi et al. 2011), Savitzky-Golay (SG) (Savitzky & Golay, 1964b), standard normal variate (SNV) (Barnes et al. 1989), first (1D) and second derivatives (2D) (Alchanatis et al. 2005; Li et al. 2019).

These pretreatments helped to reduce random noise and dispersion, eliminate constant baseline offsets, and highlight the variations among individual samples instead of using the absolute signal level. Once the corrections were made, a table was created for each macro and microelement, with rows representing the leaf samples and columns representing the wavelengths (predictor variables X). An additional column containing the reference values obtained through ionic analysis (response variable Y) was added to each table. This table was the input for building partial least squares regression (PLS-R) models.

PLS-R is a soft modelling method for constructing predictive models when there are many factors that are highly collinear (Tobias, 1995). Different models were created for each nutrient, and the samples were randomly split into a calibration set (75 %) for model building and an independent test set (25 %) for external validation. In PLS, one goal is to find a reduced number of latent variables (LV) that capture the maximum variation in the data (Wold et al. 2001). A method based on 20-fold cross-validation (CV) was used for internal validation (Cawley & Talbot, 2003; Cheng & Sun, 2017) and to determine the number of LV that balances model complexity and predictive performance.

The performance of the PLS-R models was evaluated using the root mean square error of prediction (RMSEP), which expresses the uncertainty that can be expected when predicting new samples, and the coefficient of determination ( $R^2$ ) that indicates the proportion of the variance of ionic values (variable Y) that is predicted or explained by linear regression and the spectral measurements (variables X) (Johnson et al. 2021). The lower the RMSEP and the higher the  $R^2$ , the better a model fits a dataset. The models were built using the statistical program Unscrambler version 9.7 (Camo Software, Oslo, Norway).

### **3. Results**

Descriptive statistics of each element identified from destructive ionic analysis through the sampling period are shown in table 2. The nutrient concentrations for the samples collected in July are also shown, as this month is considered one of the most suitable months for foliar sampling for persimmon in Spain (Albiach et al. 2012). All values are within the expected ranges.

**Table 2.** Descriptive statistics of the leaf macro and micronutrient concentration determined in the vegetative cycle (April-November 2020) by conventional analytical methods. Macronutrients (N, P, K, Ca, and Mg) are expressed in (%) of dry matter. Micronutrients (Fe, Zn and B) are expressed in (ppm).

	Cycle Min-Max	Average cycle	Standard deviation	Coefficient of variation	July Min- Max	Range	Std bias	Kurtosis
N	1.06-2.82	1.74	0.39	0.22	1.62-2.30	1.75	2.48	1.09
P	0.04-0.30	0.11	0.06	0.55	0.13-0.30	0.26	8.87	5.60
K	0.83-2.96	1.94	0.53	0.28	1.08-2.30	2.13	0.71	2.53
Ca	0.30-6.52	2.70	1.41	0.52	0.30-2.11	6.22	0.81	0.17
Mg	0.17-0.95	0.50	0.20	0.39	0.17-0.58	0.78	0.68	1.26
Fe	13.22-81.77	39.52	15.45	0.39	31.00-69.00	68.54	3.36	1.36
Mn	32.81-295.0	181.07	72.92	0.40	32.00-118.0	262.21	2.66	2.27
B	12.18-102.1	48.76	22.89	0.47	12.00-26.00	89.92	0.06	2.49

Table 3 shows the RMSEP, the  $R^2$  and the number of LV achieved for the macronutrients. Based on the independent test set (external validation), the best results for N were obtained using the MC + 1D with  $R^2 = 0.78$  and RMSEP = 0.18.

The better model for P was obtained with the raw data, achieving an  $R^2$  of 0.75 and RMSEP = 0.02. The best performance for K was achieved using MC + SG with  $R^2 = 0.52$  and RMSEP = 0.34. Ca achieved  $R^2 = 0.77$  and RMSEP = 0.60, while for Mg, the best model had an  $R^2 = 0.63$  and RMSEP = 0.11 in these two cases using MC + 1D.

**Table 3.** Comparative statistics on reflectance for the test sets of the model generated by PLS-R for prediction of macronutrients (N, P, K, Ca and Mg). Mean centre (MC), Savitzky-Golay (SG), Standard Normal Variate (SNV), First Derivative (1D) and Second Derivative (2D).

Pretreatment	LV	N		LV	P		LV	K		LV	Ca		LV	Mg	
		RMSEP	$R^2$		RMSEP	$R^2$		RMSEP	$R^2$		RMSEP	$R^2$		RMSEP	$R^2$
Raw data	12	0.19	0.71	12	0.02	0.75	10	0.34	0.52	12	0.70	0.72	11	0.11	0.60
MC	12	0.20	0.70	12	0.02	0.71	11	0.35	0.50	12	0.70	0.70	11	0.12	0.57
MC + SG	12	0.20	0.69	12	0.02	0.74	12	0.34	0.54	12	0.70	0.71	12	0.12	0.56
MC + SNV	12	0.19	0.72	12	0.02	0.74	12	0.35	0.51	12	0.70	0.72	12	0.11	0.63
MC + 1D	10	0.18	0.78	8	0.02	0.72	6	0.35	0.51	10	0.60	0.77	9	0.11	0.63
MC + 2D	9	0.20	0.69	8	0.02	0.72	6	0.35	0.50	12	0.70	0.72	9	0.12	0.53

The results for micronutrients are shown in table 4. In this case, the best model for Fe was based on using MC + 1D, reaching a low  $R^2 = 0.39$  and high RMSEP = 11.56. Concerning Mn, the best model was obtained with the raw data with a determination coefficient of  $R^2 = 0.69$  and RMSEP = 40.75. Finally, B achieved an  $R^2 = 0.83$  and RMSEP = 8.59 using MC + 1D.

**Table 4.** Comparative statistics and uncertainty indices ( $R^2$  and RMSEP) on reflectance for the test sets of the model generated by PLS-R for micronutrients (Fe, Mn and B). Mean center (MC), Savitzky- Golay (SG), Standard Normal Variate (SNV), First Derivative (1D) and Second Derivative (2D).

Pretreatment	Fe			Mn			B		
	LV	RMSEP	$R^2$	LV	RMSEP	$R^2$	LV	RMSEP	$R^2$
Raw data	12	11.75	0.37	12	40.75	0.69	12	9.51	0.79
MC	12	11.96	0.35	12	43.84	0.64	12	9.48	0.79
MC + SG	12	12.15	0.33	12	43.09	0.65	12	10.11	0.76
MC+ SNV	12	12.02	0.35	12	41.00	0.68	12	9.53	0.79
MC + 1D	8	11.56	0.39	9	41.11	0.68	10	8.59	0.83
MC + 2D	6	11.88	0.36	9	44.00	0.63	9	9.98	0.77

#### 4. Discussion

The  $R^2$  values for the macronutrients (N, P, K, Ca and Mg) prediction model ranged from 0.50 to 0.78, with N having the highest  $R^2$ . For the micronutrients (Fe, Mn, and B), the  $R^2$  values ranged from 0.39 to 0.83, with B having the highest  $R^2$ . Previous studies on predicting nutrients in persimmon leaves using spectroscopy have not been reported, but similar studies on other crops can be found. The strength of this study lies in two factors: the variability introduced in the models due to natural concentration variations during a vegetative cycle and the direct correlation between the spectra measured and the concentration of the crop leaves.

The PLS-R model developed to predict foliar N concentration using Vis-NIR spectroscopy achieved high accuracy with an  $R^2$  of 0.78 and low uncertainty indicated by an RMSEP of 0.18 in the external validation set. In previous studies for citrus leaves, better outcomes were obtained in trees fertilized with very different N doses, resulting in a similar  $R^2$  of 0.91 and RMSE of 1.06 using a spectral range of 380-1100 nm (Ferwerda & Skidmore, 2007; Osco et al. 2020). In tomato leaves, Ulissi et al. (2011) achieved an  $R^2$  of 0.88 with RMSEP = 0.40 for N. In olive, Rotbart et al. (2013) reported an  $R^2$  of 0.91 with RMSEP = 0.07 for N in a spectral

range from 1100 to 1700 nm. However, they obtained results similar to those presented in this work using the 450 to 1000 nm range, which suggests that NIR can be better than Vis-NIR in predicting N concentration. In pear leaves, Wang et al. (2017; 2020) obtained similar  $R^2$  values of 0.85 with RMSEP = 0.15 and 4.48, but in the range of 350-2500 nm, which requires more expensive and complex equipment than other studies. In eucalyptus, de Oliveira & Santana (2020) predicted the N leaf concentration with an  $R^2$  of 0.95, using leave-one-out cross-validation and leaves of different colours, from dark green to yellow.

In this work, P was well predicted with an  $R^2$  of 0.75 and an RMSEP of 0.02. Another study on citrus leaves achieved a similar  $R^2$  of 0.77 (Osco et al. 2020). In contrast, other work predicted P concentration for sugarcane with an  $R^2$  of 0.98 and an RMSEP of 0.008, using a broader spectral range of 780-2500 nm based on Fourier Transform NIRS (FT-NIRS) (Ordóñez et al. 2013), which required very complex equipment. The spectral data did not show a strong correlation with K concentration, with an  $R^2$  of 0.54 and an RMSEP of 0.34. Other studies have achieved higher  $R^2$  values in experiments designed to create extreme variability (Ferwerda & Skidmore, 2007). Furthermore, de Oliveira & Santana (2020) achieved an  $R^2$  of 0.76 with an RMSEP of 1.30 when examining eucalyptus leaves of varying colours and conditions, including healthy leaves and those showing symptoms of the damage. The PLS-R model developed to predict Ca showed good accuracy, as evidenced by an  $R^2$  value of 0.77 and a low RMSEP of 0.60. Comparable results have been found for citrus (Ferwerda & Skidmore, 2007). In citrus, Osco et al. (2020) determined four spectral ranges between 545 and 1020 nm and predicted Ca levels with an  $R^2$  value of 0.62 and an RMSEP of 9.40. Furthermore, de Oliveira & Santana (2020) used logarithmic transformation preprocessing and iterative predictor weighting PLS to predict Ca concentrations in eucalyptus with an  $R^2$  value of 0.81 but a higher RMSEP of 1.80. Ca concentration was predicted in grapevine with a higher  $R^2$  of 0.88 using NIRS with a spectral range of 908-1676 nm (Cuq et al. 2020). Mg was predicted with acceptable  $R^2 = 0.63$  and a low RMSEP = 0.11. Other researchers could predict the Mg of leaves with a better value in other crops, as in citrus (Ferwerda & Skidmore 2007; Osco et al. 2020) with  $R^2 = 0.83-0.94$  but a relatively high error of RMSEP=0.40-0.34 under laboratory conditions. Furthermore, in sugarcane, Yance and Rojas (2012) predicted Mg with an  $R^2 = 0.97$  and an RMSEP = 0.005, using multiple linear regression (MLR) and PLS-R in the 780-2500 nm spectral range. On the contrary, de Oliveira and Santana (2020) could not predict Mg in eucalyptus.

Concerning micronutrients, a relatively low correlation was found for Fe ( $R^2 = 0.39$ , RMSEP = 11.56). Other researchers could also not predict Fe successfully, as in

eucalyptus (de Oliveira & Santana, 2020) or citrus (Osco et al. 2020). The Mn concentration was predicted to a reasonably satisfactory extent ( $R^2 = 0.69$ , RMSEP = 40.75). Other studies predicted Mn with reasonable accuracy, as for Valencia oranges (Osco et al. 2020). However, as stated, this work has misconceptions, was based on few samples, and the sampling method was unreliable since the reflectance of the leaves indicated leaves with very different conditions, including reflectance that apparently corresponded to dead leaves. Additionally, for citrus, Pandey et al. (2017) reported higher results, but with a particular experimental design favouring extreme variability that was not found in nature. B could be predicted with a high level of estimation with an  $R^2 = 0.83$  and an RMSEP = 8.59, which surpasses other works as in eucalyptus (de Oliveira & Santana, 2020), in which the predicted values were less accurate ( $R^2 = 0.68$  and RMSEP = 22.66).

The positive results of this study indicate that Vis-NIR spectroscopy has excellent potential as a non-destructive diagnostic tool for estimating nutrients in persimmon leaves and improving fertilizer recommendations. The results confirmed that a portable computer-based system, such as the Vis-NIR spectrometer, can provide good predictions for the nutritional status of micro and macronutrients in persimmons. Due to its speed, affordability, and non-destructive nature, the technology can be used in precision agriculture applications requiring many samples. Despite other studies reporting the use of the NIRS range for predicting nutrients in plants, this research shows that using the Vis-NIR range (430 to 1040 nm) has the potential to develop satisfactory prediction models for nutrient prediction, especially for N, P, Ca, Mn, and B.

## **5. Conclusions**

The results showed that Vis-NIR reflectance spectroscopy is a feasible technique to estimate the concentrations of macro and micronutrients in persimmon leaves throughout a complete vegetative cycle. Results achieved using spectral reflectance in the range 430–1040 nm to predict the concentration of N, P, Ca, Mn, and B were satisfactory, with a coefficient of determination greater than 0.70. Lower scores were obtained for K, Mg and Fe. Moreover, the RMSEP in all cases was relatively low, which indicates a high degree of accuracy. Notwithstanding, more research is needed to know how these models, developed with data for only one year, perform in succeeding years.

## Funding

This work was co-funded by the Programa de Becas IFARHU-SENACYT, subprograma Becas excelencia-PNDR (Panamá, reference: 270-2021-020), the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA-GVA, SostE-SABio project: references 52204, 51920) and by the EU through the European Regional Development Fund (ERDF) from GVA 2021–2027.

## References

- Albiach, R., Climent, C., Canet, R., & Pomares, F. (2012). Soil fertility and nutritional state of persimmon Rojo Brillante plantations in the Ribera Alta (Valencia, Spain). *Communications in soil science and plant analysis*, 43(21), 2767-2776. <https://doi.org/10.1080/00103624.2012.719974>.
- Alchanatis, V., Schmilovitch, Z., & Meron, M. (2005). «In-field assessment of single leaf nitrogen status by spectral reflectance measurements». *Precision Agriculture* 6, n. 1 (2005): 25-39. <https://doi.org/10.1007/s11119-005-0682-7>.
- Alva, A.K., Paramasivam, S., Obreza, T., & Schumann A. (2006). «Nitrogen best management practice for citrus trees». *Scientia Horticulturae* 107, n. 3: 233-44. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.05.017>.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M.S., & Lister, S. (1989). «Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra». *Applied spectroscopy* 43(5): 772-77.
- Bertrand, D., & Dufour, E. (2006). «Infrared spectroscopy and its analytical applications. » *Infrared spectroscopy and its analytical applications*, n. 2.
- Bondada, R., & Derrick M. (2001). «Canopy photosynthesis specific leaf weight and yield components of cotton under varying nitrogen supply». *Journal of Plant Nutrition* 24, n. 3: 469-77. <https://doi.org/10.1081/PLN-100104973>.
- Bremner, J. M. (1965). Inorganic forms of nitrogen. *Methods of soil analysis: part 2 chemical and microbiological properties*, 9, 1179-1237. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.c33>.
- Cassap, M. «Method development for ICP-OES ». *Spectroscopy*. 31(5) (2016): 14-15.
- Cawley, G., & Nicola L. (2003). «Efficient leave-one-out cross-validation of kernel fisher discriminant classifiers». *Pattern Recognition* 36, n. 11: 2585-92. [https://doi.org/10.1016/S0031-3203\(03\)00136-5](https://doi.org/10.1016/S0031-3203(03)00136-5).
- Chen, M., Glaz, B., Gilbert, R., Daroub, S., Barton, F., & Wan, Y. (2002). «Near-infrared reflectance spectroscopy analysis of phosphorus in sugarcane leaves». *Agronomy Journal* 94, n. 6 (2002): 1324-31. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.1324>.
- Cheng, J., & Wen, D. (2017). «Partial Least Squares Regression (PLSR) Applied to NIR and HSI Spectral Data Modeling to Predict Chemical Properties of Fish Muscle». *Food Engineering Reviews* 9, n.1: 36-49. <https://doi.org/10.1007/s12393-016-9147-1>.
- Cuq, S; Lemetter, V., Kleiber, D., & Levasseur-Garcia, C. (2020). «Assessing macro- (P, K, Ca, Mg) and micronutrient (Mn, Fe, Cu, Zn, B) concentration in vine leaves and grape

- berries of *vitis vinifera* by using near-infrared spectroscopy and chemometrics». *Computers and Electronics in Agriculture* 179, n.10. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105841>.
- Das, S. K., & Avasthe, A. (2018). «Plant Nutrition Management Strategy: A Policy for Optimum Yield». » *Acta Scientific Agriculture* 2, n. 5: 65-70.
- Dong, H., Xiangjiang, K., Li, W., Tang, W., & Zhang, D. (2010). «Effects of plant density and nitrogen and potassium fertilization on cotton yield and uptake of major nutrients in two fields with varying fertility». *Field Crops Research* 119, n. 1: 106-13. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.06.019>.
- Embleton, T. W., Jones, W. W., Labanauskas, C. K., & Reuther, W. (1973). «Leaf analysis as a diagnostic tool and guide to fertilisation. » *The citrus industry*, 3(6): 183-210.
- Ferwerda, G., & Skidmore, A. (2007). «Can nutrient status of four woody plant species be predicted using field spectrometry? » *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* 62, n. 6: 406-14. <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2007.07.004>.
- Zhenzhen, G., Zhang, M., Deng, X., Zhu, W., Li, K., & Li, C. (2017). «Persimmon tannin promoted macrophage reverse cholesterol transport through inhibiting ERK1/2 and activating PPAR c both in vitro and in vivo». *Journal of Functional Foods* 38: 338-48. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.023>.
- George, A., Nissen, B., & Broadley, R. (2005). «Persimmon nutrition: a practical guide to improving fruit quality and production. » *Department of Primary Industries, Queensland Horticulture Institute*.
- Grassi, S., Olusola S., Giovenzana, V., Tugnolo, A., Squeo, G., Conte, P., De Bruno, A., Flammini, F., Casiraghi, E & Alamprese, C. (2021). «Near Infrared Spectroscopy as a Green Technology for the Quality Prediction of Intact Olives». *Foods* 10, n. 5: 1042. <https://doi.org/10.3390/foods10051042>.
- Güsewell, S. (2004) «N: P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance». *New Phytologist* 164, n. 2: 243-66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01192.x>.
- Intrigliolo, F., Tittarelli, F., Rocuzzo, G., & Canali, S. (1998). «Fertilizzazione degli agrumi». *INFORMATORE AGRARIO* 54: 79-86.
- Johnson, J., Sila, A., Senthilkumar, K., Keith, D. & Kazuki, S. (2021). «Application of infrared spectroscopy for estimation of concentrations of macro- and micronutrients in rice in sub-Saharan Africa». *Field Crops Research* 270, n. June: 108222. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108222>.
- Jones Jr, J. B. (2012). *Plant nutrition and soil fertility manual*. CRC press.
- Li, Y., Yang, S., Jingmin J., & Jun L. (2019). «Spectroscopic determination of leaf chlorophyll content and color for genetic selection on *Sassafras tzumu*». *Plant Methods* 15, n. 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0458-0>.
- Da Fonseca, L., José, E., Fernández, R., Caresani Ii, Costa, A., & Varella, L. (2010). «Caracterização espectral multitemporal dos cereais de estação fria em imagens de satélite com média resolução espacial Multitemporal spectral characterization of cool season cereals in satellite images with moderate spatial resolution» 40, n. 10: 2053-59.
- McQuaker, Neil R., David F. Brown, & Paul D. Kluckner. (1979). «Digestion of environmental materials for analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry». *Analytical Chemistry* 51, n. 7: 1082-84. <https://doi.org/10.1021/ac50043a071>.

- Menesatti, P., Pallottino, F., Antonucci, F., Rocuzzo, G., Intrigliolo, F., & Costa, C. (2012). Non-destructive proximal sensing for early detection of citrus nutrient and water stress. *Advances in citrus nutrition*, 113-123. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3_9).
- Menino, R. (2012). Leaf analysis in citrus: Interpretation tools. *Advances in Citrus Nutrition*, 59-79. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3_5).
- Ordóñez, C., Rodríguez-Pérez, J. R., Moreira, J. J., & Sanz, E. (2012). Using hyperspectral spectrometry and functional models to characterize vine-leaf composition. *IEEE transactions on geoscience and remote sensing*, 51(5), 2610-2618. <https://doi.org/10.1109/TGRS.2012.2217344>.
- Osco, L. P., Ramos, A. P. M., Fanta Pinheiro, M. M., Moriya, É. A. S., Imai, N. N., Estrabis, N., & Eduardo Creste, J. (2020). A machine learning framework to predict nutrient content in valencia-orange leaf hyperspectral measurements. *Remote Sensing*, 12(6), 906. <https://doi.org/10.3390/rs12060906>.
- Pandey, P., Ge, Y., Stoerger, V., & Schnable, J. (2017). «High throughput in vivo analysis of plant leaf chemical properties using hyperspectral imaging». *Frontiers in Plant Science* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01348>.
- Romanov, S. (2014). The Intertech Equipment for Laboratory Analysis and Scientific Research. *Sci. Innov*, 10, 18-24. <https://doi.org/10.15407/scine10.02.018>.
- Rotbart, N., Schmilovich, Z., Cohen, Y., Alchanatis, V., Ran Erel, R., & Yermiyahu, U. (2013). Estimating olive leaf nitrogen concentration using visible and near-infrared spectral reflectance». *Biosystems Engineering* 114, n. 4: 426-34. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.09.005>.
- Savitzky, A & Golay, M. (1964). «Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. » *Analytical Chemistry* 36, no 8: 1627-39. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>.
- Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., & Hoover, M. R. (1979). «Analysis of Forages by Infrared Reflectance». *Journal of Dairy Science* 62, no 5: 807-12. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83330-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83330-5).
- Steckenmesser, D., Vogel, C., Herzel, H., Félix, R., Adam, C., & Steffens, D. (2022). Thermal treatment of sewage sludge for phosphorus fertilizer production: a model experiment. *Journal of Plant Nutrition*, 45(8), 1123-1133. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1994595>.
- Tobias, R. (1995). «An introduction to partial least squares regression. » *In Proceedings of the twentieth annual SAS users group international conference* Vol. 20: 1250-57.
- Ulissi, V., Antonucci, F., Benincasa, P., Farneselli, M., & Tei, F. (2011). «Nitrogen concentration estimation in tomato leaves by Vis-NIR non-destructive spectroscopy». *Sensors* 11, no 6: 6411-24. <https://doi.org/10.3390/s110606411>.
- Visconti, F., & de Paz, J. M. (2019). Non-destructive assessment of chloride in persimmon leaves using a miniature visible near-infrared spectrometer. *Computers and electronics in agriculture*, 164, 104894. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.104894>.
- Wang, J., Shen, C., Liu, N., Jin, X., Fan, X., Dong, C., & Xu, Y. (2017). Non-destructive evaluation of the leaf nitrogen concentration by in-field visible/near-infrared spectroscopy in pear orchards. *Sensors*, 17(3), 538. <https://doi.org/10.3390/s17030538>.



- Wang, Y. J., Jin, G., Li, L. Q., Liu, Y., Kalkhajeh, Y. K., Ning, J. M., & Zhang, Z. Z. (2020). NIR hyperspectral imaging coupled with chemometrics for nondestructive assessment of phosphorus and potassium contents in tea leaves. *Infrared Physics & Technology*, 108, 103365. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2020.103365>.
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). «PLS-regression: A basic tool of chemometrics». *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 58, n.2: 109-30. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1).
- Yarce, C., & Rojas, G. (2012). «Near infrared spectroscopy for the analysis of macro and micro nutrients in sugarcane leaves». *Zuckerindustrie* 137, n. 11: 707-10. <https://doi.org/10.36961/si13611>.
- Zhang, X., Liu, F., & Gong, X. (2013). «Detecting macronutrients content and distribution in oilseed rape leaves based on hyperspectral imaging». *Biosystems Engineering* 115, n. 1: 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2013.02.007>.



## CAPÍTULO 2

### **Non-Destructive Appraisal of Macro-and Micronutrients in Persimmon Leaves Using Vis-NIR Hyperspectral Imaging**

Maylin Acosta<sup>1</sup>, Isabel Rodríguez-Carretero<sup>1</sup>, José Blasco<sup>2</sup>, José Miguel de Paz<sup>1</sup> and Ana Quiñones<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro para el Desarrollo de la Agricultura Sostenible, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315, km 10.7, Moncada, 46113 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Centro de Agroingeniería, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315, km 10.7, Moncada, 46113 Valencia, Spain

*Agriculture* **2023**,13(4), 916; <https://doi.org/10.3390/agriculture13040916>



**Abstract:** Visible and near-infrared (Vis-NIR) hyperspectral imaging (HSI) was used to rapidly and non-destructively determine macro- and micronutrient contents in persimmon leaves. Hyperspectral images of 687 leaves were acquired in the 500–980 nm range over 6 months, covering a complete vegetative cycle. The average reflectance spectrum of each leaf was extracted, and foliar ionomic analysis was used as a reference method to determine the actual concentration of the nutrients in the leaves. Analyses were performed via emission spectrometry (ICP-OES) for macro- and micronutrients after microwave digestion, and the Kjeldahl method was used to quantify nitrogen. Partial least square regression (PLS-R) was used to predict the nutrient concentration based on spectral data from the leaf using actual values of each element as predictor variables. Several methods were used to pre-process the spectra, including Savitzky-Golay (SG) smoothing, standard normal variate (SNV) and first (1D) and second derivatives (2D). Seventy-five per cent of the samples were used to calibrate and validate the model by cross-validation, whereas the remaining twenty-five % were used as an independent test set. The best performance of the models for the test set achieved an  $R^2 = 0.80$  for nitrogen. Results were also satisfactory for phosphorus, calcium, magnesium, and boron, with determination coefficient  $R^2$  values of 0.63, 0.66, 0.58 and 0.69, respectively. The other nutrients had lower prediction rates ( $R^2 = 0.48$  for potassium,  $R^2 = 0.38$  for iron,  $R^2 = 0.24$  for copper,  $R^2 = 0.23$  for zinc and  $R^2 = 0.22$  for manganese). The variable importance in projection (VIP) was used to extract the most influential bands for the best-predicted nutrients: N, K and B.

**Keywords:** hyperspectral imaging; Vis-NIR; spectroscopy; chemometrics; variable selection

## 1. Introduction

Persimmon (*Diospyros kaki* Thunberg) is a crop native to China, which grows in tropical and subtropical areas and has adapted well to the Mediterranean climate (Albiach et al. 2012). Cultivation of the cultivar cv. 'Rojo Brillante' has grown exponentially in recent years in Spain, which is currently ranked second for the world production of this fruit (FAOSTAT, 2023). It is essential to ensure fair handling practices during the growing period to produce good quality persimmons, including implementing optimum nutrient management according to the nutritional status of the trees at each phenological stage. However, only a little research has been carried out on the nutritional requirements of persimmon. Moreover, the previous studies were conducted mainly in Japan, Australia, and New Zealand for local varieties other than 'Rojo Brillante', the predominant variety in Spain.

Plant nutrients can be divided into two broad categories: macronutrients and micronutrients. Both types are essential for plant growth and yield since they are constituents of several structures involved in storing energy or in numerous enzymatic and metabolic processes. Research into the beneficial effects of the nutrient fertilisation of crops was pioneered by von Liebig in the 19th century when he described the essential roles of nutrients in plant development (Kirkby, 2011). Macronutrients such as nitrogen (N), phosphorous (P), potassium (K), sulphur (S), manganese (Mg) and calcium (Ca) are major constituents of cell structures and organic compounds and are therefore required in large amounts (Hawkesford et al. 2011). In contrast, micronutrients are involved in multiple metabolic and enzymatic processes, as well as in the synthesis of chlorophyll, and typically are needed in small amounts (Broadley et al. 2011). Micronutrients such as zinc (Zn), manganese (Mn), copper (Cu) and boron (B) are involved in chlorophyll formation (photosynthesis), as well as root cell division and elongation. At the same time, iron (Fe) is a critical component of photosynthesis, respiratory electron transport and a cofactor of multiple redox enzymes.

The capacity of the soil to supply the nutrients required to achieve good crop development and production is usually insufficient. Hence, rational fertilisation plans need to be applied at regular intervals. In Spain, Malagón and Monzó (2015) proposed three fertiliser applications for persimmon. The first application in mid-March comprised an N-P-K or N-P-K-Mg complex, the second included a nitrogenous fertiliser (nitric-ammoniacal) and magnesium, and a third application was based on potassium nitrate. These proposed doses are only indicative since any fertilisation plan must be adjusted to the nutritional status of the plants, the agronomic conditions, the soil composition, and the irrigation water.

The ionomic analysis of leaves is a traditional method used to determine the nutritional status of plants, which is costly, laborious, and time-consuming, resulting in delays between field sampling and ionomic diagnosis. Therefore, the need for fast, non-destructive and high-throughput alternative technologies for crop monitoring has led to the use or development of new sensors (Cubero et al. 2020). In agriculture, the potential of visible and near-infrared (Vis-NIR) spectral reflectance has already been studied for different purposes (Walsh et al. 2020), including the assessment of nutrient concentration. These developments have enabled the estimation of a wide variety of plant chemical properties and physiological processes based on leaf optical properties of living tissue. Estimating these features from sheet reflectance is based on variations in the absorption of organic molecular bonds, mainly C-H, N-H and O-

H bonds, resulting in vibrational excitation at specific electromagnetic spectrum wavelengths. Exploiting the relationships of light to organic bonds allows plant spectroscopy to characterise the chemical and physiological state of plants (Pandey et al. 2017).

Hyperspectral imaging (HSI) is a novel and emerging technology adapted for several applications in agriculture. HSI is a combination of spectroscopic and imaging techniques that identifies chemical components and their spatial distribution in a sample (Lorente et al. 2012). Due to these characteristics, it is becoming an important tool in precision agriculture for rapid assessment of crop nutrition (Peron-Danaher et al. 2021). Gómez-Casero et al. (2007) estimated K deficiencies through the hyperspectral imaging of leaves in the 400-900 nm range and found changes in the NIR region in olive orchards. They stated that the normalised difference vegetation index (NDVI) could be used to estimate the K concentration in olive trees with high precision.

Jin et al. (2022) detected N, P and K deficiencies in pear tree leaves using a handheld miniature spectrometer operating from 900 to 1700 nm in reflectance mode. They used 42 recognition models based on random forest, support vector machine (SVM), gradient boosting decision tree and extreme gradient boosting (XGBoost). The highest accuracy was achieved using SVM via pre-processing based on SNV and genetic algorithm feature extraction, which enabled them to reach correct classification rates of 82.06 % and 80.25 %, respectively. N, P and K contents in oilseed rape leaves were investigated by Zhang et al. (2013), using Vis-NIR

hyperspectral imaging and least-squares support vector machines (LS-SVM). The results were an  $R^2$  of 0.88 for N and an  $R^2$  of 0.71 for P, while using partial least square regression (PLS-R) resulted in an  $R^2$  of 0.75 for K. In barley plants, Christensen et al. (2004) used hyperspectral imaging (400-750 nm) to predict the P content in barley plants from the canopy spectral reflectance, with an accuracy rate of 74 %.

Yanli et al. (2015) estimated N and P concentrations in citrus leaves from hyperspectral images of the adaxial and abaxial sides of each leaf. The performances of five pre-processing methods, i.e. Savitzky-Golay smoothing (SG), standard normal variate (SNV), multiplicative scatter correction (MSC) and first derivative (1D) and second derivative (2D), were tested using linear partial least squares (PLS-R) and nonlinear LS SVM models. The results showed that PLS and SG-PLS performed best in predicting N ( $R = 0.90$ ,  $RMSEP = 0.104$ ) and P ( $R = 0.92$ ,  $RMSEP = 0.051$ ) concentrations, respectively. Additionally, Li et al. (2018) explored the

ability of this technology to predict P content in litchi leaves using canopy reflectance. The results using cross-validation showed that optimal spectral indices selected by correlation analyses achieved the highest accuracy in retrieving P content at each growth stage ( $R^2 = 0.54-0.98$ , RMSECV = 0.02-0.03). In contrast, only one study related to persimmons was found by Visconti and de Paz (2019), who obtained a regression model to predict chloride (Cl) in persimmon leaves, with an  $R^2$  of 0.78, an RMSE of 0.34 % Cl and a ratio performance deviation (RPD) of 2.18. Moreover, they stated that wavelengths between 390 and 472 nm and 690 and 692 nm correlated positively with the Cl content. While the estimation of macronutrients, especially N, P, and K, has been previously studied using hyperspectral imaging in some species, micronutrients have been studied to a lesser extent. Moreover, no studies have been found on determining nutrient concentration using spectral data for persimmons. Developing a tool to perform a rapid nutritional diagnosis at a lower cost would allow the efficient fertiliser management of crops, leading to earlier decisions on fertilisation while also reducing costs and the potential risk of contamination. Therefore, this work advances in the study of the potential of Vis-NIR hyperspectral imaging to determine the foliar concentration of macro (N, P, K, Ca, Mg, S and Na) and micronutrients (Fe, Cu, Mn, Zn and B) in persimmon leaves as a new tool alternative to conventional slow and complex laboratory analyses.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Field Experiment**

Leaves were sampled from an experimental plot of 48 six-year-old persimmon (*Diospyros kaki*) trees cv. 'Rojo Brillante', located at the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) in Moncada (Valencia), Spain. Six treatments (table 1) involving four nitrogen levels in combination with three doses of potassium were applied to create variability in the foliar nutrient status. The six fertilisation treatments combined N doses of 0 %, 33 % and 50 % fertilisation units (FU) of total crop requirement with K doses of 0 % and 50 % FU as per crop requirements, and the control included 100 % of the N and K crop requirements. The doses of N and K were assessed based on the characteristics of the plantation, such as age, variety, rootstock, and framework (5 x 5 m). Fertilisation treatments were applied from April to September.



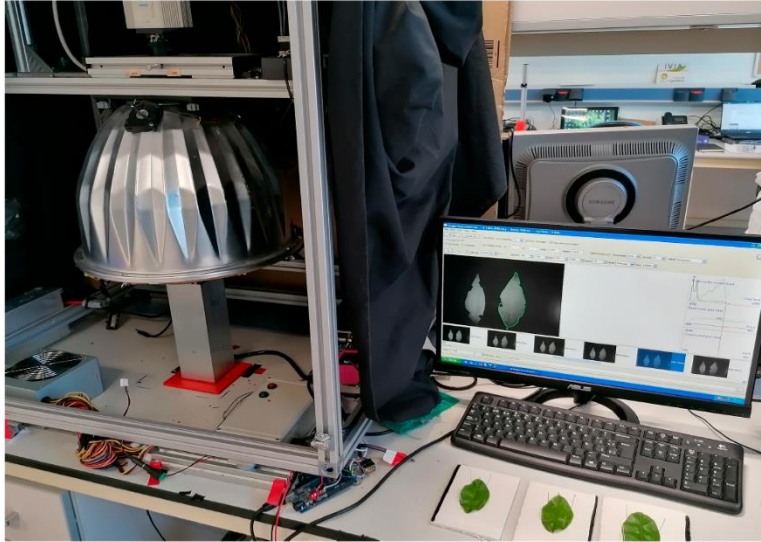
**Table 1.** Fertiliser doses (kg/ha) for each treatment.

Treatment	N	K <sub>2</sub> O	P <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	MgO
T1 (N-0%)	0	110	38.8	62.5	25.3
T2 (N-33%)	35	110	38.8	62.5	25.3
T3 (N-50%)	53	110	38.8	62.5	25.3
T4 (K <sub>2</sub> O-0%)	106	0	38.8	62.5	25.3
T5 (K <sub>2</sub> O-50%)	106	55	38.8	62.5	25.3
Control (N and K <sub>2</sub> O-100%)	106	110	38.8	62.5	25.3

Foliar sampling was carried out monthly (June, July, September, October, November, and December 2020) by taking six leaves from the summer flush leaves of each tree, and the third or fourth leaves from the axilla of reproductive sprouting were placed at the four orientations. Hence, 24 leaves were collected per treatment and month, totalling 144. Once collected, the leaves were immediately sealed in plastic bags and taken to the laboratory at air temperature. The leaves were washed with phosphate-free soap and rinsed with MilliQ water to remove any remaining dust or contamination. After drying, leaves were labelled and attached to a white surface to flatten them during image acquisition.

## 2.2. Spectral Measurements of the Leaves

The hyperspectral images were acquired with an industrial camera (CoolSNAP ES, Photometrics, AZ, USA) coupled with two tuneable liquid crystal filters (Varispec VIS-07 and NIR-07, Cambridge Research & Instrumentation, Inc. Hopkinton, MA, USA). The camera was configured to acquire images with a size of 1392-1040 pixels and a spatial resolution of 0.14 mm/pixel in the operating spectral range of 500-980 nm in steps of 10 nm (49 bands). Each hyperspectral image acquisition captured with this configuration required 40 s. To optimise the dynamic range of the camera, avoid saturated images and correct the spectral sensitivity of the different elements of the system, a calibration of the integration time of each band was performed, capturing the average grey level of a reference White (Spectralon 99 %, Labsphere, Inc. North Sutton, NH, and USA). Calibration was performed with a threshold of 1%. Hyperspectral images were taken of these 6 leaves (one image per leaf), resulting in 144 images of leaves. The scene was illuminated with indirect light from twelve halogen bulbs (37 W) (Eurostar IR Halogen MR16. Ushio America, Inc. CA, USA) arranged inside a hemispherical aluminium diffuser (figure 1).



**Figure 1.** Acquisition of the hyperspectral imaging of the leaves

Images were corrected using white and dark references. Dark was captured by switching off the lamps and covering the lens with a cap to prevent light from infiltrating the camera. The correction was performed using Equation (1):

$$I - I_0 - I_{\text{dark}}/I_{\text{white}} - I_{\text{dark}} \quad (1)$$

Where  $I_0$  is the raw image that was acquired of the leaf,  $I_{\text{white}}$  is the image of the standard white reference, and  $I_{\text{dark}}$  is the image of the dark reference.

### **2.3. Ionic leaf analysis**

The leaves were dried in an oven (Selecta, Dry big, Spain) at 65 °C for a minimum of 72 h until a constant weight was reached. They were then crushed with a refrigerated grinder (IKA M20, Germany) and stored at 4 C until later analysis to quantify the concentration of the nutrients. For foliar ionic analysis, the nutrients were extracted from the solid samples using microwave-assisted acid digestion (ETHOS UP, Milestone Srl, Sorisole, Italy). To this end, 0.200 g of the crushed samples were weighed with a precision of 0.003 g, and 4 mL of MilliQ water plus 4 mL of nitric acid ( $\text{HNO}_3$ ) and 2 mL of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) were added to each sample. The samples with the added reagents were allowed to stand for 15 to 20 min. In the extracted solution, macro- and micronutrients were determined using an atomic emission spectrometer with inductively coupled plasma (iCAP 7000, Thermo

Scientific, Barcelona, Spain). The Kjeldahl method (Kjeltec 8200, FOSS Iberia, S.A. Barcelona, Spain) was used for organic N (Bremner, 1965).

#### **2.4. Data Analysis**

Leaf nutrient concentrations determined using the conventional laboratory analyses were taken as the reference for building the nutrient estimation models based on spectral information. Descriptive statistics (mean, standard deviation, minimum and maximum, median, first and third quartiles, skewness, kurtosis, and coefficient of variation) were obtained from the samples used in the experiments.

During the acquisition of hyperspectral images, undesired effects caused by electromagnetic noise, equipment sensitivity and changes in temperature and illumination may occur. Another aspect that adversely affects the measurements is the scattering of the incident radiation due to the texture of the sample or changes in the refractive index of the material, causing unwanted variations in spectral reflection (Walsh et al. 2020). These effects can be minimised using pre-processing operations. Five pre-processing procedures were used in this study: mean centring (MC), which consists of centring each variable by subtracting the mean of all the elements, SG smoothing (Savitzky & Golay, 1964b) to reduce random noise and increase the signal-to-noise ratio and SNV, which corrects the spectra for changes in optical path length and light scattering. After SNV correction, all spectra have a mean of 0 and a standard deviation of 1 (Barnes et al. 1989). First and second derivatives were used to eliminate constant baseline shifts and shifts that vary in a linear manner with wavelength, respectively (Li et al. 2019).

A table was created for each nutrient studied, in which each sample was arranged in rows, and the columns showed the reflectance value at each wavelength (X variables). A final column was added with the reference value of the nutrient obtained from the ionomic analysis. These tables were used to build the predictive models. Data were split into two sets: a training set composed of 75% (515) of the samples used for calibration and cross-validation (CV) and a testing set consisting of the remaining 25% (172) of the samples used for independent external validation.

Partial least square (PLS-R) is a classical linear modelling method applied to many fields, including nutrient estimation from spectral data (Burnett et al. 2021). Its primary role is to extract the principal components from independent variables with synthetic consideration of the dependent variables and establish a regression model between the optimal principal components and the dependent variables (Geladi & Kowalski, 1986). In this work, the predictor variables were the wavelengths, while the response variables were the concentrations given by the ionomic analysis. CV

was applied to determine the optimum number of factors in the PLS-R model and estimate the uncertainty in the training set (Stone & Brooks, 1990).

To avoid possible overfitting of the PLSR model, the number of PLS-R factors retained in each final model was chosen to maximise the  $R^2$  and to minimise the root mean square error prediction (RMSE).  $R^2$  is a measure of goodness-of-fit that represents the level of explained variability of the model, the remaining variation being attributed to random error. In contrast, RMSE measures the differences between the predicted and measured values and quantifies the accuracy by comparing the prediction errors of different models. Therefore, the performance of the models was evaluated in terms of the  $R^2$  and the RMSE in the independent test set. Statistical tests were performed using The Unscrambler X V9.7 (Camo Software, Oslo, Norway).

Several methods can be combined with PLS to obtain the most relevant subset of bands that retain the most valuable information and with the smallest errors. Among them is the competitive adaptive reweighted sampling method (CARS), which can select the variables with large coefficients in a multivariate linear regression model (MLR), and the successive projections algorithm (SPA) employs simple projection to select variables with a minimum of collinearity. On the other hand, Uninformative Variable Elimination (UVE) is a variable elimination method that is repeated as long as the RMSE of cross-validation (RMSECV) decreases (Tang et al. 2014). However, UVE removes uninformative variables, not necessarily the most important ones, and may eliminate important variables if they are highly correlated with other variables.

VIP (Variable Importance in Projection) is a popular method for variable selection in multivariate statistical models and detects small changes in the data. VIP measures both correlation and contribution of variables to the model based on the scores achieved and provides a variable importance ranking for model interpretation (Chong & Jun, 2005). Therefore, the wavelengths of highest importance were selected using this method. VIP scores are calculated as the weighted sum of squares as a product of the variance explained by the model and give an estimate of the importance of each variable (i.e. wavelength) in the latent variable model (Sorochan et al. 2022). A VIP score higher than 1 was set to indicate essential bands (Stoessel et al. 2018). This step was performed using the statistical software ParLeS (Viscarra Rossel, 2008). To obtain the minimum number of bands that maximises the result, the evolution of the prediction success rate was studied as a function of the number of selected bands. First,  $R^2$  was obtained using the band with the highest VIP score on the independent test set. Then, models based on PLS-R were created iteratively,

with one more band being included in the model based on its VIP score and the  $R^2$  being obtained until a maximum of 20 bands were acquired.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Foliar Nutrient Concentration

Table 2 shows the basic statistics obtained from ionomic analyses of all nutrients for the leaves sampled during all the experiments. In addition, the results are highlighted for the samples collected in July, as this month is stated as being one of the most suitable ones for the foliar sampling of 'Rojo Brillante' persimmons for nutritional diagnosis. The values obtained can be considered within the normal ranges for this crop in Valencia (Spain), except for the values of the concentrations of Zn and B, which showed values below the reference values (Albiach et al. 2012).

**Table 2.** Ionomic analysis of the persimmon leaves. Concentrations are expressed in g/100 g for macronutrients (N, P, K, Ca, Mg, S and Na) and mg/kg for micronutrients (Fe, Zn, Mn, B and Cu) based on the weight of dry matter.

Nutrient	Average Cycle	Standard deviation	Coefficient variation	July Min–Max	Cycle Min–Max	Range	Std Bias	Kurtosis
N	1.74	0.39	0.22	1.62–2.30	1.06–2.82	1.75	2.48	1.09
P	0.11	0.06	0.55	0.13–0.30	0.04–0.30	0.26	8.87	5.60
K	1.94	0.53	0.28	1.08–2.30	0.83–2.96	2.13	0.71	2.53
Ca	2.70	1.41	0.52	0.30–2.11	0.30–6.52	6.22	0.81	0.17
Mg	0.50	0.2	0.39	0.17–0.58	0.17–0.95	0.78	0.68	1.26
S	0.18	0.04	0.21	0.20–0.25	0.11–0.29	0.18	1.94	1.41
Na	0.01	0.01	0.79	0.01–0.06	0.005–0.06	0.07	5.73	4.16
Fe	39.52	15.45	0.39	31.0–69.0	13.22–81.77	68.54	3.36	1.36
Zn	6.62	2.91	0.44	4.00–14.0	2.02–15.68	13.66	3.79	0.32
Mn	181.07	72.92	0.40	32.0–118.0	32.81–295.0	262.21	2.66	2.27
B	48.76	22.89	0.47	12.0–26.0	12.18–102.1	89.92	0.06	2.49
Cu	3.48	1.53	0.44	4.00–9.00	1.33–8.97	7.64	5.07	1.80

#### 3.2. Predictive Analyses

Table 3 shows the results of the PLS-R models acquired for each nutrient using the best pre-processing technique. The best result for the test set was achieved for the prediction of N ( $R^2 = 0.80$ ) using MC + 1D pre-treatments, with an RMSEP of 0.16. Additionally, for K ( $R^2 = 0.66$ ) and P ( $R^2 = 0.62$ ), relatively good values were obtained with low RMSEP values. The best prediction for P was achieved using raw spectra, while the best performance for K was achieved using MC.

**Table 3.** Comparative statistics for the calibration, cross-validation and test sets of the model generated by PLS-R for essential nutrients using all wavelengths

Nutrient	Pre-Treatment	LV	Calibration		Cross-Validation		Test	
			RMSEC	R <sup>2</sup>	RMSECV	R <sup>2</sup>	RMSEP	R <sup>2</sup>
N	MC + 1D	6	0.14	0.84	0.14	0.83	0.16	0.80
P	Raw spectra	5	0.01	0.69	0.01	0.68	0.01	0.62
K	Mean centre	10	0.88	0.68	0.90	0.64	0.83	0.67
Ca	Raw spectra	12	0.68	0.65	0.73	0.60	0.77	0.54
Mg	Raw spectra	11	0.11	0.65	0.11	0.60	0.12	0.58
S	Raw spectra	12	0.03	0.45	0.03	0.37	0.03	0.37
Na	Raw spectra	3	0.01	0.28	0.01	0.20	0.01	0.27
Fe	Raw spectra	12	9.43	0.44	9.91	0.38	10.32	0.34
Zn	Raw spectra	12	2.58	0.5	2.82	0.40	3.37	0.20
Mn	MC + SNV	9	48.81	0.24	51.45	0.16	49.85	0.22
B	MC	11	8.69	0.72	9.34	0.70	9.59	0.69
Cu	MC + 1D	6	0.84	0.31	0.89	0.23	0.93	0.24

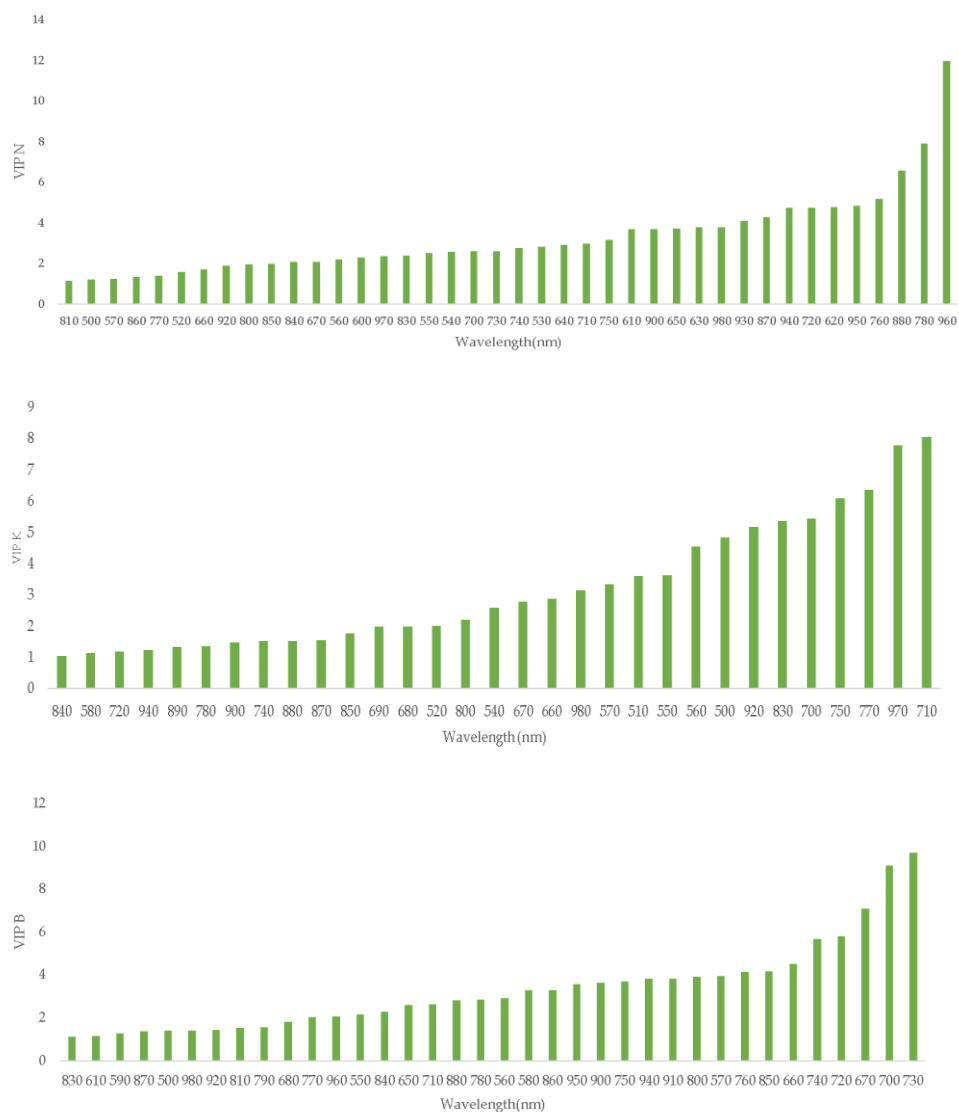
For micronutrients, B showed an R<sup>2</sup> of 0.69, with a relatively low RMSEP. Other nutrients, especially micronutrients, achieved poorer results, as was the case of Cu, Mn, Zn and Na.

### 3.3. Selection of Optimal Wavelengths

The most important bands were selected for those nutrients with the highest results (R<sup>2</sup> > 0.65) in table 3, which were N, K and B. A method based on the VIP scores was used to select the most important bands to predict the concentration of these nutrients. Figure 2 shows the bands with a VIP score higher than 1 for N (40 bands), K (32 bands) and B (36 bands). To select the minimum number of important bands capable of predicting the concentration of each nutrient, successive models were created, starting with the single band with the highest VIP score and increasing the number of bands iteratively. Figure 3 shows the R<sup>2</sup> achieved for each number of bands used in the model. Considering the evolution of the R<sup>2</sup>, the number of bands selected for N was set to 8, the number of bands for B was 11, while for K, 17 bands were selected.

Table 4 shows the results achieved using only the selected variables. In general, the results for N and B were slightly lower than those obtained using the entire spectrum, which indicates that using only a small set of variables is enough to make accurate estimations. The estimation of N using 8 bands out of 49 achieved an R<sup>2</sup> of 0.76 and an RMSE of 0.18 for the test set using MC as the pre-treatment, which is similar to

that obtained using the entire spectrum. Furthermore, B could also be modelled with the 11 wavelengths selected, with an  $R^2$  of 0.61 and an RMSE of 10.42, which were achieved using MC. However, for K, an  $R^2$  of only 0.43 was reached with the bands chosen, which is lower than that when the whole spectrum is used, and therefore, it was considered that a reduced number of bands could not be selected to make a relatively accurate prediction.

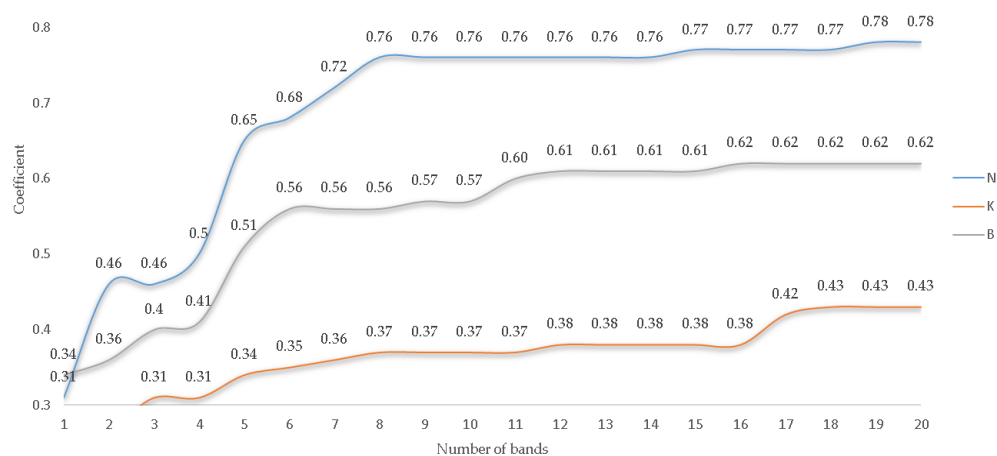


**Figure 2.** Wavelengths VIP scores higher than 1 for N (top), K (middle) and B (bottom).

**Table 4.** Results of PLS-R using the selected bands for N and B.

Nutrient	Wavelengths (nm)	Pre-Treatment	Calibration		Cross-Validation		Test	
			RMSEC	R <sup>2</sup>	RMSECV	R <sup>2</sup>	RMSEP	R <sup>2</sup>
N	620, 720, 760, 780, 880, 940, 950, 960	MC	0.16	0.79	0.17	0.77	0.18	0.76
B	730, 700, 670, 720, 740, 660, 850, 760, 570, 800, 910	MC	10.12	0.62	10.27	0.62	10.42	0.61

LV: latent variables



**Figure 3.** Coefficient R<sup>2</sup> obtained by the models as a function of the number of bands used for N, K and B.

### 3.4. Discussion

In this study, we tested the potential of reflectance spectroscopy to characterise nutrient prediction in plants non-destructively. Specifically, the relevant points of this study were to assess the use of hyperspectral images to detect and predict the concentration of nutrients in persimmon leaves by developing models based on PLS-R. Macro- and micronutrients of persimmon leaves were assessed using Vis-NIR hyperspectral imaging using PLS-R to obtain correlations with the concentrations determined by destructive ionomic analyses. The best prediction was achieved for macronutrients. Specifically, this was achieved using the MC + 1D pre-treatment for N, with R<sup>2</sup> = 0.80 in the test set. These results are consistent with those of other



studies that achieved similar coefficients of determination for estimating N content in other woody crops (Petisco et al. 2005) using PLS-R. In apple leaves, Ye et al. (2020) obtained an  $R^2$  of 0.77 for predicting the N content in apple leaves using hyperspectral imaging and PLS-R. Additionally, Malmir et al. (2020b), obtained an  $R^2$  of 0.76 for predicting N and P contents in cacao leaves, while Zhang et al. (2013), reported an  $R^2$  of 0.71 for rapeseed in the 380-1030 nm range.

A good estimation model was obtained in the test set with an  $R^2 = 0.68$  and a relatively low RMSE, similar to Abenina et al. (2022), who obtained an  $R^2 = 0.67$  for peach leaves. In rapeseed leaves, Zhang et al. (2013), predicted the K content with an  $R^2 = 0.75$ . In addition, the results are superior to those obtained by Malmir et al. (2020b) in cacao leaves, only reaching an  $R^2 = 0.35$  in CV using both the whole spectrum and selected wavelengths. The PLS-R model developed for Ca only reached an  $R^2$  of 0.54 and RMSE = 0.77. However, they obtained a better result for cacao leaves with a higher accuracy of  $R^2 = 0.76$  using CV. The PLS-R performed worse for S and Na, with  $R^2 = 0.37$  and 0.27, respectively.

Regarding micronutrients, the B content was the best predicted, with  $R^2 = 0.69$  and RMSE of 9.59. Similar results were found by de Oliveira & Santana (2020), who achieved an  $R^2$  of 0.68 in the 500-790 nm range for eucalyptus leaves. For the other micronutrients, the predictive capacity was lower ( $R^2 < 0.34$ ). This could be due to several reasons, such as the relatively low concentration of micronutrients that could be due to the sensitivity of the equipment used, the low variation range of some micronutrients such as Cu or Zn, or that other spectral ranges must be used to detect these elements. In the range from 550 to 1700 nm Pandey et al. (2017), obtained better results. However, the results were lower than for macronutrients.

De Silva et al. (2023), reported better results for Cu, Mn and Zn, while they were similar for Na. However, their results are very different between CV and P sets. In some cases, especially for micronutrients, the results achieved using leave-one-out (LOO) CV were much lower than those achieved using the prediction set, and this fact is not explained considering that LOO-CV uses the whole dataset for model fitting, so the expected results should be, at least, similar. Moreover, this work was conducted on macadamia, where the concentration of some micronutrients is very different from that of persimmons. For instance, the concentrations found for Cu in our study varied from 3 to 9 mg/kg, while in the study on macadamia, the concentrations varied from 3 to 62 mg/kg, which could explain better correlations. The same happens with the other micronutrients. Moreover, the RMSE values were relatively large, while the RPD was relatively low. In eucalyptus leaves, de Oliveira

and Santana (2020) achieved better results with  $R^2$  values of 0.78, 0.79, and 0.31 for Cu, Mn and Zn, respectively. However, only results using CV and not any independent test set were provided, and the RMSE is not shown. As in the case of (de Oliveira & Santana, 2020), the concentrations found for micronutrients were much larger in eucalyptus than in persimmons. For example, in the case of Mn, the values of the eucalyptus leaves ranged from 288 to 4096 mg/kg, while in persimmons, they were between 32 and 295 mg/kg. The selection of the important bands performed for the nutrients with the highest  $R^2$  gave similar results for N and B. However, no selection was possible for K. So, in general, the entire spectrum is needed to achieve the best performance of this technique.

Hyperspectral imaging has limitations for its use in the open field regarding other spectral methods, such as portable spectrophotometers or specific devices, such as chlorophyll meters. However, they also have several advantages, such as the possibility of being transported on agricultural vehicles or robots to collect images from entire plants and give precise diagnostics of the plot. Therefore, further work is needed to transfer the proposed approach from the laboratory settings to protected agrosystems and open field conditions, which is essential for the practical application of this technology (Cotrozzi et al. 2020; Cotrozzi & Couture, 2020).

#### **4. Conclusions**

The nutrient concentration in persimmon leaves was estimated by Vis-NIR hyperspectral imaging in the 500 to 980 nm range using partial least squares regression. The macronutrients studied included N, P, K, Ca, Mg, Na and S, while the microelements were Fe, Cu, Mn, Zn and B. The elements that achieved a satisfactory level of prediction were N, P, K and B in all cases with an  $R^2$  higher than 0.62.

Using a method based on the VIP scores, a selection of essential wavelengths was carried out for the nutrients that achieved predictions with an  $R^2$  higher than 0.65, which were N, K and B. Initially, bands with a VIP score greater than one were selected. However, this resulted in the selection of too many bands. So, models were made to calculate the  $R^2$ , starting with only the wavelength with the highest VIP score and successively adding the rest of the bands with the highest VIP scores. Based on the  $R^2$  achieved, a total of 8, 11 and 17 bands were selected for N, B and K, respectively. However, in the case of K, the results indicated that the entire spectrum was necessary to make more accurate predictions.

The results indicate that a non-destructive technique such as Vis-NIR hyperspectral imaging is a promising alternative for nutritional diagnostics of persimmon leaves under laboratory conditions as a preliminary step to performing nutritional diagnostics in the field. This would be the first work on persimmon cultivation using hyperspectral imaging technology to predict nutrients. It is confirmed that reflectance spectroscopy can successfully characterize nutrient determination and provide detailed information on each nutrient of interest for plant performance.

### Funding

This work is co-funded by MICIN-AEI through project TED2021-130117B-C31, GVA-IVIA through projects 52203 and 52204, and the EU through the European Regional Development Fund (ERDF) of the Generalitat Valenciana 2021–2027.

### References

- Abenina, M., Joe, M., Cutulle, M., Melgar, J., & Liu, H. (2022). «Prediction of Potassium in Peach Leaves Using Hyperspectral Imaging and Multivariate Analysis». *AgriEngineering* 4(2):400-413. Doi: 10.3390/agriengineering4020027
- Albiach, R., Climent, C., Canet, R., & Pomares, F. (2012). «Soil Fertility and Nutritional State of Persimmon Rojo Brillante Plantations in the Ribera Alta (Valencia, Spain) ». *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 43(21):2767-76. Doi: 10.1080/00103624.2012.719974.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M.S., & Lister, S. J. (1989). «Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra». *Applied spectroscopy* 43(5):772-77.
- Bremner, J. M. (1965). Inorganic forms of nitrogen. *Methods of soil analysis: part 2 chemical and microbiological properties*, 9, 1179-1237.
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Function of nutrients: micronutrients. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (pp. 191-248). Academic Press.
- Burnett, A. C., Anderson, J., Davidson, K. J., Ely, K. S., Lamour, J., Li, Q., & Serbin, S. P. (2021). A best-practice guide to predicting plant traits from leaf-level hyperspectral data using partial least squares regression. *Journal of Experimental Botany*, 72(18), 6175-6189. Doi: 10.1093/jxb/erab295.
- Chong, I. G., & Jun, C. H. (2005). Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 78(1-2), 103-112. Doi: 10.1016/j.chemolab.2004.12.011.
- Christensen, L., Bennedsen, R., Jørgensen, N., & Nielsen, H. (2004). «Modelling nitrogen and phosphorus content at early growth stages in spring barley using hyperspectral line scanning». *Biosystems Engineering* 88(1):19-24. Doi: 10.1016/j.biosystemseng.2004.02.006.

- Cotrozzi, L., & Couture, J. (2020). «Hyperspectral assessment of plant responses to multi-stress environments: Prospects for managing protected agrosystems». *Plants People Planet* 2(3):244-58. Doi: 10.1002/ppp3.10080.
- Cotrozzi, L., Peron, R., & Couture, J. (2020). «Spectral Phenotyping of Physiological and Anatomical Leaf Traits Related with Maize Water Status». *Plant Physiology* 184(3):1363-77. Doi: 10.1104/pp.20.00577.
- Cubero, S., Marco-Noales, E., Aleixos, N., Barbé, S., & Blasco, J. (2020). Robhortic: A field robot to detect pests and diseases in horticultural crops by proximal sensing. *Agriculture*, 10(7), 276. Doi: 10.3390/agriculture10070276.
- De Silva, A., Stephen, J., Wiebke, H., & Shahla, H. (2023). «Hyperspectral Imaging of Adaxial and Abaxial Leaf Surfaces as a Predictor of Macadamia Crop Nutrition». *Plants* 12(3). Doi: 10.3390/plants12030558.
- FAOSTAT. (2023). «FAOSTAT». <https://www.fao.org/faostat/en/#home>. [Accessed January 15, 2022]
- Geladi, P., & Kowalski, B. (1986). «Partial least-squares regression: a tutorial». *Analytica Chimica Acta* 185:1-17. doi: 10.1016/0003-2670(86)80028-9.
- Gómez-Casero, M., López-Granados, F., Peña-Barragán, J., Jurado-Expósito, M., & Fernández-Escobar, R. (2007). «Assessing Nitrogen and Potassium Deficiencies in Olive Orchards through Discriminant Analysis of Hyperspectral Data». *Journal of the American Society for Horticultural Science* 132(5):611-18. Doi: 10.21273/JASHS.132.5.611.
- Hawkesford, M., Kichey, T., Schjoerring, J., & White, P. (2011). «Functions of Macronutrients». Pp. 135-89. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*. Elsevier Inc.
- Kirkby, E. (2011). «Introduction, Definition and Classification of Nutrients». Pp. 3-5. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*. Elsevier Inc.
- Li, D., Wang, C., Jiang, H., Peng, Z., Yang, J., Su, Y., & Chen, S. (2018). Monitoring litchi canopy foliar phosphorus content using hyperspectral data. *Computers and electronics in agriculture*, 154, 176-186. Doi: 10.1016/j.compag.2018.09.007.
- Li, Y., Yang, S., Jingmi, J., & Jun, L. (2019). «Spectroscopic determination of leaf chlorophyll content and color for genetic selection on Sassafras tzumu». *Plant Methods* 15(1). doi: 10.1186/s13007-019-0458-0.
- Lorente, D., Aleixos, N., Gómez-Sanchis, J., Cubero, S., García-Navarrete, O., & Blasco, J. (2012). «Recent Advances and Applications of Hyperspectral Imaging for Fruit and Vegetable Quality Assessment». *Food and Bioprocess Technology* 5(4):1121-42. Doi: 10.1007/s11947-011-0725-1.
- Malagón, J., & Monzó, J. (2015). «Diseño de la plantación de caqui y su manejo en los primeros años del cultivo.» *Agrícola vergel: Fruticultura, horticultura, floricultura* 34(381):61-67.
- Malmir, M., Iman, T., Xu, Z., Farrar, M., & Bai, S. (2020). «Prediction of macronutrients in plant leaves using chemometric analysis and wavelength selection». *Journal of Soils and Sediments* 20(1):249-59. Doi: 10.1007/s11368-019-02418-z.
- Pandey, P., Ge, Y., Stoerger, V., & Schnable, J. (2017). «High throughput in vivo analysis of plant leaf chemical properties using hyperspectral imaging». *Frontiers in Plant Science* 8. Doi: 10.3389/fpls.2017.01348.

- Peron-Danaher, R., Blake, R., Cotrozzi, L., Mohammadi, M., & Couture, J. (2021). «Incorporating Multi-Scale, Spectrally Detected Nitrogen Concentrations into Assessing Nitrogen Use Efficiency for Winter Wheat Breeding Populations». *Remote Sensing* 13(19):3991. doi: 10.3390/rs13193991.
- Petisco, C., García-Criado, B., de Aldana, I. & García, A. (2005). «Use of near-infrared reflectance spectroscopy in predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody plant species». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382(2):458-65. Doi: 10.1007/s00216-004-3046-7.
- Savitzky, A., & Golay, M. J. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical chemistry*,36(8), 1627-1639.Doi: 10.1021/ac60214a047.
- Sorochan A., Michael, A. & Harynuk, J. (2022). «Review of Variable Selection Methods for Discriminant-Type Problems in Chemometrics». *Frontiers in Analytical Science* 2. Doi: 10.3389/frans.2022.867938.
- Stone, M., & Brooks, R. (1990). «Continuum Regression: Cross-Validated Sequentially Constructed Prediction Embracing Ordinary Least Squares, Partial Least Squares and Principal Components Regression». *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 52(2):237-58. Doi: 10.1111/j.2517-6161.1990.tb01786.x.
- Rossel, R. A. V. (2008). ParLeS: Software for chemometric analysis of spectroscopic data. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 90(1), 72-83. doi: 10.1016/j.chemolab.2007.06.006.
- Visconti, F., & de Paz, J.M. (2019). «Non-destructive assessment of chloride in persimmon leaves using a miniature visible near-infrared spectrometer». *Computers and Electronics in Agriculture* 164(July):104894. Doi: 10.1016/j.compag.2019.104894.
- Walsh, K., Blasco, J., Zude-Sasse, M., & Xudong, S. (2020). «Visible-NIR ‘point’ spectroscopy in postharvest fruit and vegetable assessment: The science behind three decades of commercial use». *Postharvest Biology and Technology* 168(June):111246. Doi: 10.1016/j.postharvbio.2020.111246.
- Yanli, L., Lyu, Q., He, S., Yi, S., Liu, X., Xie, R, Zheng, Y., & Deng, L. (2015). «Prediction of nitrogen and phosphorus contents in citrus leaves based on hyperspectral imaging». *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 8(2):80-88. Doi: 10.3965/j.ijabe.20150802.1464.
- Ye, X., Shiori, A., & Shuhuai, Z. (2020). «Estimation and mapping of nitrogen content in apple trees at leaf and canopy levels using hyperspectral imaging». *Precision Agriculture* 21(1):198-225. Doi: 10.1007/s11119-019-09661-x.
- Zhang, X., Fei, L., Yong, H, & Xiangyang, G. (2013). «Detecting macronutrients content and distribution in oilseed rape leaves based on hyperspectral imaging». *Biosystems Engineering* 115(1):56-65. Doi: 10.1016/j.biosystemseng.2013.02.007



## CAPÍTULO 3

### **Rapid Prediction of Nutrient Concentration in Citrus Leaves Using Vis-NIR Spectroscopy**

Maylin Acosta<sup>1</sup>, Ana Quiñones<sup>1</sup>, Sandra Munera<sup>2</sup>, José Miguel de Paz<sup>1</sup> and José Blasco<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Centro para el Desarrollo de la Agricultura Sostenible, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315, km 10.7, 46113 Moncada, Valencia, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Gráfica, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia, Valencia, Spain

<sup>3</sup> Centro de Agroingeniería, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315, km 10.7, 46113 Moncada, Valencia, Spain

*Sensors* **2023**,*23*(14), 6530; <https://doi.org/10.3390/s23146530>





**Abstract:** The nutritional diagnosis of crops is carried out through costly foliar ionic analysis in laboratories. However, spectroscopy is a sensing technique that could replace these destructive analyses for monitoring nutritional status. This work aimed to develop a calibration model to predict the foliar concentrations of macro and micronutrients in citrus plantations based on rapid non-destructive spectral measurements. To this end, 592 cv. 'clementina de Nules' citrus leaves were collected during several months of growth. In these foliar samples, the spectral absorbance (430-1040 nm) was measured using a portable spectrometer, and the foliar ionomics was determined by emission spectrometry (ICP-OES) for macro and micronutrients, and the Kjeldahl method to quantify N. Models based on partial least squares regression (PLS-R) were calibrated to predict the content of macro and micronutrients in the leaves. The determination coefficients obtained in the model test were between 0.31 and 0.69, the highest values being found for P, K, and B (0.60, 0.63, and 0.69, respectively). Furthermore, the important P, K, and B wavelengths were evaluated using the weighted regression coefficients (BW) obtained from the PLS-R model. The results showed that the selected wavelengths were all in the visible region (430-750 nm) related to foliage pigments. The results indicate that this technique is promising for rapid and non-destructive foliar macro and micronutrient prediction.

**Keywords:** citrus nutrition; agricultural sensors; fertilization; ionomics; chemometrics

## 1. Introduction

Citrus is one of the most popular and widespread fruit crops worldwide. According to FAO, the world production of citrus fruits was estimated at 152 million tons in 2020. Oranges are the most widely produced citrus fruit worldwide (50.5 % of the total), followed by mandarins (33.7 %), lemons (8.4 %), and grapefruit (7.4 %) (FAO, 2020). The leading citrus producer is China (32.7 million tons), followed by Brazil (16.6 million tons), India (9.8 million tons), and the United States (7.8 million tons). Spain, with a cultivated surface area of 300.504 ha, reaches a production of 6.8 million tons and is the first producer country in the EU, followed by Italy (USDA, 2020). Moreover, Spain is the foremost global provider of fresh citrus fruits, commanding approximately 25 % of the export market worldwide (CITRUS-USDA, 2020).

This high level of production requires optimal handling of resources. Among the primary agricultural inputs are those related to fertilisation management, such as nutrients. Nutrients are essential elements for the growth and productivity of crops and can be categorized as macronutrients and micronutrients based on the relative amounts required by plants (Marschner, 2012). Reducing unnecessary fertilizer use helps to reduce costs, improve fruit quality, and minimize the risk of contamination. Excess or nutritional deficiency can affect vegetative development and crop yield.

Sixteen elements are considered essential nutrients for the optimum development of crops. These nutrients include carbon (C), oxygen (O), hydrogen (H), nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), sulphur (S), iron (Fe), manganese (Mn), zinc (Zn), copper (Cu), boron (B), molybdenum (Mo), chlorine (Cl), and nickel (Ni). Plants absorb C and O from the air through the leaves as carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). The photosynthesis process transforms CO<sub>2</sub> and water into H, C, and O. The other nutrients are absorbed through the root system or foliar surface and must be supplied during the growth cycle following fertilization plans (Millard, 1996).

Macronutrients are essential elements for plants and are required in relatively large amounts. Nitrogen is a major factor in photosynthesis since chlorophyll molecules contain this nutrient (Bassi et al. 2018; Payne et al. 2017), and it is the nutrient that affects, to a greater extent, the vegetative development of the plant. Phosphorus intervenes in the transport, storage, and transfer of energy, stimulating root development and favouring the flowering and fruit set. Potassium is the element that influences production the most since the fruit is the main sink of this nutrient. Calcium is crucial in activating and regulating various cellular processes, including cell division and elongation. It also influences the organization of cells, particularly concerning the specialization of cell organelles and the translocation of carbohydrates. Magnesium is part of the chlorophyll molecule (photosynthesis), a constituent of cell walls, and plays a vital role in P translocation and N assimilation. Regarding micronutrients, S is the key to protein synthesis, a component of sulphur containing AA (cysteine and methionine) and is part of vitamins and coenzymes. Iron deficiency is common in calcareous soils. It is an essential element for the growth and development of plants since it participates in numerous enzymatic and metabolic processes and the synthesis of chlorophyll. Zinc is part of the chlorophyll molecule (photosynthesis), and Mn is bound to Fe for chlorophyll formation (photosynthesis). Copper is involved in photosynthesis and carbohydrate metabolism. Boron is necessary for lignin biosynthesis, involving cell division and root elongation (Quiñones et al. 2010). Molybdenum is a key component in two enzymes that convert nitrate to nitrite and ammonia. Its absence prevents the correct transformation of N into amino acids. Chloride is essential for plant growth but is absorbed by plants in minimal quantities. Finally, Ni is necessary for N metabolism and plant germination.

Therefore, nutritional diagnosis is essential for efficient fertilisation management, especially at the early stages of crop development when it influences the production quality. Traditionally, the nutritional status of plants is determined via a leaf ionomic

analysis carried out in a laboratory to know the concentration of nutrients (Shenk et al. 1979). The results of these laboratory analyses are compared with the published reference levels at different phenological stages to make sustainable and efficient recommendations on fertilization. However, leaf ionomic analyses are complex, expensive, and time-consuming and involve high reagent costs and negative environmental impact. Optical sensors are emerging as a faster, more economical alternative to nutritional diagnosis. These sensors can measure the electromagnetic energy reflected, absorbed, or transmitted by vegetation (spectral signature) at different wavelengths. Biotic or abiotic stresses, diseases or nutritional deficiencies affect this energy and the spectral signature. It can, therefore, be related to crop nutritional status (Carter, 1998; Mcvicar et al. 2003). Visible and near-infrared (Vis-NIR) spectroscopy is the most used technology to obtain these measurements (Walsh et al. 2020). In this context, Vis-NIR spectroscopy has shown potential as a fast, non-destructive method for analysing several plant features (dos Santos et al. 2023; Guo et al. 2019; Ling et al. 2019; Rodrigues et al. 2020). The principle is based on biochemical changes that result in photosynthetic activity, cell structure, and stability of chemical bond variations, promoting changes in reflectance (Ling et al. 2019).

Several studies have confirmed the potential of spectroscopy to obtain the concentration of nutrients in different crops. In citrus leaves, Menessatti et al. (2012), predicted K and N with high accuracy using Vis-NIR spectroscopy and leaves from trees with different N treatments. In different species of citrus leaves, Galvez-Sola et al. (2015) determined N, K, Ca, Mg, B, Fe, Cu, Mn, and Zn concentrations using Fourier Transform NIR (FT-NIR) spectroscopy. In other fruit trees, Phanomsophon et al. (2022) calibrated models based on partial least squares (PLS-R) to predict N and K concentration levels in durian leaves with higher accuracy. In vine leaves, Cuq et al. (2020) studied the nutritional status of P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, and B contents in different vine organs (leaf blades, petioles and berries) using PLS models. The best prediction model was shown for Ca and Mg with  $R^2 = 0.88, 0.70, 0.72$  and  $0.60, 0.72, \text{ and } 0.80$  for limbs, petioles, and berries, respectively. In wheat and oats, N and Mg deficiencies were found to cause a great increase in reflectance in both Vis and NIR spectral ranges, and deficiencies of P and K resulted in a decrease in the 412 to 770 nm range. Additionally, Johnson et al. (2021) found that the combination of NIR and mid-infrared (MIR) ranges showed good potential for the determination of both macronutrient (N, P, K, Ca, Mg, and S) and micronutrient (Na, Fe, Mn, B, Cu, Mo, and Zn) concentrations in rice plants (straw and paddy) using PLS. In sugarcane, Yarce et al. (2012) found high correlations using the NIR region to predict macro and micronutrients (Ca, Mg, N, P, K, Cu, Zn, Mn, and Fe) and Chen

et al. (2002) used the same spectral region to predict P. More recent work has been carried out to study the nutrient concentration in persimmon leaves, achieving better results using spectroscopy (Acosta et al. 2023a) than hyperspectral imaging (Acosta et al. 2023b).

The European Union (EU) is committed to promoting sustainable agriculture and reducing the use of fertilizers by 50 % by 2030 as part of its European Green Deal and Farm to Fork strategy. To achieve this goal, developing tools and robust predictive models for nutrient assessment is essential to further developing rational fertilization plans. Each plant species and variety has its own nutritional needs. Therefore, it is essential to understand the specific nutritional requirements of the variety to ensure optimal plant health and productivity. Few studies conducted to determine nutrients in citrus leaves using Vis-NIR spectroscopy have been found. This work advances the development of a non-destructive tool for the prediction of the foliar concentrations of macro (N, P, K, Ca, and Mg) and micronutrients (Na, S, Fe, Cu, Mn, Zn, B) in citrus leaves based on Vis-NIR spectroscopy, using a portable field spectrometer. This tool would boost the establishment of rational fertilisation programmes.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Samples**

The study was carried out on an eight-year-old trees commercial plot of clementine mandarins (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) grafted on two rootstocks, *Citrus macrophylla* and *Citrango carrizo*. The plot was located in Almenara (Castellón), Spain (39°44'59.75" N and 0°13'39.76" W), on a loam-clay soil with good drainage and a depth greater than 1.5 m with a total area of 72.2 ha. Table 1 shows the amount of nutrients applied in the experimental plot. These doses are recommended for citrus cultivation in Mediterranean growing conditions (Quiñones et al. 2010).

Leaf samplings were carried out in June, July, September, October, November 2020, and January 2021 to enhance the variability of foliar nutrient concentrations. Each month, 12 samples of eight spring flush leaves from the non-fruiting shoots were randomly collected and separately bagged. The eight leaves in the same bag were later used for every ionic analysis. A total of 592 leaves were collected because the last sampling included 16 more leaves. The samples were transported to The laboratory was washed with deionised water and placed on a paper towel to dry the moisture.

**Table 1.** Fertiliser units (kg/ha) applied to the experimental plot.

Annual Dose	Chemical Compound (Kg/ha)
N	240
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	80
K <sub>2</sub> O	140
MgO	180
Fe	1

## 2.2. Spectral Acquisition

The CI-710 Miniature Leaf Spectrometer (CID Bio-Science, Inc. Camas, Washington, USA) was used to record the spectra of the leaves. This fully portable spectrometer can measure Vis-NIR transmittance, absorbance or reflectance spectrum between 345 and 1050 nm. The radiation source emitted consists of a combination of a blue LED and an incandescent lamp, and a clip system protects the measurement area from interference from the environmental light. Measurements were taken in 232 bands in the spectral range 430-1040 nm at intervals of 2.6 nm. The spectral measurements were performed in absorbance mode at two leaf points, one near the apex and the other near the petiole. The average spectrum of these two points was obtained. Figure 1 shows the acquisition of the spectrum of the citrus leaf at a point on the leaf, specifically at the apex, in absorbance mode, with the CI-710 spectrometer.



**Figure 1.** Spectral acquisition of citrus leaves in absorbance mode.

## 2.3. Foliar Ionic Analysis

After the spectral measurements, the leaves were dried in a forced air oven at 65 °C for a minimum of 72 h and ground to 1 mm with a water-cooled mill (IKA M 20, IKA Labortechnik, and Staufen, Germany). Ionic analyses were then performed using eight leaves for every single analysis. The Kjeldahl method (Bodenkunde,

1982) was used for organic N analysis using a Tecator Kjeltec 8200 TM Digestor (FOSS, Denmark). The other macro and microelements were determined by an inductively coupled plasma optical emission spectrometry iCAP 7000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Nutrient extraction was performed by wet digestion using a microwave (Milestone ETHOS UP, Sorisole, and BG. Italy). 0.2 g of the crushed dry samples were weighed, and 4 mL of MilliQ, 4 mL of nitric acid (HNO<sub>3</sub>) and 2 mL of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were added to each sample. The tubes were kept at 200 °C for 15 to 20 min. Once digestion had finished, the extracts were diluted in 25 mL tubes and micronutrient concentrations were analysed in the ICP. The concentration was calculated through Equation (1).

$$\text{Micronutrient concentration} = ((a - b) \times V) / P \quad (1)$$

where  $a$  was the concentration of Fe, Zn, Mn, Cu, and B in the solution of the digestion of the foliar sample (mg·L<sup>-1</sup>);  $b$  was the concentration of these nutrients in the blank (mg·L<sup>-1</sup>);  $V$  was the final volume of digestion (25 mL); and  $P$  was the dry weight of the sample digested. An aliquot of 0.5 mL was taken from the extraction solution to determine the macronutrients, and it was made up to 10 mL with milliQ water. The concentration was calculated using Equation (2).

$$\text{Macronutrient concentration} = ((a - b) \times Vd) / (P \times 1000) \quad (2)$$

where  $a$  was the concentration of P, K, Mg, Ca, and S in the aliquot from the digestion of the sample (mg L<sup>-1</sup>);  $b$  was the concentration of these nutrients in the blank (mg L<sup>-1</sup>);  $V$  was the final volume of digestion (25 mL);  $P$  was the dry weight of the sample digested; and  $d$  was the dilution factor.

Mo, Cl, and Ni were not included in the analysis since these nutrients were recently considered essential elements in plants (Marschner, 1985), and, hence, the focus was placed on the nutrients with reference values for nutritional diagnosis that had already been established.

#### 2.4. Chemometric Analysis

The two spectra obtained from each sample were averaged to obtain a single value per leaf and correlated with the nutrient concentrations determined by ionic analysis. Five pre-treatments were applied to the spectra. Mean centre (MC) was used to centre each variable by subtracting the mean of all the elements of that variable (Ulissi et al. 2011). Savitzky-Golay (SG) smoothing (Savitzky & Golay, 1964) was applied to reduce random noise and increase the signal-to-noise ratio. A reduction in dispersion was performed through Standard Normal Variate (SNV)

(Barnes et al. 1989), while the first (1D) and the second derivatives (2D) were used to eliminate constant baseline offsets and offsets that vary linearly with wavelength (Alchanatis et al. 2005). Models combining MC with the other techniques were trained and tested.

PLS-regression (PLS-R) is a common technique to establish a correlation between sample spectra and the properties of interest, such as nutrient concentration (Furlanetto et al. 2020). In this work, PLS-R models were trained to predict the nutrient content in citrus leaves (Lindgren et al. 1993). A separate model was developed for each nutrient by creating a table with the leaf samples as rows and pre-treated spectra (X-variables) as columns. An additional column was added to each table to include the actual nutrient concentration values obtained from ionic analyses, which served as the variable to be predicted (Y-variable). Samples were randomly divided into a training set (75 %) for calibration and an independent test set (25 %) for external validation. We checked that there were no statistical differences in the nutrient concentrations of both tests. The training set was used for calibration and cross-validation (CV), while the test set was for external validation. Parameter optimisation is essential to improve the efficiency and accuracy in the development of models (Dimov et al. 2015; Todorov & Dimov, 2020). CV was employed to determine the optimal number of PLS-R latent variables (LV) and estimate the model uncertainty in the training set (Cawley & Talbot, 2003). The model with the lowest root-mean-square error (RMSE) and the highest coefficient of determination ( $R^2$ ) in the test of the model was selected, along with the LV used to calibrate a robust model. LV refers to a series of factors used to build a reliable model, and a smaller number of components with a lower error indicate a higher level of prediction accuracy (Wold et al. 2001).

In addition, a study was also conducted to determine whether a subset of wavelengths is important for predicting nutrients. In this work, the weighted regression coefficients (BW) of the PLS-R model were used to determine the wavelengths of interest for the prediction of micro and macro elements. This method measures the association between each wavelength and the content of the element under study, where wavelengths with large absolute BW coefficient values are the most important in the model (Mehmood et al. 2012). The BW coefficients were calculated directly from the PLS loadings corresponding to the model with the optimum number of LV (Frenich et al. 1995). This selection was only applied to the PLS-R models with an  $R^2$  higher than 0.60.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Descriptive Statistics of the Foliar Macro and Micronutrient Concentrations

Table 2 shows the descriptive statistical values of foliar macro and micronutrient concentrations of the leaves taken throughout the crop cycle, as determined by ionic procedures. This table summarises the values found for all samples, but the calibration and validation sets had very similar values and distribution for the concentrations. The values obtained for the sampling carried out in November are shown in brackets since it is considered the optimal date for the nutritional diagnosis of citrus. N and Cu nutrients were found to be deficient. The value obtained for P was low. Nutrients such as K, Na, S, Fe, Mn, Zn, and B yielded an optimum value. The results obtained for Ca and Mg were high. The classification was developed according to the reference parameters described in Quiñones et al. (2010).

**Table 2.** *Ionic analysis of the citrus leaves. Concentrations are expressed in % for macronutrients (N, P, K, Ca, Mg, Na, S) and mg/kg for micronutrients (Fe, Cu, Mn, Zn, B) based on the dry matter weight.*

	N	P	K	Ca	Mg	Na	S	Fe	Cu	Mn	Zn	B
November	1.94	0.11	0.83	5.65	0.52	0.03	0.33	83.13	3.03	25.1	26.7	46.61
Mean	2.1 (D)	0.13 (L)	1.00 (O)	4.01 (H)	0.41 (H)	0.03 (O)	0.28 (O)	72.26 (O)	3.95 (D)	22.32 (O)	28.51 (O)	41.88 (O)
Max	2.78	0.22	1.71	6.57	0.68	0.06	0.37	149.9	14.8	54.93	57.64	94.9
Min	1.48	0.05	0.36	1.05	0.12	0.01	0.16	28.9	0.75	6.34	3.48	21.57
SD	0.29	0.04	0.35	1.36	0.13	0.01	0.05	27.65	2.77	11.44	14.25	12.12
Median	2.06	0.14	0.96	4.18	0.41	0.03	0.29	65.75	3.19	20.98	27.48	41.13

SD: standard deviation; D = deficient; L = low; O = optimum; H = high. The values obtained in November are shown in brackets.

#### 3.2. PLS-R Models for Macro and Micronutrients Estimation

Table 3 presents the predictive results for each element using PLS-R with the optimal spectra pre-treatment. The macronutrients P, K, and Ca showed the highest accuracy for calibrating the models using CV. The P model was calibrated using 10 LVs and MC, with an  $R^2$  of 0.66 being obtained. The K model was calibrated using 12 LVs and MC + SNV, with an  $R^2$  of 0.58, while Ca was calibrated using 7 LVs and MC + 1D, an  $R^2$  of 0.63 being obtained. Using the test set, an  $R^2$  of 0.60 was achieved for P, and the K model obtained an  $R^2$  of 0.63. However, the  $R^2$  for Ca was lower (0.53). In the case of N, the performance of the model was lower, with an  $R^2$  of 0.57 being obtained. Regarding the micronutrients, the model for B was the most accurate in



calibration and testing. This model was calibrated using 7 LV and MC + 1D, an  $R^2$  of 0.64 being obtained in the CV and an  $R^2$  of 0.69 in the test. In all cases, a relatively low RMSE was achieved.

**Table 3.** Results for calibration, cross-validation, and test sets using PLS-R.

Nutrient	Pre-Treatment	LVs	Calibration		Cross-Validation		Test Set	
			RMSE	$R^2$	RMSE	$R^2$	RMSE	$R^2$
N	MC	10	0.18	0.58	0.18	0.55	0.19	0.57
P	MC	10	0.02	0.69	0.02	0.66	0.02	0.60
K	MC + SNV	12	0.21	0.65	0.23	0.58	0.22	0.63
Ca	MC + 1D	7	0.65	0.67	0.69	0.63	0.73	0.53
Mg	Raw	9	0.08	0.52	0.08	0.47	0.08	0.47
S	MC	11	0.02	0.52	0.03	0.48	0.03	0.44
Fe	MC	7	24.93	0.48	24.93	0.46	24.39	0.48
Cu	Raw	9	0.93	0.33	0.95	0.29	0.93	0.31
Mn	MC + SNV	12	7.73	0.53	8.42	0.44	8.07	0.49
Zn	MC + 1D	7	9.94	0.50	10.52	0.44	10.25	0.46
B	MC + 1D	7	5.26	0.70	5.75	0.64	5.83	0.69

LV: Latent variables; RMSE: Root mean square error; MC: mean centre; SNV: standard normal variate; 1D: first derivative.

The results for macronutrient prediction were particularly noteworthy for P and K:  $R^2 = 0.60$  using MC and  $R^2 = 0.63$  using MC + SNV, respectively. B had the highest prediction accuracy for micronutrients, with an  $R^2 = 0.69$  obtained using an MC + 1D pre-treatment. The models were less accurate for the rest of the micro and macronutrients ( $R^2 < 0.60$ ). Comparable results were achieved in previous scientific literature, but this study has unique features that make the outcomes closer to natural crop stages. In citrus Osco et al. (2020), predicted the concentration of macro and micronutrients in ‘Valencia’ orange leaves using a handheld spectroradiometer in the spectral range of 380 to 1020 nm. For the macronutrients, the  $R^2$  range was between 0.62 and 0.90. However, the study was based on a limited test set of 32 leaves and had several misconceptions. The methods used were primarily for classification rather than regression, making it unclear how the coefficients of determination were obtained.

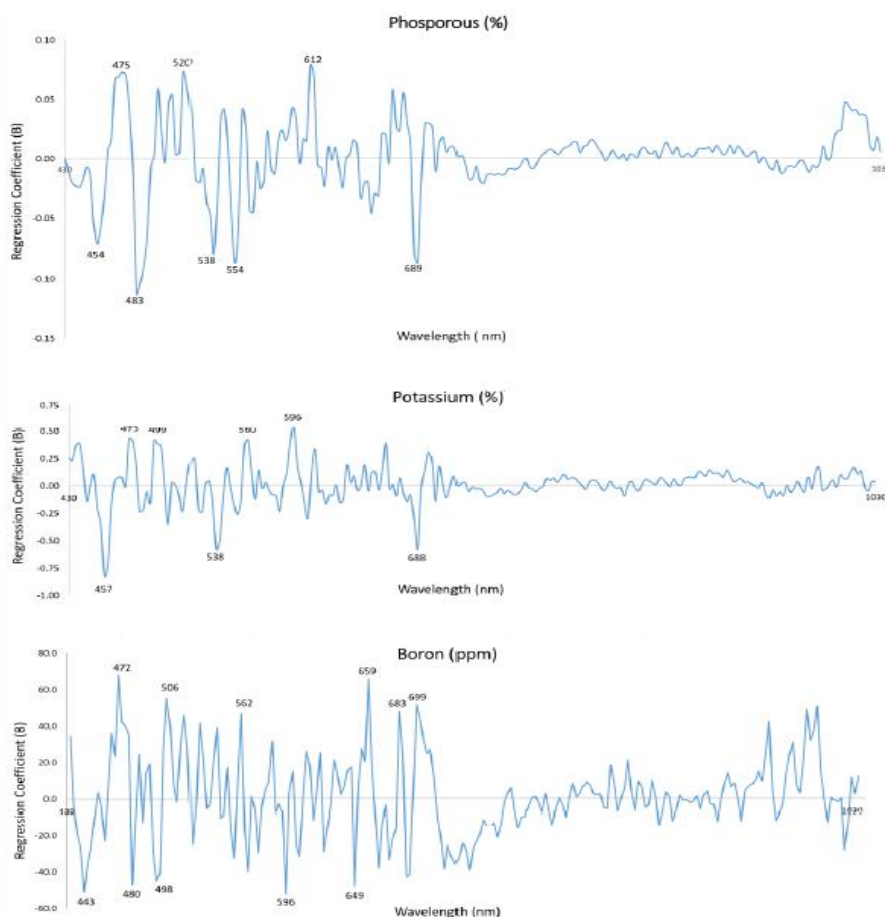
Additionally, the number of leaves required for chemical analysis was not stated, and only one leaf might not suffice to obtain the minimum amount required as with traditional methods. In six different citrus tree species Galvez-Sola et al. (2015) used FT-NIR (830-2600 nm) to predict macronutrients, achieving  $R^2$  values ranging from 0.88 to 0.99. However, the spectral measurements were conducted on powdered leaf samples, thus forfeiting some of the primary advantages of these methods, such as

simplicity and non-destructiveness, and avoiding the need to process the samples. Since the different citrus species exhibit varying nutrient concentrations, the results could be influenced by intrinsic species-specific factors. Obtaining practical results would, therefore, require independent knowledge of the predictions for each species. In citrus, Menesatti et al. (2012) employed Vis-NIR spectroscopy to determine macronutrient levels in 20 Tarocco leaves. They observed high  $R^2$  for all nutrients except for P. However, the experimental setup involved using a randomised block design with five rates of N input at varying levels, ranging from 0 to 800 g N per tree per year, from no N to twice the typical recommendations. As a result, the models could predict extreme cases of nutrient deficiency or excess, but their ability to accurately predict or differentiate nutrient concentrations under more typical fertilisation rates was not demonstrated. On the contrary, the present study successfully captured the natural variability of nutrient values observed in the field throughout the season under commercial recommendations.

### **3.3. Evaluation of Relevant Wavelengths for Prediction**

Figure 2 shows the BW coefficients with the associated wavelengths for the most accurate models (P, K and B). The important wavelengths selected for P, K, and B were close to 440-530 nm and 560-690 nm. For P, the selected wavelengths, in order of importance, were 483, 554, 689, 538, 454, 475, 520, and 612 nm. For K, they were 457, 538, 596, 688, 475, 560, and 499 nm, and for B, they were 472, 659, 506, 596, 443, 649, 683, 480, 562, 498, and 699 nm. The selected wavelengths were all situated in the visible region (430-750 nm), related to photosynthetic pigments that absorb about 90% or more of the incoming light (Gates, 1965). In contrast, there are no strongly absorbing molecules in the NIR, so plants refract or transmit all but about 10% of the incoming radiation in this region (Jacquemoud, 2008). This is also compatible with the fact that deficiency or excess of some nutrients can affect pigment accumulation in leaves, which influences the absorption or refraction of specific wavelengths of visible light. These photosynthetic pigments in the leaves are mainly chlorophylls (Sonobe et al. 2018) and carotenoids (Gitelson et al. 2002), which play a crucial role in plant photosynthesis. In this process, the plant forms sugars from the energy received from sunlight and  $CO_2$  that the plant absorbs. Chlorophylls are divided into chlorophyll a and chlorophyll b, which are responsible for the characteristic green colour of leaves with an absorption of carotene b and xanthophylls and exhibit strong light absorption in the blue region of the spectrum (450-500 nm) (Demmig-Adams et al. 1996).

Few studies have identified which individual wavelengths are the most important in predicting macro and micronutrients in citrus leaves. Osco et al. (2020) used a Vis-NIR spectroradiometer to identify the optimal wavelengths and observed that all bands selected to predict P were found in the visible region, while for K, they were located only in the NIR region. In apple leaves, Azadnia et al. (2023) used Vis-NIR spectroscopy and variable importance in projection (VIP) scores to select the most important wavelengths for P and K.



**Figure 2.** BW coefficients from PLS-R models of P, K, and B.

For P, all the selected bands were also located mainly in the visible region (between 575 and 700 nm), except for one that was selected around 970 nm. In the case of K, they found six spectral regions in the visible (between 505 and 700 nm) and NIR (between 920 and 965 nm).

This technology provides a detailed analytical view of nutrient content in plants for rapid non-destructive estimates of macro and micronutrients in leaves, which will pave the way to the planning of better and more efficient fertilisation systems under a precision agriculture strategy. However, little research has been performed on alternative techniques, such as Vis-NIR spectroscopy, for macro and micronutrient prediction in orchard crops. The results indicated that it is possible to perform relatively accurate predictions for some nutrients, such as P, K, and B, while it is necessary to continue working to achieve better models for others. Important wavelengths have been found only in the visible part of the spectrum, which can guide future work to advance in this direction. Chemometric methods are possibly the primary approach to analyse spectral data. However, algorithms based on deep learning approaches could be further trained and optimized to achieve robust results capturing the variability found in the samples throughout the entire season. Moreover, this work also advances the achievement of future field measurements for macro and micronutrient prediction. Currently, there are no portable spectral devices aimed at estimating nutrient concentration, and the closest solutions come from chlorophyll meters used to estimate N, with limited success.

#### **4. Conclusions**

This work has studied the potential of Vis-NIR spectroscopy to predict the concentration of nutrients in cv. 'Clementina de Nules' citrus leaves through a vegetative cycle as a faster and non-destructive alternative to foliar ionic analyses. The results showed a good ability ( $R^2 > 0.60$ ) to estimate the concentrations of P, K, and B with relatively low RMSE for the independent prediction set. The other nutrients studied were estimated with relatively lower performance. Effective wavelengths were found in the visible region for P, K, and B using the BW coefficients, which suggest that this region contains the most relevant information for nutrient prediction. Hence, future works should focus on it.

#### **Funding**

This work is co-financed by the PNDR and GVA-IVIA (projects 52203, 52204 and by the EU through the ERDF of GVA 2021–2027).

#### **Acknowledgments**

Maylin Acosta thanks IFARHU-SENACYT for the Professional Excellence Scholarships, contract No. 270-2021-020. Sandra Munera thanks the Juan de la Cierva-Formación contract (FJC2021-047786-I) co-funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and EU NextGenerationEU/PRTR.

## Abbreviations

Artificial neural networks (ANN)	Molybdenum (Mo)
Boron (B)	Multiple linear regression (MLR)
Calcium (Ca)	Near infrared (NIR)
Carbon (C)	Nitrogen (N)
Carbon dioxide (CO <sub>2</sub> )	Nickel (Ni)
Chlorine (Cl)	Oxygen (O)
Chlorophyll a (Chl-a)	Partial least squares (PLS)
Chlorophyll b (Chl-b)	PLS-regression (PLS-R)
Copper (Cu)	Phosphorus (P)
Cross-validation (CV)	Principal component regression (PCR)
Emission spectrometry (ICP-OES)	Random forest (RF)
First derivative (1D)	Root mean square error (RMSE)
Fourier Transform NIR (FT-NIR)	Standard normal variate (SNV)
Hydrogen (H)	Sulphur (S)
Iron (Fe)	Support vector machine (SVM)
Latent variables (LV)	Variable importance in projection (VIP)
Magnesium (Mg)	Visible (Vis)
Manganese (Mn)	Weight regression coefficients (BW)
Mean centre (MC)	Zinc (Zn)

## References

- Acosta, M., Rodríguez-Carretero, I., Blasco, J., de Paz, J. M., & Quiñones, A. (2023b). Non-Destructive Appraisal of Macro- and Micronutrients in Persimmon Leaves Using Vis-NIR Hyperspectral Imaging. *Agriculture*, 13(4), 916. <https://doi.org/10.3390/agriculture13040916>
- Acosta, M., Visconti, F., Quiñones, A., Blasco, J., & de Paz, J. M. (2023a). Estimation of Macro and Micronutrients in Persimmon (*Diospyros kaki* L.) cv. 'Rojo Brillante' Leaves through Vis-NIR Reflectance Spectroscopy. *Agronomy*, 13(4), 1105. <https://doi.org/10.3390/agronomy13041105>
- Alchanatis, V., Schmilovitch, Z., & Meron, M. (2005). In-field assessment of single leaf nitrogen status by spectral reflectance measurements. *Precision Agriculture*, 6(1), 25-39. <https://doi.org/10.1007/s11119-005-0682-7>
- Azadnia, R., Rajabipour, A., Jamshidi, B., & Omid, M. (2023). New approach for rapid estimation of leaf nitrogen, phosphorus, and potassium contents in apple-trees using Vis-NIR spectroscopy based on wavelength selection coupled with machine learning. *Computers and Electronics in Agriculture*, 207, 107746. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2023.107746>
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied spectroscopy*, 43(5), 772-777.
- Bassi, D., Menossi, M., & Mattiello, L. (2018). Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf. *Scientific Reports*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20653-1>
- Young, J. L., & Aldag, R. W. (1982). Inorganic forms of nitrogen in soil. *Nitrogen in agricultural soils*, 22, 43-66.
- Carter, G. A. (1998). Reflectance wavebands and indices for remote estimation of photosynthesis and stomatal conductance in pine canopies. *Remote Sensing of Environment*, 63(1), 61-72. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(97\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(97)00110-7)
- Cawley, G. C., & Talbot, N. L. C. (2003). Efficient leave-one-out cross-validation of kernel fisher discriminant classifiers. *Pattern Recognition*, 36(11), 2585-2592. [https://doi.org/10.1016/S0031-3203\(03\)00136-5](https://doi.org/10.1016/S0031-3203(03)00136-5)
- Chen, M., Glaz, B., Gilbert, R. A., Daroub, S. H., Barton, F. E., & Wan, Y. (2002). Near-infrared reflectance spectroscopy analysis of phosphorus in sugarcane leaves. *Agronomy Journal*, 94(6), 1324-1331. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.1324>
- Cuq, S., Lemetter, V., Kleiber, D., & Levasseur-Garcia, C. (2020). Assessing macro- (P, K, Ca, Mg) and micronutrient (Mn, Fe, Cu, Zn, B) concentration in vine leaves and grape berries of *vitis vinifera* by using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Computers and Electronics in Agriculture*, 179, 105841. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105841>
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M., & Iii, W. W. A. (1996). In vivo functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal*, 10(4), 403-412. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.4.8647339>

- Cuq, S., Lemetter, V., Kleiber, D., & Levasseur-Garcia, C. (2020). Assessing macro- (P, K, Ca, Mg) and micronutrient (Mn, Fe, Cu, Zn, B) concentration in vine leaves and grape berries of *Vitis vinifera* by using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Computers and Electronics in Agriculture*, *179*, 105841. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105841>
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M., & Iii, W. W. A. (1996). In vivo functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal*, *10*(4), 403-412. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.4.8647339>
- Dimov, I., Georgieva, R., & Todorov, V. (2014). Balancing of systematic and stochastic errors in Monte Carlo algorithms for integral equations. In *International Conference on Numerical Methods and Applications* (pp. 44-51). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-15585-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-15585-2_5)
- dos Santos, G. L. A. A., Reis, A. S., Besen, M. R., Furlanetto, R. H., Rodrigues, M., Crusiol, L. G. T., & Nanni, M. R. (2023). Spectral method for macro and micronutrient prediction in soybean leaves using interval partial least squares regression. *European Journal of Agronomy*, *143*, 126717. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2022.126717>
- Frenich, A. G., Jouan-Rimbaud, D., Massart, D. L., Kuttatharmmakul, S., Galera, M. M., & Vidal, J. M. (1995). Wavelength selection method for multicomponent spectrophotometric determinations using partial least squares. *Analyst*, *120*(12), 2787-2792. <https://doi.org/10.1039/an9952002787>
- Galvez-Sola, L., García-Sánchez, F., Pérez-Pérez, J. G., Gimeno, V., Navarro, J. M., Moral, R., & Nieves, M. (2015). Rapid estimation of nutritional elements on citrus leaves by near infrared reflectance spectroscopy. *Frontiers in plant science*, *6*, 148942. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00571>
- Gates, D. M. (1965). Energy, plants, and ecology. *Ecology*, *46*(1-2), 1-13.
- Gitelson, A. A., Zur, Y., Chivkunova, O. B., & Merzlyak, M. N. (2002). Assessing carotenoid content in plant leaves with reflectance spectroscopy. *Photochemistry and photobiology*, *75*(3), 272-281. <https://doi.org/10.1562/0031-8655>
- Guo, T., Tan, C., Li, Q., Cui, G., & Li, H. (2019). Estimating leaf chlorophyll content in tobacco based on various canopy hyperspectral parameters. *Journal of Ambient Intelligence and Humanized Computing*, *10*(8), 3239-3247. <https://doi.org/10.1007/s12652-018-1043-5>
- Jacquemoud S, U. S. (2008). *Modeling leaf optical properties*. *Photobiological Sciences Online*. Photobiological Sciences Online. Environmental Photobiology. <http://www.photobiology.info/#Environ>. [Accessed Nov 27,2018].
- Johnson, J. M., Sila, A., Senthilkumar, K., Shepherd, K. D., & Saito, K. (2021). Application of infrared spectroscopy for estimation of concentrations of macro-and micronutrients in rice in sub-Saharan Africa. *Field Crops Research*, *270*, 108222. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108222>
- Lindgren, F., Geladi, P., & Wold, S. (1993). The kernel algorithm for PLS. *Journal of Chemometrics*, *7*(1), 45-59. <https://doi.org/10.1002/cem.1180070104>
- Ling, B., Goodin, D. G., Raynor, E. J., & Joern, A. (2019). Hyperspectral analysis of leaf pigments and nutritional elements in tallgrass prairie vegetation. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00142>

- Mcvicar, T. R., Briggs, P. R., King, E. a, & Raupach, M. R. (2003). A Review of Predictive Modelling from a Natural Resource Management Perspective: The Role of Remote Sensing of the Terrestrial Environment by CSIRO Land and Water and the CSIRO Earth Observation Centre. *Earth*.
- Mehmood, T., Liland, K. H., Snipen, L., & Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *118*, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.07.010>
- Menesatti, P., Pallottino, F., Antonucci, F., Rocuzzo, G., Intrigliolo, F., & Costa, C. (2012). Non-destructive proximal sensing for early detection of citrus nutrient and water stress. *Advances in Citrus Nutrition, January*, 113-123. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3_9)
- Millard, P. (1996). Ecophysiology of the internal cycling of nitrogen for tree growth. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, *159*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1002/jpln.1996.3581590102>
- Oscó, L. P., Ramos, A. P. M., Pinheiro, M. M. F., Moriya, É. A. S., Imai, N. N., Estrabis, N., Ianczyk, F., de Araújo, F. F., Liesenberg, V., de Castro Jorge, L. A., Li, J., Ma, L., Gonçalves, W. N., Marcato, J., & Creste, J. E. (2020). A machine learning framework to predict nutrient content in valencia-orange leaf hyperspectral measurements. *Remote Sensing*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/rs12060906>
- Payne, R. J., Dise, N. B., Field, C. D., Dore, A. J., Caporn, S. J. M., & Stevens, C. J. (2017). Nitrogen deposition and plant biodiversity: Past, present, and future. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *15*(8), 431-436. <https://doi.org/10.1002/fee.1528>
- Phanomsophon, T., Jaisue, N., Tawinteung, N., Khurnpoon, L., & Sirisomboon, P. (2022). Classification of N, P, and K concentrations in durian (*Durio Zibethinus Murray cv. Mon Thong*) leaves using near-infrared spectroscopy. *Engineering and Applied Science Research*, *49*(1), 127-132.
- Quiñones, A., Martínez-Alcántara, B., Primo-Millo, E., & Legaz, F. (2012). Fertigation: Concept and application in citrus. *Advances in citrus nutrition. Springer, Dordrecht.*, 281-301.
- Rodrigues, M., Nanni, M. R., Cezar, E., dos Santos, G. L. A. A., Reis, A. S., de Oliveira, K. M., & de Oliveira, R. B. (2020). Vis-NIR spectroscopy: From leaf dry mass production estimate to the prediction of macro- and micronutrients in soybean crops. *Journal of Applied Remote Sensing*, *14*(04). <https://doi.org/10.1117/1.jrs.14.044505>
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1993). Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. *Infrasoft International*.
- Sonobe, R., Sano, T., & Horie, H. (2018). Using spectral reflectance to estimate leaf chlorophyll content of tea with shading treatments. *Biosystems Engineering*, *175*, 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2018.09.018>
- Todorov, V., & Dimov, I. (2020). Efficient stochastic approaches for multidimensional integrals in bayesian statistics. In *Large-Scale Scientific Computing: 12th International Conference, LSSC 2019, Sozopol, Bulgaria, June 10–14, 2019, Revised Selected Papers 12* (pp. 454-462). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41032-2\\_52](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41032-2_52)



- Ulissi, V., Antonucci, F., Benincasa, P., Farneselli, M., Tosti, G., Guiducci, M., Tei, F., Costa, C., Pallottino, F., Pari, L., & Menesatti, P. (2011). Nitrogen concentration estimation in tomato leaves by VIS-NIR non-destructive spectroscopy. *Sensors*, *11*(6), 6411-6424. <https://doi.org/10.3390/s110606411>
- United States Department of Agriculture (USDA). (2020). *Citrus: World Market and Trade. Foreign Agriculture Service*. <https://fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>. [Accessed May 04, 2021]
- Walsh, K. B., Blasco, J., Zude-Sasse, M., & Sun, X. (2020). Visible-NIR ‘point’ spectroscopy in postharvest fruit and vegetable assessment: The science behind three decades of commercial use. *Postharvest Biology and Technology*, *168*, 111246. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111246>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *58*(2), 109-130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- Yarce, C. J., & Rojas, G. (2012). Near infrared spectroscopy for the analysis of macro and micronutrients in sugarcane leaves. *Zuckerindustrie*, *137*(11), 707-710. <https://doi.org/10.36961/si13611>
- Young, J. L., & Aldag, R. W. (1982). Inorganic forms of nitrogen in soil. *Nitrogen in agricultural soils*, *22*, 43-66.



## CAPÍTULO 4

### **Estimating the concentration of macro- and micronutrients in spring citrus leaves using Vis-NIR hyperspectral imaging**

Maylin Acosta<sup>a</sup>, Ana Quiñones<sup>a</sup>, Alejandro Rodríguez-Ortega<sup>b</sup>, Isabel Rodríguez-Carretero<sup>a</sup>, José Blasco<sup>c</sup>, Sandra Munera<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Centro para el Desarrollo de la Agricultura Sostenible, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315, km 10.7, 46113 Moncada, Valencia, Spain.

<sup>b</sup>Departamento de Ingeniería Gráfica, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia, Valencia, Spain.

<sup>c</sup>Centro de Agroingeniería, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), CV-315, km 10.7, 46113 Moncada, Valencia, Spain.



**Abstract:** Accurately fertilising citrus trees requires a precise understanding of the plant's nutritional status. Traditionally, complex, and expensive ionic analyses of leaves have been used for this purpose. An alternative approach to ionic analyses involves hyperspectral imaging (HSI), which has been successfully applied to other crops. Moreover, carefully selecting leaves, which act as nutrient reserves for other developing organs, is crucial for obtaining accurate results in nutritional diagnosis. This work aimed to estimate the concentrations of macro and micronutrients of 'Clementina de Nules' citrus trees using visible and near-infrared HSI, discriminating in advance the young leaves (from spring sprouting) from old leaves (previous cycles). Leaf samples were collected during two consecutive seasons in a commercial orchard: in the first season, 480 (including both young and old leaves) were collected in May, and in the subsequent season, 640 spring flush leaves were gathered from May to December. Discrimination between young and old leaves using the spectral information was done by principal component analysis (PCA) and partial least square-discriminant analysis (PLS-DA), while the potential to predict nutritional concentrations was performed using PLS regression (PLS-R). Young and old leaves were correctly discriminated with an accuracy of 99.4 % using optimal wavelengths. The highest prediction of nutrients was achieved for P, K, Ca, Fe, and Cu, with  $R^2$  values around 0.60-0.69 using the whole spectrum. When the optimal wavelengths were selected, the models predicting those nutrients showed accuracies with  $R^2$  values around 0.57-0.67.

**Keywords:** hyperspectral imaging; non-destructive; plant nutrition; leaves; precision agriculture

## 1. Introduction

Citrus fruits rank among the most widely consumed fruits globally. In 2020, global citrus production reached an estimated 152 million tons, according to the Food and Agriculture Organization (FAO). China leads the global production, yielding over 44.6 million tons, followed by Brazil with 19.4 million tons, India with 13.9 million tons, Mexico with 8.8 million tons, and Spain in sixth place with over 6.8 million tons (FAOSTAT, 2020). For the 2022/2023 season, total world production is forecasted at 47.5 million tons of oranges, followed by tangerines with 36.6 million tons, lemons with 9.3 million tons, and grapefruit with 6.8 million tons (USDA, 2023). Mediterranean citrus production accounts for approximately 20 % of global output (FAOSTAT, 2020), led by Spain, with 60 % of the production and a cultivated area of 330.504 ha (MAPA, 2023).

The extensive cultivation of citrus worldwide demands economically and environmentally sustainable practices, with fertilisation as a key factor influencing production costs, environmental impact, fruit quality, and overall crop yields. Hence, nutrients are crucial in crop growth and productivity (Campisi-Pinto et al. 2017). An optimal fertilisation program entails monitoring the plant's nutritional dynamics throughout its vegetative cycle and adjusting fertiliser application doses according to the requirements of the trees at different crop stages (Kadyampakeni et al. 2015).

An excess of nutrients can lead to plant toxicity, elevate soil salinity, and hinder water absorption by roots, causing osmotic imbalances. Furthermore, surplus fertilisers can contaminate surface and subsurface water through lixiviation (Rehman et al. 2021). Excessive fertiliser usage can present economic challenges for farmers and endanger short- and long-term sustainability of agricultural production. Thus, it is crucial to develop production systems with reduced reliance on inputs to enhance the sustainability of farming practices (Thompson et al. 2019).

Within the actions of the United Nations (UN) for global sustainable development and promoting a pollution-free, healthy life and food safety, Europe has implemented the Green Deal, which is legally binding for all European Union member states, to make Europe the first climate-neutral continent by 2050. The European Commission is acting to reduce nutrient losses by at least 50 % while ensuring no deterioration in soil fertility. It is expected that the use of fertilisers will be reduced by at least 20 % by 2030, by applying balanced fertilisation and sustainable nutrient management throughout the lifecycle.

Effective resource management is essential to achieve these goals. Reducing the use of fertilisers reduces expenses, enhances fruit quality, and minimises the risk of contamination (Kremsa, 2021; Ruan et al. 2024). Nevertheless, insufficient essential nutrients can result in plant deficiencies, manifesting symptoms like leaf yellowing, inhibited growth, foliar abnormalities, and diminished flowering, leading to decreased yields (Marschner, 2012). To prevent these issues, applying fertilisers at appropriate rates corresponding to the phenological stage is imperative, following recommended nutrient management practices.

Essential nutrients can be classified into macronutrients and micronutrients based on the quantity required by plants. Macronutrients, including nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and sulphur (S), are essential in substantial for their physiological functions in plant metabolism and enzymatic processes (Menino, 2012). Micronutrients such as iron (Fe), copper (Cu), manganese (Mn), zinc (Zn), boron (B), molybdenum (Mo), chlorine (Cl) and nickel (Ni) are

involved in the process of photosynthesis, cell division, and elongation requiring smaller quantities for optimal plant health (Jones, 2012; Marschner, 1995).

Currently, used nutrient diagnostic methods encompass subjective visual assessments in the field, which rely on growers' expertise, and destructive ionic analysis, known for its time-consuming, costly, labour-intensive, and complex procedures (Acosta et al. 2023a). Conversely, modern non-destructive optical techniques have emerged as practical and feasible means of plant nutritional diagnosis (Nadafzadeh et al. 2024; Silva et al. 2023). Among these techniques, spectral-based sensors, such as hyperspectral imaging (HSI), stand out since they capture spectral and spatial information relevant to plant nutritional status (Du et al., 2023; Siedliska et al. 2021). Several studies have tested the potential of this technology in assessing nutrient concentrations across various crops (Chen et al. 2024). For instance, in persimmon, Acosta et al. (2023b) used HSI within the range of 500 to 980 nm combined with partial least squares regression (PLS-R) to predict leaf nutrient content. Satisfactory accuracy was achieved for elements such as N, P, K, and B, with  $R^2$  values exceeding 0.62. In olive trees, Gómez-Casero et al. (2007) discriminated different N and K treatments within the 400-900 nm range using several spectral indices, including the NDVI, attaining accuracies of 99.2 % for N and 94.4 % for K. Debnath et al. (2021) conducted a comparative experimental study on grapevine leaves, discriminating healthy leaves from those with nutritional deficiencies using HSI in the range of 380 nm to 1000 nm. Healthy leaves were discernible using the first derivative (1D) between 675 and 775 nm. De Silva et al. (2023) determined macro and micronutrient concentrations in leaves across the 400 to 1000 nm spectral range in macadamia trees. Employing PLSR, the best models achieved an  $R^2$  of 0.55 for N,  $R^2$  of 0.77 for P,  $R^2$  of 0.77 for K, and  $R^2$  of 0.75 for Ca as the best results.

These studies have been conducted by manually sampling selected leaves from specific sprouts and analysing them in the laboratory. However, the nutritional status of the crop should ideally be diagnosed in the field using sensors onboard ground or aerial vehicles, such as agricultural robots, tractors or drones.

In citrus plants, the ideal timeframe for conducting a nutritional diagnosis falls in November, coinciding with the age of 7 to 9 months of the spring-flush leaves, since these leaves maintain a stable concentration of mineral elements during this period, unlike other moments of the vegetative cycle (Menino, 2012). Therefore, the reference tables have been developed for these leaves (Quiñones et al. 2012). A problem arises when images captured by sensors on these vehicles capture leaves of

different ages and sprouts, which can lead to inaccurate diagnoses. Therefore, developing methods to discriminate the appropriate leaves in the images is imperative to perform a reliable nutrient diagnostic.

In this regard, no previous research has discriminated leaves from different sprouts in images to accurately assess the nutrient concentration in citrus or any other crop. Therefore, the objectives of this study are to evaluate the potential of a Vis-NIR HSI system in distinguishing citrus leaves from different vegetative moments and use the spectral information of these leaves to determine the nutrient concentrations of macro (N, P, K, Ca, Mg, S and Na) and micronutrients (Fe, Cu, Mn, Zn and B).

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental design and citrus leaves samples

The study was conducted in a commercial plot of adult citrus cv. 'Clementina de Nules' (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) mandarin grafted on Carrizo Citrange rootstock (*C. sinensis* (L.) Osbeck. x *Poncirus trifoliata* (L.) located in Almenara (Castellón) Spain (39° 44' 59.75" N and 0° 13' 39.76" W), with a total area of 72.2 ha in a loam-clay soil under drip irrigation system. Trees were fertilised according to the annual dose established for adult trees (table 1).

**Table 1.** Fertiliser doses applied to the experimental plot.

Nutrient	Dose (Kg/h)
N	240
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	80
K <sub>2</sub> O	140
MgO	180
Fe	1

Two leaf samplings were performed during two vegetative seasons, S1 and S2. The S1 collection was completed in May 2021. Sixty samples of eight leaves each were randomly selected around the tree canopy, separately bagged, and carried to the laboratory for further processing. In total, 480 leaves were collected, of which 240 were spring sprouting leaves, considered young leaves, and 240 were from older vegetative cycles, considered old leaves. In the S2 collection, 80 leaves were collected monthly from May to December 2022, for a total of 640 leaves. Each month, ten samples of eight leaves from non-fruiting branches of spring flush leaves were randomly selected, individually bagged, and carried to the laboratory. All the



collected samples were cleaned with deionised water and placed on paper towels to air dry when arriving at the laboratory.

## 2.2. Hyperspectral imaging acquisition and processing

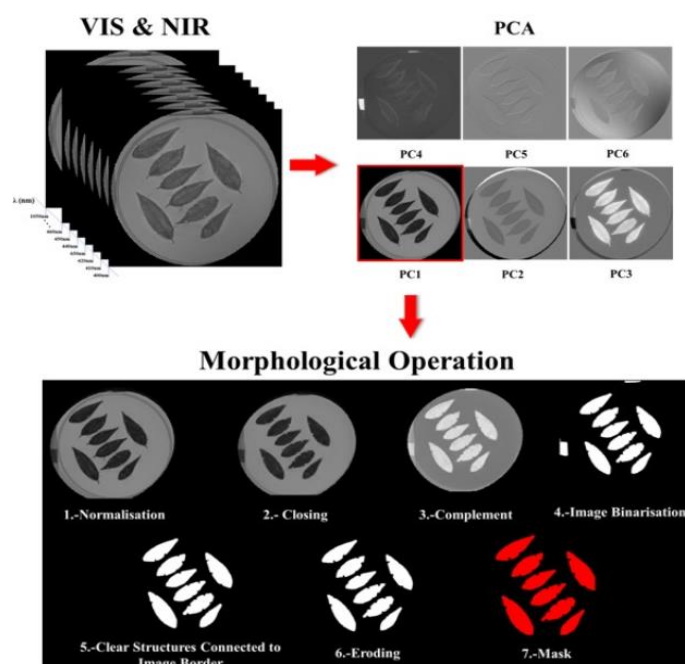
The HSI system, capable of capturing images in the spectral range of 500 to 980 nm, was composed of an industrial camera (CoolSNAP ES, Photometrics, AZ, USA), two liquid crystal tuneable filters (Varispec VIS-07 and NIR-07, Cambridge Research & Instrumentation, Inc. MA, USA), and a lens (Xenoplan 1.4/23, Schneider Optics, Hauppauge, NY, USA) with the ability to cover the entire spectral range without losing focus. The system was configured to acquire images with a resolution of 1392 x 1040 pixels, featuring a spatial resolution of 0.14 mm/pixel and a spectral resolution of 10 nm. An integration time calibration for each spectral band was carried out to optimise the dynamic range of the camera, prevent image saturation, and correct the spectral sensitivity of the various components of the system. This step was done by capturing the average reflectance from a white reference target (Spectralon 99 %, Labsphere, Inc. NH, USA) at 90 % of the dynamic range of the camera.

The scene was illuminated using 12 halogen spotlights, each with a power of 37 W (Eurostar IR Halogen MR16, Ushio America, Inc. CA, USA), operated with direct current (12 V). These spotlights indirectly illuminated the scene within a hemispherical dome. The interior surface of the aluminium dome was painted white and given a rough texture to minimise directional reflections that could lead to bright spots, ensuring highly uniform lighting. A holder was employed to position the leaf samples inside the dome. Equation (1) Gat, (2000) was used to obtain the reflectance,  $\rho_{xy}(x,y,\lambda)$ , using the white and a dark reference:

$$\rho_{xy}(x, y, \lambda) = \rho_{Ref}(\lambda) \frac{R(x,y,\lambda) - R_{black}(x,y,\lambda)}{R_{white}(x,y,\lambda) - R_{black}(x,y,\lambda)} \quad (1)$$

where  $\rho_{Ref}(\lambda)$  represents the standard reflectance of the white target (99 %),  $R(x,y,\lambda)$  is the radiance of the leaf as captured by the camera sensor,  $R_{white}(x,y,\lambda)$  corresponds to the radiance of the white reference target, and  $R_{black}(x, y, \lambda)$  is the radiance obtained when avoiding any light source to measure the electronic noise of the sensor. Each hyperspectral image was composed of eight leaves. The procedure proposed by (Munera Picazo et al. 2021) was followed to obtain the mean spectrum of each leaf (figure 1). First, a principal component analysis (PCA) was used to obtain the PC images that better contrasted the leaves and the background. The selected image of PC 1 was first min-max normalised to scale the intensity values in [0, 1], then

binarised by the Otsu method (Otsu, 1979). Finally, a morphological opening operation was applied to remove noisy pixels or objects.



*Figure 1. Segmentation of the leaves in the hyperspectral images.*

### 2.3. Ionic analysis

After the image acquisition, the eight leaves in each hyperspectral image were used for the ionic analysis as a single sample, as they were necessary to obtain the minimum dry matter weight required by ionic analysis. All leaves were dried in a hot-air oven (Selecta, Barcelona, Spain) at 60 °C until constant weight. Then, leaves were grounded to 1 mm with a water-cooled mill (IKA M 20, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) and stored at 4 °C until later analysis to quantify the concentration of the nutrients. The determination of organic N was performed through a Tecator Kjeltex 8200 TM Digestor (Kjeltex 8200, FOSS Iberia SA, Barcelona, Spain) using the Kjeldahl method (Bremner, 2016). The other macro and micronutrients were determined by an inductively coupled plasma optical emission spectrometry iCAP 7000 Plus Series ICP-OES (Thermo Scientific, Waltham, MA USA). The extraction from the solid samples was previously performed by wet digestion using a microwave (Milestone ETHOS UP, Sorisole, BG. Italy). For this, 0.20 g of the crushed samples were weighed, and 4 mL of MilliQ, 4 mL of nitric acid

(HNO<sub>3</sub>) and 2 mL of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were added to each sample. The tubes were kept at 200 °C for 15 to 20 min. After digestion, the extracts were diluted in 25 mL tubes, and the nutrient concentrations were subsequently analysed using the ICP.

#### **2.4. Data analysis**

The reference data obtained by the ionic analysis was first tested for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test to evaluate the statistical differences between both vegetative cycles of the leaves. The non-parametric Kruskal-Wallis test was carried out as the data did not follow a normal distribution. Significance was defined at  $p < 0.05$ . These analyses were conducted using StatGraphics software (Manugistics, Inc. Rockville, USA).

Before the discrimination of young and old leaves, an exploratory analysis of the spectral data using PCA was performed to identify patterns and essential wavelengths. This unsupervised projection method condenses data by creating new variables as uncorrelated and linear combinations of the original variables (Lorente et al. 2012). The predictive models were constructed using the Partial Least Squares (PLS) method. This approach tries to find a linear regression model of latent variables (LVs) by projecting the X and Y variables into a new latent space, where the covariance between these LVs is maximised (Lorente et al. 2012). PLS discriminant analysis (PLS-DA) models were employed to discriminate leaves from different seasons, using the mean spectra as X variables and the leaves classes (young = 1; old = 0) as Y variables. PLS regression (PLS-R) models were developed to predict the nutrient content in the young leaves, using the mean spectra as X variables and nutrient concentrations as Y variables.

For the model calibration and test of the discrimination of young and old leaves, the mean spectra of the 480 leaves collected in S1 were randomly divided into two data sets: 320 samples (66.7 %) were selected for model calibration, and the remaining 160 samples (33.3 %) were used for testing. The spectra were pre-treated using standard normal variate (SNV) to reduce the scatter due to the irregular surface of the leaves (Rinnan et al. 2009). First, an exploratory spectral data analysis was performed using PCA to identify hidden patterns and essential wavelengths that could help discriminate both classes of leaves. This unsupervised projection method condenses data by creating new variables as uncorrelated and linear combinations of the original variables (Lorente et al. 2012). Then, a PLS-DA model was performed to classify young and old leaves in a supervised manner.

For the prediction of the nutrient concentration, the young leaves obtained monthly in the S2 collection plus the 240 young leaves from the collection of S1 were used. Similarly to the previous PLS-DA model, the 880 individual spectra were randomly separated into two datasets: 590 samples (67.0 %) were chosen for model calibration and validation, and the remaining 290 samples (33.0 %) were used for testing. In this case, no pre-treatments were applied to the raw spectra, considering our previous study on persimmon leaves Acosta et al. (2023), where several pre-treatments were tested, obtaining the best results using the raw spectra. The mean value of the nutrient concentration determined by ionic analysis of the set of eight leaves in each hyperspectral image was correlated with the mean spectrum obtained from each leaf of this set in the PLS-R models.

The essential wavelengths for predicting each nutrient were selected using the weighted regression coefficients (BW) extracted from the PLS-R models with the optimum number of LV (Frenich et al. 1995). Although PLS-R is not explicitly designed as a feature selection method, fitting a PLS-R model yields regression coefficients that indicate the relative contribution of each original variable to the components. These coefficients serve as weights of the importance of each predictor variable (in this case, wavelengths) concerning the response variable (nutrient concentration). Variables with large regression coefficients (positive or negative) wield more influence on the construction of these components, so they were regarded as contributing significantly to explaining the variability in the response variable (Mehmood et al. 2012).

Some methods involve a threshold to decide whether a variable is relevant, as in the case of Variable Importance in Prediction (VIP). Since the average of the squared VIP scores equals 1, it is generally accepted that the variable is relevant if the score exceeds 1 (Chong & Jung, 2005). However, the BW does not give any potential threshold, so it was empirically decided to select the ten variables with the highest BW.

The selection of the optimal number of LVs and the estimation of the error rate in both types of PLS models were performed using a 10-fold cross-validation (CV) on the training set (Hastie, 2017). The performance of the models was evaluated by the accuracy of classification (the correct sample predicted divided by the total number of samples) in the case of the discrimination between young and old leaves and by using the coefficient of determination ( $R^2$ ) and the root mean square error (RMSE) for nutrient prediction, in the calibration and test sets.

. All spectral analyses were performed using The Unscrambler X 10.3 (CAMO Software, Oslo, Norway).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Assessment of the vegetative cycles

##### 3.1.1. Ionomics of young (spring sprouting) and old leaves (previous cycles)

Table 2 shows the concentrations of macro and micronutrients found in the leaves of two vegetative cycles from the S1 collection, determined by ionomic procedures. Mobile nutrients, translocated from the leaves to other plant organs during development, showed lower concentrations in old leaves, while their accumulation was significantly higher in the young leaves (Obreza, 2008). Thus, the concentration of N, P and K in young leaves were higher than in old leaves, while the contrary pattern occurs in immobile nutrients, like the other macronutrients and all micronutrients (Mengel, 2000).

**Table 2.** Macro and microelements concentration in the young and old leaf samples in the S1 collection.

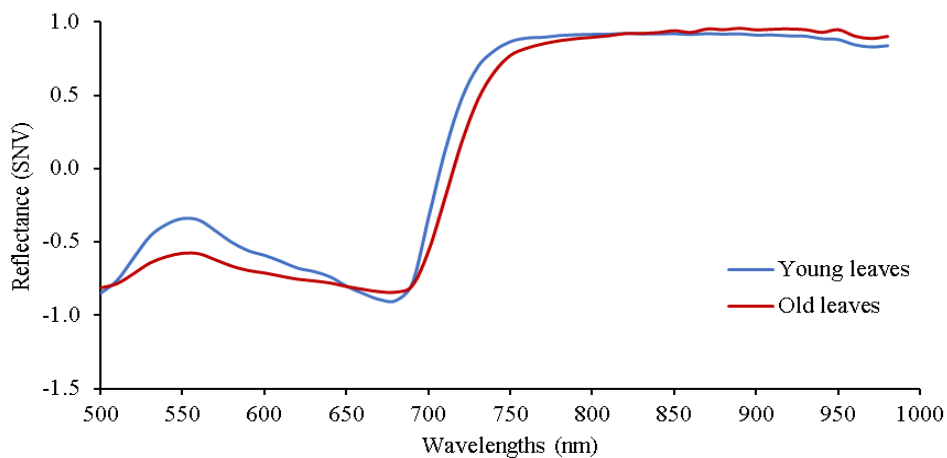
		Macronutrients (%)						Micronutrients (ppm)					
		N	P	K	Ca	Mg	Na	S	Fe	Cu	Mn	Zn	B
		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Young leaves	Mean	2.54	0.25	2.09	2.29	0.29	0.04	0.22	51.5	11.00	17.56	20.10	35.10
	Max	2.97	0.36	2.96	4.96	0.36	0.14	0.33	165.0	34.70	48.00	51.60	58.10
	Min	1.89	0.09	0.60	1.28	0.17	0.02	0.01	22.2	5.68	8.53	6.67	12.00
	SD	0.16	0.05	0.44	0.48	0.05	0.01	0.09	22.3	3.22	5.46	8.31	9.91
Old leaves	Mean	1.97	0.09	0.71	5.15	0.34	0.04	0.30	62.4	37.80	26.6	30.4	40.80
	Max	2.47	0.12	1.06	6.09	0.44	0.10	0.38	188.0	63.30	54.10	81.20	60.40
	Min	1.58	0.07	0.43	3.34	0.22	0.02	0.18	22.4	14.00	13.20	12.30	4.85
	SD	0.14	0.02	0.15	0.74	0.06	0.02	0.05	25.0	13.10	7.24	13.80	10.30

\* statistical differences ( $p < 0.05$ ) according to the vegetative cycle.

##### 3.1.2. Exploratory analysis of citrus leaves spectra

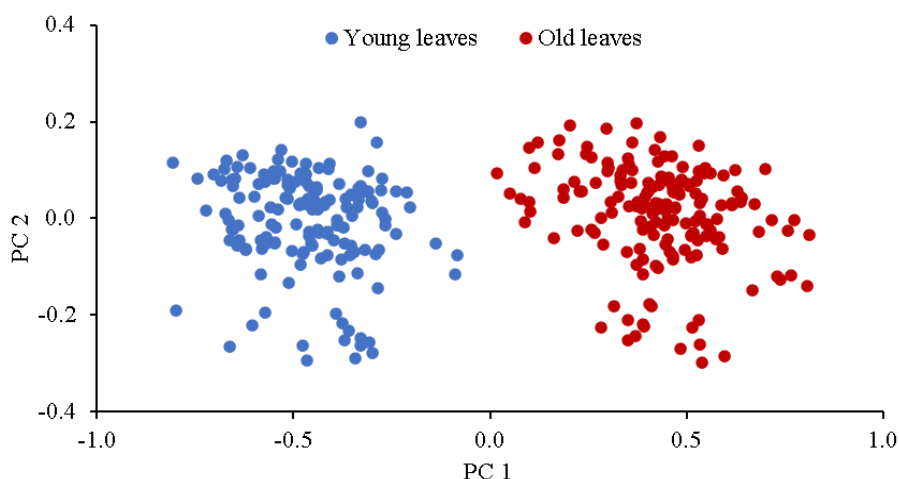
The mean spectrum of young and old leaves is plotted in figure 2. The leaves of citrus trees evolve throughout development, undergoing chemical, morphological and structural changes. These changes make the spectral fingerprint different depending on the moment of the vegetative stage, and these differences are reflected in the measurements of the average spectrum. (Mediavilla & Escudero, 2009). In

both cases, the mean spectrum presented a greater absorption in the Vis region (500-750 nm), where electron transmission between pigment compounds occurs (Zhang et al. 2007), due mainly to the chlorophyll content associated with absorbance peaks around 500 and 670 nm (Homolová et al. 2013). The 510-520 nm region is also associated with carotenoids (Ustin et al. 2009), and Feret et al. (2008) demonstrated that the ratio of chlorophylls to carotenoids is informative to reflect the plant phenology and nutrition status. These absorbance peaks were higher in the young leaves since they present a higher photosynthetic activity. In contrast, both types of leaves showed a lower absorbance in the NIR region, where internal structure and organic compounds have a higher contribution (Prananto et al. 2020). Still, the young leaves showed lower reflectance, around 950 nm, probably due to higher tissue water content (Jacquemoud, 2008).

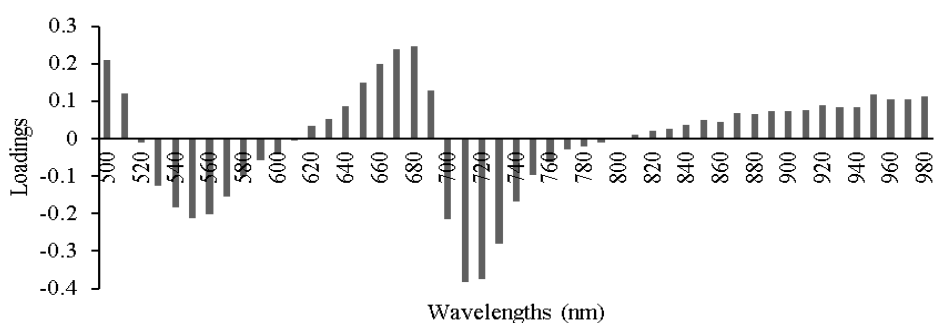


**Figure 2.** Mean spectra of the young and old leaves.

A PCA was performed to explore the spectral data of the citrus leaves in the calibration set. The scores were projected in the space defined by the two first PCs, explaining 92.3 % of the total variance (88.0 % and 4.3 %). Two groups of scores were found, corresponding clearly to the age of the leaves. Using only the PC1, the two types of leaves could be better separated (figure 3a).



**Figure 3a.** Scores of the first two PCs of PCA.



**Figure 3b.** Loadings of the first PC of the PCA.

Therefore, the loadings of each wavelength for the PC1 are shown in figure 3b. The wavelengths that contributed the most to this separation were found mainly in the Vis region, around 500, 550, 680 and 710 nm. These wavelengths are related to strong absorption peaks of pigments related to nutrients, primarily chlorophyll and carotenoids (Feret et al. 2008; Homolová et al. 2013).

### 3.1.3. Classification models

PLS-DA models were calibrated to discriminate young leaves from old leaves, and the results are shown in table 3. In the calibration, 99.7 % of the samples were correctly classified, and similar results were obtained in the test set (99.4 %). This high accuracy is related to the large separation of scores in the first PC of the PCA. Considering the loadings of the first PC of the PCA (figure 3b), a new model was

calibrated using the wavelengths with the highest contribution to score separation in the PCA. The new model was calibrated using ten wavelengths, 500, 550, 560, 660, 670, 680, 700, 710, 720, and 730 nm, obtaining the same performance in classifying the leaves as the model using all wavelengths, 99.4 %. These results indicate that the age of the leaves is mainly related to the visible region.

**Table 3.** Results of the discrimination of young and old leaves.

W	LV	Class	Calibration (CV)			Test		Accuracy (%)
			Young	Old	CC (%)	Young	Old	
49	3	Young leaves	160	0	99.7	80	0	99.4
		Old leaves	1	159		1	79	
10	3	Young leaves	160	0	99.4	80	0	99.4
		Old leaves	2	158		1	79	

W = wavelengths; LV = latent variable; CV = cross-validation

### 3.2. Prediction of macro and micronutrient content in spring citrus leaves

#### 3.2.1. Ionomics of spring flush leaves

Once the young leaves of the S1 collection were discriminated, these were merged with the leaves of the S2 collection (all spring-sprout leaves). The statistical description of the nutrients of the leaves is shown in table 4. The values obtained for the sampling carried out in November are shown since it is considered the optimal date for the nutritional diagnosis of citrus. Nutrients such as K, Na, S, Fe, Mn, Zn, and B yielded an optimum value as described by (Quiñones et al. 2012). However, the concentrations of N and Cu were deficient. The P was low, while Ca and Mg were present in higher concentrations.

**Table 4.** Macro and microelements content in all spring sprouting citrus leaves.

	Macronutrients (%)							Micronutrients (ppm)				
	N	P	K	Ca	Mg	Na	S	Fe	Cu	Mn	Zn	B
Nov	1.94	0.11	0.83	5.65	0.52	0.03	0.33	83.1	3.03	25.1	26.7	46.6
	(D)	(L)	(O)	(H)	(H)	(O)	(O)	(O)	(D)	(O)	(O)	(O)
Mean	2.23	0.16	1.28	3.61	0.4	0.03	0.27	67.40	5.68	21.20	26.50	40.10
Max	2.97	0.36	2.96	6.57	9.26	0.14	0.37	165.00	34.70	54.90	57.60	70.40
Min	1.48	0.05	0.36	1.05	0.12	0.01	0.01	22.20	0.75	6.34	3.48	12.00
SD	0.32	0.07	0.61	1.41	0.32	0.01	0.07	28.20	4.18	10.40	13.4	10.70

D: deficient, L: low, O: optimum, H: High (Quiñones et al. 2012); SD: Standard deviation



### 3.2.2. Prediction models

PLS-R models were calibrated to predict the content of each macro and micronutrient in all those spring sprouting leaves using 49 wavelengths from 500 nm to 980 nm, and the results are shown in table 5. The macronutrients P, K, and Ca showed the highest accuracy with similar results in the calibration of the models. The P model was calibrated using 5 LVs, obtaining an  $R^2$  of 0.70 and an  $RMSE_{cv}$  of 0.04 %. The K and Ca models were also calibrated using 5 LVs with an  $R^2$  of 0.68 and an  $RMSE_{cv}$  of 0.37 % and 0.78 %, respectively. When the models were tested, Ca model presented the highest value of  $R^2$ , 0.69, while P and K presented  $R^2$  values of 0.61 and 0.62, respectively. The performance of N and Mg models was lower, with an  $R^2$  of 0.56 and an  $RMSE_{cv}$  of 0.21 % and 0.08 %, respectively, in the calibration, and  $R^2$  of 0.52 and 0.54 and  $RMSE_P$  0.23 % and 0.09 %, respectively, in the test. In the case of S and Na, the models presented the lowest  $R^2$  values in both calibration and test.

Concerning micronutrients, Fe and Cu models demonstrated the highest accuracy for calibration and testing sets. The Fe model underwent validation using 9 latent variables (LVs), resulting in an  $R^2$  of 0.66 and an  $RMSE_{cv}$  of 16.4 ppm. Similarly, the Cu model, calibrated with 5 LVs, achieved an  $R^2$  of 0.66 and an  $RMSE_{cv}$  of 5.53 ppm. During testing, the Cu model maintained an  $R^2$  of 0.66 and an  $RMSE_P$  of 5.53 ppm, while the Fe model exhibited an  $R^2$  of 0.60 and an  $RMSE_P$  of 17.10 ppm. In contrast, the performance of the B model was comparatively lower, yielding an  $R^2$  of 0.52 and an  $RMSE_P$  of 7.30 ppm during calibration and 0.56 and 7.14 ppm, respectively, in the test. Models for Zn and Mn displayed the least favourable  $R^2$  and  $RMSE$  values in both calibration and test.

**Table 5.** Results of prediction of macro and micronutrient content in the spring sprouting leaves using all wavelengths.

Nutrient	LV	Calibration (CV)		Test	
		$R^2$	$RMSE_{CV}$	$R^2$	$RMSE_P$
N (%)	10	0.56	0.21	0.52	0.23
P (%)	5	0.70	0.04	0.61	0.04
K (%)	5	0.68	0.35	0.62	0.37
Ca (%)	5	0.68	0.81	0.69	0.78
Mg (%)	6	0.56	0.08	0.54	0.09
Na (%)	4	0.13	0.01	0.18	0.01
S (%)	5	0.36	0.05	0.33	0.05
Fe (ppm)	9	0.66	16.4	0.60	17.1

Cu (ppm)	5	0.66	2.21	0.66	2.53
Mn (ppm)	6	0.28	8.85	0.29	8.80
Zn (ppm)	6	0.31	11.20	0.33	10.80
B (ppm)	7	0.52	7.30	0.56	7.14

LV = latent variable; CV = cross-validation; RMSE: root mean square error in cross-validation (CV) and test (P, prediction).

Although the prediction results for P, K, Ca, Fe, and Cu did not achieve  $R^2$  values higher than 0.70, these models could still discriminate between high and low contents of these nutrients. It should be considered that, to enhance the robustness of the models, leaves from two seasons selected at different times (one day and throughout the entire season) have been used to calibrate these models.

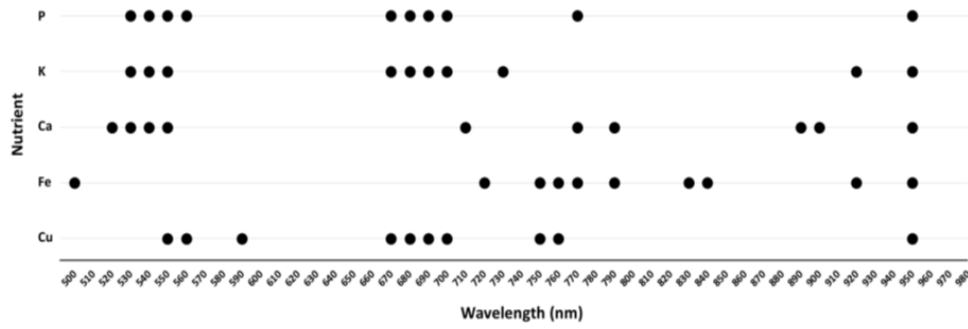
Few studies have been performed using HSI technology to predict nutrients in citrus. Osco et al. (2020) obtained  $R^2$  values of 0.62-0.90 for macronutrients in 'Valencia' orange leaves. They used the spectral range of 380-1020 nm and machine learning algorithms, but from the 320 samples used in that study, only 10 % (32 leaves) were used to validate the models. However, the analyses presented some weaknesses. The methods used mixed classifiers and regressors, and it is unclear how the determination coefficients were obtained. In 'Navel' oranges, Yanli et al. (2015) estimated N and P concentrations using images of both sides of leaves collected in a single day through PLS-R and nonlinear least square support vector machine models (LS-SVM). The results showed a high  $R^2$  of 0.90 and an RMSE of 0.10 for N. For P, the  $R^2$  was 0.92, and the RMSE was 0.05. regarding other crops, Acosta et al. (2023) predicted macro and micronutrients using Vis-NIR HSI and variable dose fertilisation of N and K in persimmon. The best results were obtained for the nutrients N, P, K and B, with an  $R^2$  of 0.62-0.80. In leaves of oilseed rape, N, P and K nutrients were investigated by Zhang et al. (2013) using HSI in the region 380-1030 nm HSI and variable dose fertilisation, obtaining values of  $R^2$  around 0.71 to 0.88 also using PLS-R. In olive leaves, Gómez-Casero et al. (2007) discriminated among leaves treated with different K doses using HSI in the 400-900 nm range and NDVI indices, achieving a success rate of 94.4 %.

### 3.2.3. Wavelength selection

Ten optimal wavelengths for each nutrient were selected. Figure 4 shows the wavelengths selected to predict P, K, Ca, Fe, and Cu using the BW from the PLS-R models. The optimal wavelengths to predict P, K and Cu concentration were primarily located in the Vis region (from 500 nm to 750 nm). In contrast, a similar number of wavelengths were found to be important in the Vis and the NIR regions

in the estimation of Ca and Cu, while for Fe, the essential wavelengths were mostly seen in the NIR region. In general, regions can be observed corresponding to the absorbance of the chlorophyll (around 500 and 670 nm), the red edge (around 770 nm) and the NIR (950 nm). In leaves, the Vis region is close to the absorption of leaf pigments, such as chlorophyll, carotenoids, anthocyanins and polyphenols (Khdery, 2021), in which K and P are involved. On the other hand, the NIR region is primarily associated with moisture content and cellular structure. Ca is a constituent of this structure and is responsible for maintaining the cell walls of plants bound together (Prananto et al. 2020), while Cu helps form lignin in cell walls, which provide structural support to keep plants upright. These findings agree with Ling et al. (2019), who examined relationships between leaf photosynthetic pigments and nutritional elements, finding that the leaf photosynthetic pigments significantly correlate with some nutritional elements.

Previous studies also noted that the optimal wavelengths for the prediction in citrus (Osco et al. 2020), persimmon (Acosta et al. 2023) and apple (Azadnia et al. 2023) leaves were also located mainly in the Vis region or between both Vis and NIR regions. This is due to the relationship of some nutrients with the photosynthetic activity of plants (Feret et al. 2008; Mutanga et al. 2004). HSI using Vis-NIR wavelengths can predict P indirectly because it is associated with organic acids, which form part of the nucleotides in cell walls, which is related to the functioning of the internal structure of the leaf and with the absorption peaks of the visible (da Silva et al. 2021). K plays a vital role in plant water uptake and in the regulation of osmotic potential and accumulates as a mineral element in the vacuole, so these changes in the internal structure of the leaf have their maximum water absorption in the NIR spectrum and are therefore related to this element (Malmir et al. 2020). The estimation of Ca is possible when it binds with molecules with covalent bonds such as N-H, S-H, O-H, C-H, C-O or C=C, which is important in developing cell structure (Manley, 2014). These bonds are usually present in the main biochemicals in plants, such as water, sugar, proteins, and lipids. Since K is soluble in water and exists in plants in the form of ions, it can be found in the following forms, so this element is related to the spectral regions of the NIR. The same occurs with S, a component of amino acids, and B, which forms a complex with sugars facilitating their transport by the plant, which is related to the NIR (Mishra et al. 2021). Other elements such as Mg, Fe, Cu and Mn are part of electron transporters and enzyme activators important in chlorophyll synthesis. So, changes in these plant nutritional elements can directly cause changes in spectral reflectance (Abukmeil et al. 2022).



**Figure 4.** Optimal wavelengths selected for the prediction of each nutrient using the BW from the PLS-R models.

After selecting the optimal wavelengths, PLS-R models for P, K, Ca, Fe, and Cu were calibrated using these wavelengths, and the results are presented in table 6. All models maintained the values of  $R^2$  above 0.60, with the P model exhibiting the highest accuracy in the calibration, an  $R^2$  of 0.68 and an  $RMSE_{CV}$  of 0.04 %. In the test, only the Ca and Cu models demonstrated  $R^2$  values higher than 0.60, with  $R^2$  values of 0.67 and 0.62, while  $RMSE_P$  values of 0.80 % and 2.54 ppm, respectively.

**Table 6.** Results of prediction of macro and micronutrient content in all spring sprouting leaves using ten optimal selected wavelengths.

Nutrient	LV	CV		Test	
		$R^2$	RMSECV	$R^2$	RMSEP
P (%)	3	0.68	0.04	0.59	0.04
K (%)	4	0.65	0.37	0.57	0.39
Ca (%)	4	0.65	0.84	0.67	0.80
Fe (ppm)	6	0.61	17.40	0.57	17.70
Cu (ppm)	4	0.66	2.21	0.62	2.54

LV = latent variable; CV = cross-validation; RMSE: root mean square error.

#### 4. Conclusions

This study evaluated the potential of Vis-NIR HSI to differentiate young or spring flush leaves from old leaves (leaves of previous vegetative cycles) and to estimate macro- and micronutrient concentrations in 'Clementina de Nules' citrus spring leaves. The results demonstrated a high level of accuracy of 99.4 % in distinguishing young leaves using PLS-DA, which is essential to make more accurate predictions when leaves of different shoots are mixed in an image (e.g. in the image of a tree).

Moreover, the prediction of macro (N, P, K, Ca, Mg, Na and S) and micronutrients (Fe, Cu, Mn, Zn and B) in all spring leaves was performed using PLS-R, achieving satisfactory prediction results ( $R^2 > 0.60$ ) for P, K, Ca, Fe and Cu. For each of these nutrients, ten optimal wavelengths were identified on the BW coefficient vector from the PLS-R models, maintaining predictive accuracy comparable to that obtained using all wavelengths. These results indicate that Vis-NIR HSI could be a promising alternative tool to conventional ionomic analysis of nutrients in citrus leaves, thus facilitating the nutritional diagnosis of the plantation. More research is needed on other varieties to generalize HSI for this task, while using more sophisticated algorithms, including those based on deep learning, could lead to improved results.

### Acknowledgements

This work is co-funded by MICIN-AEI through project TED2021-130117B-C31, GVA-IVIA through projects 52203 and 52204, and the European Regional Development Fund (ERDF) of the Generalitat Valenciana 2021–2027. Maylin Acosta thanks IFARHU-SENACYT for the Professional Excellence Scholarships, contract 270-2021-020. Sandra Munera thanks the postdoctoral contract Juan de la Cierva - Formación (FJC2021-047786-I) co-funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and EU NextGenerationEU/PRTR.

### References

- Abasolo, M., Lee, D. J., Raymond, C., Meder, R., & Shepherd, M. (2013). Deviant near-infrared spectra identifies *Corymbia* hybrids. *Forest Ecology and Management*, *304*, 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2013.04.040>
- Abukmeil, R., Al-Mallahi, A., & Campelo, F. (2022). New approach to estimate macro and micronutrients in potato plants based on foliar spectral reflectance. *Computers and Electronics in Agriculture*, *198*, 107074. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.107074>
- Acosta, M., Quiñones, A., Munera, S., de Paz, J. M., & Blasco, J. (2023). Rapid Prediction of Nutrient Concentration in Citrus Leaves Using Vis-NIR Spectroscopy. *Sensors*, *23*(14), 6530. <https://doi.org/10.3390/s23146530>
- Acosta, M., Rodríguez-Carretero, I., Blasco, J., de Paz, J. M., & Quiñones, A. (2023b). Non-Destructive Appraisal of Macro- and Micronutrients in Persimmon Leaves Using Vis/NIR Hyperspectral Imaging. *Agriculture*, *13*(4), 916. <https://doi.org/10.3390/agriculture13040916>
- Andreatta, R. H. P., & Pereira, T. S. (1990). Morfologia das plântulas de algumas espécies de *Smilax* L. Pesquisas. *Botânica Instituto Anchieta de Pesquisas*.
- Azadnia, R., Rajabipour, A., Jamshidi, B., & Omid, M. (2023). New approach for rapid estimation of leaf nitrogen, phosphorus, and potassium contents in apple trees using Vis/NIR spectroscopy based on wavelength selection coupled with machine learning. *Computers and Electronics in Agriculture*, *207*, 107746. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2023.107746>

- Bremner, J. M. (2016). Inorganic forms of nitrogen. En *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties* (pp. 1179-1237). wiley. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.c33>
- Campisi-Pinto, S., Zheng, Y., Rolshausen, P. E., Crowley, D. E., Faber, B., Bender, G., Bianchi, M., Khuong, T., & Lovatt, C. J. (2017). Optimal Nutrient Concentration Ranges of "'Hass' Avocado Cauliflower Stage Inflorescences-Potential Diagnostic Tool to Optimise Tree Nutrient Status and Increase Yield. *HortScience*, 52(12), 1707-1715. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12437-17>
- Chen, R., Liu, W., Yang, H., Jin, X., Yang, G., Zhou, Y., Zhang, C., Han, S., Meng, T., Zhai, C., Feng, H. (2024) A novel framework to assess apple leaf nitrogen content: Fusion of hyperspectral reflectance and phenology information through deep learning. *Computers and Electronics in Agriculture*, 219, 108816, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2024.108816>.
- Chong, I.-G., & Jun, C.-H. (2005) Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 78, 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.011>
- da Silva, A., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A., Huertas Tavares, O.C., Pereira, M.G., de Campos, T., & da Silva, L.M. (2021). Near-infrared spectroscopy to rapid assess the rubber tree clone and the influence of maturation and disease at the leaves. *Microchemical Journal*, 168, 106478. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106478>
- De Silva, A. L., Trueman, S. J., Kämper, W., Wallace, H. M., Nichols, J., & Hosseini Bai, S. (2023). Hyperspectral Imaging of Adaxial and Abaxial Leaf Surfaces as a Predictor of Macadamia Crop Nutrition. *Plants*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/plants12030558>
- Debnath, S., Paul, M., Rahaman, D. M. M., Debnath, T., Zheng, L., Baby, T., Schmidtke, L. M., & Rogiers, S. Y. (2021). Identifying Individual Nutrient Deficiencies of Grapevine Leaves Using Hyperspectral Imaging. *Remote Sensing*, 13(16), 3317. <https://doi.org/10.3390/rs13163317>
- Dhugga, K. S. (2001). Building the wall: Genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(6), 488-493. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00205-3)
- Du, R., Chen, J., Xiang, Y., Zhang, Z., Yang, N., Yang, X., Tang, Z., Wang, H., Wang, X., Shi, H., Li, W. (2023) Incremental learning for crop growth parameters estimation and nitrogen diagnosis from hyperspectral data, *Computers and Electronics in Agriculture*, 215, 108356, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2023.108356>.
- Durgante, F. M., Higuchi, N., Almeida, A., & Vicentini, A. (2013). Species Spectral Signature: Discriminating closely related plant species in the Amazon with Near-Infrared Leaf-Spectroscopy. *Forest Ecology and Management*, 291, 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.10.045>
- FAOSTAT. (2020). Database for food and agriculture. Rome: Food and Agriculture Organisation of United Nations (FAO).
- Feret, J. B., Francois, C., Asner, G. P., Gitelson, A. A., Martin, R. E., Bidel, L. P. R., Ustin, S. L., le Maire, G., Jacquemoud, S. (2008). PROSPECT-4 and 5: advances in the leaf optical properties model separating photosynthetic pigments. *Remote Sens. Environ*, 112, 3030–3043. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2008.02.012>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). Citrus Fruit-Fresh and Processed Statistical Bulletin 2020. Market and trade commodities. <https://www.fao.org/markets-and-trade/commodities/citrus/en/>.
- Frenich, A. G., Jouan-Rimbaud, D., Massart, D. L., Kuttatharmmakul, S., Galera, M. M., & Vidal, J. L. M. (1995). Wavelength selection method for multicomponent spectrophotometric determinations using partial least squares. *The Analyst*, *120*(12), 2787. <https://doi.org/10.1039/an9952002787>
- Gat, N. (2000). Imaging spectroscopy using tunable filters: A review. In: H.H. Szu, M. Vetterli, W.J. Campbell, & J.R. Buss, Eds. pp. 50-64. <https://doi.org/10.1117/12.381686>
- Gómez-Casero, M. T., López-Granados, F., Peña-Barragán, J. M., Jurado-Expósito, M., García-Torres, L., & Fernández-Escobar, R. (2007). Assessing Nitrogen and Potassium Deficiencies in Olive Orchards through Discriminant Analysis of Hyperspectral Data. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *132*(5), 611-618. <https://doi.org/10.21273/JASHS.132.5.611>
- Hastie, T. J., & Pregibon, D. (2017). *Generalised linear models*. In *Statistical models in S*. 195-247.
- Herrera, A. M., Lima, N., Silva, I., Oliveira, A., Araujo, E., & Marangon, G. (2017). Spectroradiometry from Eucalyptus grandis W. Hill ex Maiden population with different ages. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *11*(15). <https://doi.org/10.22587/ajbas.2017.11.15.7>
- Homolová, L., Malenovský, Z., Clevers, J. G. P. W., García-Santos, G., & Schaepman, M. E. (2013). Review of optical-based remote sensing for plant trait mapping. *Ecological Complexity*, *15*, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2013.06.003>
- Jacquemoud S, U. S. (2008). *Modeling leaf optical properties*. *Photobiological Sciences Online*. Photobiological Sciences Online. Environmental Photobiology. <http://www.photobiology.info/#Environ>. Accessed 27 Nov 2018.
- Jones, J. B. (2012). Plant Nutrition and Soil Fertility Manual. Ed. CRC Press. EE. UU. *Ed. CRC Press. EE. UU.*, 282.
- Kadyampakeni, D. M., Morgan, K. T., Nkedi-Kizza, P., & Kasozi, G. N. (2015). Nutrient Management Options for Florida Citrus: A Review of NPK Application and Analytical Methods. *Journal of Plant Nutrition*, *38*(4), 568-583. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.934470>
- Khdery, G. A. (2021). Remote Sensing Technology and Its Applications in Plant Pathology. En *Emerging Trends in Plant Pathology* (pp. 683-701). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-6275-4\\_30](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6275-4_30)
- Kremsa, V. Š. (2021). Sustainable management of agricultural resources (agricultural crops and animals). En *Sustainable Resource Management* (pp. 99-145). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824342-8.00010-9>
- Lang, C., Costa, F. R. C., Camargo, J. L. C., Durgante, F. M., & Vicentini, A. (2015). Near Infrared Spectroscopy Facilitates Rapid Identification of Both Young and Mature Amazonian Tree Species. *PLOS ONE*, *10*(8), e0134521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134521>

- Ling, B., Goodin, D. G., Raynor, E. J., Joern, A. (2019). Hyperspectral Analysis of Leaf Pigments and Nutritional Elements in Tallgrass Prairie Vegetation. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00142>
- Lorente, D., Aleixos, N., Gómez-Sanchis, J., Cubero, S., García-Navarrete, O. L., & Blasco, J. (2012). Recent Advances and Applications of Hyperspectral Imaging for Fruit and Vegetable Quality Assessment. *Food and Bioprocess Technology*, 5(4), 1121-1142. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0725-1>
- Mahlein, A.-K., Kuska, M. T., Behmann, J., Polder, G., & Walter, A. (2018). Hyperspectral Sensors and Imaging Technologies in Phytopathology: State of the Art. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 535-558. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050100>
- Malmir, M., Tahmasbian, I., Xu, Z., Farrar, M. B., & Bai, S. H. (2020). Prediction of macronutrients in plant leaves using chemometric analysis and wavelength selection. *Journal of Soils and Sediments*, 20(1), 249-259. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02418-z>
- Manley, M. (2014). Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: Non-destructive analysis of biological materials. *Chemical Society Reviews*, 43(24), 8200-8214. <https://doi.org/10.1039/c4cs00062e>
- Mishra, P., Herrmann, I., & Angileri, M. (2021). Improved prediction of potassium and nitrogen in dried bell pepper leaves with visible and near-infrared spectroscopy utilising wavelength selection techniques. *Talanta*, 225, 121971. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121971>
- MAPA. (2023). Análisis de la Campaña de cítricos 2022/2023 (pp. 1-50). MAPA.
- Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. *Academic, London, 2nd Editio*, 369-379.
- Mediavilla, S., & Escudero, A. (2009). Ontogenetic changes in leaf phenology of two co-occurring Mediterranean oaks differing in leaf life span. *Ecological Research*, 24(5), 1083-1090. <https://doi.org/10.1007/s11284-009-0587-4>
- Mees, C., Souard, F., Delporte, C., Deconinck, E., Stoffelen, P., Stévigny, C., Kauffmann, J.-M., & De Braekeleer, K. (2018). Identification of coffee leaves using FT-NIR spectroscopy and SIMCA. *Talanta*, 177, 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.056>
- Mehmood, T., Liland, K. H., Snipen, L., & Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 118, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.07.010>
- Mengel, K., & Kirkby, E. A. (2000). *Principios de nutrición vegetal*.
- Menino, R. (2012). Leaf Analysis in Citrus: Interpretation Tools. En *Advances in Citrus Nutrition* (pp. 59-79). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3_5)
- Munera, S., Rodríguez-Ortega, A., Aleixos, N., Cubero, S., Gómez-Sanchis, J., Blasco, J. (2021) Detection of Invisible Damages in ‘Rojo Brillante’ Persimmon Fruit at Different Stages Using Hyperspectral Imaging and Chemometrics. *Foods*, 10, 2170. <https://doi.org/10.3390/foods10092170>
- Mutanga, O., Skidmore, A. K., & Prins, H. H. T. (2004). Predicting in situ pasture quality in the Kruger National Park, South Africa, using continuum-removed absorption features. *Remote Sensing of Environment*, 89(3), 393-408. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2003.11.001>



- Nadafzadeh, M., Banakar, A., Mehdizadeh, S.A., Bavani M.Z., Minaei, S., Hoogenboom G., (2024) Design, fabrication and evaluation of a robot for plant nutrient monitoring in greenhouse (case study: Iron nutrient in spinach). *Computers and Electronics in Agriculture*, 217, 108579, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2023.108579>.
- Obreza, T. A., & Morgan, K. T. (2008). *Nutrition of Florida citrus trees*. 2nd Ed Univ. Fla. Coop. Ext. Publ. SL-253.
- Oscó, L. P., Ramos, A. P. M., Pinheiro, M. M. F., Moriya, É. A. S., Imai, N. N., Estrabis, N., Ianczyk, F., de Araújo, F. F., Liesenberg, V., de Castro Jorge, L. A., Li, J., Ma, L., Gonçalves, W. N., Marcato, J., & Creste, J. E. (2020). A machine learning framework to predict nutrient content in valencia-orange leaf hyperspectral measurements. *Remote Sensing*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/rs12060906>
- Prananto, J. A., Minasny, B., & Weaver, T. (2020). Near infrared (NIR) spectroscopy as a rapid and cost-effective method for nutrient analysis of plant leaf tissues (pp. 1-49). <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.06.001>
- Quiñones, A., Martínez-Alcántara, B., Primo-Millo, E., & Legaz, F. (2012). Fertigation: Concept and application in citrus. In *Advances in citrus nutrition*. Springer, Dordrecht., 281-301.
- Rehman, A. U., Nazir, S., Irshad, R., Tahir, K., ur Rehman, K., Islam, R. U., & Wahab, Z. (2021). Toxicity of heavy metals in plants and animals and their uptake by magnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 321, 114455. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114455>
- Ribeiro da Luz, B. (2006). Attenuated total reflectance spectroscopy of plant leaves: A tool for ecological and botanical studies. *New Phytologist*, 172(2), 305-318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01823.x>
- Rinnan, Å., Berg, F. van den, & Engelsen, S. B. (2009). Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(10), 1201-1222. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.007>
- Ruan, G., Cammarano, D., Ata-UI-Karim, S.T., Liu, X., Tian, Y., Zhu, Y., Cao, W., Cao, Q. (2024) Investigating data-driven approaches to optimize nitrogen recommendations for winter wheat. *Computers and Electronics in Agriculture*, 220, 108857, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2024.108857>.
- Serbin, S. P., Dillaway, D. N., Kruger, E. L., & Townsend, P. A. (2012). Leaf optical properties reflect variation in photosynthetic metabolism and its sensitivity to temperature. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 489-502. <https://doi.org/10.1093/jxb/err294>
- Siedliska, A., Baranowski, P., Pastuszka-Woźniak, J., Zubik, M., & Krzyszczak, J. (2021). Identification of plant leaf phosphorus content at different growth stages based on hyperspectral reflectance. *BMC Plant Biology*, 21(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02807-4>
- Silva, F.H.C.A., Wijewardane, N.K., Bheemanahalli, R., Reddy, K.R., Zhang, X., Vennam, R.R. (2023). Comparison of UV, visible and near-infrared, and mid-infrared spectrometers to estimate maize and sorghum leaf nutrients using dry-intact and ground leaves- *Computers and Electronics in Agriculture*, 211, 108001, <https://doi.org/10.1016/j.compag.2023.108001>.

- Thompson, R. L., Lassaletta, L., Patra, P. K., Wilson, C., Wells, K. C., Gressent, A., Koffi, E. N., Chipperfield, M. P., Winiwarter, W., Davidson, E. A., Tian, H., & Canadell, J. G. (2019). Acceleration of global N<sub>2</sub>O emissions seen from two decades of atmospheric inversion. *Nature Climate Change*, 9(12), 993-998. <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0613-7>
- USDA. (2023). Citrus: World Markets and Trade. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>.
- Ustin, S. L., Gitelson, A. A., Jacquemoud, S., Schaepman, M., Asner, G. P., Gamon, J. A., & Zarco-Tejada, P. (2009). Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. *Remote Sensing of Environment*, 113, S67-S77. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2008.10.019>
- Yanli, L., Qiang, L., Shaolan, H., Shilai, Y., Xuefeng, L., Rangjin, X., Yongqiang, Z., & Lie, D. (2015). Prediction of nitrogen and phosphorus contents in citrus leaves based on hyperspectral imaging. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 8(2), 80-88. <https://doi.org/10.3965/j.ijabe.20150802.1464>
- Zhang, X., Liu, F., He, Y., & Gong, X. (2013). Detecting macronutrients content and distribution in oilseed rape leaves based on hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering*, 115(1), 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2013.02.007>
- Zhang, Y., Chen, J. M., & Thomas, S. C. (2007). Retrieving seasonal variation in chlorophyll content of overstory and understory sugar maple leaves from leaf-level hyperspectral data. *Canadian Journal of Remote Sensing*, 33(5), 406-415. <https://doi.org/10.5589/m07-037>

## Resumen de la producción científica

### 1. Publicaciones científicas

- Acosta M., Visconti F., Quiñones A., Blasco J., de Paz, J.M. (2023) Estimation of macro and micronutrients in persimmon (*Diospyros kaki* L.) cv. 'Rojo Brillante' leaves through Vis-NIR reflectance spectroscopy. *Agronomy*, 13(4), 1105; <https://doi.org/10.3390/agronomy13041105>. N° orden en su área de interés: 16/89. IF (2022): 3,7.
- Acosta M., Rodríguez-Carretero I., Blasco J., de Paz J.M., Quiñones A. (2023) Non-destructive appraisal of macro-and micronutrients in persimmon leaves using Vis-NIR hyperspectral imaging. *Agriculture*, 13(4), 916; <https://doi.org/10.3390/agriculture13040916>. N° orden en su área de interés: 17/89. IF (2022): 3,6.
- Acosta M., Quiñones A., Munera S., de Paz, J.M., Blasco J. (2023) Rapid prediction of nutrient concentration in citrus leaves using Vis-NIR spectroscopy *Sensors*, 23(14), 6530; <https://doi.org/10.3390/s23146530>. N° orden en su área de interés: 27/86. IF (2022): 3,9.
- Acosta M., Quiñones A., Rodríguez-Ortega A., Rodríguez-Carretero I., Blasco J., Munera S. Estimating the concentration of macro- and micronutrients in spring citrus leaves using Vis-NIR hyperspectral imaging. En revisión en *Precision Agriculture* (22/04/2024).

### 2. Publicaciones de divulgación

- Acosta M, Rodríguez-Carretero I, Visconti F, Munera S, de Paz JM, Blasco J, Quiñones A (2023). Potencial de la espectroscopia visible e infrarroja para la determinación rápida de nutrientes. *Vida Rural*, 5/2023, 42-47.
- Acosta M, Morales J, de Paz JM, Blasco J, Quiñones A, Munera S (2024) Diagnóstico nutricional de los cítricos mediante técnicas de imagen. *Vida Rural*, en prensa.

### 3. Participación en congresos

- Acosta M, Rodriguez I, Visconti F, Munera S, Quiñones A, de Paz JM, Blasco J (2021). Rapid determination of Nitrogen, Iron and Potassium in citrus leaves by VIS / NIR spectroscopy and chemometrics. 20th biennial meeting of the International Council for NIR Spectroscopy (ICNIRS), 17-21 Octubre 2021, Pekín, (China).

- Acosta M, Rodríguez I, Visconti F, Munera S, de Paz JM, Quiñones A, Blasco J (2021). Determinación rápida de Nitrógeno, Potasio y Hierro en hojas de cítricos mediante espectroscopia VIS/NIR. XI Congreso Ibérico de Agroingeniería. 11 y 12 de noviembre de 2021.
- Acosta, M., Rodríguez, I., Visconti, F., Munera, S., Quiñones, A., de Paz, J.M., Blasco, J. (2022). Nutritional analysis of Nitrogen, Phosphorus, Potassium, Calcium, Magnesium, Iron, Manganese and Boron in Rojo Brillante Persimmon leaves by Vis/NIR reflectance spectroscopy. 2º Congreso Latinoamericano de Agricultura de Precisión (CLAP 2022). 30-31 de marzo, 01 de abril de 2022, Córdoba, Argentina.
- Acosta, M., Rodríguez, I., Visconti, F., Munera, S., Quiñones, A., de Paz, J.M., Blasco, J. (2021). Análisis de macro y micronutrientes en hojas de caqui " Rojo brillante" mediante espectroscopia de reflectancia VIS/NIR. III Symposium Ibérico de Ingeniería Hortícola. 6-8 de abril de 2022, Cartagena- Murcia.
- Acosta M, Munera S, Quiñones A, de Paz JM, Blasco J (2022) Aplicación de tecnologías no destructivas en la estimación del contenido de fósforo, calcio y hierro en hojas de cítricos utilizando la técnica de imágenes hiperespectrales. Jornadas de la SECH sobre Fertilización, Sustratos, Fresón y otros Frutos Rojos, 18 – 20 Mayo 2022, Lugo (España). Póster
- Acosta M. (2022). Determinación de macros y micronutrientes en hojas de cítricos, mediante métodos ópticos no destructivos. VII Encuentro de estudiantes de doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. 7 de julio de 2022, Valencia, España.

## **IV. DISCUSIÓN GENERAL**



El objetivo de esta tesis doctoral es evaluar la aplicación de la tecnología espectrométrica como herramienta para el diagnóstico nutricional de los cultivos, que facilite un manejo eficiente de la fertilización. Conocer y monitorizar el estado nutricional durante el desarrollo del cultivo es crucial para llevar a cabo los ajustes necesarios en el plan de abonado que garanticen una producción óptima y un uso eficiente de los recursos. Tradicionalmente, el estado nutricional de las plantas se determina a partir de un análisis ionómico de las hojas, realizado en un laboratorio. Estos análisis son destructivos, complejos, requieren mucho tiempo e implican altos costes derivados de los reactivos, gases y equipos necesarios, así como, un impacto negativo en el medioambiente. Como alternativa, en esta tesis se han evaluado dos técnicas ópticas no destructivas, la espectroscopia y la imagen hiperespectral, para estimar la concentración de nutrientes en hojas de dos cultivos de gran importancia económica e implantación en la Comunidad Valenciana. Los cultivos seleccionados fueron cítricos, mandarina cv. 'clementina de Nules' y un frutal, caqui cv. 'Rojo Brillante'.

Los resultados se han publicado a través de cuatro artículos, dos en cada uno de los cultivos evaluados con ambas técnicas estudiadas. En el estudio publicado en el primer artículo se aplicó la técnica espectrométrica para la estimación de la concentración de macro y micronutrientes en hojas de caqui cv. 'Rojo Brillante'. La importancia de este trabajo reside en ser el primer trabajo publicado sobre la determinación de ionómica foliar en caqui mediante tecnologías no destructivas. En este estudio se aplicaron tratamientos diferenciales para el N (0 %, 33 %, 50 % y 100 % de la demanda en N del cultivo) y el K (0%, 50 % y 100 % de la demanda de K<sub>2</sub>O del cultivo).

Para la construcción de los modelos que pudieran estimar la concentración a partir de los datos espectrales, se utilizó el método PLS-R, obteniendo resultados de coeficiente de determinación ( $R^2_p$ ) entre 0,50 y 0,78 para los macronutrientes de N, P, K, Ca y Mg; siendo el N el nutriente con una mayor precisión en la estimación ( $R^2_p = 0,78$  y RMSEP=0.18 %), aplicando la combinación de pretratamientos espectrales MC-1D. En cuanto a los micronutrientes, Fe, Mn and B, los resultados se sitúan en valores de  $R^2_p$  entre 0,39 y 0,83. El B fue el micronutriente que obtuvo una mayor precisión en la predicción,  $R^2_p = 0,83$  y RMSEP = 9,98 ppm utilizando la combinación de pretratamientos espectrales MC-1D. No existen estudios previos sobre estimación de la concentración nutricional en caqui mediante técnicas no destructivas, lo que dificulta la comparación del método con otros trabajos resaltando la novedad del estudio realizado.

Existen pocos estudios que hayan abordado la estimación de la concentración de todos los nutrientes esenciales como es el caso de esta tesis. La mayoría se limitan a algún nutriente en concreto que generalmente es el N. En cultivos de frutales se han obtenido, previamente, resultados mejores en cítricos (Menesatti et al. 2010; Osco et al. 2020) utilizando tratamientos diferenciales. La realidad es que algunos de los resultados obtenidos, con  $R^2$  cercanos a uno, se han podido alcanzar provocando artificialmente concentraciones extremas que no reflejan la realidad del campo. Otros estudios que han obtenido mejores resultados en peral (Jie et al. 2014; Wang et al. 2017) y olivo (Rotbart et al. 2013) han utilizado rangos espectrales más amplios (hasta 2500 nm). Por ejemplo, en olivo consiguieron un  $R^2$  de 0,91 utilizando un rango espectral en el NIR entre 1100 y 1700 nm, mientras que usando Vis-NIR sus resultados fueron similares a los alcanzados en este estudio. Existen pocos ensayos para la estimación de otros nutrientes. Así, el P y el Ca han sido estimados con relativo éxito en cítricos (Menesatti et al. 2010; Osco et al. 2020) con un resultado cercano al encontrado en esta tesis; mientras que para el Mg obtuvieron mejores coeficientes de estimación bajo condiciones de laboratorio diseñadas para obtener una variabilidad extrema, lo que facilita la obtención de  $R^2$  mayores, aunque alejadas de las condiciones de campo. En cuanto a los micronutrientes, se encontró una correlación relativamente baja para el Fe y satisfactoria para el Mn, que coincide con otros trabajos realizados, aunque en cítricos (Osco et al. 2020). Por lo tanto, los resultados muestran que un sistema basado en un espectrómetro portátil puede ser una herramienta útil para estimar de manera no destructiva el estado nutricional de las plantas de caqui, especialmente para los macronutrientes N, P, Ca, Mn y el B, mejorando así las recomendaciones posteriores de fertilización.

La segunda publicación presenta un estudio similar, pero utilizando imágenes hiperespectrales (HSI). Se utilizaron las muestras y datos del estudio anterior para evaluar la imagen hiperespectral como herramienta alternativa a los análisis de laboratorio, ya que combina la información espectral con la distribución espacial, permitiendo así capturar posibles variaciones de los nutrientes en las hojas. Los mejores resultados de predicción se obtuvieron para N, P, K, Ca, Mg y B con un  $R^2_p$  entre 0,65 y 0,84 y un RMSEP bajo en todos los casos. El N y el B fueron los nutrientes estimados con mayor precisión, con  $R^2$  de 0,72 y 0,84, respectivamente. Los nutrientes S, Na, Fe, Zn, Mn y Cu, no se pudieron predecir con fiabilidad debido a que los  $R^2$  obtenidos oscilaron entre 0,24 y 0,50, respectivamente. Además, se realizó un estudio para identificar las bandas espectrales más importantes en la estimación de los nutrientes. Para el N, K y B se obtuvo el mejor resultado de predicción. Esta selección se realizó mediante el método de variable de importancia



en la proyección (VIP), eligiendo aquellas variables que más contribuyen. En este caso, aquellas que presentaban la puntuación VIP superior a 1 indican longitudes de onda de gran importancia (Alchanatis et al. 2005; Gates, 1965; Ulissi et al. 2011). Considerando la evolución del  $R^2$ , el número de longitudes de onda seleccionadas para N se fijó en 8, para B fue 11, mientras que para K se escogieron 17 longitudes de onda. En general, los resultados para N y B fueron ligeramente inferiores a los obtenidos utilizando todo el espectro, lo que indica que utilizar sólo un conjunto de variables importantes es suficiente para realizar estimaciones razonablemente buenas. Sin embargo, para el K se alcanzó un  $R^2$  de 0,43 con las bandas elegidas, que es inferior al que se obtuvo cuando se utilizó todo el espectro, por lo que se consideró que no era suficiente un número reducido de bandas para hacer una estimación precisa. Al igual que en el caso anterior, no existen trabajos previos que utilicen imagen hiperespectral para estimar concentraciones de nutriente en caqui, siendo este el primer estudio en hacerlo. Además, hay pocos trabajos realizados sobre frutales. En hojas de manzano, Ye et al. (2020) obtuvieron resultados similares, con un  $R^2$  de 0,77 para la predicción de N en un rango espectral de entre 400-1000 nm. Este estudio empleó técnicas de selección de bandas además del VIP, como los coeficientes de correlación de Pearson, ponderaciones del PLS con las que identificar las longitudes de onda clave para el desarrollo de modelos mediante métodos de regresión lineal (MLR). Abenina et al. (2022) utilizaron diferentes pretratamientos espectrales para reducir la dispersión y eliminar los valores atípicos en las hojas del cultivo de melocotón. Estos autores obtuvieron los mejores resultados con la aplicación del pretratamiento MSC con un  $R^2$  de 0,81 y SNV con un  $R^2$  de 0,85 para la estimación del K.

La tercera publicación de esta tesis estudió la posibilidad de determinar la concentración de nutrientes en hojas de cítricos cv. 'clementina de Nules', mediante espectroscopía Vis-NIR, a lo largo de un ciclo vegetativo completo. Se crearon modelos de estimación para macro (N, P, K, Ca, Mg y S) y micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn y B) mediante PLSR. Los macronutrientes P y K se estimaron de manera más precisa con un  $R^2$  de 0,60 y 0,63, usando el pretratamiento de MC + SNV, respectivamente. En los micronutrientes, el B se ha estimado con una mayor fiabilidad obteniendo un  $R^2$  de 0,69, aplicando la combinación de los pretratamientos de MC + 1D.

En cítricos, existen dos trabajos previos que destacan por haber obtenido resultados relevantes. El primer trabajo fue publicado por Menesatti et al. (2010) y obtuvo unos coeficientes de correlación superiores a 0.90 para N, K, Ca, Fe, Mg, Mn y Zn utilizando el rango espectral entre 400 y 1000 nm. En este estudio se realizó un

tratamiento diferencial de N, que no explica los resultados obtenidos ya que son extraordinariamente superiores a cualquier otro estudio en cualquier cultivo. El segundo trabajo, publicado por Osco et al. (2020) contiene errores conceptuales graves y presenta serias dudas en cuanto a la metodología. Los resultados se obtuvieron solamente con el análisis de 32 hojas, se utilizaron métodos de clasificación en vez de métodos de regresión, sin explicar cómo se obtuvieron los coeficientes de determinación y, los órganos muestreados parecen incluir desde hojas sanas a hojas prácticamente muertas, lo que pudo influir en la reflectancia más que la propia concentración nutricional. Además de predecir la concentración de nutrientes, se realizó una evaluación de las longitudes de onda más relevantes, con los modelos más precisos, utilizando los coeficientes de regresión ponderados (BW) del modelo PLS-R, para conocer las bandas de mayor interés para la predicción de esos elementos y, aparte, encontrar una relación de cada elemento con el funcionamiento de la fisiología vegetal del cultivo. Así, las longitudes de onda más importantes para la predicción del P, K y B se hallaron en los rangos 440-530 nm y 560-690 nm. Para P, las longitudes de onda seleccionadas, en orden de importancia, fueron 483, 554, 689, 538, 454, 475, 520 y 612 nm. Para K fueron 457, 538, 596, 688, 475, 560 y 499 nm, y, para B 472, 659, 506, 596, 443, 649, 683, 480, 562, 498 y 699 nm. Un hallazgo importante de este estudio radica en que las longitudes de onda seleccionadas para los nutrientes que se relacionan más con la estructura o funcionalidad de la clorofila, estaban situadas en la región visible (430-750 nm), que se corresponden con pigmentos fotosintéticos (Alchanatis et al. 2005; Gates, 1965).

En la cuarta publicación, al igual que en el caso del caqui, se ha estudiado el potencial de las imágenes hiperespectrales en el rango espectral entre 500 y 980 nm, para medir la concentración de macro (N, P, K, Ca, Mg, S y Na) y micronutrientes (Fe, Cu, Mn, Zn y B) en hojas de cítricos, en ciclos vegetativos distintos. A diferencia del estudio anterior en el que se utilizó espectroscopia, este trabajo incluye hojas muestreadas de dos campañas consecutivas: en la primera se recogieron 480 hojas (incluyendo jóvenes y viejas) en el mes de mayo, y en la campaña siguiente, se muestrearon 640 hojas de brotación de la primavera entre los meses de mayo a diciembre.

En una primera parte, se calibraron modelos PLS-DA para discriminar entre hojas jóvenes y viejas obteniendo un resultado superior al 99 % de clasificación correcta, lo que nos indica que es posible la discriminación de las hojas de primavera con una gran precisión. La importancia de este resultado radica en que las tablas de recomendación actuales se obtuvieron para valores de concentración de nutrientes de hojas de la brotación de primavera y, dada la gran variabilidad existente en cuanto a concentración nutricional en hojas de diferentes brotaciones, es necesario realizar

los análisis sobre estas mismas hojas de primavera para obtener diagnósticos reales del estado nutricional de una parcela. Un sistema hiperespectral que capture una imagen del árbol podrá aplicar esta discriminación previa para realizar la estimación únicamente sobre las hojas adecuadas, facilitando el muestreo para los agricultores que encuentran una gran dificultad en seleccionar las hojas a muestrear, aumentando, por tanto, la precisión del análisis realizado.

Utilizando todo el rango espectral, se obtuvo la mejor predicción para los macronutrientes de P, K y Ca, con  $R^2_P$  entre 0,61 y 0,69. Los micronutrientes mejores estimados fueron el Fe y el Cu con  $R^2_P$  0,60 y 0,63 respectivamente. Para el resto de los nutrientes (N, Mg, Na, S, Mn, Zn y B), se obtuvieron  $R^2$  entre 0,56 y 0,18. Además, se realizó una selección de bandas de mayor importancia para los nutrientes que mejor resultados dieron en la estimación anterior (P, K, Ca, Fe y Cu), utilizando el BW de los modelos PLS-R. Para el P, K y Cu, las longitudes de onda óptimas se situaron principalmente en la región visible (de 500 nm a 750 nm), mientras que, para el Ca y Fe, un número similar de longitudes de onda de la región Vis y NIR (de 760 nm a 980 nm) resultaron importantes en su estimación. Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante espectroscopía, lo que confirma la importancia del rango visible para la mayoría de los nutrientes. De hecho, en la medición del espectro medio de las hojas de cítricos presenta una mayor absorción en la región visible, donde se produce la transmisión de electrones relacionada con los pigmentos fotosintéticos en las plantas (Zhang et al. 2007), debido principalmente al contenido en clorofila asociado a los picos de absorbancia en torno a 500 y 670 nm (Cochrane, 2000; Fu et al. 2022). La región de 510-520 nm también está asociada a los carotenoides (Ustin et al. 2009). La región NIR, está relacionada con la parte estructural de la hoja y los compuestos orgánicos (Prananto et al. 2020). El Ca es un constituyente de esta estructura y es responsable de mantener unidas las paredes celulares de las plantas (Prananto et al. 2020), mientras que el Cu ayuda a la síntesis de lignina en las paredes celulares, que proporciona soporte estructural para mantener las plantas.

Por otro lado, se construyeron modelos utilizando las bandas seleccionadas para estimar los nutrientes de P, K, Ca, Fe y Cu. Los mejores resultados se han mostrado para los nutrientes de Ca y Cu con un  $R^2$  de 0,67 y 0,62, respectivamente, corroborando los resultados obtenidos en otros trabajos previos que, en hojas de cítricos, caqui y manzana, relacionan los picos de absorción o cambios de reflectancia del espectro del cultivo con la función que realiza cada elemento en su fisiología vegetal (Azadnia et al. 2023; Osco et al. 2020).



## **V. CONCLUSIONES GENERALES**



Esta sección presenta las principales conclusiones derivadas de las investigaciones realizadas en esta tesis. Estas conclusiones destacan la importancia y necesidad de avanzar en el desarrollo de técnicas no destructivas para estimar la concentración nutricional en hojas de caqui y cítricos, en sustitución de los análisis convencionales. Además, remarcan las principales ventajas de la espectroscopía y la imagen hiperespectral como alternativa y la necesidad de seguir investigando en esta línea para superar los inconvenientes encontrados.

- Se han utilizado técnicas de preprocesamiento para mejorar la señal e imágenes espectrales obtenidas, como SNV, MC, SNV y derivadas 1D y 2D. No se observa ninguna combinación de técnicas de que haya permitido mejorar los resultados para todos los nutrientes.
- La espectroscopia de reflectancia (430-1040 nm) es una técnica fiable para estimar las concentraciones de la mayor parte de macro y micronutrientes en hojas de caqui y cítricos a lo largo de un ciclo vegetativo completo. La concentración de todos los nutrientes se ha estimado con coeficientes de determinación superiores a 0,40 para ambos cultivos.
- Utilizando imágenes hiperespectrales (500-980 nm) se obtienen buenos resultados para la predicción de todos los macronutrientes, destacando N, P y K en el caso del caqui y P, K y Ca en los cítricos. En cuanto a los micronutrientes, sobresalen los resultados en la predicción de la concentración de B en ambos cultivos, mientras que, en el caso de los cítricos, Zn y Fe también muestran resultados relativamente satisfactorios.
- Se alcanzan mejores resultados en caqui que en cítricos. Entre los macronutrientes con mejores predicciones destacan el N, P, Ca y Mg en caqui y el P y K en cítricos. Entre los micros destacan el Mn y, especialmente, el B.
- Mediante la espectroscopía se obtienen mejores predicciones que la imagen hiperespectral, por lo que sería la técnica más recomendable, especialmente en el caqui. Para cítricos, las diferencias entre ambas tecnologías son menores, aunque la espectroscopia destaca por sus mejores resultados para estimar micronutrientes.
- Los macronutrientes se estiman mejor que los micronutrientes con ambas tecnologías. Algunos elementos, como el S, el Na o el Cu fueron imposibles de estimar con coeficientes de determinación aceptables, mientras que otros como el N, P, K, Ca o B logran estimaciones satisfactorias en ambos cultivos.

- En el caso de los cítricos, se ha creado un modelo capaz de diferenciar entre hojas jóvenes y viejas, lo que resulta de gran utilidad para obtener diagnósticos más ajustados a las tablas de referencia actuales.
- Se han utilizado técnicas de extracción de características para obtener predicciones con un conjunto reducido de longitudes de onda. Esta selección se ha aplicado para los nutrientes con mejores coeficientes de determinación. Los resultados son ligeramente inferiores a los obtenidos con todo el espectro.
- En general, las longitudes de onda seleccionadas corresponden a la absorbancia de la clorofila (alrededor de 500 y 670 nm), el borde rojo (alrededor de 770 nm) y un pico de absorción de agua (950 nm), lo que se ha relacionado con la composición química y estructural de la hoja.

Esta tesis confirma la validez de las técnicas espectrales estudiadas para estimar la concentración de nutrientes en los cultivos de cítricos y caqui, permitiendo realizar un diagnóstico nutricional de forma rápida y no destructiva. Es recomendable utilizar un rango espectral mayor en ambas tecnologías (al menos de 400 a 1800 nm) y buscar índices espectrales específicos que permitan la implementación de estas tecnologías en cámaras multiespectrales o dispositivos electrónicos, como alternativa a índices genéricos como el NDVI, el TCARI o el OSAVI. Finalmente, sería importante analizar los datos con nuevos algoritmos de inteligencia artificial (IA).



## **VI. REFERENCIAS**



- Abdi, H. (2010). Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *WIREs Computational Statistics*, 2(1), 97-106. <https://doi.org/10.1002/wics.51>
- Abenina, M. I. A., Maja, J. M., Cutulle, M., Melgar, J. C., & Liu, H. (2022). Prediction of Potassium in Peach Leaves Using Hyperspectral Imaging & Multivariate Analysis. *AgriEngineering*, 4(2), 400-413. <https://doi.org/10.3390/agriengineering4020027>
- Acosta, M., Visconti, F., Quiñones, A., Blasco, J., & de Paz, J. M. (2023). Estimation of Macro & Micronutrients in Persimmon (*Diospyros kaki L.*) cv. 'Rojo Brillante' Leaves through Vis-NIR Reflectance Spectroscopy. *Agronomy*, 13(4), 1105. <https://doi.org/10.3390/agronomy13041105>
- Agelet, L. E., & Hurburgh, C. R. (2010). A Tutorial on Near Infrared Spectroscopy & Its Calibration. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(4), 246-260. <https://doi.org/10.1080/10408347.2010.515468>
- Alchanatis, V., Schmilovitch, Z., & Meron, M. (2005). In-field assessment of single leaf nitrogen status by spectral reflectance measurements. *Precision Agriculture*, 6(1), 25-39. <https://doi.org/10.1007/s11119-005-0682-7>
- Almeida, H. J. D., Carmona, V. M. V., Cavalcante, V. S., Filho, A. B. C., Prado, R. D. M., Flores, R. A., & Mauad, M. (2020). Nutritional and visual diagnosis in broccoli (*Brassica oleracea var. italica L.*) Plants: disorders in physiological activity, nutritional efficiency and metabolism of carbohydrates. *Agronomy*, 10(10), 1572. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101572>
- Alpaydin, E. (2020). Introduction to machine learning. *MIT press*.
- Amissah, S., Ankomah, G., Agyei, B. K., Lee, R. D., Harris, G. H., Cabrera, M., & Sintim, H. Y. (2023). Nutrient Sufficiency Ranges for Corn at the Early Growth Stage: Implications for Nutrient Management. *Plants*, 12(4), 713. <https://doi.org/10.3390/plants12040713>
- Araújo, M. C. U., Saldanha, T. C. B., Galvao, R. K. H., Yoneyama, T., Chame, H. C., & Visani, V. (2001). The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 57(2), 65-73. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00119-8)
- Arnon, D. I. (1971). The Light Reactions of Photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(11), 2883-2892. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.11.2883>
- Asner, G. P. (1998). Biophysical & Biochemical Sources of Variability in Canopy Reflectance. *Remote Sensing of Environment*, 64(3), 234-253. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(98\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(98)00014-5)
- Azadnia, R., Rajabipour, A., Jamshidi, B., & Omid, M. (2023). New approach for rapid estimation of leaf nitrogen, phosphorus, & potassium contents in apple-trees using Vis-NIR spectroscopy based on wavelength selection coupled with machine learning.

- Computers & Electronics in Agriculture*, 207, 107746.  
<https://doi.org/10.1016/j.compag.2023.107746>
- Barbazán, M. (1998). Análisis de plantas y síntomas visuales de deficiencia de nutrientes. Informe de asistente de fertilidad de suelos. *Informe de asistente de fertilidad de suelos*. Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, 3.
- Barker, A. V., & Pilbeam, D. J. (Eds.). (2015). *Handbook of plant nutrition*. CRC press.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied spectroscopy*, 43(5), 772-777.
- Bates, T. (1971). Factors affecting critical nutrient concentrations in plants & their evaluation. A review. *Soil Science*, 112, 116-130.
- Beebe, K. R., Pell, R. J., & Seasholtz, M. B. (1998). Chemometrics: a practical guide. (*No Title*).
- Bélanger, J., & Pilling, D. (2019). *The state of the world's biodiversity for food and agriculture*, 529.
- Bertoni, G., Morard, P., Soubieille, C., & Llorens, J. M. (1992). Growth & nitrogen nutrition of garlic (*Allium sativum* L.) during bulb development. *Scientia Horticulturae*, 50(3), 187-195. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(92\)90172-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(92)90172-9)
- Bertsch, F. (1995). La fertilidad de los suelos y su manejo. *Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. San José, Costa Rica*, 157.
- Berzal, F. (2017). Clustering jerárquico. Universidad de Granada, [En línea]. Available: [https://elvex.ugr.es/idbis/dm/slides/42% 20Clustering](https://elvex.ugr.es/idbis/dm/slides/42%20Clustering). [Acceso 12 de diciembre de 2023].
- Bhaduri, D., & Pal, S. (2013). Diagnosis and recommendation integrated system (DRIS): Concepts and applications on nutritional diagnosis of plants-a review. *Journal of Soil and Water Conservation*, 12(1), 70-79.
- Boulesteix, A.L., & Strimmer, K. (2006). Partial least squares: A versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data. *Briefings in Bioinformatics*, 8(1), 32-44. <https://doi.org/10.1093/bib/bbl016>
- Breiman, L. (2001). Random Forest. *Machine Learning*, 45(1), 5-32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Brown, C. D., Vega Montoto, L., & Wentzell, P. D. (2000). Derivative preprocessing & optimal corrections for baseline drift in multivariate calibration. *Applied Spectroscopy*, 54(7), 1055-1068.
- Brown, P. H., Welch, R. M., & Cary, E. E. (1987). Nickel: A Micronutrient Essential for Higher Plants. *Plant Physiology*, 85(3), 801-803. <https://doi.org/10.1104/pp.85.3.801>

- Bustan, A., & Goldschmidt, E. E. (1998). Estimating the cost of flowering in a grapefruit tree. *Plant, Cell & Environment*, 21(2), 217-224. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00267.x>
- Cadahía, C. (2008). La savia como índice de fertilización. Cultivos agroenergéticos, hortícolas, frutales y ornamentales. *Mundi-Prensa*. Madrid, España.
- 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. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292013000400003>
- Campisi-Pinto, S., Zheng, Y., Rolshausen, P. E., Crowley, D. E., Faber, B., Bender, G., Bianchi, M., Khuong, T., & Lovatt, C. J. (2017). Optimal Nutrient Concentration Ranges of 'Hass' Avocado Cauliflower Stage Inflorescences-Potential Diagnostic Tool to Optimize Tree Nutrient Status & Increase Yield. *HortScience*, 52(12), 1707-1715. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12437-17>
- Cánovas-García, F., Alonso-Sarría, F., Gomariz-Castillo, F., & Oñate-Valdivieso, F. (2017). Modification of the random forest algorithm to avoid statistical dependence problems when classifying remote sensing imagery. *Computers & Geosciences*, 103, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2017.02.012>
- Castañeda, C. S., Almanza-Merchán, P. J., Pinzón, E. H., Cely, G. E., & Serrano, P. A. (2018). Estimación de la concentración de clorofila mediante métodos no destructivos en vid (*Vitis vinifera L.*) cv. Riesling Becker. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 12(2), 329-337. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7566>
- Cayuela, M. L., Aguilera, E., Sanz-Cobena, A., Adams, D. C., Abalos, D., Barton, L., & Lassaletta, L. (2017). Direct nitrous oxide emissions in Mediterranean climate cropping systems: Emission factors based on a meta-analysis of available measurement data. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 238, 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.10.006>
- Cervantes, J., García Lamont, F., López-Chau, A., Rodríguez Mazahua, L., & Sergio Ruíz, J. (2015). Data selection based on decision tree for SVM classification on large data sets. *Applied Soft Computing*, 37, 787-798. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2015.08.048>
- Cho, W. J., Kim, H. J., Jung, D. H., Han, H. J., & Cho, Y. Y. (2019). Hybrid signal-processing method based on neural network for prediction of NO<sub>3</sub>, K, Ca, and Mg ions in hydroponic solutions using an array of ion-selective electrodes. *Sensors*, 19(24), 5508. <https://doi.org/10.3390/s19245508>
- Chong, I. G., & Jun, C. H. (2005). Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics & Intelligent Laboratory Systems*, 78(1), 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.011>
- Clarkson, D. T., & Hanson, J. B. (1980). The mineral nutrition of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 31, 239-298.

- Cochrane, M. A. (2000). Using vegetation reflectance variability for species level classification of hyperspectral data. *International Journal of Remote Sensing*, 21(10), 2075-2087. <https://doi.org/10.1080/01431160050021303>
- Consejo Europeo. (2023). De la granja a la mesa. <https://www.consilium.europa.eu/es/policias/from-farm-to-fork/>. [Acceso 12 octubre de 2023]
- Correndo, A., & García, F. (2017). Métodos de diagnóstico nutricional en cultivos extensivos en Argentina. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica*, 26, 3-12
- Cortés, V., Blanes, C., Blasco, J., Ortíz, C., Aleixos, N., Mellado, M., Cubero, S., & Talens, P. (2017). Integration of simultaneous tactile sensing & visible & near-infrared reflectance spectroscopy in a robot gripper for mango quality assessment. *Biosystems Engineering*, 162, 112-123. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2017.08.005>
- Cover, T. M., & Thomas, J. A. (1991). Entropy, relative entropy & mutual information. *Elements of information theory*, 2(1), 12-13.
- Cozzolino, D., Cynkar, W. U., Shah, N., & Smith, P. (2011). Multivariate data analysis applied to spectroscopy: Potential application to juice and fruit quality. *Food Research International*, 44(7), 1888-1896. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.041>
- de Bang, T. C., Husted, S., Laursen, K. H., Persson, D. P., & Schjoerring, J. K. (2021). The molecular-physiological functions of mineral macronutrients and their consequences for deficiency symptoms in plants. *New Phytologist*, 229(5), 2446-2469. <https://doi.org/10.1111/nph.17074>
- De La Calle, I., Cabaleiro, N., Romero, V., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2013). Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 90, 23-54. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.10.001>
- de Mello Prado, R., & Rozane, D. E. (2020). Leaf analysis as diagnostic tool for balanced fertilization in tropical fruits. *Fruit crops*, 131-143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818732-6.00011-3>
- Desmit, X., Thieu, V., Billen, G., Campuzano, F., Dulière, V., Garnier, J., Lassaletta, L., Ménesguen, A., Neves, R., Pinto, L., Silvestre, M., Sobrinho, J. L., & Lacroix, G. (2018). Reducing marine eutrophication may require a paradigmatic change. *Science of The Total Environment*, 635, 1444-1466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.181>
- Dhanao, M. S., Lister, S. J., Sanderson, R., & Barnes, R. J. (1994). The link between multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variate (SNV) transformations of NIR spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2(1), 43-47. <https://doi.org/10.1255/jnirs.30>
- Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., & Fiñana, I. T. (2010). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Universidad de Córdoba*, 1-8.

- Dong, T., Shang, J., Chen, J. M., Liu, J., Qian, B., Ma, B., & Zhou, G. (2019). Assessment of portable chlorophyll meters for measuring crop leaf chlorophyll concentration. *Remote Sensing*, *11*(22), 2706. <https://doi.org/10.3390/rs11222706>
- Epstein, A. B. (2004). *Mineral Nutrition of Plants: Principles & Perspectives*. Inc. Publishers, Sunderl&, MA, 2 ed.
- Espinosa-Zúñiga, J. J. (2020). Aplicación de algoritmos Random Forest y XGBoost en una base de solicitudes de tarjetas de crédito. *Ingeniería, investigación y tecnología*, *21*(3). <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2020.21.3.022>
- Everitt, B., & Dunn, G. (2001). *Applied multivariate data analysis* (Vol. 2). London: Arnold.
- Fageria, N. K. (2009). The use of nutrients in crop plants. *CRC Press. Boca Raton*. FL.
- FAOSTAT. (2021). *Agricultural Outlook 2021-2032*. <https://doi.org/10.1787/08801ab7-en>. [Acceso 14 noviembre de 2023]
- Flis, S. (2018). 4R history and recent phosphorus research. *Crops & Soils*, *51*(2), 36-47. <https://doi.org/10.2134/cs2018.51.0207>
- Flis, S. (2019). 4R nitrogen fertilizer management in cotton production. *Crops & Soils*, *52*(3), 22-24. <https://doi.org/10.2134/cs2019.52.0303>
- Fontal, B. (2005). *El espectro electromagnético y sus aplicaciones*. Merida: Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química.
- Foth, E. B. (1997). *Soil Fertility*. Boca Raton, Florida. *CRC Press*. 2nd Ed. 290.
- Fu, L., Sun, J., Wang, S., Xu, M., Yao, K., & Zhou, X. (2022). Nondestructive evaluation of Zn content in rape leaves using MSSAE and hyperspectral imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *281*, 121641. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121641>
- Gates, D. M. (1965). Energy, plants, and ecology. *Ecology*, *46*(1-2), 1-13.
- Gianquinto, G., Goffart, J. P., Olivier, M., Guarda, G., Colauzzi, M., Dalla Costa, L., & 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.
- Goodfellow, I., Bengio, Y., & Courville, A. (2016). *Deep learning*. Deep learning. *MIT Press*.
- Gregoire, N., & Fisher, R. F. (2004). Nutritional diagnoses in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) established stands using three different approaches. *Forest ecology and management*, *203*(1-3), 195-208. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.07.049>
- Gu, H., Li, C., Xu, Y., Hu, W., & Chen, M. (2008). Structural features & antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *41*, 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.011>
- Havlin, J., Tisdale, S., Nelson, W., & Beaton, J. (2014). *Soil fertility & fertilizers: An introduction to nutrient management*. *Pearson*, 8th ed.
- Haykin, S. (2009). *Neural networks & learning machines*, 3/E. Pearson Education India.

- Henry, J., Veazie, P., Furman, M., Vann, M., & Whipker, B. (2023). Spectral Discrimination of Macronutrient Deficiencies in Greenhouse Grown Flue-Cured Tobacco. *Plants*, 12(2), 280. <https://doi.org/10.3390/plants12020280>
- Hernando, V., & Cadahia, C. (1973). El análisis de savia como índice de fertilización. *Consejo Superior de Investigaciones de España, Instituto Edafología y Biología Vegetal, Madrid, España*.
- Herrera, J., Rodríguez, J., Coto, J. M., Salgado, V., & Borbón, H. (2013). Evaluación de metales pesados en los sedimentos superficiales del río Pirro. *Escuela de Química, Universidad Nacional, Costa Rica*, 26(1), 27-36.
- Hyndman, R. J., & Koehler, A. B. (2006). Another look at measures of forecast accuracy. *International Journal of Forecasting*, 22(4), 679-688. <https://doi.org/10.1016/j.ijforecast.2006.03.001>
- Hyvärinen, A., Karhunen, J., & Oja, E. (2001). Independent component analysis. *John Wiley & Sons, Inc., New York*, 165-202.
- INTAGRI. (2017). Las 4R's para el Manejo Responsable de la Fertilización. Serie Nutrición Vegetal Núm. 101. *Artículos Técnicos de INTAGRI*. México. Serie Nutrición Vegetal Núm. 101. *Artículos Técnicos de INTAGRI*. México
- Jie, W., Hua-bing, Z., Chang-wei, S., qiao-wei, C., Cai-xia, D., & Yang-chun, X. (2014). Determination of Nitrogen Concentration in Fresh Pear Leaves by Visible/Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Agronomy Journal*, 106(5), 1867-1872. <https://doi.org/10.2134/agronj13.0303>
- Jifon, J. L., Syvertsen, J. P., & Whaley, E. (2005). Growth Environment & Leaf Anatomy Affect Nondestructive Estimates of Chlorophyll & Nitrogen in Citrus sp. Leaves. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(2), 152-158. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.152>
- Jiménez Heinert, M. E., Grijalva Endara, A. de las M., & Ponce Solórzano, H. X. (2020). Plasma acoplado inductivamente en espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES). *Recimundo*, 4(4), 4-12. [https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(4\).octubre.2020.4-12](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(4).octubre.2020.4-12)
- Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: A review & recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical & Engineering Sciences*, 374(2065), 20150202. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- Jones, J. B. (2012). *Plant Nutrition & Soil Fertility Manual*. Ed. CRC Press. EE. UU. Ed. CRC Press. EE. UU. 282.
- Kalaji, H. M., Dąbrowski, P., Cetner, M. D., Samborska, I. A., Łukasik, I., Brestic, M., Zivcak, M., Tomasz, H., Mojski, J., Kociel, H., & Panchal, B. M. (2017). A comparison between different chlorophyll content meters under nutrient deficiency conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 40(7), 1024-1034. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1263323>



- Kaur, H., & Srivastava, S. (2023). The beneficial roles of trace & ultratrace elements in plants. *Plant Growth Regulation*, 100(2), 219-236. <https://doi.org/10.1007/s10725-022-00837-6>
- Keithley, R. B., Mark Wightman, R., & Heien, M. L. (2009). Multivariate concentration determination using principal component regression with residual analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(9), 1127-1136. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.002>
- Khalid, S., Khalil, T., & Nasreen, S. (2014). A survey of feature selection & feature extraction techniques in machine learning. 2014 *Science & Information Conference*, 372-378. <https://doi.org/10.1109/SAI.2014.6918213>
- Kodinariya, T. M., & Makwana, P. R. (2013). Review on determining number of Cluster in K-Means Clustering. *International Journal*, 1(6), 90-95.
- Kumar, S., & Mohapatra, T. (2021). Interaction Between Macro- & Micro-Nutrients in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.665583>
- Lacertosa, G., Giuffrida, A., & Mennone, C. (2001). Stato nutrizionale e qualità dei frutti in agrumeti del metapontino. *XVII Convegno SICA*, 387-394.
- Landriscini, M. R., Galantini, J. A., & Rosell, R. A. (2002). Aplicación de la metodología DRIS al cultivo de trigo en la región semiárida pampeana. *Balance NPKS. Investigaciones Agronómicas. INPOFOS Cono Sur*, 12, 6-11.
- Ling, B., Goodin, D. G., Raynor, E. J., & Joern, A. (2019). Hyperspectral analysis of leaf pigments & nutritional elements in tallgrass prairie vegetation. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00142>
- Liu, B., Yue, Y. M., Li, R., Shen, W. J., & Wang, K. L. (2014). Plant leaf chlorophyll content retrieval based on a field imaging spectroscopy system. *Sensors*, 14(10), 19910-19925. <https://doi.org/10.3390/s141019910>
- Lorente, D., Aleixos, N., Gómez-Sanchis, J., Cubero, S., García-Navarrete, O. L., & Blasco, J. (2012). Recent Advances & Applications of Hyperspectral Imaging for Fruit & Vegetable Quality Assessment. *Food & Bioprocess Technology*, 5(4), 1121-1142. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0725-1>
- Lucena, J. R., Ruano, S., García-Serrano, P., Ginés, I., & Mariscal, I. (2002). Informe DRIS: Normas para el diagnóstico del análisis foliar del olivo, partiendo de la base de datos de Fertiberia. *Madrid, España*, 9-18.
- Luo, C., Xue, L., Liu, M., Li, J., & Wang, X. (2011). Nondestructive measurement of sugar content in navel orange based on Vis-NIR spectroscopy. *Springer Berlin Heidelberg*. 467-473.
- Malavolta, E., & Moraes, M. F. (2007). Nickel-from toxic to essential nutrient. *Better Crops*, 91(3), 26-27.
- Malmir, M., Tahmasbian, I., Xu, Z., Farrar, M. B., & Bai, S. H. (2020). Prediction of macronutrients in plant leaves using chemometric analysis and wavelength

- selection. *Journal of soils and sediments*, 20, 249-259. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02418-z>
- MAPA. (2022). Anuario de estadística del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx> [Acceso 13 de diciembre de 2023]
- MAPA. (2023). Análisis de la campaña de cítricos 2022/2023 (pp. 1-50). Disponible en [https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/informecampana2022-23citricossept22-feb23\\_tcm30-650104.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/informecampana2022-23citricossept22-feb23_tcm30-650104.pdf) [Acceso 11 de diciembre de 2023]
- Marschner, H. (1995). "Mineral Nutrition of Higher Plants, ". *Academic, London*, 2nd Editio, 369-379.
- Marschner, P. (2012). Rhizosphere biology. In Marschner's mineral nutrition of higher plants, 369-388.
- Martínez, T., Lartigue, J., Zarazua, G., Avila-Perez, P., Navarrete, M., & Tejeda, S. (2008). Application of the total reflection X-ray fluorescence technique to trace elements determination in tobacco. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63(12), 1469-1472. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.10.008>
- Matsuoka, K., Moritsuka, N., Nukada, M., Saito, Y., Ono, Y., & Kusaba, S. (2019). Identification of the effects of long-term application of nitrogen fertilizer on the availability of 11 elements in soils and their supply to 'Jonathan' apple trees by using simultaneous multi-element analysis. *Journal of Plant Nutrition*, 42(16), 1952-1966.
- Mehmood, T., Liland, K. H., Snipen, L., & Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in partial least squares regression. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 118, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.07.010>
- Menesatti, P., Antonucci, F., Pallottino, F., Rocuzzo, G., Allegra, M., Stagno, F., & Intrigliolo, F. (2010). Estimation of plant nutritional status by Vis-NIR spectrophotometric analysis on orange leaves [*Citrus sinensis* (L) Osbeck cv Tarocco]. *Biosystems Engineering*, 105(4), 448-454. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.01.003>
- Mengel, K., & Kirkby, E. A. (2012). Principles of plant nutrition. *Springer Science & Business Media*. No. Ed. 4, p. 687pp
- Menino, R. (2012). Leaf analysis in citrus: Interpretation tools. *Advances in Citrus Nutrition*, 59-79. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3_5)
- Ministerio de la Presidencia (2022). BOE-A-2022-860. Ministerio de la Presidencia, Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática. Disponible en <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2022-860> [Acceso 10 de diciembre de 2023]
- Ministerio de transición ecológica (2020). El Pacto Verde Europeo, su desarrollo y la financiación europea, especial referencia al Mecanismo de Recuperación y Resiliencia.

- Morales, J., Rodríguez-Carretero, I., Martínez-Alcántara, B., Canet, R., & Quiñones, A. (2022). DRIS Norms & Sufficiency Ranges for Persimmon 'Rojo Brillante' Grown under Mediterranean Conditions in Spain. *Agronomy*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy12061269>
- Moros, J., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2010). Vibrational spectroscopy provides a green tool for multi-component analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 578-591. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.012>
- Moujahid, A., Inza, I., & Larranaga, P. (2019). Clasificadores K-NN. Departamento de Ciencias de la Computación e inteligencia artificial, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea. 3(1).
- Næs, T., Isaksson, T., Fearn, T., & Davies, T. (2002). *A user-friendly guide to multivariate calibration & classification* (Vol. 6, p. 347). Chichester: NIR.
- Nagelkerke, N. J. (1991). A note on a general definition of the coefficient of determination. *biometrika*, 78(3), 691-692
- Nicolai, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., & Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest biology and technology*, 46(2), 99-118. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.024>
- Olabe, X. B. (1998). Redes neuronales artificiales y sus aplicaciones. *Publicaciones de la Escuela de Ingenieros*.
- Oliveira, R. C., da Silva, J. R. R., Lana, R. M. Q., de Azevedo Pereira, A. I., Castoldi, R., de Camargo, R., & Luz, J. M. Q. (2020). Fertilizer application levels in potato crops and the diagnosis and recommendation integrated system (DRIS). *Agronomy*, 11(1), 51. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010051>
- Olivier, M., Goffart, J., & Ledent, J. (2006). Threshold Value for Chlorophyll Meter as Decision Tool for Nitrogen Management of Potato. *Agronomy Journal*, 98(3), 496-506. <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0108>
- Ollinger, S. V. (2011). Sources of variability in canopy reflectance & the convergent properties of plants. *New Phytologist*, 189(2), 375-394. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03536.x>
- Oscó, L. P., Ramos, A. P. M., Fanta Pinheiro, M. M., Moriya, É. A. S., Imai, N. N., Estrabis, N., & Eduardo Creste, J. (2020). A machine learning framework to predict nutrient content in valencia-orange leaf hyperspectral measurements. *Remote Sensing*, 12(6), 906. <https://doi.org/10.3390/rs12060906>
- Otto, M. (2016). *Chemometrics: statistics & computer application in analytical chemistry*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9783527699377>
- Padilla, F. M., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., & Thompson, R. B. (2015). Threshold values of canopy reflectance indices and chlorophyll meter readings for optimal nitrogen

- nutrition of tomato. *Annals of Applied Biology*, 166(2), 271-285. <https://doi.org/10.1111/aab.12181>
- Padilla, F. M., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., & Thompson, R. B. (2014). Evaluation of optical sensor measurements of canopy reflectance and of leaf flavonols and chlorophyll contents to assess crop nitrogen status of muskmelon. *European journal of agronomy*, 58, 39-52. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.04.006>
- Parent, S. É., Parent, L. E., Rozane, D. E., & Natale, W. (2013). Plant ionome diagnosis using sound balances: case study with mango (*Mangifera Indica*). *Frontiers in plant science*, 4, 63683. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00449>
- Parry, C., Blonquist, J.M., & Bugbee, B. (2014). In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: Analysis of the optical/absolute relationship. *Plant, Cell & Environment*, 37(11), 2508-2520. <https://doi.org/10.1111/pce.12324>
- Pepi, S., Coletta, A., Crupi, P., Leis, M., Russo, S., Sansone, L., Tassinari, R., Chicca, M., & Vaccaro, C. (2016). Geochemical characterization of elements in *Vitis vinifera* cv. Negroamaro grape berries grown under different soil managements. *Environmental Monitoring & Assessment*, 188(4), 211. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5203-9>
- Pestana, M., de Varennes, A., Goss, M. J., Abadía, J., & Faria, E. A. (2004). Floral analysis as a tool to diagnose iron chlorosis in orange trees. *Plant and Soil*, 259, 287-295. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000020979.83817.b4>
- Petisco, C., García-Criado, B., Vázquez de Aldana, B. R., Zabalgoeazcoa, I., Mediavilla, S., & García-Ciudad, A. (2005). Use of near-infrared reflectance spectroscopy in predicting nitrogen, phosphorus & calcium contents in heterogeneous woody plant species. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 382(2), 458-465. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-3046-7>
- Plaza, L., Colina, C., Ancos, B. D., Sánchez-moreno, C., & Cano, M. P. (2012). Influence of ripening & astringency on carotenoid content of high-pressure treated persimmon fruit (*Diospyros kaki L*). 130, 591-597. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.080>
- Prananto, J. A., Minasny, B., & Weaver, T. (2020). Near infrared (NIR) spectroscopy as a rapid & cost-effective method for nutrient analysis of plant leaf tissues (pp. 1-49). <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2020.06.001>
- Quaggio, J. A., Mattos Jr. D., & Boaretto, R. M. (2010). Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes. *Piracicaba: International Plant Nutrition*, pp. 371-409.
- Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., & Kawai, S. (2005). Effects of Nickel on Growth & Composition of Metal Micronutrients in Barley Plants Grown in Nutrient Solution. *Journal of Plant Nutrition*, 28(3), 393-404. <https://doi.org/10.1081/PLN-200049149>
- Rehman, A. U., Nazir, S., Irshad, R., Tahir, K., Rehman, K., Islam, R. U., & Wahab, Z. (2021). Toxicity of heavy metals in plants and animals and their uptake by magnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Molecular Liquids*, 321, 114455. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114455>

- Reussi Calvo, N. I., Rozas, H. S., Echeverría, H., & Diovisalvi, N. (2015). Using canopy indices to quantify the economic optimum nitrogen rate in spring wheat. *Agronomy Journal*, *107*(2), 459-465.
- Rinnan, A., Van Den Berg, F., & Engelsen, S. B. (2009). Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *28*(10), 1201-1222. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.007>
- Rock, B. N., Vogelmann, J. E., Williams, D. L., Vogelmann, A. F., & Hoshizaki, T. (1986). Remote Detection of Forest Damage: Plant responses to stress may have spectral “signatures” that could be used to map, monitor, and measure forest damage. *Bioscience*, *36*(7), 439-445. <https://doi.org/10.2307/1310339>
- Rockström, J., Gupta, J., Qin, D., Lade, S. J., Abrams, J. F., Andersen, L. S., & Zhang, X. (2023). Safe and just Earth system boundaries. *Nature*, *619*(7968), 102-111. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06083-8>
- Rodríguez, A., Peña-Fleitas, M. T., Padilla, F. M., Gallardo, M., & Thompson, R. B. (2021). Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper. *Scientia Horticulturae*, *285*, 110157. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110157>
- Rojas, R. (1996). Networks of neurons. *Neural Networks: A Systematic Introduction*. Springer Science & Business Media, pp. 9-21. *Springer Science & Business Media*, 9-21.
- Rosenberg, R., Bono Jr, M. S., Braganza, S., Vaishnav, C., Karnik, R., & Hart, A. J. (2018). In-field determination of soil ion content using a handheld device and screen-printed solid-state ion-selective electrodes. *Plos one*, *13*(9), e0203862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203862>
- Rotbart, N., Schmilovitch, Z., Cohen, Y., Alchanatis, V., Erel, R., Ignat, T., Shenderey, C., Dag, A., & Yermiyahu, U. (2013). Estimating olive leaf nitrogen concentration using visible & near-infrared spectral reflectance. *Biosystems Engineering*, *114*(4), 426-434. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.09.005>
- Rozane, D. E., Parent, L. E., & Natale, W. (2016). Evolution of the predictive criteria for the tropical fruit tree nutritional status. *Científica*, *44*(1), 102-112. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n1p102-112>
- Savitzky, A., & Golay, M. J. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical chemistry*, *36*(8), 1627-1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>
- Schepers, J. S., Blackmer, T. M., Wilhelm, W. W., & Resende, M. (1996). Transmittance and reflectance measurements of corn leaves from plants with different nitrogen and water supply. *Journal of plant physiology*, *148*(5), 523-529. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80071-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80071-X)
- Shi, J., Li, W., Zhai, X., Guo, Z., Holmes, M., Elrasheid Tahir, H., & Zou, X. (2019). Nondestructive diagnostics of magnesium deficiency based on distribution features of

- chlorophyll concentrations map on cucumber leaf. *Journal of Plant Nutrition*, 42(20), 2773-2783.
- Siedliska, A. Baranowski, P. Pastuszka-Woźniak, J. Zubik, M. & Krzyszczak, J. (2021). Identification of plant leaf phosphorus content at different growth stages based on hyperspectral reflectance. *BMC Plant Biology*, 21(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02807-4>
- Siesler, H. W., Ozaki, Y., Kawata, S., & Heise, H. M. (Eds.). (2008). *Near-infrared spectroscopy: principles, instruments, applications*. John Wiley & Sons.
- Smith, P. F. (1962). Mineral Analysis of Plant Tissues. *Annual Review of Plant Physiology*, 13(1), 81-108. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.13.060162.000501>
- Stenberg, B., Jonsson, A., & Börjesson, T. (2005). Use of near infrared reflectance spectroscopy to predict nitrogen uptake by winter wheat within fields with high variability in organic matter. *Plant & Soil*, 269(1-2), 251-258. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0556-1>
- Sumner, M. E. (1979). Interpretation of Foliar Analyses for Diagnostic Purposes 1. *Agronomy Journal*, 71(2), 343-348.
- Dos Santos, C. A. T., Lopo, M., Páscoa, R. N., & Lopes, J. A. (2013). A review on the applications of portable near-infrared spectrometers in the agro-food industry. *Applied spectroscopy*, 67(11), 1215-1233. <https://doi.org/10.1366/13-07228>
- Thompson, R. L., Lassaletta, L., Patra, P. K., Wilson, C., Wells, K. C., Gressent, A., Koffi, E. N., Chipperfield, M. P., Winiwarter, W., Davidson, E. A. Tian, H. & Canadell, J. G. (2019). Acceleration of global N<sub>2</sub>O emissions seen from two decades of atmospheric inversion. *Nature Climate Change*, 9(12), 993-998. <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0613-7>
- Torkashv&, A. M., Ahmadi, A., & Nikraves, N. L. (2017). Prediction of kiwifruit firmness using fruit mineral nutrient concentration by artificial neural network (ANN) & multiple linear regressions (MLR). *Journal of Integrative Agriculture*, 16(7), 1634-1644. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61546-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61546-0)
- Torres -Beltran, N. G., Yanez-Muñoz, R. M., Soto Parra, J. M., & Noperi-Mosqueda, L. C. (2023). Nutritional standards through Integrated Differential Diagnosis (IDD) in pomegranate (*Punica granatum L.*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 51(1), 12988. <https://doi.org/10.15835/nbha51112988>
- Torri, S. (2015). Análisis foliar. *Facultad de Agronomía, UBA*. 40-47
- Uchida, R. (2000). Essential nutrients for plant growth: Nutrient functions and deficiency symptoms. *Plant nutrient management in Hawaii's soils*, 4, 31-55.
- Ulissi, V., Antonucci, F., Benincasa, P., Farneselli, M., Tosti, G., Guiducci, M., Tei, F., Costa, C., Pallottino, F., Pari, L., & Menesatti, P. (2011). Nitrogen concentration estimation in tomato leaves by VIS-NIR non-destructive spectroscopy. *Sensors*, 11(6), 6411-6424. <https://doi.org/10.3390/s110606411>

- Ustin, S. L., Gitelson, A. A., Jacquemoud, S., Schaepman, M., Asner, G. P., Gamon, J. A., & Zarco-Tejada, P. (2009). Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. *Remote Sensing of Environment*, 113, S67-S77. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2008.10.019>
- Valdés, F. A. (2018). Determinación de Cobre y oro en muestras de concentrado de Cobre mediante comparación de dos métodos: Digestión tradicional y digestión acida asistida por microondaas.
- Varmuza, K. & Filzmoser, P. (2009). Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics. *CRC press*
- Velliangiri, S., Alagumuthukrishnan, S., & Thankumar joseph, S. I. (2019). A Review of Dimensionality Reduction Techniques for Efficient Computation. *Procedia Computer Science*, 165, 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2020.01.079>
- Villalobos, F. J. (2008). Fitotecnia: Bases y Tecnologías de la Producción Agrícola. España: *MundiPrensa*, 2008.
- Villardón, J. L. V. (2007). Introducción al análisis de clúster. *Departamento de Estadística. Universidad de Salamanca*. 22p
- Walsh, K. B., Blasco, J., Zude-Sasse, M., & Sun, X. (2020). Visible-NIR ‘point’ spectroscopy in postharvest fruit & vegetable assessment: The science behind three decades of commercial use. *Postharvest Biology & Technology*, 168(June), 111246. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111246>
- Wang, J., Shen, C., Liu, N., Jin, X., Fan, X., Dong, C., & Xu, Y. (2017). Non-Destructive Evaluation of the Leaf Nitrogen Concentration by In-Field Visible/Near-Infrared Spectroscopy in Pear Orchards. *Sensors*, 17(3), 538. <https://doi.org/10.3390/s17030538>
- Ye, X., Abe, S., & Zhang, S. (2020). Estimation & mapping of nitrogen content in apple trees at leaf & canopy levels using hyperspectral imaging. *Precision Agriculture*, 21(1), 198-225. <https://doi.org/10.1007/s11119-019-09661-x>
- Zagatto, E. A., & Rocha, F. R. (2020). The multiple facets of flow analysis. A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 1093, 75-85. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.050>
- Zhang, L., Tian, F., & Zhang, D. (2018). Electronic nose: Algorithmic challenges (pp. 3-339). *Singapore: Springer*.
- Zhang, X., Davidson, E. A., Zou, T., Lassaletta, L., Quan, Z., Li, T., & Zhang, W. (2020). Quantifying nutrient budgets for sustainable nutrient management. *Global Biogeochemical Cycles*, 34(3), e2018GB006060. <https://doi.org/10.1029/2018GB006060>
- Zhang, X., Yao, G., Vishwakarma, S., Dalin, C., Komarek, A. M., Kanter, D. R., & Davidson, E. A. (2021). Quantitative assessment of agricultural sustainability reveals divergent priorities among nations. *One Earth*, 4(9), 1262-1277. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.08.015>

Zhang, Y., Chen, J. M., & Thomas, S. C. (2007). Retrieving seasonal variation in chlorophyll content of overstory & understory sugar maple leaves from leaf-level hyperspectral data. *Canadian Journal of Remote Sensing*, 33(5), 406-415. <https://doi.org/10.5589/m07-037>



