

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE AMONIO DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA SOBRE EL COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DEL CULTIVO DE LA ESCAROLA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL
MEDIO RURAL

ALUMNO: IÑIGO CALVO AMOR
DIRECTORA PARTE EXPERIMENTAL: ANDREA GROMAZ ROIG
TUTORES: JOSÉ FRANCISCO TORRES RUBIO
ALBERTO SAN BAUTISTA PRIMO

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, 7 DE JULIO 2015

RESUMEN:

La acumulación de nitratos en plantas aprovechables por sus hojas, como es el caso de la escarola, *Cichorium endivia L.*, puede estar influido por la fuente de nitrógeno que se suministra con el abonado. Por esta razón, se estableció como objetivo del presente experimento comparar la influencia de tres soluciones nutritivas con un mismo contenido en nitrógeno, con tres ratios Amonio/Nitratos diferentes (**N0**:0/13; **N5**:0,65/12,32; **N10**: 1,30/11,72 mmol L⁻¹), sobre la acumulación de nitratos en hojas y la producción final obtenida. También se pretendió determinar la evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad a lo largo del ciclo de cultivo. Asimismo, se quiso dilucidar, si las medidas realizadas con el SPAD y el colorímetro pueden ser incluidas como herramientas eficaces para la estimación de nitratos en hojas de escarola. Para todo ello, utilizando el cultivar de escarola ‘Cuartana’ – de hoja ancha- se analizó periódicamente (0, 14, 28,42 días después del trasplante) la evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad (contenido de clorofilas (SPAD), nitratos (reflectometría), nitrógeno (Kjeldahl), fósforo (colorimetría) y color de las hojas (escala CIELab)), y al final del cultivo, se valoraron el porcentaje de plantas comerciales, su peso medio y la incidencia de distintas fisiopatías (“tipburn” y subida a flor prematura).

El incremento de la concentración de amonio supuso un aumento de los valores de SPAD (contenido en clorofilas) y una disminución de los parámetros de color a^* y b^* . Los valores de SPAD se incrementaron con el desarrollo del ciclo, lo que fue unido a una disminución del color amarillo (parámetro b^*). El aumento de la concentración de amonio no disminuyó la acumulación de nitratos, la cual fue aumentando al avanzar el ciclo.

Palabras clave

Escarola, amonio, nitrógeno, nitratos, fósforo, SPAD, “tipburn”, concentración, solución.

ABSTRACT:

Nitrate accumulation in leafy vegetables, as endives, *Cichorium endivia L*, could be influenced by nitrogen source supplied in the fertilizing. That is why it established as the objective of this experiment compares the influence of three fertilizing, with the same amount of nitrogen, three different with three ratios Ammonium /Nitrate different (**N0**:0/13; **N5**:0,65/12,32; **N10**: 1,30/11,72 mmol L⁻¹), on the nitrates accumulation in leaves and the obtained final production. Also one tried to determine the evolution of different physiological parameters and of quality along the cultivation cycle. Also, it was about to elucidate, if the measurements realized with the SPAD and the colorimeter can to be included like effective hardware for the nitrates estimation in endive leaves. For all this, using cultivating of escarole ‘Cuartana’ – of wide leave - it was analyzed periodically (0, 14, 28,42 days after the transplant) the evolution of different physiological parameters and of quality (content of chlorophylls (SPAD), (reflectometry) nitrates, nitrogen (Kjeldahl), phosphorus (colorimeter) and color of the leaves (scale CIELab)), and at the end of the cultivation, there were valued the percentage of commercial plants, its middleweight and the incidence of different fisiopatías ("tipburn" and increase to premature flower). The increase of the concentration of ammonium supposed an increase of the values of SPAD (content in chlorophylls) and a decrease of the parameters of color *a** and *b**. The values of SPAD increased with the development of the cycle, what was joined to a decrease of the yellow color (parameter *b**). The increase of the concentration of ammonium did not decrease the accumulation of nitrates, which was increasing on having advanced the cycle.

Key words

Endive, ammonium, nitrogen, nitrate, phosphorus, SPAD, “tipburn”, concentration, fertilizing.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Alberto por darme la oportunidad de conocer la investigación.

A José y Andrea por su paciencia e implicación.

A mis padres y a Nora por estar siempre a mi lado.

Muchas gracias a todos ellos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Clasificación botánica y generalidades.	1
1.1.1. Importancia económica	1
1.2. Acumulación de nitratos en hortalizas de hoja.	2
1.2.1. Efectos perjudiciales para la salud humana.	2
1.2.2. Efectos beneficiosos para la salud humana	3
1.3. Factores que afectan a la acumulación de nitratos en hortalizas de hoja.	3
1.3.1. Factores nutritivos.	3
1.3.2. Factores fisiológicos	5
1.3.2.1 Variabilidad genética.	5
1.3.2.2 Distribución nítrica a través de la planta.	5
1.3.3 Factores externos: Relación intensidad lumínica – enzima nitrato reductasa.	6
1.3.4. Prácticas agronómicas	6
1.4 Métodos indirectos para estimar el contenido de nitrógeno y nitratos en las hojas de escarola	7
1.4.1. Medidas SPAD	7
1.4.2 Parámetros de color	8
1.5 Tasa relativa de Crecimiento.	8
1.6. Objetivos	8
2. MATERIAL Y MÉTODOS	9
2.1 Características del experimento	9
2.2. Parámetros estudiados y metodología	10
2.2.1. Evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad.	11
2.2.1.1. Medida de la concentración de clorofilas	11
2.2.1.2. Determinación de los parámetros de color y del contenido de nitratos.	11
2.2.1.3. Determinación de macronutrientes (N y P)	13
2.2.2. Análisis de la producción	16
2.2.2.1. Evaluación de la incidencia de las fisiopatías.	17
2.2.2.2. Producción comercial.	17
2.2.3. Tasa de crecimiento.	17
2.2.4. Análisis estadísticos de los resultados.	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. RESULTADOS	19
3.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	25

4. CONCLUSIONES	30
5. BIBLIOGRAFÍA	31
ANEJOS.	36
ANEJO FOTOGRÁFICO	36
ANEJO TEMPERATURA Y HUMEDAD	37

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Clasificación botánica y generalidades.

La escarola (*Cichorium endivia* L.) es una hortaliza que forma parte de la familia *Compositae* y al género *Cichorium*.

Existen dos variedades botánicas claramente diferenciadas (Maroto, 2000):

- *Cichorium endivia* L. var. *crispa* L: se caracteriza por las hojas divididas en estrechos y retorcidos segmentos y los bordes fuertemente dentados. Como cvs. de otoño invierno pueden citarse: *Cabello de Ángel*, *Despa*, etc. Entre los cvs. de primavera verano: *Rizada doble de verano*.

- *Cichorium endivia* L. var. *latifolia* L: son escarolas con las hojas muy anchas, algo onduladas, y con un dentado muy ligero. Entre los cvs. de otoño-invierno: *Gigante*, *Hortelana*, *Ágora*, *Natacha*. Entre los cvs. de primavera-verano: *Malan*, *Gruesa Bouclée*, *Cuartana*.

En los últimos años, existe un interés creciente en este cultivo, fundamentalmente para la elaboración de ensaladas y presentaciones de cuarta gama. Por su sabor ligeramente amargo se le considera un estimulador del apetito. Desde el punto de vista nutricional destaca por su contenido en vitamina A (Maroto, 2002).

Los requerimientos climáticos de la escarola se consideran similares a los de la lechuga, por ello muchos estudios realizados en este cultivo sirven como patrón orientativo para extraer conclusiones que pueden ser utilizadas para la escarola (Ryder, 1999).

1.1.1. Importancia económica

La superficie dedicada en España al cultivo de esta hortaliza en el año 2014, fue de 20.700 has, con una producción de 75.732 t, siendo Cataluña la comunidad autónoma más productora, seguida de Murcia y de la Comunidad Valenciana (MAGRAMA, 2014).

En España, las exportaciones de este cultivo junto a las de las endivias alcanzaron las 61. 616 t, sin embargo las importaciones apenas alcanzaron las 7. 939 t (FEPEX, 2014).

En la actualidad, la presencia de la escarola en el mercado como componente de bolsas de ensalada preparadas de cuarta gama, es mayor que como hortaliza consumida en fresco (FEPEX, 2014).

1.2. Acumulación de nitratos en hortalizas de hoja.

El ion nitrato tiene una gran importancia y desempeña un papel imprescindible en la nutrición vegetal. La mayor parte del nitrógeno absorbido por las plantas para la síntesis de proteínas se realiza bajo este ion (Maroto, 2000).

Aunque los nitratos en sí no representan un riesgo para la salud humana, un exceso de éstos puede suponer un problema debido a los compuestos tóxicos que de ellos se derivan; por ello, la acumulación de nitratos en hortalizas de hoja se presenta como uno de los aspectos más destacables a controlar en estos cultivos (Rincón *et al.*, 2002).

1.2.1. Efectos perjudiciales para la salud humana.

Algunos de los problemas relacionados con la salud humana provocados por la toxicidad nítrica son conocidos. La existencia de esta toxicidad se debe a la reducción de los nitratos a forma nítrica y su posterior reacción con aminos y amidas localizadas fundamentalmente en el estómago produciendo nitrosaminas y nitrosamidas, compuestos cuyo efecto cancerígeno es bien conocido (Walker, 1990). El principal mecanismo que provoca la toxicidad nítrica es la oxidación del ion ferroso (Fe^{2+}) en la hemoglobina a ión férrico (Fe^{3+}), produciendo la alteración metahemoglobinemia, que provoca una detención en la oxigenación del organismo (Knobeloch *et al.*, 2000; Mesinga *et al.*, 2003).

Esta alteración no es común que se presente en personas adultas, sin embargo se han llegado a observar casos incluso mortales en lactantes, debido a que presentan una menor acidez en su jugo gástrico, hecho que acelera la transformación de la hemoglobina a metahemoglobina (Maroto *et al.*, 2000).

Por tanto los lactantes son un grupo susceptible a esta toxicidad, pero no es el único colectivo afectado, dado que también las personas mayores de 45 años son susceptibles a esta anomalía, aunque en un menor grado.

Para evitar posibles riesgos, agrupaciones sanitarias se han pronunciado respecto a este tema, concretamente la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un valor de 4 mg por kg de peso corporal como dosis diaria máxima admisible (Maroto *et al.*, 2000).

Tomando como referencia la lechuga, cultivo que se puede asociar a la escarola, la concentración máxima de nitratos establecida por la Unión Europea es de 5000 mg $NO_3 Kg^{-1}$ en lechugas cultivadas en la modalidad bajo invernadero y de 4000 mg $NO_3 Kg^{-1}$ al aire libre, recolectadas entre el 1 de octubre y 31 de marzo, y de 4000 mg $NO_3 Kg^{-1}$ y 3000 mg

$NO_3 Kg^{-1}$ las que son recolectadas entre el 1 de abril y 30 de septiembre. De esta clasificación se excluye a la lechuga tipo "Iceberg".

1.2.2. Efectos beneficiosos para la salud humana

En contrapartida a los efectos nocivos de los nitratos, se pueden encontrar diversos estudios que hablan de los efectos beneficiosos de los mismos.

Los nitratos pueden resultar una fuente útil de nutrición para la dieta humana (Dykhuisen *et al.*, 1996).

También tiene efectos positivos su presencia para combatir patógenos microbianos tanto en la boca, como en la lengua y en la superficie estomacal. Algunas bacterias aeróbicas toman el nitrógeno para generar óxido nítrico, necesario en el estómago (Bjorne *et al.*, 2004)

Los nitratos también ayudan a reducir la hipertensión y los desórdenes cardiovasculares (Mc Knight *et al.*, 1999).

1.3. Factores que afectan a la acumulación de nitratos en hortalizas de hoja.

El contenido de nitratos en plantas es comúnmente visto como resultado del desequilibrio entre absorción neta y tasa de asimilación (Cárdenas-Navarro *et al.*, 1999). El efecto de los factores endógenos y exógenos parece ser sencillo: por una parte los sistemas de absorción y asimilación están determinados genéticamente (Ferrario-Mery *et al.*, 1997; Ourry *et al.*, 1997), explicando la variabilidad en el contenido de nitratos entre especies y cultivares; por otra parte, la absorción de nitratos depende de la disponibilidad de los distintos elementos nutritivos, y la asimilación está influida por las condiciones climáticas, ya que p.e. la luz juega un papel decisivo en su reducción. Por otra parte, el contenido en nitratos en las plantas puede ser fijado a través de la regulación del potencial osmótico (Umar e Iqbal, 2007).

1.3.1. Factores nutritivos.

Los productos químicos agrícolas utilizados en la fertilización afectan a la acumulación de nitratos en plantas, y se pueden dividir en tres grupos: fertilizantes minerales, sustancias fisiológicamente activas (ácidos húmicos) y los cambios naturales y antropogénicos en las condiciones del suelo. Para controlar la acumulación de nitratos en los tejidos vegetales, es

1. Introducción y objetivos

importante estimar el nivel del nitrógeno aplicado exógenamente, así como el nivel del ya presente en el suelo (Nazaryuk *et al.*, 2002).

Es importante conocer la incidencia que los distintos tipos de fertilizantes tienen en la acumulación de nitratos. La mayor concentración de esta sustancia se da con la urea, seguida por carbonato amónico, nitrato amónico y sulfato amónico (Zhou *et al.*, 2000)

Se ha podido observar que plantas a las que se suministran fertilizantes orgánicos tienen un menor contenido de nitratos, que aquellas, que han sido abonadas con fertilizantes minerales (Raupp, 1996)

La acumulación de nitratos en las plantas suele estar condicionada por la cantidad y tipo de nutrientes presentes en el suelo, y está muy relacionado con la composición del fertilizante aplicado, su cantidad y su momento de aplicación (Zhou *et al.*, 2000)

Cuando el nivel de fertilización nitrogenada aumenta, se observan mayores niveles de nitratos, mientras que limitando la disponibilidad de nitrógeno, se reduce el contenido de los mismos (Santamaría *et al.*, 1998)

Aplicando nitrógeno una vez, al comienzo del ciclo de cultivo, se puede controlar la acumulación de nitratos, puesto que la concentración de éstos en la planta disminuye a la vez que la misma alcanza su tamaño comercial (Vieira *et al.*, 1998).

La concentración de nitratos en las plantas puede controlarse frenando el suministro de nitrógeno unos días antes de la cosecha, de esta forma, los nitratos serán eliminados de las vacuolas (Santamaría *et al.*, 2001).

Respecto a los dos grandes grupos de fertilizantes nitrogenados, se ha demostrado mediante varios estudios, que las formas amoniacales tienen un menor efecto en la acumulación de nitratos en hojas que las nítricas (Rincón, 2005).

Diversos estudios enfocados a establecer la influencia del abono amoniacal en la acumulación final de nitratos, modificaron el ratio NH_4/NO_3 ; en general se obtuvo que el aumento de la forma amoniacal redujo la acumulación de nitratos. Santamaría (1999) determinó que soluciones con un ratio de 70:30 y 50:50 derivaban en una menor acumulación de nitratos que aquellas que o no tenían forma amoniacal, 0:100 o se presentaba en baja proporción 30:70.

Otros autores, sin embargo, señalaron que la presencia de 10 % de $N-NH_4^+$ y 90 % de $N-NO_3^-$ (expresado en $meq \cdot L^{-1}$ en la solución nutritiva), en general no causa ningún problema (Steiner, 1984).

1. Introducción y objetivos

Jones (1997) señaló que el porcentaje del ion NH_4^+ en la solución nutritiva no debía exceder del 50 % del total del N, considerando la mejor relación: 75 % N- NO_3^- y 25 % N- NH_4^+ , aunque este porcentaje dependía de la especie y la etapa de desarrollo.

Se ha demostrado que un incremento en la fertilización de fósforo, supone una reducción en la concentración de nitratos. El fósforo inorgánico dentro de la planta es necesario para el metabolismo y almacenamiento de nitratos, pero a elevadas concentraciones inhiben reacciones enzimáticas, crean presiones anómalas en las paredes celulares y aceleran la senescencia y en etapas avanzadas de la edad de la planta va acompañado de una reducción en la absorción y acumulación de nitratos (Ahmed *et al.*, 2000).

Un estudio realizado en lechuga demostró que con un control óptimo del pH, valores cercanos a la neutralidad favorecían la absorción del fósforo, que a su vez estimulaba la asimilación de nitrógeno en forma amoniacal, siempre que esta forma representase al menos un 30 % del nitrógeno total de la solución nutritiva. Por tanto, de manera indirecta, el fósforo contribuyó a una menor acumulación de nitratos en las plantas (Savvas *et al.*, 2001).

La menor acumulación de nitratos también ha sido relacionada con otros elementos y componentes químicos: aplicaciones foliares de ácido salicílico (Ahmed *et al.*, 2000), fertilizantes con molibdeno (Zhou *et al.*, 2000) e inhibidores de calcio (Tzung *et al.*, 1995).

También se determinó que a mayor presencia de nitrógeno en forma amoniacal, el contenido total de nitrógeno es mayor (Santamaría, 1999).

1.3.2. Factores fisiológicos

1.3.2.1 Variabilidad genética.

El contenido en nitratos varía marcadamente con la especie, cultivares e incluso genotipos con distinta ploidía (Anjana *et al.*: 2003).

En lo que se refiere a la escarola, en estudios realizados anteriormente, por la Cátedra de Horticultura y Cultivos Herbáceos de la UPV el cultivar "Cuartana" resultó más propenso a la acumulación de nitratos que el cultivar "Natacha" (Gromaz, 2013)

1.3.2.2 Distribución nítrica a través de la planta.

Los órganos de las plantas pueden ser clasificados en función de la propensión a acumular nitratos, clasificados de mayor a menor: peciolo, hoja, tallo, raíz, inflorescencia, tubérculo, bulbo, fruto, semilla (Santamaría *et al.*, 1999).

1.3.3 Factores externos: Relación intensidad lumínica – enzima nitrato reductasa.

Los nitratos, una vez en el entorno de la planta, tienen dos opciones: ser asimilados y reducidos donde hay actividad radicular, o bien, ser transportados vía xilema hasta las hojas, donde una vez allí serán reducidos. Todo este proceso de asimilación está regulado en el metabolismo de las plantas por un complejo enzimático formado por dos enzimas: la enzima nitrato reductasa, que se encuentra en el citoplasma y es la responsable de reducir el ion nitrato al ion nitrito, y la segunda enzima es la nitrito reductasa que reduce estos últimos iones a iones amoniacales (Gonella *et al.*, 2002).

Toda esta actividad enzimática y su interacción con la acumulación de nitratos está relacionada con diferentes procesos fisiológicos, entre ellos la fotosíntesis. La intensidad lumínica parece tener un papel fundamental y ser un factor decisivo en esta relación, ya que este factor condiciona la actividad de la enzima nitrato reductasa. Un aumento de la intensidad lumínica provoca gran actividad en el complejo enzimático que deriva en una disminución de la acumulación de nitratos favoreciendo la presencia de iones amoniacales, además las plantas fotosintéticamente eficientes favorecen la presencia de diferentes fotoasimilados, principalmente carbohidratos, en sus vacuolas en detrimento de los nitratos, que también se acumulaban en estas estructuras (Gonella *et al.*, 2002).

Plantas de espinaca y lechuga cultivadas en condiciones de baja intensidad lumínica, incluso con umbría presentaron una baja actividad del complejo enzimático, lo que llevó asociado una escasa reducción a iones amoniacales, observándose elevados niveles de nitratos en las hojas de estas plantas (Anjana *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la concentración de nitratos en hojas de espinaca fue más baja al mediodía, en horario de máxima luminosidad en un día soleado (Anjana *et al.*, 2006).

1.3.4. Prácticas agronómicas.

Entre las diferentes prácticas aconsejables en el manejo de los cultivos son aconsejables para poder controlar la acumulación de nitratos cabe citar:

- Elección del cultivar más apropiado (Maroto *et al.*, 2000).
- Utilizar el agua de riego de forma eficiente para evitar, en lo máximo posible, las pérdidas de nitrógeno por el fenómeno de percolación (Maroto *et al.*, 2000).

- Aplicando la modalidad de riego localizado, si el manejo es el apropiado, se suele alcanzar un mejor aprovechamiento de los fertilizantes, pudiendo llegar a reducir en algunos casos la dosis de nitrógeno en un 20 – 30% (Maroto *et al.*, 2000).
- No cosechar en días nublados o inmediatamente después de periodos de poca iluminación ya que favorecen una mayor acumulación de nitratos (Rincón *et al.*, 2005).

1.4 Métodos indirectos para estimar el contenido de nitrógeno y nitratos en las hojas de escarola

1.4.1. Medidas SPAD.

La acumulación de nitratos en hojas de lechuga se considera, entre otras razones, consecuencia del contenido y tipo de nitrógeno aplicado y disponible (Escalona *et al.*, 2009).

Este nitrógeno presente en las hojas de la hortaliza se puede conocer a través de las medidas y lecturas SPAD.

Algunos estudios han tratado de comprobar la relación del contenido de nitrógeno con las lecturas de SPAD, ya que éstas podrían indicar el nitrógeno que forma parte de las clorofilas. Éste es un importante parámetro ya que sabemos que el nitrógeno que entra en la planta tiene dos vías principalmente: constituir la macromolécula de la clorofila y acumularse en forma de nitratos.

En el cultivo de la lechuga se puede observar que entre dos de las principales fuentes nitrogenadas: sulfato amónico y nitrato cálcico, existe una relación entre el nivel de nitratos y las lecturas SPAD, pudiéndose ver en el nitrato cálcico un valor mayor tanto en la presencia de nitrato como en las lecturas SPAD (Escalona *et al.*, 1999). Diferentes estudios realizados en tomate (Rodríguez *et al.*, 1998), maíz (Rincón y Ligarreto, 2010), uva (Li *et al.*, 1998) y haba (Abdelhamid *et al.*, 2003) encontraron una alta correlación entre las medidas de clorofila (SPAD) y el porcentaje de nitrógeno de las hojas, lo que permitiría emplear dicho medidor para establecer una estimación del contenido de nitrógeno en las hojas.

Sin embargo en un estudio realizado con escarola no se encontraron las correlaciones deseadas entre las lecturas SPAD y la cantidad de nitrógeno cuantificable (Suárez – Rey *et al.*, 2008), hecho que sí demostró (López-Bellido *et al.*, 2004) con el SPAD y el nitrógeno aplicado en las hojas bandera del maíz. Dwyer *et al.* (1995) en un ensayo en maíz no encontraron una correlación e.s. entre los dos parámetros citados.

1. Introducción y objetivos

En el caso del contenido de nitratos en hojas, se determinó en un ensayo con acelga (Papasavvas et al., 2008) que existía una elevada correlación de este parámetro con las lecturas de SPAD, pudiendo emplearse este método para llevar a cabo un control de la fertilización del cultivo. En otros ensayos (Westerweld et al., 2003), esta correlación fue e.s. para algunos cultivos (calabaza), pero no para otros (cebolla y zanahoria). Por su parte, Carrión (2011) en un estudio con escarola y Westcott y Wraith (2003) en menta no hallaron una correlación entre los nitratos en hojas y las medidas de SPAD, considerando que con aportaciones altas de nitrógeno, se produce una saturación en las medidas de SPAD, en tanto que los niveles de nitratos siguen aumentando.

En un estudio realizado con endivias, se determinó que cuando el amonio representaba un 25% del nitrógeno total, las lecturas SPAD eran más altas, comparándolas con soluciones con 0, 50 y 75% de amonio (Sandoval et al., 1999).

1.4.2 Parámetros de color.

En un estudio realizado con perejil y rúcula, se determinó que entre los parámetros de color L y a^* existía una elevada correlación con los niveles de clorofilas, nitrógeno y nitratos (Tuncay, 2011).

1.5 Tasa relativa de Crecimiento.

Este parámetro es la medida principal del análisis de crecimiento y se define como la ganancia de biomasa por unidad de biomasa y tiempo (Villar *et al.*, 2004). El comportamiento típico de esta medida es el de presentar unos valores más elevados al principio del muestreo, descendiendo con el paso del tiempo, ya que a medida que crece la planta hay una mayor acumulación de materia seca en relación a la producción de fotoasimilados (Hoyos *et al.*, 2009)

1.6. Objetivos

El objetivo de este trabajo pretende establecer la influencia de la relación Nitrato/Amonio en las soluciones nutritivas, en la acumulación de nitratos en las hojas de escarola, así como la producción obtenida. También se pretendió determinar la evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad a lo largo del ciclo de cultivo. Por otro lado, se quiso dilucidar, si las medidas realizadas con el SPAD y el colorímetro pueden ser incluidas como un método indirecto para la estimación de nitratos en hojas de escarola

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Características del experimento

El experimento se realizó en las instalaciones del Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Valencia (U.P.V.), localizado en las coordenadas 39 38' N, 0 22' W. Estas instalaciones consistieron en un invernadero tipo *Venlo*, de cubierta de vidrio, con ventilación cenital, dotado de un sistema de “*cooling system*” y de calefacción que se activaban con temperaturas ambientales superiores a 24°C e inferiores a 10°C, respectivamente.

Se ha llevado a cabo un ciclo de cultivo primaveral con escarola de hoja ancha, cv. ‘*Cuartana*’. La siembra se efectuó en bandejas de poliestireno de 104 alveolos y, empleándose como sustrato una mezcla de fibra de coco y sustrato comercial (60-40).

La plantación definitiva, en invernadero (Fotografía1), se llevó a cabo en macetas de 8 L, rellenas con una mezcla de perlita y fibra de coco (50-50).

Las fechas de siembra, trasplante y recolección se recogen en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Fechas de siembra, trasplante y recolección

Ciclo	Siembra	Trasplante	Recolección
42 días	12-02-2015	10-03-2015	28-03-2015

Se aportaron tres soluciones nutritivas, (cuya composición se recoge en el cuadro 2.2), en las cuales se modificaron las concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ aportadas, manteniendo, en todas ellas, una concentración de nitrógeno constante de $13 \text{ mMol}\cdot\text{L}^{-1}$. Así pues, en la solución N0 todo el nitrógeno se aplicó en forma de NO_3^- , en la solución N5 un 5% se encontraba en forma de NH_4^+ , mientras que en la solución N10 este porcentaje se incrementó al 10%.

Cuadro 2.2. Composición de las soluciones nutritivas ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Solución	NO_3^-	H_2PO_4	SO_4^{2-}	HCO_3^-	Cl^-	NH_4^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	CE ($\text{ds}\cdot\text{m}^{-1}$)
N0	13.00	1.20	5.60	0.50	2.80	0.00	7.00	6.50	8.29	1.30	2.31
N5	12.35	1.20	5.60	0.50	2.80	0.65	7.00	6.50	8.29	1.30	2.25
N10	11.70	1.20	5.60	0.50	2.80	1.30	7.00	6.50	8.29	1.30	2.18

El aporte de las soluciones nutritivas se realizó mediante fertirrigación, con un sistema de alta frecuencia, empleando dos emisores por maceta ($2 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$), que aportaban individualmente un caudal de 2 L h^{-1} . El volumen de solución aportada se controló mediante el número de riegos, el cual variaba en función del porcentaje de drenaje, que se intentó mantener entre el 20 y el 30% del volumen total de riego (Fotografía2).

Diseño del experimento

Producción

- **Soluciones nutritivas:**

- N0: Solución nutritiva con un 0% de amonio.
- N5: Solución nutritiva con un 5% de amonio.
- N10: Solución nutritiva con un 10% de amonio

Se estableció un diseño de bloques al azar con 3 (soluciones nutritivas) y 4 repeticiones de 5 plantas cada una, para un total de 12 unidades de repetición y 60 plantas

Evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad

- **Soluciones nutritivas:**

- N0: Solución nutritiva con un 0% de amonio.
- N5: Solución nutritiva con un 5% de amonio.
- N10: Solución nutritiva con un 10% de amonio

- **Días después del trasplante (ddt).**

- 0, 14, 28, 42.

Se estableció un diseño factorial de bloques al azar 3 (soluciones nutritivas) x 3 (ddt) (ya que en el trasplante las plantas se tomaron del semillero), con 3 repeticiones de 5 plantas cada una, para un total de 27 unidades de repetición y 135 plantas (más 270 el día del trasplante).

2.2. Parámetros estudiados y metodología

En este experimento se analizó periódicamente (0, 14, 28 y 42 ddt) la evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad de la escarola (contenido de clorofilas nitratos, nitrógeno y fósforo, color de las hojas y tasa de crecimiento) y al final del cultivo se valoró la producción.

Cuadro 2.2.5. Fechas de medidas SPAD, color, nitratos y tasa de crecimiento.

ddt	Fecha medida
0	10-03-2015
14	23-03-2015
28	22-03-2015
42	28-04-2015

2.2.1. Evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad.

2.2.1.1. Medida de la concentración de clorofilas (Fotografía3).

El día del trasplante se tomaron 10 por plantas para cada unidad de repetición llevándose a cabo en la parte apical de cada una de las hojas dos determinaciones de la concentración de clorofilas, (medidas SPAD) con un medidor modelo Chlorophyll meter SPAD-502 Plus, Konica Minolta, de las que se obtuvo un valor medio. En los siguientes días (14, 28 y 42 ddt) se tomó una planta por unidad de repetición llevándose a cabo las mismas medidas en la cantidad de hojas necesaria para alcanzar los 20 g, (empezando a tomarlas desde el exterior). La mitad de las hojas se destinaron a la determinación del contenido de nitratos y color y la otra a la determinación de nitrógeno y fósforo.

2.2.1.2. Determinación de los parámetros de color y del contenido de nitratos.

Parámetros de color

Una vez realizadas las medidas de SPAD, en la parte apical de cada una de ellas se tomaban dos medidas de color con un colorímetro modelo Chroma meter cr-400; los parámetros empleados fueron los de la escala CieLab (L, a*, b*). Posteriormente las hojas se emplearon para la determinación del contenido de nitratos.

Método de análisis utilizado, cálculos y operaciones realizadas para obtener el contenido en nitratos (Fotografía 6).

La determinación del contenido de nitratos, se realizó mediante reflectometría, para lo que se dispuso de un equipo RQflex de la marca Merck modelo KGaA, compuesto por un lector y unas tiras de plástico que sirven de soporte al reactivo.

2. Material y métodos

Para ello el primer paso fue calcular el peso fresco de las muestras extraídas de cada repetición con una balanza analítica de la marca Mettler Toledo modelo AG204

- a) Peso fresco de la hoja (kg)

Una vez determinado el peso, y considerando que los nitratos se acumulan en mayor cantidad en el nervio central de la hoja, este se separó del resto de la hoja y se determinó su peso.

- b) Peso del nervio central.

Seguidamente, con la ayuda de un mortero y una maza, se procedió a triturar el nervio central. La muestra triturada se filtró a través de una muselina y se obtuvo un extracto líquido, y un triturado que fueron pesados.

- c) Peso del extracto líquido.

d) Peso fresco del triturado = Peso del nervio central (b) – Peso del extracto líquido (c). El triturador en fresco se colocó en una estufa a una temperatura de 60°C durante 48 horas, hasta alcanzar un peso constante, para obtener posteriormente su peso seco.

- e) Peso seco del triturado

$$f) \quad \% \text{ Materia seca del triturado} = \frac{\text{Peso seco del triturado (e)}}{\text{Peso fresco del triturado (d)}} \times 100$$

$$g) \quad \% \text{ Líquido en el triturado} = 100 - (\% \text{ materia seca del triturado (f)})$$

$$h) \quad \text{Peso de líquido del triturado} = \text{Peso fresco del triturado (d)} \times \frac{\% \text{ líquido del triturado}}{100}$$

i) Peso del líquido del nervio central = Peso del extracto líquido (c) + Peso del líquido del triturado (h).

Por otra parte, del extracto en líquido, se extrajo con una pipeta, 1ml el cual se obtuvo su peso.

- j) Peso de 1ml de extracto líquido.

Con este valor se puede calcular el volumen total de líquido en el nervio central.

$$\text{Volumen de líquido en el nervio central (mL)} = \frac{\text{Peso del líquido del nervio central (i)}}{\text{Peso mL (j)}}$$

Este volumen se empleó para hacer una disolución con agua destilada 1: 25 (m), sobre la cual se efectuaron las medidas de reflectometría. Para realizar las lecturas de nivel de nitratos se siguieron los siguientes pasos:

- Primero se sumerge durante 4-5 segundos la tira en la dilución.
- Seguidamente, con la ayuda de un papel de trapicel se retira por capilaridad, el líquido sobrante.

2. Material y métodos

- Antes de que transcurra 1 minuto se introduce la tira en el adaptador de varillas del aparato.
- Obtener la lectura ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Para expresar la medida en (mg de nitratos) · (kg de materia fresca) se realizaron los siguientes cálculos.

$$\text{k) } \text{mg de nitratos en la dilución} = \text{Lectura} \times \frac{\text{Volumen dilución (ml)}}{1000}$$

Los miligramos de nitratos de la dilución estaban contenidos en un mililitro de líquido.

$$\text{l) } \text{mg de nitratos en el nervio central} = \frac{\text{mg de nitratos}}{\text{mL de líquido}} \times \text{Vol de líquido en el nervio central}$$

$$\text{m) } \frac{\text{mg de nitratos}}{\text{kg de materia fresca}} = \frac{\text{mg de nitratos en el nervio central}}{\text{kg de materia fresca}}$$

2.2.1.3. Determinación de macronutrientes (N y P)

Determinación del contenido en nitrógeno (Fotografía4).

El análisis del nitrógeno se realizó mediante el método convencional de Kjeldhal. En este método, el material vegetal, seco y triturado, es atacado con ácido sulfúrico concentrado a ebullición, en presencia de un catalizador, para transformar el nitrógeno en sulfato amónico. A continuación, se destila en presencia de un exceso de hidróxido sódico y se valora el amoníaco destilado con ácido clorhídrico.

Los materiales, aparatos y reactivos utilizados fueron:

- Balanza de precisión.
- Campana extractora
- Placa agitadora marca selecta, modelo Agimatic-N
- pHmetro marca Mettler Toledo, modelo Easyseven
- Batería 2020 DIGESTOR Foss Tecator.
- Unidad de destilación KJELTEC modelo 2300 Foss Tecator
- Catalizador Kjeldal (Cu) (0.3 % en $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en tabletas.
- H_2O_2 al 33 % p/v
- NaOH 40 %
- Agua destilada
- Mezcla ácida (H_3PO_4 y H_2SO_4)
- Solución ácido bórico indicador

2. Material y métodos

La mezcla ácida se obtuvo añadiendo, por cada 50 mL de H₃PO₄ concentrado (d=1.75 g cm⁻³), 1000 mL de H₂SO₄ concentrado (d=1.82-1.84 g cm⁻³). El proceso se llevó a cabo en campana extractora.

Para preparar 0.5 L de disolución indicadora, se pesaron 0.495 g de verde de bromocresol y 0.330 g de rojo de metilo y se disolvieron en 0.5 L de etanol.

La disolución ácido bórico-indicador (1 L) se obtuvo pesando 20 g de H₃BO₃ que se disolvieron en 0.8 L de agua destilada, con la ayuda de un imán, placa agitadora y el calefactor conectado. Se le añadieron 20 mL de la disolución indicadora y se continuó agitando. Con la ayuda de un pHmetro se dejó el pH en 5.01, utilizando HCl para bajarlo y NaOH para subirlo. Se aforó con agua destilada a 1L y se homogeneizó.

Para realizar la digestión se pesaron 0.5 g de muestra y se introdujeron en el tubo de digestión, poniendo, al menos, dos tubos como blancos (sin muestra). Luego, se añadieron 10 mL de mezcla ácida y una pastilla de catalizador a cada tubo y 10 mL de H₂O₂ al 33 % (que debe guardarse en nevera). La aplicación del agua oxigenada se hizo en dos tandas. En la primera se añadieron 5 mL, se dejó hervir y pasados unos minutos se pusieron los 5 mL restantes), dejando reposar unos 30 minutos para que se enfriaran.

A continuación se colocaron los tubos en el bloque de digestión (que estaba en la campana extractora), que previamente se había calentado hasta 420°C, y se dejaron durante 1 hora para que el ácido atacase totalmente a la muestra. Luego, se dejaron enfriar los tubos 10 minutos y se les añadió a cada uno 50 mL de agua destilada.

Por último, se llevaron los tubos a la unidad de destilación, que aportó el volumen de NaOH requerido para la destilación y recogió el amonio liberado sobre el ácido bórico. El destilador Kjeltex realizó de forma automática la valoración, dando la cantidad de HCl 0.1 N utilizada en mL.

Los valores del porcentaje de nitrógeno en la materia seca de las plantas se obtuvieron de la siguiente forma:

$$\% N = [(V_M) * f * N * 100 * 14] / P_m$$

donde: V_M = Volumen HCl gastados en la valoración de la muestra (mL), f = Factor del HCl, N = Normalidad del HCl, P_m = Peso de la muestra (mg).

Determinación del contenido en fósforo

Material

- Molinillo analítico marca IKA, modelo A-10.

2. Material y métodos

- Hornillo eléctrico marca Selecta, modelo 420.
- Horno de mufla marca Heron, serie 74.
- Balanza de precisión marca Mettler Toledo, modelo AG204
- Embudos de vidrio
- Matraces de vidrio de 100 mL
- Botellas de polietileno de 100 mL
- Espectrofotómetro Digital Ultraviolet CE 1021.
- Ácido nítrico concentrado ($d = 1.4 \text{ g cm}^{-3}$).
- Disolución patrón de fósforo de 1000 mg L^{-1} de P.
- Reactivo nitrovanadomolibdato, obtenido a partir de las disoluciones A y B.
- Vanadato de amonio (disolución B) y molibdato de amonio (disolución A).

Método

Las muestras se prepararon según los métodos oficiales de análisis para plantas (MAPA, 1986).

Se tomaron muestras exentas de contaminaciones del material seco ya pesado, y se trituraron con el molinillo de aspas metálicas hasta reducir las a un polvo fino. Posteriormente, se introdujeron en un recipiente de cierre hermético, para su almacenamiento en un lugar seco a la espera de la realización de los análisis.

La determinación del fósforo precisó que las muestras estuvieran mineralizadas. Para ello, de cada muestra, se pesaron 0.2 g del material molido, introduciéndolos posteriormente, en crisoles de porcelana, que fueron llevados al hornillo eléctrico para producir una rápida combustión (en la cual se apreciaba una gran formación de humos que eran evacuados por la campana extractora), con la que se destruyó la materia orgánica. El proceso se daba por concluido cuando la emisión de humos cesaba. A continuación, los crisoles se colocaban en el horno de mufla, en el que las muestras fueron incineradas al someterse a una temperatura de 550°C durante 5 horas y 30 minutos. Las muestras se retiraban tras dejar que se enfriaran. De este proceso resultaban unas cenizas, generalmente blancas.

A las cenizas se les añadieron 4 gotas de HCl 0.1 N, agitándose la mezcla con una varilla o moviendo los crisoles, tras lo cual se situaron bajo una lámpara de infrarrojos hasta que la mezcla de cenizas y HCl se secaba. A continuación, se les aplicaron con micropipeta, 5 mL de HCl 2 N, agitando nuevamente la mezcla. El contenido de los crisoles se introdujo en un matraz de 100 mL haciéndolo pasar por un filtro exento de cenizas dispuesto sobre un embudo de vidrio, enjuagándose el crisol varias veces con agua destilada. El filtrado fue enrasado con agua destilada a 100 mL, obteniendo de esta forma lo que llamamos extracto clorhídrico, que se

2. Material y métodos

guardó en botellas de polietileno de 100 mL convenientemente rotuladas, las cuales se conservaron a una temperatura de 8°C.

La determinación del fósforo se realizó por espectrofotometría, ya que en solución ácida y en presencia de iones Mo^{6+} y V^{5+} , el ácido fosfórico da un complejo de color amarillo de fosfomolibdovanadato, cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente a 430 nm.

La disolución A, se obtuvo disolviendo 25 g de molibdato amónico en 0.4 L de agua destilada.

La disolución B, se obtuvo disolviendo 1.25 g de metavanadato amónico en 0.3 L de agua destilada caliente, se dejó enfriar y se añadieron en 0.250 L de ácido nítrico concentrado, enfriándose de nuevo a temperatura ambiente.

El reactivo nitrovanadomolibdato se obtuvo finalmente vertiendo la disolución A en la disolución B y diluyendo con agua destilada hasta 1 L. Este reactivo debe mantenerse en la oscuridad.

Para preparar los patrones, se partió de la disolución patrón de 1000 mg L^{-1} de P, de la que se tomaron 10 mL que se aforaron en un matraz de 100 mL con agua destilada, con lo que se obtuvo una nueva disolución patrón de 100 mg L^{-1} de P. A continuación, en ocho matraces de 0.05 L se añadieron 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 y 3 mL de la disolución patrón y 10 mL del reactivo nitrovanadomolibdato, aforando la solución con agua destilada. De esta manera se obtuvieron patrones de 0, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 y 6 mg L^{-1} de P.

Para preparar las muestras, en un tubo de ensayo se vertieron 1 mL del extracto clorhídrico, 0.001 L del reactivo nitrovanadomolibdato y 3 mL de agua destilada.

Una vez preparados los patrones y las muestras, se esperó una hora antes de leer en el espectrofotómetro a 430 nm.

Los valores del porcentaje de P en la materia seca de las plantas se obtuvieron de la siguiente forma:

$$\% M = (V_D * n) / (V_M * P_M * 100)$$

donde: % M = % de macronutriente sobre materia seca, V_D = Volumen de la disolución (mL), n = lectura del espectrofotómetro (mg L^{-1}), V_M = Volumen de la muestra tomado (mL), P_M = Peso de la muestra mineralizada (g).

2.2.2. Análisis de la producción

Tras la recolección de las escarolas, se procedió a determinar y valorar la incidencia de fisiopatías y la producción.

2.2.2.1. Evaluación de la incidencia de las fisiopatías.

Evaluación de la incidencia de “tipburn”.

Para valorar el grado de incidencia del “tipburn” se empleó una escala cualitativa, de valores entre el 0 y el 3. Siendo el 0 el valor correspondiente a plantas que no presentaban síntomas de las fisiopatía, el 1 para aquellas que mostraban pequeños indicios, el 2 para las que presentaban un nivel medio y el 3 para aquellas cuya incidencia fue elevada. El “tipburn” se evaluó en el momento de la recolección.

Evaluación de la subida a flor prematura (Fotografía5).

Para estudiar la susceptibilidad de los cultivares a la subida a flor prematura, se determinó la altura de la planta y la longitud del esbozo floral de cada planta, y con ambos parámetros se obtuvo la incursión del esbozo floral (en porcentaje) mediante la siguiente expresión:

$$(\%) = \frac{\text{Esbozo floral (cm)}}{\text{Altura de la planta (cm)}} \cdot 100$$

Para calcular el porcentaje de plantas subidas a flor, se consideraron aquellas en las que el esbozo podía apreciarse a simple vista.

2.2.2.2. Producción comercial.

Se consideraron plantas comerciales aquellas cuya incidencia de “tipburn” presentaba valores entre 0-1, y no mostraban externamente problemas de subida a flor. De las plantas comerciales se determinó el porcentaje (%) y el peso medio.

2.2.3. Tasa de crecimiento.

Para determinar la tasa de crecimiento, se emplearon los datos de Peso fresco (g) y Peso seco (g) de los diferentes días de medida (0, 14, 28 Y 42 ddt) y de cada solución nutritiva (N0, N5 Y N10).

$$TC (\%) = \frac{\ln(Ps \ ddt_2) - \ln(Ps \ ddt_1)}{ddt_2 - ddt_1}$$

2.2.4. Análisis estadísticos de los resultados.

Los datos obtenidos para cada uno de los experimentos fueron analizados con el programa Statgraphic Centurion realizándose un análisis de la varianza, La separación de medias se llevó a cabo mediante el test LSD.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

Tabla 1: Resultados del análisis de la varianza para el peso medio (g), la altura (cm), y incursión del esbozo floral (%) en función del factor solución.

	Plantas comerciales (%)	Peso medio (g)	Altura (cm)	Incursión del esbozo floral (%)
Solución				
N0	100	365.7	27.55	8.225
N5	100	421.9	27.45	9.525
N10	100	293.7	26.73	9.400
Resumen ANOVA				
Factor				
Solución		29.7 ^{ns}	11.6 ^{ns}	33.9 ^{ns}
Residual				
		70.3	88.4	66.1
Desv. estandar				
		93.1	1.2	1.0

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$.

ns: no significativo; *: significativo ($p \leq 0.05$) ; **: significativo ($p \leq 0.1$)

N0: solución nutritiva con un 5% de amonio.

N5: solución nutritiva con un 10% de amonio.

N10: solución nutritiva con 10% de amonio.

Como se observa en la Tabla 1, todas las plantas del experimento resultaron comerciales, por lo que las distintas concentraciones de amonio no tuvieron efecto sobre las distintas fisiopatías estudiadas. En el resto de parámetros las soluciones nutritivas tampoco indujeron diferencias e.s., si bien el mayor peso medio correspondió a la solución N5, mientras que los valores más altos de incursión del esbozo floral correspondieron a las soluciones nutritivas con amonio (N5 y N10).

El parámetro L (luminosidad) (Tabla 2) no presentó diferencias e.s. para el factor solución, sin embargo sí que las hubo en el factor DDT, presentándose los valores más altos en las plantas medidas el día del trasplante. Para el parámetro a^* (Tabla 2) se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los dos factores estudiados ($p \leq 0.05$), siendo la solución N0 la que presentó los valores más altos (valor absoluto), y los 0 DDT el día con valores más altos (valor absoluto). Respecto al parámetro b^*

3. Resultados y discusión

(Tabla 2) hubo diferencias significativas para los dos factores estudiados ($p \leq 0.05$), encontrándose los valores más elevados en la solución N0 y 0 DDT.

Tabla 2: Resultados del análisis de la varianza para los datos obtenidos con el colorímetro en función de los factores solución y DDT (Días Después del Trasplante). Los parámetros representados corresponden a la escala CIELab y son L , a^* y b^* .

	SPAD	L	a^*	b^*
Solución				
N0	28,27 b	51,07	-18,59 c	27,26a
N5	28,40 b	50,42	-17,40b	25,46a
N10	31,45a	50,19	-15,58 a	21,16b
DDT				
0	25,89 b	52,27 a	-21,46 d	32,57 a
14	27,86 b	50,08b	-17,82 c	26,18 b
28	32,01 a	49,58 b	-14,11 a	18,77 c
42	31,75 a	50,30 b	-15,37 b	20,98 c
Resumen ANOVA				
Factor				
Solución	6,5*	1,90 ^{ns}	10,63*	11,58*
DDT	18,8*	12,86*	50,42*	45,86*
Interacción				
Solución x DDT	7,3 ^{ns}	14,17 ^{ns}	7,77*	8,58*
Residual				
	62,3	69,44	22,64	23,71
Desv. estándar				
	4,9	2,32	1,90	3,88

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$.

ns: no significativo; *: significativo ($p \leq 0.05$); **: significativo ($p \leq 0.01$)

N0: solución nutritiva con un 5% de amonio.

N5: solución nutritiva con un 10% de amonio.

N10: solución nutritiva con 10% de amonio.

DDT: Días después del trasplante.

Se encontraron sendas interacciones Solución x DDT (Figuras 1 y 2) para los parámetros de color a^* y b^* ($p \leq 0.05$), por las que, para el día 0 no se hallaron diferencias e.s. entre las soluciones nutritivas. En el día 14, la solución N0 dio lugar a valores más altos de a^* (valor absoluto) y b^* que la solución N10 ($p \leq 0.05$). En el tercer punto de control (28 ddt), los valores de a^* (valor absoluto) y b^* disminuyeron al aumentar la concentración de amonio, con diferencias e.s. ($p \leq 0.05$) entre todas ellas. En el control correspondiente a los 42 ddt, las soluciones N0 y N5 alcanzaron valores más altos de a^* (valor absoluto) y b^* que la solución con mayor contenido en amonio (N10) ($p \leq 0.05$).

3. Resultados y discusión

Por otra parte, en virtud de las mismas interacciones, para la solución N0, el valor más alto de a^* (valor absoluto) y b^* se dio a los 0 ddt, con diferencias e.s. ($p \leq 0.05$) respecto a los 28 ddt, alcanzándose a los 14 ddt un valor intermedio. Para las soluciones N5 y N10 los valores de a^* (valor absoluto) y b^* fueron disminuyendo hasta los 28 ddt, con diferencias e.s. ($p \leq 0.05$) entre todos los puntos de control. En el caso de la solución N5, el valor a los 42 ddt no difirió del obtenido a los 14 ddt, en tanto que para solución N10, el valor a los 42 ddt no presentó diferencias e.s. respecto a los 28 ddt.

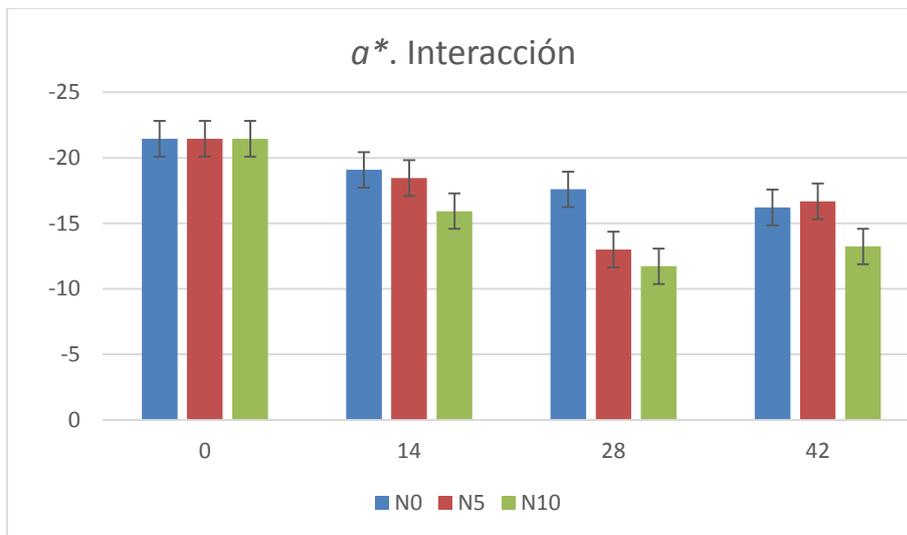


Figura 1. Interacción Solución \times DDT en el parámetro a^*

Las barras verticales corresponden a los valores de a^* según la solución nutritiva a lo largo de los días.

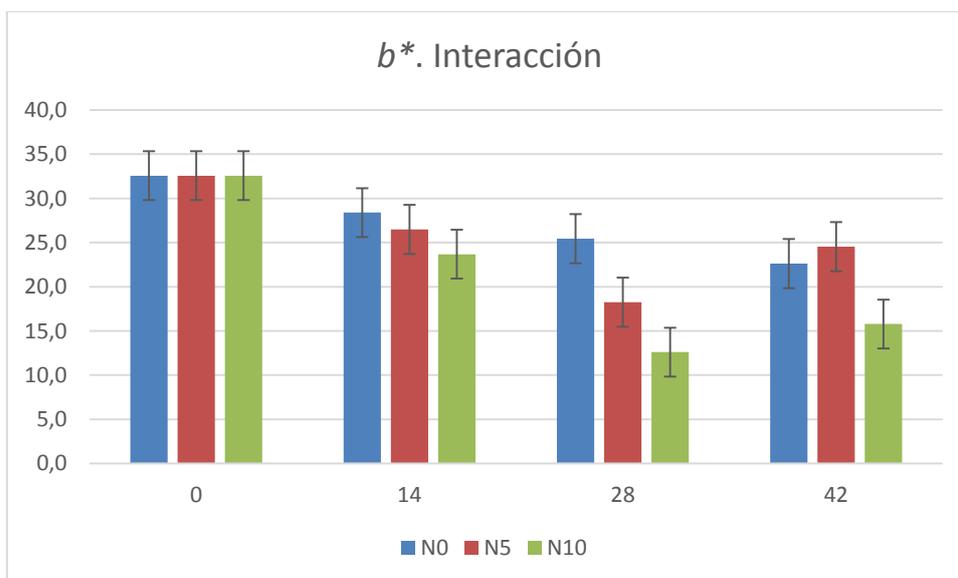


Figura 2. Interacción Solución \times DDT en el parámetro b^*

Las barras verticales corresponden a los valores de a^* según la solución nutritiva a lo largo de los días

3. Resultados y discusión

El parámetro SPAD (Tabla 2) presentó diferencias estadísticamente significativas para los dos factores, siendo N10 la que mayor valor alcanzó dentro del factor solución; en el caso del factor DDT, a los 28 y 42 se obtuvieron los valores más altos, sin llegar a existir diferencias significativas entre ellos, pero sí respecto a los valores a los 0 y 14 ddt (días después del trasplante).

Tabla 3: Resultados del análisis de la varianza para el contenido en nitrógeno (%), acumulación de nitratos ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de materia fresca) y contenido en fósforo (%), según los dos factores estudiados.

	Nitrógeno (%)	Nitratos ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de materia fresca)	Fósforo (%)
Resumen ANOVA			
Factor			
Solución	0,107 ^{ns}	308,2 ^{ns}	18,98*
DDT	8,861*	630,5*	31,37*
Interacción			
Solución x DDT	2,918 ^{ns}	6,69 ^{ns}	16,47 ^{ns}
Residual	37,45	31,59	33,18
Desv. estándar	0,376	557,2	0,09

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$.

ns: no significativo; *: significativo ($p \leq 0.05$); **: significativo ($p \leq 0.01$)

N0: solución nutritiva con un 5% de amonio.

N5: solución nutritiva con un 10% de amonio.

N10: solución nutritiva con 10% de amonio.

DDT: Días después del trasplante.

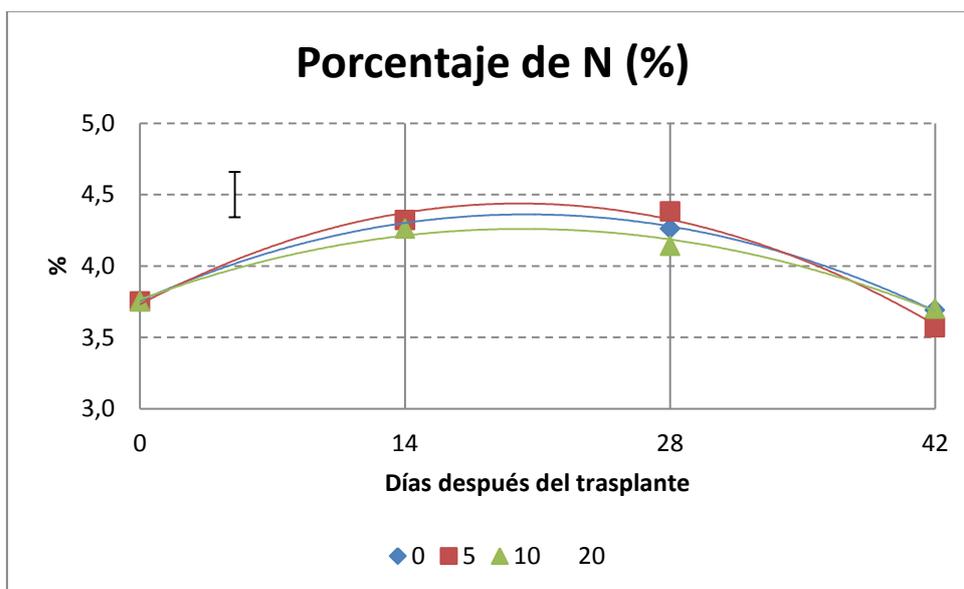


Figura 3. Contenido en N (%)

Las curvas representan la tendencia del contenido en N (%) según las distintas soluciones a lo largo de los días.

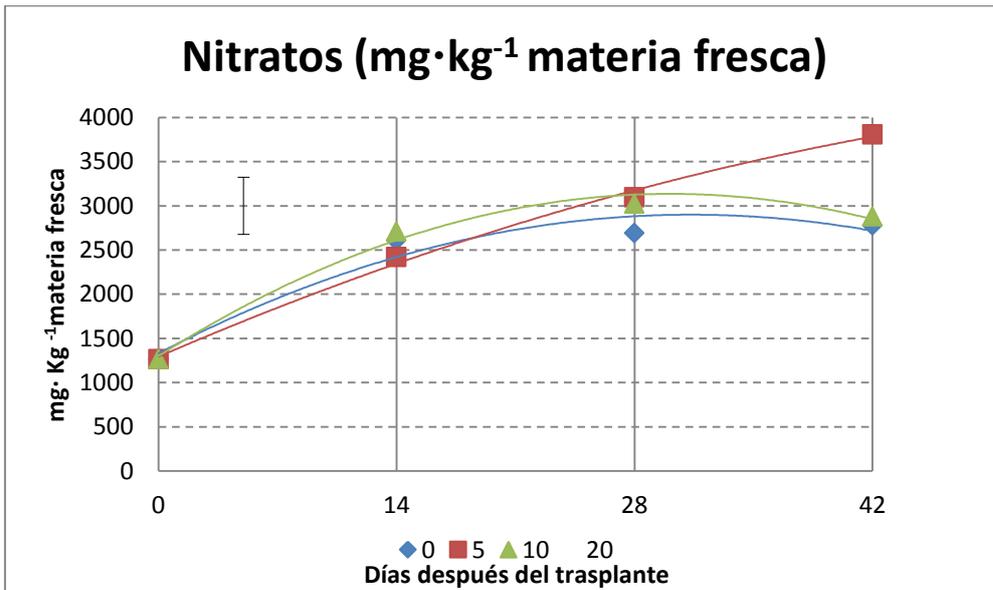


Figura 4: Contenido en nitratos ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Las curvas representan la tendencia del contenido en nitratos (mg/kg) según las distintas soluciones a lo largo de los días

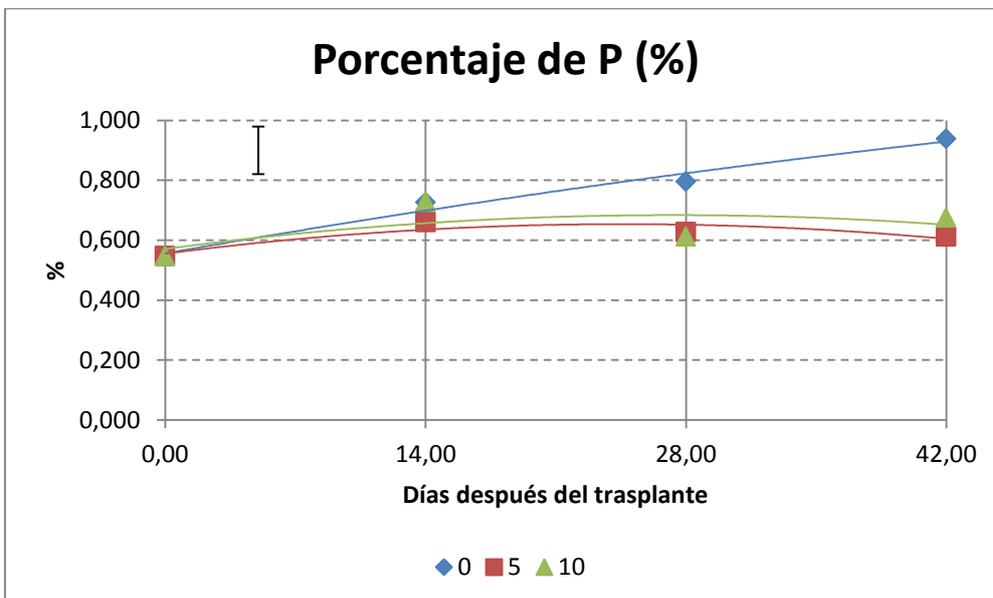


Figura 5: Contenido en P (%)

Las curvas representan la tendencia del contenido en P (%) según las distintas soluciones a lo largo de los días.

El porcentaje de fósforo (Tabla 3) se vio afectado por la concentración de amonio en la solución nutritiva ($p \leq 0.05$), obteniéndose con N0 un valor más alto que con las restantes soluciones. En el caso del porcentaje de nitrógeno y el contenido de nitratos en las hojas (Tabla 3), no hubo una influencia e.s. del factor solución.

3. Resultados y discusión

En lo que respecta a la evolución a lo largo del ciclo de cultivo, se observó que para el porcentaje de nitrógeno, los valores alcanzados a los 14 y 28 ddt superaron a los de los restantes puntos de control ($p \leq 0.05$). Por su parte, el porcentaje de fósforo alcanzó el valor más bajo el día del trasplante ($p \leq 0.05$). El contenido en nitratos en hojas fue aumentando a lo largo de ciclo, si bien entre los 14 y 28 ddt no hubo diferencias e.s.

Ninguna de las interacciones Solución x DDT resultó ser significativa en los parámetros estudiados.

Tabla 4. Matriz de correlación entre todos parámetros estudiados.

	% Nitrógeno	L	a	b	Nitratos
SPAD	0,0886 ^{ns}	0,826**	0,769**	-0,850**	0,182 ^{ns}
% Nitrógeno		-0,273*	0,179 ^{ns}	-0,198 ^{ns}	-0,048 ^{ns}
L			-0,665**	0,737**	-0,16 ^{ns}
a*				-0,962**	0,444**
b*					-0,369**

ns: no significativo; *: significativo ($p \leq 0.05$); **: significativo ($p \leq 0.01$)

El parámetro SPAD (Tabla 4) presentó una correlación e.s. con los parámetros de color *L*, *a** y *b**, con un coeficiente de correlación alto; con *a** la correlación fue positiva, a medida que el valor SPAD era mayor, el valor de *a** aumentó; en el caso de los parámetros *L* y *b** las correlaciones fueron negativas, es decir, el aumento del valor SPAD, provocó que el valor de estos parámetros fuera menor.

El porcentaje de nitrógeno (Tabla 4) presentó una correlación e.s. con el parámetro de color *L*, con un coeficiente de correlación bajo y negativo.

El parámetro de color *L* (Tabla 4) presentó sendas correlaciones e.s. con los parámetros de color *a** y *b**, con altos coeficientes de correlación, negativo en el primer caso y positivo en el segundo.

La correlación entre los nitratos (Tabla 4) y los parámetros de color *a** y *b** fueron e.s., con coeficientes de correlación bajos, positivo en el primer caso y negativo en el segundo.

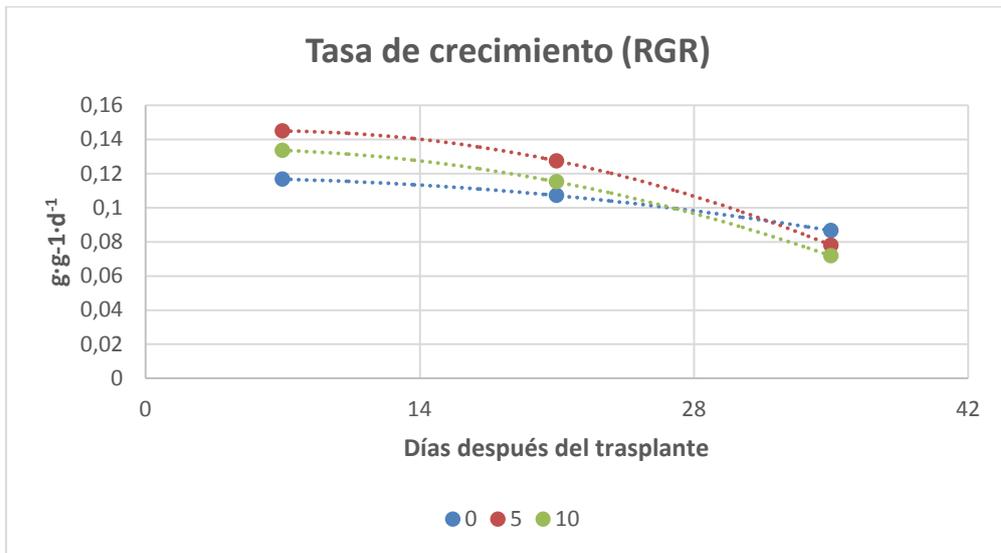


Figura 6: Tasa de crecimiento (%)

Las curvas representan la tendencia de la tasa de crecimiento (%) según las distintas soluciones nutritivas a lo largo de los días.

En la figura 6, se puede ver, como en las tres soluciones nutritivas, la tendencia de la tasa de crecimiento es la misma, con el paso de los días se puede ver cómo ésta va descendiendo.

3.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En las condiciones en las que se desarrolló el experimento todas las plantas resultaron comerciales.

No se ha observado una respuesta productiva a las concentraciones de amonio, lo que podría estar causado por un porcentaje de este catión relativamente bajo, no superior al 10 %, considerado el nivel máximo de amonio que no acarrea efectos tóxicos sobre las plantas (Steiner, 1984)

A lo largo del ciclo el régimen de temperaturas existentes no superó los 30 °C, valor por encima del cual Misaghi and Grogan (1978) observaron un incremento en el desarrollo de la fisiopatía. Estas condiciones menos favorables para la aparición del “tipburn” se unieron a la tolerancia que el cultivar ‘Cuartana’ demostró hacia esta

fisiopatía en ensayos previos realizados por Gromaz (2013) en la Cátedra de Horticultura y Cultivos Herbáceos de la UPV.

Las plantas del género *Cichorium*, como la escarola o la achicoria, son especies bianuales que requieren de vernalización y días largos para su floración (Maroto, Dielen *et al.*, 2005). Sin embargo, también se ha observado en campo la subida a flor prematura de estas especies en veranos secos y cálidos. En ensayos realizados por Mathieu *et al.* (2014) se constató que las altas temperaturas podían ser causantes de floración en plantas de achicoria. En el presente ensayo, tal y como ya se ha comentado previamente, las temperaturas no han excedido los 25°C, lo que explicaría la escasa incidencia que esta fisiopatía ha tenido sobre el cultivo.

El contenido en clorofilas (medidas de SPAD) se incrementó con el aumento de la proporción de amonio en la solución nutritiva, llegándose al valor más alto con la solución N10. En ensayos realizados en tomate (Sandoval *et al.*, 1999), las medidas de SPAD fueron aumentando hasta que la concentración de amonio en la solución nutritiva alcanzó el 25%. Con proporciones más altas, los valores de SPAD disminuyeron.

El parámetro de color *L* presentó los valores más altos al inicio del cultivo. Estos resultados pueden estar relacionados con una menor concentración de clorofilas, con las que presenta una fuerte correlación negativa, confirmando lo obtenido anteriormente por Tuncay (2011) en perejil y rúcula y León *et al.* (2007) en lechuga.

Respecto al parámetro *a** los valores más altos (en valor absoluto) (coloración más verde) se dieron para la solución N₀, disminuyendo este valor al aumentar la proporción de amonio; este resultado diferiría de expuesto por Steiner (1984) en el sentido de que el abonado amoniacal puede provocar el descenso en la absorción de cationes como el Mg²⁺, el cual forma parte de la molécula de clorofila, responsable de la coloración verde de las plantas.

En el caso del parámetro *b** (a mayores valores se incrementa la coloración amarilla), disminuyó al incrementarse la proporción de amonio en la solución nutritiva. Este resultado confirma lo obtenido por Santamaria y Elia (1997) en cultivo de endivias,

en el que las plantas a las que se aplicó una solución nutritiva con amonio como única fuente nitrogenada presentaron un color verde más oscuro.

La interacción obtenida entre la solución nutritiva y los DDT para los parámetros a^* y b^* , puso de manifiesto que con el avance del ciclo se fue haciendo más evidente la influencia que el abonado amoniacal tuvo sobre las plantas.

Tanto en el caso del SPAD, como de los parámetro de color a^* y b^* , se constató a los 42 ddt un cambio en la tendencia observada, lo que podría relacionarse con la entrada en senescencia de la planta. Carrión (2011) en un ensayo con escarola y Chituchidet *et al.* (2011) en lechuga, también apreciaron una disminución de las medidas de SPAD y en los valores de b^* , respectivamente, en la última fase del cultivo.

El contenido en clorofilas, medido a través de las medidas de SPAD, presentó una elevada correlación con los parámetros de color, L^* , a^* y b^* , corroborando lo obtenido por León *et al.*, (2007) en lechuga.

La proporción de amonio en la solución nutritiva no supuso un factor significativo en el porcentaje de nitrógeno en la hoja, lo que no resultó coincidente con lo expuesto por Sandoval *et al.*, (1999) en un ensayo de tomate en el que un incremento de la proporción de amonio llevó asociado un aumento del contenido total de nitrógeno en las hojas.

La acumulación de nitratos en las hojas no se vio afectada por el porcentaje de amonio en la solución nutritiva. En otros ensayos realizados en escarola (Santamaria *et al.*, 1997; Santamaria *et al.*, 1998; Santamaria and Elia, 1997; Bonera *et al.*, 2008) y lechuga (Demsar and Oswald, 2003; Rincón, 2005), la aportación de nitrógeno en forma de amonio, solo o en proporciones crecientes, disminuyó la acumulación de nitratos en las hojas. En el presente experimento, las proporciones de amonio han sido más bajas que en estos ensayos, lo que podría explicar la falta de diferencias en la acumulación de nitratos entre las distintas soluciones nutritivas.

Se observó un descenso en el contenido en fósforo de las hojas con las soluciones N5 y N10 en la última fase del ciclo. El empleo de amonio en la solución

nutritiva lleva asociada una acidificación del medio, condiciones que resultan más favorables para la absorción de fósforo. Así, en ensayos llevados a cabo en lechuga (Savvas *et al.*, 2006), un porcentaje del 30% de amonio en la solución nutritiva indujo una mayor absorción de este elemento que proporciones más bajas. En el presente experimento los porcentajes de amonio fueron notablemente más bajos, lo que no ha permitido constatar la mayor absorción de fósforo con las soluciones más ricas en amonio. El incremento de la proporción de fósforo con el transcurrir del ciclo coincide con lo expuesto por Savvas *et al.* (2006) en ensayos con lechuga.

En cuanto a las correlaciones entre los distintos parámetros se observó que para los nitratos sólo hubo correlaciones significativas con los parámetros a^* y b^* ($p \leq 0.01$), aunque los valores del coeficiente de correlación (0.4443 y -0.3689 respectivamente) no permiten ser utilizados en la estimación de nitratos en hojas.

En el caso del porcentaje de nitrógeno, únicamente el parámetro de color L^* presentó una correlación e.s. con el mismo, aunque el bajo coeficiente de correlación no permiten utilizar este parámetro para hacer una estimación del porcentaje de nitratos en hojas.

Diferentes estudios realizados en tomate (Rodríguez *et al.*, 1998), maíz (Rincón y Ligarreto, 2010), uva (Li *et al.*, 1998) y haba (Abdelhamid *et al.*, 2003) encontraron una alta correlación entre las medidas de clorofila (SPAD) y el porcentaje de nitrógeno de las hojas, lo que permitiría emplear dicho medidor para establecer una estimación del contenido de nitrógeno en las hojas. Sin embargo, Dwyer *et al.* (1995) en un ensayo en maíz no encontraron una correlación e.s. entre los dos parámetros citados. La falta de correlación entre ambos parámetros podría deberse a que una parte del nitrógeno en las hojas está en forma de nitratos, que no están asociados a la molécula de clorofila. En el caso del contenido de nitratos en hojas, se determinó en un ensayo con acelga (Papasavvas *et al.*, 2008) que existía una elevada correlación de este parámetro con las lecturas de SPAD, pudiendo emplearse este método para llevar a cabo un control de la fertilización del cultivo. En otros ensayos (Westerweld *et al.*, 2003), esta correlación fue e.s. para algunos cultivos (calabaza), pero no para otros (cebolla y zanahoria). Por su parte, Carrión (2011) en un estudio con escarola y Westcott y Wraith (2003) en menta no hallaron una correlación entre los nitratos en hojas y las medidas de

3. Resultados y discusión

SPAD, considerando que con aportaciones altas de nitrógeno, se produce una saturación en las medidas de SPAD, en tanto que los niveles de nitratos siguen aumentando. En el presente ensayo, los valores de SPAD no han mostrado una correlación e.s. con el contenido de nitratos y el porcentaje de nitrógeno en hojas, por lo que, en las condiciones en las que se ha desarrollado el ensayo, el medidor de clorofilas no podría emplearse para hacer una estimación de los valores de estos dos parámetros.

4. CONCLUSIONES

- No se ha encontrado una respuesta de las plantas de escarola a la aportación de amonio a las soluciones nutritivas, ni desde el punto de vista del peso por planta, ni respecto a la incidencia de fisiopatías, siendo todas las plantas del ensayo comerciales.
- El incremento de la concentración de amonio supuso un aumento de los valores de SPAD (contenido en clorofilas) y una disminución de los parámetros de color a^* y b^* .
- Las medidas de SPAD alcanzaron los valores más elevados con la mayor concentración de amonio.
- Los valores de SPAD se incrementaron con el desarrollo del ciclo, lo que fue unido a una disminución del color amarillo (parámetro b^*).
- La utilización de amonio no ha incrementado la absorción de fósforo.
- El aumento de la concentración de amonio no ha producido una disminución en la acumulación de nitratos, la cual fue aumentando al avanzar el ciclo.
- El medidor de clorofilas (SPAD) y el colorímetro (escala CIELab) no han resultado unas herramientas adecuadas para la estimación del porcentaje de nitrógeno y el contenido en nitratos de las hojas.

5. BIBLIOGRAFÍA

Abdelhamid M., Horiuchi T., Oba S. 2003. Evaluation of the SPAD Value in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Leaves in Relation to Different Fertilizer Applications. Plant Science Production. Vol 6. No 3, pp. 185 – 189.

Ahmed A.H.H., Khalil M.K., Farrag A.M. (2000). Nitrate accumulation, growth, yield and chemical composition of Rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) plant as affected by NPK fertilization, kinetin and salicylic acid, in: Proceedings of ICEHM 2000, Cairo University, Egypt, pp. 495–508.

A.O.A.C. 1990. *Ofjicial Methods of Analysis* (5th ed.). The Association of Official Analysis Chemists, Arlington, VA, USA. pp. 40-42

Anjana, Shahid , Muhammad. 2007 Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. Agron. Sustain. Dev. 27 (2007) 45–57.

Bjorne H., Petersson J., Phillipson M., Weitzberg E., Holm L., Lundberg J.O. (2004). Nitrate in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness, J. Clin. Invest. 113, 106–114.

Cardenas-Navarro R., Adamowicz S., Robin P. (1999). Nitrate accumulation in plants: a role for water, J. Exp. Bot. 50, 613–624.

Carrión M.T., Hernández J., E.M. Suárez-Rey 2011. Cultivo de la escarola en una zona vulnerable de contaminación por nitratos. Universidad de Almería. Escuela Superior de Ingeniería.

Dykhuisen R., Frazer R., Duncan C., Smith C.C., Golden M., Benjamin N., Leifert C. (1996). Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: importance of dietary nitrate in host defence, Antimicrob. Agents Ch. 40, 1422–1425.

Escalona A., Santana M., Acevedo I., Rodríguez V., Merú L. 2009. Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre el contenido de nitratos y lecturas SPAD en el cultivo de la lechuga. Agronomía Trop.59 (1): 99-105.

FEPEX (Federación española de asociaciones de productores y exportadores de frutas, hortalizas y plantas vivas), 2014. Avances estadísticos de importación y exportación de frutas y hortalizas. En www.fepex.es

Ferrario-Mery S., Murchie E., Hirel B., Galtier N., Quick W.P., Foyer C.H. (1997). Manipulation of the pathways of sucrose biosynthesis and nitrogen assimilation in transformed plants to improve photosynthesis and productivity, in: Foyer C.H., Quick W.P. (Eds.), A molecular approach to primary metabolism in higher plants, Taylor and Francis, London, pp. 125–153.

Gonella, M., Serio, F., Santamaria, P., 2002. Fattori genetici e ambientali e contenuto di nitrato degli ortaggi. Supplemento a Colture Protette. N°12.

Gromaz A. 2003. Comportamiento productivo, fisiopatías y acumulación de nitratos en dos cultivares de escarola (*Cichorium endivia* L.) bajo distintos sistemas de manejo y ciclos. Tesina de máster, dirigida por Maroto J.V. y Torres J.F. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Rural U.P.V.

Hoyos V., Rodríguez M., Cardenas-Hernández J.f., Balaguera-López H.R. 2009. Análisis del crecimiento de la espinaca bajo efecto de diferentes fuentes y dosis de nitrógeno. REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS - Vol. 3 - No.2 - pp. 175-187.

Jones, Jr. J. B. 1997. Hydroponics. A practical guide for soilless grower. St Lucie Press. USA. 207P.

Knobeloch L., Salna B., Hogan A., Postle J., Anderson H. (2000). Blue babies and nitrate-contaminated well water, Environ. Health Persp. 108, 675-678.

L. M. Dwyer, D. W. Stewart, E. Gregorich, A. M. Anderson, B. L. Ma, M. Tollenaar 1995. Quantifying the nonlinearity in chlorophyll meter response to corn leaf nitrogen concentration. Canadian Journal of Plant Science, 75(1), pp. 179-182.

Li C.Y., Alva A.k., Calvert D.V., Zhang M.1998. A Rapid Nondestructive Technique to Predict Leaf Nitrogen Status of Grapefruit Tree with Various Nitrogen Fertilization Practices. HortTechnology vol. 8 no.1, pp. 81-86.

López-Bellido, R.J. Shepherd, C.E., Barraclough, P.B. 2004. Predicting post-anthesis N requirements of bread wheat with a Minolta SPAD meter. *European Journal of Agronomy* 20:313- 320.

M.Sandoval-Villa, C.W. Wood, E.A. Guertal 1999. Ammonium concentration in solution affects chlorophyll meter readings in tomato leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 22 (11), pp. 1717-1729.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, alimentación y medioambiente), 2014. Superficies y producciones de cultivos. En www.magrama.gob.es.

Maroto, J.V., 2000 . Botánica (taxonomía y fisiología) y adaptabilidad. En: La lechuga y la escarola. Eds. J.V. Maroto Borrego, A. Miguel Gómez, C. Baixauli Soria. Caja Rural Valencia. Fundación. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp 27-43.

Maroto, J.V., 2000. Fertilización. En: La lechuga y la escarola. Eds. J.V. Maroto Borrego, A. Miguel Gómez, C. Baixauli Soria. Caja Rural Valencia. Fundación. Ediciones Mundi-Prensa. pp 105-123.

Maroto, J.V. 2002. Horticultura Herbácea Especial. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid 702 pp.

McKnight G.M., Duncan C.W., Leifert C., Golden M.H. (1999). Dietary nitrate in man: Brit. J. Nutr. 81, 349–358. mediante un medidor portátil de clorofilas. *Tierra Volumen* 16. Número 2, pp. 135-141.

Mensinga T.T., Speijers G.J.A., Meulenbelt J. (2003). Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds, *Toxicol. Rev.* 22, 41-51.

Misaghi, I.J. and Grogan, R.G. 1978. Effect of Temperature on Tipburn Development in Head Lettuce. *Phytopathology* 68: 1738-1743. International Congress on Soilless Culture. Wageningen. The Netherlands.

Nazaryuk V.M., Klenova M.I., Kalimullina F.R. (2002). Ecoagrochemical approaches to the problem of nitrate pollution in agroecosystems, *Russ. J. Ecol.* 33, 392–397.

Papasavvas A., Triantafyllidis V., Zervoukadis G., Kapotis G., Samaras Y., Salahas G. 2008. Correlation of SPAD-502 meter readings with physiological parameters and leaf nitrate content in *Beta vulgaris*. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 9, No 2, pp. 351-356.

Raupp J. (1996). Fertilization effects on product quality and examination of parameters and methods for quality assessment, in: Raupp J. (Ed.), Quality of plant products grown with manure fertilization, Darmstadt, pp. 44–48.

Rincón A, Ligarreto G.A. 2010 Relación entre nitrógeno foliar y el contenido de clorofila, en maíz asociado con pastos en el Pídemonte Llanero colombiano. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria 11 (2), pp. 122-128.

Rincón Sanchez, L. 2005. Fertilización nitrogenada y contenido de nitratos en hojas de lechuga “Iceberg”. Vida Rural, 210: 50-55.

Rincón Sanchez, L., Pérez Crespo, A., Pellicer Botía C., Sáez Sironi, J., Abadía Sanchez, A., 2002. Influencia de la fertilización nitrogenada en la absorción de nitrógeno y acumulación de nitratos en la lechuga iceberg. Invest. Agr: Prod. Prot. Veg. Vol. 17 (2).

Rodríguez Mendoza M., Alcántar G., Aguilar A., Etchebers J., Santizó J.A. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate con un medidor portátil de clorofilas.

Ryder, E.J. 1999. Lettuce, endive and chicory. CABI Publishing. Walingford-Oxon/New York.

Santamaria P., Elia A., Parente A., Serio F. (1998). Fertilization strategies for lowering nitrate content in leafy vegetables: Chicory and rocket, J. Plant Nutr. 21, 1791–1803.

Santamaria P., Elia A., Serio F., Todaro E. (1999). A survey of nitrate and oxalate content in retail fresh vegetables, J. Sci. Food Agr. 79, 1882–1888.

Savvas D., Passam H.C., Olympios C. 2001. Efectos of ammonium nitrogen on lettuce grown on pumice in closed hydroponical system. Hort Science 41 (7), pp. 1667-1673.

Steiner, A.A. 1984. The universal nutrient solution. pp. 633-650. In: Proceedings 6th International Congress on Soils Culture. Wageningen. The Netherlands.

Suárez – Rey E.M., Carrión M.T., Leyva R. Romero – Gámez M., Pérez – López L., Soriano T., Castilla N., Hernández J. 2012. Evaluación del SPAD para el asesoramiento del abonado nitrogenado en el cultivo de la escarola. Actas de Horticultura N° 60, XIII Congreso de Ciencias Hortícolas, pp. 847-851.

Tuncay O. 2011. Relationships between nitrate, chlorophyll and chromaticity values in rocket salad and parsley. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (75), pp. 17152-17159.

Tzung W.-J., Po W.-Y., Wu J.T., Wang Y.-P. (1995). Effects of some environmental factors on nitrate content of Chinese cabbage (*Brasica* factors on nitrate content of Chinese cabbage (*Brasica chinensis* L.), *J. Chin. Agr. Chem. Soc.* 33, 125–133.

Vieira I.S., Vasconcelos E.P., Monteiro A.A. (1998). Nitrate accumulation, yield and leaf quality of turnip greens in response to nitrogen fertilisation, *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 51, 249–258.

Villar, R.; J. Ruiz-Robledo; J.L. Quero; H. Poorter; F. Valladares y T. Maranon. 2004. Capítulo 7: Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. pp. 193-226. En: *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Red Temática Globimet, Madrid.

Walker R. 1990. Nitrates, nitrites and *N*-nitrosocompounds: A review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food additives and contaminants*. Volume 7, issue 6.

Westcott, M.P. and J.M. Wraight. 1995. Correlation of leaf chlorophyll readings and stem nitrate concentration in peppermint. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 26 : 1481-1490.

Westerveld S.M., McKeown A.W., Scott-Dupree C.D., McDonald 2003 M.R. How Well Do Critical Nitrogen Concentrations Work for Cabbage, Carrot, and Onion Crops? *HortScience* vol. 38 no. 6, pp . 1122-1128.

Zhou Z.-Y., Wang M.-J., Wang J.-S. (2000). Nitrate and nitrite contamination in vegetables in China, *Food Rev. Int.* 16, 61–76.