

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORURO Y AMONIO DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA SOBRE EL COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO EN CULTIVO DE ESCAROLA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO
RURAL

ALUMNO: ADRIÁN IRLES MARCO

TUTOR: ALBERTO SAN BAUTISTA PRIMO

COTUTOR: JOSÉ FRANCISCO TORRES RUBIO

DIRECTORA EXPERIMENTAL: ANDREA GROMAZ ROIG

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, 7 DE JULIO 2016

RESUMEN:

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CLORURO Y AMONIO DE LA SOLUCIÓN NUTRITIVA SOBRE EL COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO EN CULTIVO DE ESCAROLA

La acumulación de nitratos en plantas aprovechables por sus hojas, como es el caso de la escarola, (*Cichorium endivia* L.), puede tener efectos perjudiciales en la salud humana. Esta acumulación está influenciada, entre otros factores, por el aporte de nitrógeno que se realiza con el abonado, así como por la forma en que se aplica (fundamentalmente nítrico o amoniacal). En las células, los nitratos tienen una función osmótica, ayudando a mantener su turgencia, por lo que el aporte en la solución nutritiva de otros iones con una función similar, como es el caso de los cloruros, puede reducir su acumulación. Los nitratos, antes de integrarse al proceso de síntesis de aminoácidos, se acumulan en las vacuolas donde se reducen a amonio. Aplicando el nitrógeno en forma amoniacal, este pasa a ser empleado directamente en la síntesis aminoácidos, lo que puede reducir la acumulación de nitratos en hojas. Por estas razones, se estableció como objetivo de este experimento estudiar la influencia en la concentración de nitratos en hojas, así como en el rendimiento del cultivo, de seis soluciones nutritivas. Todas las soluciones presentarán el mismo contenido de nitrógeno. Las plantas se agruparon en tres bloques, inicialmente a cada uno de los bloques se le aplicó una solución nutritiva con distinto porcentaje de cloro respecto del nitrógeno total (5% aplicado en forma amónica), (**CI0**:0% Cl⁻; **CI20**:20% Cl⁻; **CI40**:40% Cl⁻); a partir del día 21 la mitad de las plantas de cada bloque se regaron con las tres soluciones restantes con los mismos porcentajes de Cl⁻ anteriormente citados, pero incrementando la proporción de nitrógeno aplicado en forma amónica hasta un 20%. Durante todo su ciclo, 42 ddt (días después del trasplante), se determinó la evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad. Se determinaron además las correlaciones existentes entre el contenido de nitratos y los valores de SPAD y del colorímetro. Para todo ello se utilizó el cultivar de hoja ancha ‘Cuartana’. Semanalmente, desde el día del trasplante hasta los 42 ddt se analizó la tasa de crecimiento; por otro lado, periódicamente (0, 14, 28, 42 ddt) se observó 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 CIEL*a*b*)). Adicionalmente, al final del cultivo, se valoró el porcentaje de plantas comerciales, su peso medio y la incidencia de “tipburn”.

Palabras clave

Escarola, amonio, cloruro, SPAD, nitratos, nitrógeno, fósforo, solución, concentración, tipburn

ALUMNO: ADRIÁN IRLES MARCO

VALENCIA, 7 DE JULIO 2016

TUTOR: ALBERTO SAN BAUTISTA PRIMO

COTUTOR: JOSÉ FRANCISCO TORRES RUBIO

DIRECTORA EXPERIMENTAL: ANDREA GROMAZ ROIG

ABSTRACT:

EFFECT OF CHLORIDE AND AMMONIUM CONCENTRATION OF NUTRIENT SOLUTION ON THE AGRONOMIC PERFORMANCE IN ENDIVE.

Nitrate accumulation in plants which are grown for the consumption of their leaves, like the endive (*Cichorium endivia* L.), can have damaging effects on the human health. This accumulation is influenced, among other factors, by the nitrogen fertilization, and by the chemical form of nitrogen that is used (ammonium or nitric form). In cells, nitrates have an osmotic function, helping to maintain turgor, so the supply in the nutrient solution of other ions which function is similar, like chloride, can reduce its accumulation. Nitrates, before getting into the aminoacids synthesis process, are accumulated in the vacuoles where are reduced to ammonium. Using nitrogen in ammonium form, which is directly in the aminoacids synthesis, can reduce the nitrate accumulation on leaves. For these reasons, it was set as an objective of this experiment to study the influence of six nutrient solutions on the nitrate concentration on leaves, as well as the yield. All the nutrient solutions have the same level of nitrogen. The plants were put in three blocks. At first it was applied to each block a nutrition solution with different chloride percentage regarding the total nitrogen (5% applied in ammonium form) (**CI0**:0% Cl⁻; **CI20**:20% Cl⁻; **CI40**:40% Cl⁻). 21 days after the transplant half of the plants of each block were irrigated with the three solutions with the same Cl⁻ percentage already mentioned, but increasing the nitrogen proportion applied in the ammonium form until the 20%. Along all the cycle (42 days after the transplant), were determined the evolution of different physiological and quality parameters. Furthermore, there were determined the correlations between the nitrate content and the SPAD and colorimeter values. All the results were taken from a wide leaf variety 'Cuartana'. Every week, since the transplant until the 42 days after it was analyzed the grown rate. Moreover, the evolution of different physiological and quality parameters were observed periodically (chlorophyll content, nitrates, nitrogen and leaf color). Besides, the commercial plants percentage, their weight and the incidence of "tipburn" were assessed.

Key words

Endive, ammonium, chloride, SPAD, nitrates, nitrogen, phosphorus, nutrient solution, concentration, tipburn

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Alberto por brindarme esta oportunidad.

A José y Andrea por su tiempo e implicación.

Muchas gracias por vuestra ayuda.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Encuadramiento taxonómico y generalidades	1
1.1.1. Importancia económica	1
1.2 Acumulación de nitratos en hortalizas de hoja.	1
1.2.1. Efectos perjudiciales para la salud humana	2
1.2.2. Efectos beneficiosos para la salud humana	2
1.3. Factores que afectan a la acumulación de nitratos en hortalizas consumidas por sus hojas	3
1.3.1. Factores genéticos	3
1.3.2. Factores nutritivos	3
1.3.3. Factores externos: relación intensidad lumínica	4
1.4 Prácticas agronómicas	5
1.5 Distribución nítrica a través de la planta	5
1.6 Métodos indirectos para estimar el contenido de nitrógeno y nitratos en las hojas de escarola.	5
1.6.1 Medidas SPAD	5
1.6.2. Parámetros de color	6
1.7. Tasa de crecimiento	6
1.8. Objetivo	6
2. MATERIAL Y MÉTODOS	7
2.1 Características del experimento	7
2.2. Parámetros estudiados y metodología	9
2.2.1. Evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad	9
2.2.1.1. Medida de la concentración de clorofilas	9
2.2.1.2. Determinación de los parámetros de color y del contenido de nitratos	9
2.2.1.3. Determinación de macronutrientes (N y P)	11
2.2.2. Análisis de la producción	15
2.2.2.1. Evaluación de la incidencia de las fisiopatías.	15
2.2.2.2. Producción comercial	17
2.2.3. Tasa de crecimiento.	17
2.2.4. Determinación del pH y CE	17
2.2.5. Análisis estadísticos de los resultados	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1. Resultados	18
3.2 Discusión de los resultados	25
4. CONCLUSIONES	28
5. BIBLIOGRAFÍA	29
ANEJO FOTOGRÁFICO	33
ANEJO GRÁFICAS	34

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Encuadramiento taxonómico y generalidades.

La escarola (*Cichorium endivia* L.) es una hortaliza consumida por sus hojas, que pertenece a la familia *Compositae* y al género *Cichorium*.

Existen dos variedades botánicas claramente definidas (Maroto, 2002):

- *Cichorium endivia* L. var. *crispa* L.: caracterizada porque sus hojas están muy divididas en estrechos y retorcidos segmentos, cuyos bordes son fuertemente dentados. Como cvs. de otoño-invierno pueden citarse: *Rizada del Prat*, *Ruffec*. Entre los cvs. de primavera-verano: *Rizada doble de verano*.

- *Cichorium endivia* L. var. *latifolia* L.: escarolas con las hojas muy anchas, algo onduladas y con un dentado muy ligero. En términos generales son más rústicas que las anteriores. Entre los cvs. de otoño-invierno pueden citarse: *Gigante Hortelana*, *Redonda*, *Agora*, *Bossa*. Entre los cvs. de primavera-verano: *Malan*, *Gruesa Bouclée*, *Cuartana*.

Este cultivo tiene un importante interés debido al uso de sus hojas para la elaboración de ensaladas y presentaciones de cuarta gama. Destaca por su contenido en vitamina A y vitamina C, así como por un sabor ligeramente amargo y estimulador del apetito (Maroto, 2002).

Por lo general, las escarolas no suelen ser resistentes a las bajas temperaturas, aunque hay variedades que se adaptan al invierno del litoral mediterráneo. En producciones primaverales puede haber problemas con la subida a flor prematura, debido al efecto vernalizador de las bajas temperaturas. Se considera un cultivo tolerante a la acidez, adaptándose mejor en suelos de tipo medio, ligeramente arcillosos (Maroto, 2000; Maroto, 2002).

1.1.1. Importancia económica.

La superficie dedicada al cultivo de la escarola en España durante el año 2014 fue de 2.231 ha, con una producción de 58.687 t, siendo Cataluña la comunidad autónoma con mayor producción, seguida de Murcia y la Comunidad Valenciana, con un total de 12.884 t, 12.177 t y 9.335 t respectivamente (MAGRAMA, 2016).

En lo referido al comercio internacional, las exportaciones de endivia y escarola durante 2015, fueron de 72.352 t, lo que supuso un incremento respecto al año 2014 (61.584 t). Por otra parte, las importaciones en 2015 (10.867 t) aumentaron respecto al año 2014 (7.951 t) (FEPEX, 2016).

1.2 Acumulación de nitratos en hortalizas de hoja.

El ion nitrato resulta imprescindible para la nutrición de las plantas, ya que es la principal forma en la que las plantas absorben el nitrógeno necesario para la síntesis de proteínas en el metabolismo vegetal (Maroto, 2000).

El nitrato como tal, es una sustancia poco tóxica, sin embargo, una vez ingerida se reduce por la acción de enzimas secretadas por bacterias de la saliva humana a NO_2^- , que sí resulta dañina para el ser humano (Rincón, 2005; Santamaría 2006).

Las hortalizas de hoja, como la lechuga y la escarola, son proclives a acumular nitratos, por lo que es un aspecto a tener en mente, ya que los vegetales son la mayor fuente diaria de NO_3^- (72-94%) (Rincón, 2005; Anjana and Iqbal, 2007).

1.2.1. Efectos perjudiciales para la salud humana.

A pesar de que el nitrato en sí no es perjudicial para la salud humana, cuando éste se reduce a nitrito en la cavidad bucal gracias a la saliva, se vuelve dañino. Esto se debe a que el nitrito es capaz de reaccionar con la hemoglobina, para formar metahemoglobina (oxiHb): $\text{NO}_2^- + \text{oxiHb} (\text{Fe}_2^+) \rightarrow \text{metahemoglobina} (\text{Fe}_3^+) + \text{NO}_3^-$. De esta forma se pierde la capacidad de transporte de oxígeno a las células. (Andreu *et al.*, 2006; Santamaría, 2006). En lactantes existe una mayor susceptibilidad a esta enfermedad debido a que poseen una menor acidez gástrica, que favorece la reducción de nitratos a nitritos, además de que la hemoglobina fetal se oxida más fácilmente a metahemoglobina (Santamaría, 2006).

Por otro lado, cabe destacar también la posible reacción de los nitritos, con las amidas y aminas, formando de esta forma nitrosaminas y nitrosamidas, compuestos asociados a la aparición de cáncer estomacal (Shao-ting *et al.*, 2007).

Para evitar posibles riesgos en la salud humana, las instituciones sanitarias han establecido límites máximos de ingesta de nitratos. 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, 2000).

Tomando como referencia la lechuga, cultivo que por sus características puede considerarse similar a la escarola, la concentración máxima de nitratos establecida por la Unión Europea es de 5000 mg $\text{NO}_3 \text{kg}^{-1}$ en lechugas cultivadas en la modalidad bajo invernadero y de 4000 mg $\text{NO}_3 \text{kg}^{-1}$ al aire libre, recolectadas entre el 1 de octubre y 31 de marzo, y de 4000 mg $\text{NO}_3 \text{kg}^{-1}$ y 3000 mg $\text{NO}_3 \text{kg}^{-1}$ las que son recolectadas entre el 1 de abril y 30 de septiembre. De esta clasificación se excluye a la lechuga tipo "Iceberg" (DOUE, 2011).

1.2.2. Efectos beneficiosos para la salud humana.

En contraposición a los efectos perjudiciales de los nitratos, encontramos diversos estudios que hacen referencia a los efectos beneficiosos de éstos.

Los nitratos pueden ser una fuente útil de nutrición para la dieta humana, y ayudar a prevenir enfermedades tales como la arteriosclerosis, la diabetes, la presión arterial baja, y las enfermedades relacionadas con la coagulación (Shao-ting *et al.*, 2007; Dykhuizen *et al.*, 1996).

Los potenciales efectos beneficiosos de los nitratos han sido objeto de limitadas investigaciones, aun así, se ha constatado su efecto en la prevención de infecciones microbianas y la reducción de hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Santamaría, 2006).

1.3. Factores que afectan a la acumulación de nitratos en hortalizas consumidas por sus hojas.

La acumulación de los nitratos en las hojas se debe a un desequilibrio entre la absorción de nitratos y la reducción de éstos en amonio. Está determinada genéticamente y además se ve afectada por la fuente de fertilizante nitrogenado, NH_4^+ o NO_3^- , el momento de aplicación de éste, la radiación, el fotoperiodo, el ciclo de cultivo y el cultivar empleado (Pavlou *et al.*, 2007). Alternativamente, los nitratos cumplen en la planta una función osmótica, en la que bajo determinadas condiciones pueden ser sustituidos, por otros similares, como los cloruros, contribuyendo a disminuir su nivel de acumulación (Anjana and Iqbal, 2007).

1.3.1. Factores genéticos.

El contenido de nitratos dentro de cada especie presenta diferencias entre cultivares, así como entre genotipos con distinto nivel de ploidía (Gonella *et al.*, 2002).

En ensayos previos realizados por la Cátedra de Horticultura y Cultivos Herbáceos de la UPV el cultivar “Cuartana” resultó tener mayor tendencia a la acumulación de nitratos que el cultivar “Natacha” (Gromaz, 2013).

1.3.2. Factores nutritivos.

Nazaryuk *et al.* (2002) estudiaron el papel que desempeñan los productos químicos agrícolas en la acumulación de nitrato en las plantas, estableciendo que dicho proceso depende de tres factores principales: aplicación de fertilizantes minerales, tratamiento con sustancias fisiológicamente activas y absorbentes y los cambios tanto naturales como antropogénicos en las condiciones del suelo (Nazaryuk *et al.*, 2002).

La acumulación de nitratos en hortalizas depende de la cantidad y tipo de los nutrientes presentes en el suelo y está estrechamente relacionado con el momento de la aplicación, la cantidad y composición de los fertilizantes empleados (Zhou *et al.*, 2000).

La fertilización nitrogenada facilita la acumulación de nitrato en los tejidos de la planta como resultado de una absorción de nitrógeno por encima de su reducción. Cuando se toma en exceso se almacena en forma de nitrato libre en la vacuola y puede ser movilizado posteriormente cuando el suministro de nitrógeno es insuficiente para satisfacer la demanda (Anjana and Iqbal, 2007). El momento en el que se realiza el aporte de nitrógeno, así como la forma en la que se encuentra (NH_4^+ ó NO_3^-) influyen en la acumulación de NO_3^- en las hojas. Dejando de aplicar nitrógeno días previos a la recolección se produce un descenso en la concentración de NO_3^- (Santamaría *et al.*, 1999b). Por otro lado, formulaciones amoniacales reducen el contenido de nitratos en hoja y formulaciones nítricas elevan la concentración (Rincón, 2005).

En varios estudios enfocados a establecer la influencia del abono amoniacal en la acumulación final de nitratos, se modificó la ratio $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$; obteniendo que el aumento de la forma amoniacal redujo la acumulación de nitratos (Santamaría *et al.*, 1997; Santamaría *et al.*, 1999a). Soluciones con una 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 (Santamaría *et al.*, 1999b).

Sin embargo, otras fuentes inciden en que el suministro de 10% a 15% del total de N en forma de NH_4^+ es óptimo para la mayoría de los cultivos, mientras que una ratio mayor que 15% o 20% está asociado con un mayor riesgo de toxicidad de amonio, no debiendo sobrepasar nunca el 30% (Savvas *et al.*, 2006).

Una de las funciones que desempeñan los NO_3^- en las células es actuar como agente osmótico en muchas especies, como es el caso de la lechuga. El nitrato es uno de los componentes solubles que ayudan a mantener la turgencia celular necesaria para la expansión del tejido mediante la reducción del potencial osmótico de la savia vacuolar (Burns *et al.*, 2010).

El aporte de iones, como los cloruros, que tengan la capacidad de suplir a los nitratos en su función como agente osmótico puede reducir el contenido de nitratos (Van der Boon *et al.*, 1988).

Un incremento en la fertilización amoniacal supone una reducción del pH, lo que conlleva una mayor absorción de fósforo. El fósforo inorgánico es necesario en la planta para el metabolismo y almacenamiento de nitratos, pero a elevadas concentraciones crean presiones anómalas en las paredes celulares, inhiben reacciones enzimáticas y aceleran la senescencia. En etapas finales de la planta se reduce la absorción de fósforo y aumenta la acumulación de nitratos (Ahmed *et al.*, 2000).

Estudios realizados en lechuga demostraron que la aplicación de nitrógeno en forma amoniacal producía una disminución del pH de la solución nutritiva, lo que favorece la absorción de fosforo (Savvas *et al.*, 2006).

Santamaría *et al* (1999b) determinó que, a mayor presencia de nitrógeno en forma amoniacal, el contenido total de nitrógeno es mayor.

1.3.3. Factores externos: relación intensidad lumínica

La intensidad luminosa es un factor influyente en la acumulación de nitratos en planta de lechuga debido a su influencia sobre la actividad de la enzima nitrato-reductasa, de manera que un incremento de la luminosidad, la aumenta, disminuyendo la acumulación de nitratos (Rincón *et al*, 2002). Por otro lado, el aumento de la luminosidad incrementa la disponibilidad de carbohidratos y de ácidos orgánicos producto de la fotosíntesis, que se acumulan en las vacuolas como alternativa a la función osmótica los nitratos (Gonella *et al.*, 2002).

Por esta razón, en vegetales aprovechados por sus hojas se recomienda realizar la cosecha al final del día para para obtener una menor acumulación de nitratos. En la mayoría de los casos la concentración de nitratos disminuyó linealmente durante el día y aumentó por la noche (Neely *et al.*, 2010).

Lechugas y espinacas cultivadas en condiciones de baja luminosidad presentaron una baja actividad del complejo enzimático, que llevó asociada una escasa reducción a iones amoniacales, observando así elevados niveles de nitratos en las hojas de estas plantas (Anjana and Iqbal, 2007).

1.4 Prácticas agronómicas.

En el manejo de los cultivos existen diferentes prácticas que resultan recomendables para controlar la acumulación de nitratos; entre ellas podemos citar:

- Elección del cultivar más apropiado (Maroto, 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, 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.*, 2002).

1.5 Distribución nítrica a través de la planta.

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

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

1.6.1 Medidas SPAD

Existe una relación entre el contenido de nitrógeno en hoja y la concentración de clorofila en la misma, ya que la mayoría del N de las hojas está contenido en las moléculas de clorofila (Peterson *et al.*, 1993). Actualmente existen métodos ópticos no destructivos (medidores SPAD) que permiten estimar de manera indirecta la concentración de clorofilas (Rodríguez *et al.*, 1998).

La acumulación de nitratos en hojas de plantas de lechuga, está influenciada por el contenido y el tipo de nitrógeno disponible y puede ser determinado a través de lecturas "SPAD" (Escalona *et al.*, 2009).

Diversos estudios han tratado de relacionar el contenido de nitrógeno con las lecturas de SPAD, ya que éstas podrían indicar el nitrógeno que forma parte de las clorofilas en las hojas (Suarez-Rey *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 1998).

En el cultivo de lechuga se puede observar que existe una relación entre el nivel de nitratos y las lecturas SPAD, pudiéndose ver que valores más alto de nitratos se comprenden con mayores valores de las lecturas SPAD (Escalona *et al.*, 2009). Diferentes estudios realizados en maíz (Rincón y Ligarreto, 2010), uva (Li *et al.*, 1998) y haba (Abdelhamid *et al.*, 2003) se encontró 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 esta parte de la planta, hecho que sí demostraron López-Bellido *et al.*, (2004) con el SPAD y el nitrógeno aplicado en las hojas bandera de maíz.

Sin embargo, en un estudio realizado con escarola no se encontraron elevadas correlaciones entre las lecturas SPAD y la cantidad de nitrógeno cuantificable (Suárez-Rey *et al.*, 2012).

En lo referido al contenido de nitratos en hojas, un ensayo con acelga (Papasavvas *et al.*, 2008) determinó una alta correlación entre este parámetro y las lecturas de SPAD, pudiendo emplear este método para llevar un control óptimo de la fertilización nitrogenada del cultivo. Otro ensayo realizado en lechuga estableció que las plantas con mayor acumulación de nitratos presentaron mayores valores de lectura SPAD (Escalona *et al.*, 2009). Sin embargo, en otros ensayos se obtuvo una correlación entre estos parámetros en cultivos como calabaza, pero no en cebolla y zanahoria (Westerweld *et al.*, 2003).

Por otro lado, en un estudio realizado con endivias, se ha observado un efecto del contenido de NH_4^+ en la solución nutritiva en los valores SPAD, de manera 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).

1.6.2. Parámetros de color

Estudios realizados con rúcula y perejil determinaron que los parámetros de color L y H° tuvieron una elevada correlación con los niveles de clorofilas y nitratos (Tuncay, 2011).

1.7. Tasa 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).

En estudios realizados con lechuga los valores más altos de la tasa relativa de crecimiento se presentaron en los primeros muestreos, esto es debido a que acorde al crecimiento de la planta hay mayor acumulación de materia seca en relación a la producción de fotoasimilados (Hoyos *et al.*, 2009).

1.8. Objetivo

El objetivo de este trabajo es establecer la influencia de distintas concentraciones de cloruro en las soluciones nutritivas, así como de la ratio $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ en la acumulación de nitratos en hoja de escarola, así como en la evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad a lo largo del cultivo. Por último, se quiere determinar 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 invernal 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	09/12/2015	18/01/2016	29/02/2016

Se aportaron seis soluciones nutritivas, (cuya composición se recoge en el cuadro 2.2). Todas las soluciones presentaron el mismo contenido de nitrógeno. Las plantas se agruparon en tres bloques, inicialmente a cada uno de los bloques se le aplicó una solución nutritiva con distinto porcentaje de cloro respecto del nitrógeno total (5% aplicado en forma amónica), (**CI0**:0% Cl⁻; **CI20**:20% Cl⁻; **CI40**:40% Cl⁻); a partir del día 21 la mitad de las plantas de cada bloque, se regaron con una solución que mantenía el porcentaje de Cl⁻, pero incrementaba la proporción de nitrógeno aplicado en forma amónica hasta un 20%.

- Solución 1: Sin iones cloruro preparada con agua desionizada, con 5% NH₄⁺
- Solución 2: Contenido en cloro del 20% respecto del nitrógeno total, con 5% NH₄⁺
- Solución 3: Contenido en cloro del 40% respecto del nitrógeno total, con 5% NH₄⁺
- Solución 4: Sin iones cloruro y con un 20% del nitrógeno total aportado de forma amónica.
- Solución 5: Solución con un 20% de cloro y un 20 % del nitrógeno total aportado de forma amónica.
- Solución 6: Solución con un 40% de cloro y un 20 % del nitrógeno total aportado de forma amónica.

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

Solución	NO_3^-	H_2PO_4^-	SO_4^{2-}	HCO_3^-	Cl^-	NH_4^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	CE ($\text{ds}\cdot\text{m}^{-1}$)
1	12.00	1.20	4.90	0.00	0.00	0.60	7.90	4.70	4.90	0.00	1.51
2	12.00	1.20	5.60	0.50	2.52	0.60	7.00	6.50	6.69	1.03	1.82
3	12.00	1.20	5.60	0.50	5.04	0.60	7.52	7.41	7.78	1.03	2.03
4	10.08	1.20	4.90	0.00	0.00	2.52	6.10	3.70	3.86	0.00	1.35
5	10.08	1.20	5.60	0.50	2.52	2.52	4.40	6.50	5.45	1.03	1.66
6	10.08	1.20	5.60	0.50	5.04	2.52	6.92	6.50	5.45	1.03	1.87

El aporte de las soluciones nutritivas se realizó mediante fertirrigación, con un sistema de alta frecuencia, empleando dos emisores por maceta, 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. Semanalmente se midió el pH y la CE del drenaje.

Diseño del experimento

Producción (42 ddt)

Se estableció un diseño de bloques al azar con 3 concentraciones de Cl^- , y 2 concentraciones de amonio con 3 repeticiones de 4 plantas cada una, para un total de 18 unidades de repetición y 72 plantas.

Evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad

Días después del trasplante (ddt).

-0 ddt

El día de trasplante, se evaluaron distintos parámetros fisiológicos y de calidad de la escarola (contenido de clorofilas, nitratos, nitrógeno, fósforo, color de las hojas y tasa de crecimiento). Para ello se tomaron plantas del semillero, completándose 3 repeticiones de 8 plantas cada una, para un total de 24 plantas.

-14, 28, 42 ddt.

En estas fechas de muestreo se tomaron plantas del invernadero para seguir la evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad de la escarola (contenido de clorofilas, nitratos, nitrógeno, fósforo, color de las hojas y tasa de crecimiento). Se estableció un diseño factorial completamente aleatorizado con 3 concentraciones de Cl^- , y 2 concentraciones de amonio

(soluciones nutritivas) x 3 fechas, con 3 repeticiones de 2 plantas cada una, para un total de 54 unidades de repetición y 108 plantas.

-7, 21, 35 ddt.

En estas fechas de muestreo se tomaron plantas para seguir la evolución de la tasa de crecimiento. Estableciendo un diseño factorial completamente aleatorizado con 3 concentraciones de Cl⁻, y 2 concentraciones de amonio (soluciones nutritivas) x 3 fechas, con 3 repeticiones de 1 planta cada una, para un total de 54 unidades de repetición y 54 plantas.

2.2. Parámetros estudiados y metodología

Cuadro 2.3. Fechas de muestreo (días después del trasplante)

DDT	Fecha medida
0	18-01-2015
7	25-01-2015
14	1-02-2015
21	8-02-2016
28	15-02-2016
35	22-02-2016
42	29-02-2016

2.2.1. Evolución de distintos parámetros fisiológicos y de calidad.

2.2.1.1. Medida de la concentración de clorofilas.

El día del trasplante se tomaron 8 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, realizándose las mismas medidas en el número de hojas sanas necesarias para alcanzar los 20 g, (empezando a tomarlas desde el exterior) necesarios para la determinación de nitratos.

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 tomaron 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.

A partir de las coordenadas rectangulares L, a* y b* se estiman las coordenadas cilíndricas Tono Hue, Cromo, empleando las siguientes formulas.

$$\text{Hue} = 180 + \text{arc tg } \frac{b}{a} \text{ cuando } a \leq 0 ; b \geq 0$$

$$\text{Croma} = \sqrt{a^2 + b^2}$$

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

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.

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

- g) % Líquido en el triturado = 100 – (% materia seca del triturado) (f)

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

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.
- 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.

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

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

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

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

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

La mezcla ácida se obtuvo añadiendo, por cada 50 mL de H_3PO_4 concentrado ($d=1.75 \text{ g cm}^{-3}$), 1000 mL de H_2SO_4 concentrado ($d=1.82\text{-}1.84 \text{ g cm}^{-3}$). 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 H_3BO_3 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 H_2O_2 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 enfriasen.

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. Valoración HCl 0,05 N anotando el volumen utilizado 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.
- 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 (A.O.A.C. 1990).

Se tomaron muestras exentas de contaminaciones del material seco ya pesado, y se trituraron con el molinillo de aspas metálicas hasta reducirlas 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 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, 1 mL 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 la 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.

Las plantas que presentaban un grado de incidencia de 0 o 1 se consideraban comerciales, mientras que las de grado 2 o 3 no comerciales. Se determinó entonces el porcentaje de las plantas no comerciales (para el “tipburn”), así como los índices medio (IMTB) y ponderado (IPTB) de “tipburn”, que se calcularon con las siguientes expresiones:

$$IMTB = 1x(n^{\circ}plant. grado1/u.r.) + 2x(n^{\circ}plant. grado2/u.r.) + 3x(n^{\circ}plant. grado3/u.r.)$$

$$IPTB = \frac{IMTB}{n^{\circ} plant. grado 1/u.r. + n^{\circ}plant. grado 2/u.r + n^{\circ}plant. grado 3/u.r}$$

El IMTB, sirve para estimar la incidencia de “tipburn” por cada u.r. Como se disponen de 5 plantas por u.r. el valor máximo para este índice es de 15.

El IPTB, permite observar la incidencia media de la fisiopatía en cada planta. Según el criterio empleado para evaluar la afección de “tipburn”, el valor máximo de este índice es 3.

Evaluación de la subida a flor prematura.

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:

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

Para calcular el porcentaje de plantas subidas a flor, se consideraron afectadas por la fisiopatía 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.

La tasa de crecimiento, para cada solución nutritiva, se determinó empleando el peso seco (g) de los diferentes días de medida (0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 ddt) y de cada solución nutritiva (0, 20, 40, 0N, 20N, 40N).

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

Ps: peso seco diferentes días de medida

ddt: días después del trasplante

2.2.4. Determinación del pH y CE

Las medidas de pH y CE se realizaron semanalmente con el phmetro y conductímetro; Modelo SevenEasy Metter Toledo.

2.2.5. 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 ($p \leq 0.05$). Para el análisis de los porcentajes (% de plantas comerciales, afectadas por “tipburn”, esbozo floral) se realizó una transformación de los datos angular a arcoseno, determinando el ángulo cuyo seno es la raíz cuadrada de la proporción (porcentaje (%)/100). Para el cálculo de la matriz de correlaciones se realizó un modelo de regresión simple entre los dos parámetros.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados

Como se observa en la Tabla 1, no hubo diferencias estadísticamente significativas (e.s.) para ninguno de los parámetros estudiados, si bien el porcentaje de plantas con “tipburn” fue mayor para las soluciones CI20 y A5; el del peso medio para la solución CI40 y de la incursión del esbozo floral para la solución CI20.

Tabla 1: Valores medios del número de plantas comerciales (%), peso medio (g), porcentaje de plantas con tipburn (%), IMTP, IPTB e incursión del esbozo floral (%); porcentaje de la suma de cuadrados del análisis de la varianza.

	Producción comercial		Producción no comercial	Incidencia de fisiopatías		
	Plantas Comerciales (%)	Peso medio comercial (g)	Porcentaje plantas con “tipburn” (%)	IMTB	IPTB	Incursión esbozo floral (%)
Cloro						
CI0	100.0 -	219.8 -	0.0 -	0.8 -	1.0 -	2.5 -
CI20	96.7 -	233.5 -	4.2 -	1.0 -	1.2 -	3.8 -
CI40	100.0 -	303.8 -	0.0 -	0.3 -	1.1 -	2.6 -
Amonio						
A5	97.8 -	275.5 -	2.7 -	0.7 -	1.1 -	2.6 -
A20	100.0 -	229.3 -	0.0 -	0.7 -	1.0 -	3.3 -
Resumen ANOVA						
Factor						
Cloro (Cl)	11.8 ^{ns}	12.0 ^{ns}	11.8 ^{ns}	9.3 ^{ns}	-	20.1 ^{ns}
Amonio (A)	5.9 ^{ns}	4.8 ^{ns}	8.3 ^{ns}	0.4 ^{ns}	-	7.0 ^{ns}
Interacción						
Cl x A	11.8 ^{ns}	8.4 ^{ns}	16.7 ^{ns}	30.6 ^{ns}	-	22.1 ^{ns}
Residual	70.6	74.7	70.6	59.8	-	50.7
Desv. estándar	0.1	112.0	0.7	0.9	-	0.2

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$. ** y * indican efectos e.s. con una $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.05$, respectivamente. ns, indican que no existen diferencias e.s. La desviación estándar está expresada como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

CI0: 0% de cloro en la solución nutritiva

CI20: 20% de cloro en la solución nutritiva

CI40: 40% de cloro en la solución nutritiva

A5: 5% de amonio en la solución nutritiva

A20: 20 % de amonio en la solución nutritiva

Tabla 2: Valores medios de los datos obtenidos con el colorímetro. Los parámetros representados corresponden a la escala CIELa*b* y son L, C (croma) y H° (ángulo Hue); porcentaje de la suma de cuadrados del análisis de la varianza.

	SPAD	L	C	H°
Cloro				
Cl0	27.85	52.49	30.61 a	125.63 b
Cl20	27.53	52.73	29.81 a	126.10 b
Cl40	27.72	52.31	28.61 b	126.85 a
DDT				
0	20.40 c	56.41 a	37.24 a	121.97 c
14	29.03 b	51.95 b	25.91 c	128.44 a
28	32.74 a	49.57 c	25.73 c	128.41 a
42	28.63 b	52.12 b	29.83 b	125.95 b
A				
A5	27.40	52.66	31.34 a	125.23 b
A20	27.99	52.36	28.02 b	127.16 a
Resumen ANOVA				
Factor				
Cloro (Cl)	0.07 ^{ns}	0.36 ^{ns}	2.39**	2.60**
L	0.03 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.30 ^{ns}
Q	0.13 ^{ns}	0.21 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.00 ^{ns}
DDT	84.12**	75.91**	77.04**	71.86**
A (A)	0.37 ^{ns}	0.28 ^{ns}	9.77**	9.55**
Interacción				
Cloro x DDT	0.72 ^{ns}	0.47 ^{ns}	2.00**	1.78 ^{ns}
Cloro x A	0.04 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.46 ^{ns}
DDT x A	0.68 ^{ns}	0.65 ^{ns}	3.68**	4.69**
Cloro x A x DDT	1.43 ^{ns}	2.40 ^{ns}	0.40 ^{ns}	1.36 ^{ns}
Residual	12.57	19.87	4.67	7.69
Desv. estándar	2.13	1.55	1.40	1.06

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$. ** y * indican efectos e.s. con una $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.05$, respectivamente. ns, indican que no existen diferencias e.s. La desviación estándar está expresada como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Cl0: 0% de cloro en la solución nutritiva

Cl20: 20% de cloro en la solución nutritiva

Cl40: 40% de cloro en la solución nutritiva

A5: 5% de amonio en la solución nutritiva

A20: 20 % de amonio en la solución nutritiva

DDT: Días después del trasplante.

Como se observa en la Tabla 2, el parámetro L (luminosidad), no presentó diferencias e.s. para los factores cloro y amonio, sin embargo sí que se observaron diferencias e.s. en el factor DDT (Días Después del Trasplante), siendo su valor más alto el día de trasplante, seguido por los días 14 y 42 y el valor más bajo a los 28 días ($p \leq 0.05$). En lo que se refiere al SPAD, no se observaron diferencias e.s. en los factores cloro y amonio, sin embargo sí se encontraron diferencias e.s. para el factor DDT, siendo su valor más el día 28, seguido por los días 14 y 42 y

el valor más bajo el día de trasplante ($p \leq 0.05$). Los parámetros C (croma) y H (ángulo Hue) presentaron diferencias e.s. para los tres factores estudiados ($p \leq 0.05$; $p \leq 0.05$). Para el parámetro C, los valores mayores correspondieron a las soluciones CI0 y CI20 ($p \leq 0.05$). En cuanto a los DDT el valor más alto se dio el día de trasplante, seguido por los 42 ddt, siendo los valores más bajos para los días 14 y 28 ($p \leq 0.05$). En cuanto al amonio encontramos diferencias e.s. entre las soluciones, siendo A5 la de mayor valor ($p \leq 0.05$). Para el parámetro H el valor más alto se alcanzó con la solución CI40, con diferencias e.s. respecto de las otras dos soluciones, que no difirieron entre sí ($p \leq 0.05$). En lo que respecta al factor DDT, los días 14 y 28 dieron lugar a diferencias e.s. respecto a los 42 ddt, que también presentó con valor más alto que el obtenido en el trasplante ($p \leq 0.05$). En cuanto al amonio encontramos diferencias e.s. entre las soluciones, siendo A20 la de mayor valor ($p \leq 0.05$).

Se encontró una interacción Cloro x DDT (Figura 1) para el parámetro C ($p \leq 0.01$). Para el parámetro C no hubo diferencias e.s. el día de trasplante ($p \leq 0.05$). El día 14 el valor de la solución CI0 fue mayor que las otras dos soluciones con diferencias e.s., no difiriendo entre si las restantes. Para el día 28 hubo diferencias e.s. entre las tres soluciones, siendo la de mayor valor la solución CI0 y la de menor valor la de CI40. Se encontraron interacciones A x DDT (Figuras 2 y 3) para C y H ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.01$). Tanto para el parámetro C como el H no hubo diferencias e.s. el día de trasplante ($p \leq 0.05$).

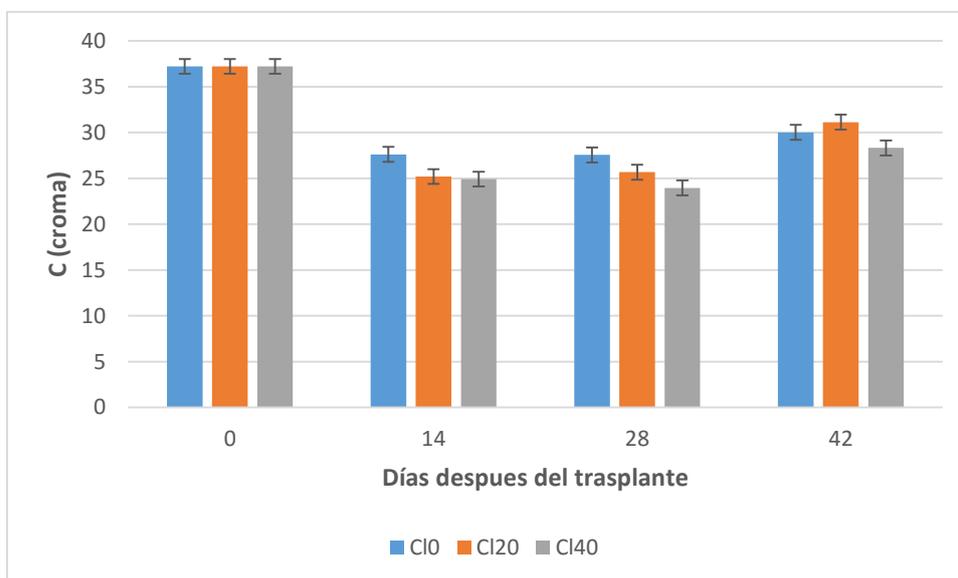


Figura 1. Valores del parámetro C correspondientes a la interacción entre los factores Cloro y DDT. Las barras verticales corresponden al valor del intervalo LSD ($p \leq 0.05$).

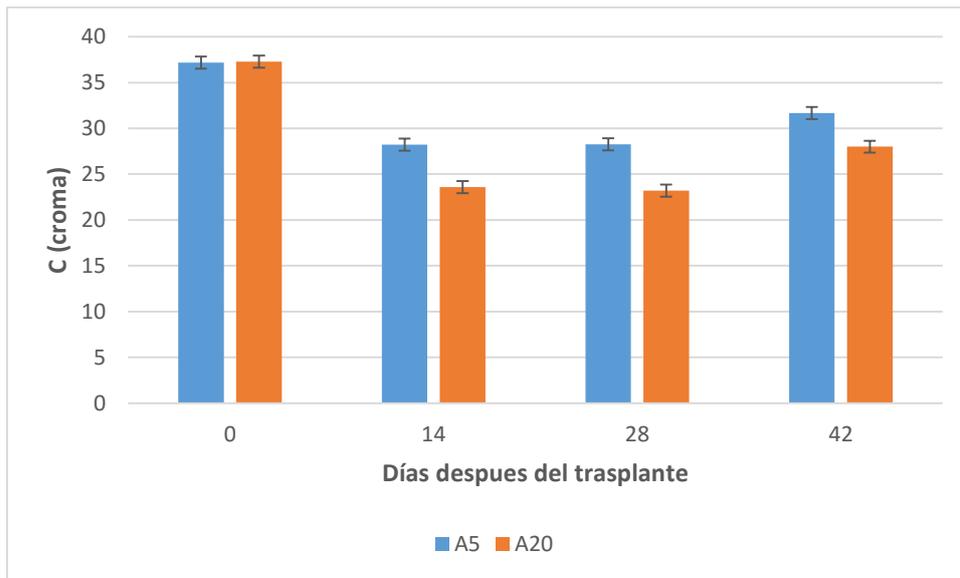


Figura 2. Valores del parámetro C correspondientes a la interacción entre los factores Amonio y DDT. Las barras verticales corresponden al valor del intervalo LSD ($p \leq 0.05$).

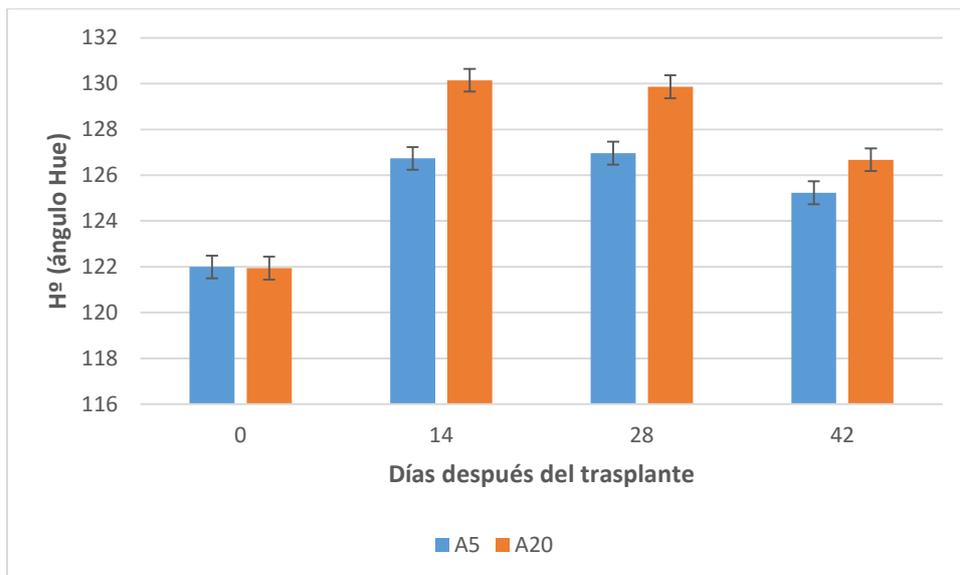


Figura 3. Valores del parámetro H° correspondientes a la interacción entre los factores Amonio y DDT. Las barras verticales corresponden al valor del intervalo LSD ($p \leq 0.05$).

Tabla 3: Valores medios del contenido en nitrógeno (%), acumulación de nitratos ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de materia fresca) y contenido en fósforo (%); porcentaje de la suma de cuadrados del análisis de la varianza.

	Nitrógeno (%)	Nitratos ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de m.f.)	Fósforo (%)
Cloro			
0	3.23	3318.40 a	4.36
20	3.29	2979.20 b	4.43
40	3.34	2644.20 c	4.25
DDT			
0	2.11 c	3951.51 a	4.76 a
14	4.01 a	2161.43 c	4.50 a
28	3.70 ab	2976.64 b	4.43 a
42	3.23 b	2832.88 b	3.70 b
A			
A5	3.31	3069.50	4.50
A20	3.26	2891.70	4.20
Resumen ANOVA			
Factor			
Cloro (Cl)	0.67 ^{ns}	10.64**	1.08 ^{ns}
L	0.01 ^{ns}	1.33*	0.00 ^{ns}
Q	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.00 ^{ns}
DDT	44.22**	57.41**	28.96**
A (A)	0.27 ^{ns}	1.11 ^{ns}	4.16 ^{ns}
Interacción			
Cloro x DDT	1.75 ^{ns}	9.14**	3.09 ^{ns}
Cloro x A	1.06 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.47 ^{ns}
DDT x A	4.58 ^{ns}	0.87 ^{ns}	1.60 ^{ns}
Cloro x A x DDT	10.82 ^{ns}	1.11 ^{ns}	2.32 ^{ns}
Residual	36.62	19.70	58.32
Desv. estándar	1.31	458.73	0.69

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$. ** y * indican efectos e.s con una $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.05$, respectivamente. ns, indican que no existen diferencias e.s. La desviación estándar está expresada como la raíz cuadrada del cuadrado medio residual.

Cl0: 0% de cloro en la solución nutritiva

Cl20: 20% de cloro en la solución nutritiva

Cl40: 40% de cloro en la solución nutritiva

A5: 5% de amonio en la solución nutritiva

A20: 20 % de amonio en la solución nutritiva

DDT: Días después del trasplante.

Como se observa en la Tabla 3, hubo diferencias e.s. en la acumulación de nitratos para los factores cloro y DDT ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.01$), pero no la hubo en el factor amonio. Para el cloro se constataron diferencias e.s. entre las tres soluciones ($p \leq 0.05$), obteniéndose mayor acumulación con la solución Cl0 y la menor con la solución Cl40, observándose un efecto lineal del cloro en

la acumulación de nitratos, de manera que al aumentar el porcentaje de cloro en la solución nutritiva, se produjo una disminución de los nitratos acumulados. En cuanto al factor DDT se encontró una mayor acumulación el día de trasplante, seguido por los días 28 y 42, que también acumularon más nitratos que el día 14, con diferencias e.s. ($p \leq 0.05$). Para el porcentaje de nitrógeno solo se observaron diferencias e.s. para el factor DDT, para el que se encontró la menor acumulación el día de trasplante, con diferencia e.s., respecto a los días 14, 28 y 42 entre las que no hubo diferencias e.s. De la misma forma ocurrió en el caso del fósforo, en el que solamente se hallaron diferencias e.s. para el factor DDT, acumulándose los días 0, 14 y 28 más fósforo que a los 42 ddt ($p \leq 0.05$).

Se encontró una interacción Cloro x DDT (Figura 4) para los nitratos ($p \leq 0.01$), de manera que no hubo diferencias e.s. entre soluciones ni el día de trasplante ni el día 14 ($p \leq 0.05$). Para el día 28 no hubo diferencias e.s. entre las soluciones CI20 y CI40, alcanzando un valor más bajo que CI0. Para el día 42 se observó que las soluciones CI0 y CI20, no presentaron diferencias e.s. entre ambas, mostrando un valor más alto que la solución CI40, con diferencias e.s. ($p \leq 0.05$). De la misma interacción se observó que para la solución CI0 no hubo diferencias e.s. entre los días 0 y 28. En cuanto a la solución CI40 no se hallaron diferencias e.s. para los días 14, 28 y 42.

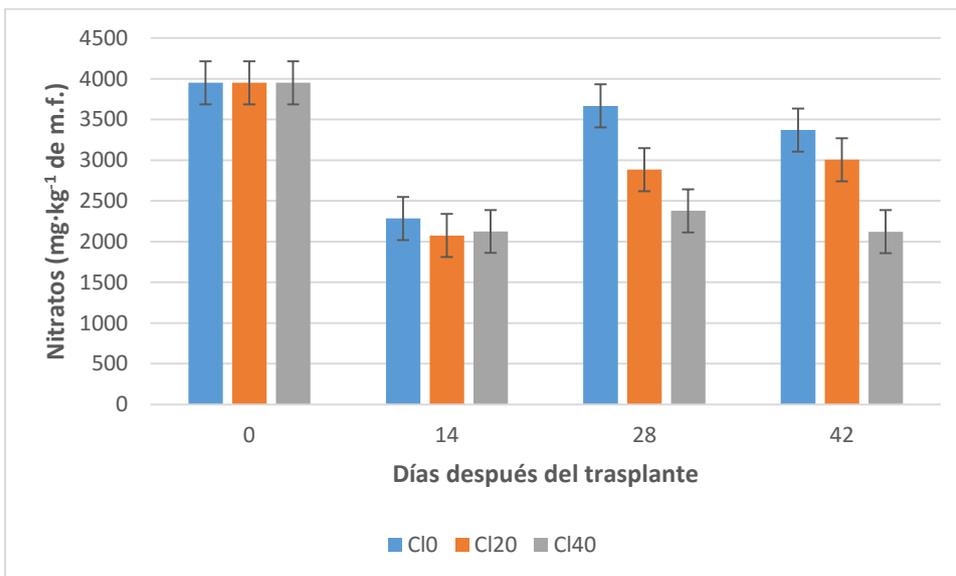


Figura 4. Valores del parámetro Nitratos correspondientes a la interacción entre los factores Cloro y DDT. Las barras verticales corresponden al valor del intervalo LSD ($p \leq 0.05$).

Tabla 4. Matriz de correlación entre todos parámetros estudiados.

	C	SPAD	Nitratos	% Nitrógeno
Hº	-0.9703**	0.8527**	-0.6597**	0.6992**
C		-0.8459**	0.6950**	-0.7569**
SPAD			-0.5096**	0.7074**
Nitratos				-0.6885**

** : Significativo ($p \leq 0.01$)

El parámetro SPAD (Tabla 4) presentó una correlación e.s. con los parámetros de color Hº y C, con un alto coeficiente de correlación, con Hº la correlación fue positiva, por lo que a medida que el valor SPAD era mayor, el valor de Hº aumentó; en el caso del parámetro C la correlación fue negativa, es decir, el aumento del valor SPAD, provocó que el valor de este parámetro fuera menor.

La cantidad de nitratos (Tabla 4) presentó una correlación e.s. con los parámetros de color Hº, C y SPAD, con altos coeficientes de correlación para el primero (negativo) y el segundo (positivo), el coeficiente de correlación con el SPAD fue más bajo

El porcentaje de nitrógeno (Tabla 4) presentó correlaciones e.s. con los parámetros indicadores de color, Hº y C, con el SPAD y los nitratos, con elevados coeficientes de correlación, positivo para el primero y el tercero y negativo para el segundo y el cuarto.

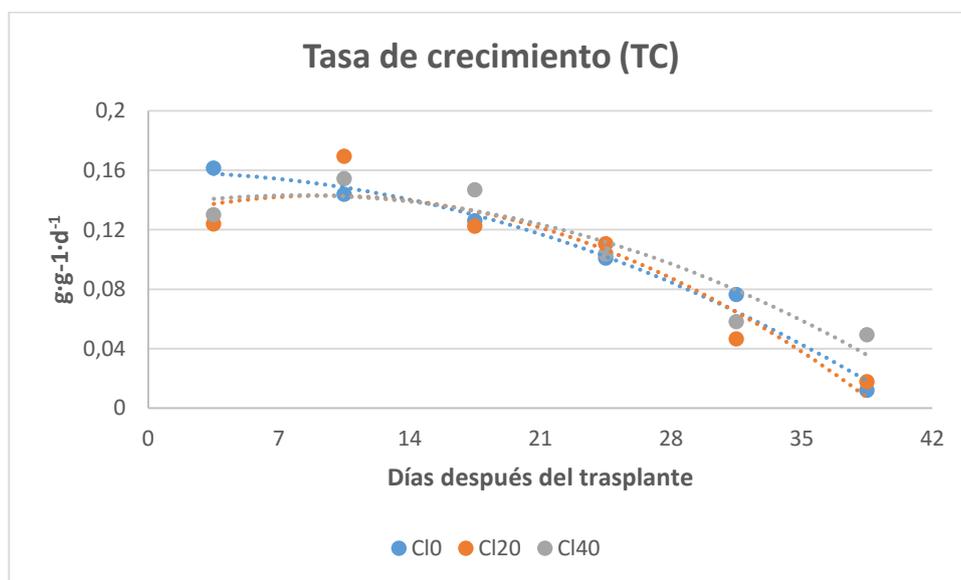


Figura 5. Las curvas representan la tendencia de la tasa de crecimiento (%) según las distintas concentraciones de cloruro en las soluciones nutritivas a lo largo de los días.

Cl0: ($r^2 = 98,4346^{**}$) $TC = 0,157646 + 0,000670265 \cdot DDT - 0,0000949291 \cdot DDT^2$.

Cl20: ($r^2 = 90,7452^*$) $TC = 0,116268 + 0,00414203 \cdot DDT - 0,000160475 \cdot DDT^2$.

Cl40: ($r^2 = 88,4974^*$) $TC = 0,127867 + 0,0026608 \cdot DDT - 0,000115575 \cdot DDT^2$.

** : Significativo ($p \leq 0.01$)

* : Significativo ($p \leq 0.05$)

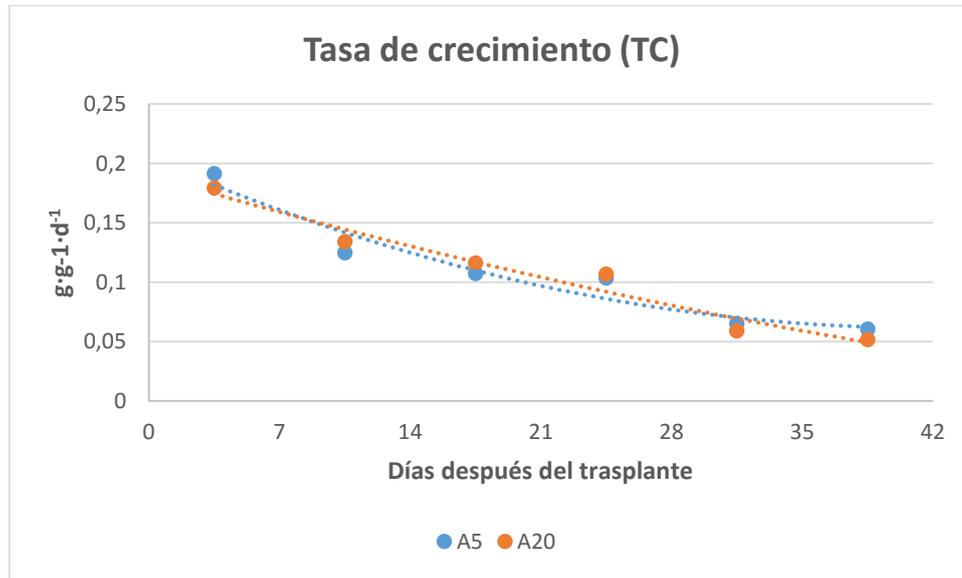


Figura 6. Las curvas representan la tendencia de la tasa de crecimiento (%) según las distintas concentraciones de amonio en las soluciones nutritivas a lo largo de los días.

A5: ($r^2=93,5468^*$) TC: $0,229996-0,00744218 \cdot \text{DDT} + 0,0000821847 \cdot \text{DDT}^2$.

A20: ($r^2=95,9696^{**}$) TC = $0,206799-0,0048072 \cdot \text{DDT} + 0,0000252642 \cdot \text{DDT}^2$

** : Significativo ($p \leq 0.01$)

* : Significativo ($p \leq 0.05$)

En la figuras 5 y 6 se observa como la tasa de crecimiento disminuyó a lo largo del ciclo de cultivo, tanto en las plantas regadas con diferentes concentraciones de cloruro, como en las regadas con diferentes concentraciones de amonio.

3.2 Discusión de los resultados

En estudios realizados en lechuga se observó que la aplicación de nitrógeno en forma amoniacal incrementó la incidencia de “tipburn” más que la aplicación en forma nítrica (Saure, 1998). Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente experimento en el que la variación de la ratio $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ no influyó en la incidencia de “tipburn”, lo que pudo estar causado por una presencia del catión, por debajo de la concentración considerada perjudicial (30% del total de nitrógeno) (Savvas *et al.*, 2006). El alto valor de la suma de cuadrados residual indica que hay otros factores no contemplados en el estudio que afectan en mayor medida a este parámetro; en este sentido, en trabajos realizados en escarola se observó una elevada influencia de las condiciones ambientales en la incidencia de fisiopatías y producción comercial (Torres *et al.*, 2012a, 2012b)

En ensayos con escarola, el empleo de valores crecientes de la ratio $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ en la solución nutritiva supuso una disminución del peso fresco de la planta (Santamaría *et al.*, 1999a); este efecto ha podido observarse en el presente estudio de una manera no tan evidente debido a que las ratios empleadas $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$ fueron más bajas que en el estudio realizado por (Santamaría *et al.*, 1999a).

En el presente experimento al aumentar el contenido de cloruro en la solución nutritiva, así como un mayor aporte de nitrógeno en forma amoniacal, no supusieron una variación de los valores SPAD (contenido de clorofilas). 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 un 25%. Con proporciones más altas, los valores SPAD disminuyeron (contenido en clorofilas).

Los datos obtenidos han evidenciado que existe una alta correlación entre el parámetro H° (hue angle) y las medidas SPAD, por lo que una coloración verde más intenso lleva asociada una mayor concentración de clorofilas. Esta correlación también la muestra León *et al.* (2007) en sus estudios ($r=0,92^*$) en lechuga.

El parámetro H° (hue angle) presentó valores más altos (correspondientes a la zona del verde intenso) cuando el porcentaje de amonio y la concentración de cloruros en la solución eran mayores. Por lo comentado en el párrafo anterior se deduciría que las aplicaciones más elevadas de amonio y cloruros produjeron un aumento en la concentración de clorofilas.

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 and Elia, 1997) 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. La falta de diferencias en el presente experimento pudo estar provocada por el empleo de una menor proporción de amonio que en los ensayos referidos. Además, el incremento de amonio no se llevó a cabo durante todo el ciclo, produciéndose a partir de los 21 días después del trasplante, es lo que pudo repercutir en la acumulación de los nitratos.

El incremento del contenido de cloruros ($5.04 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) en la solución nutritiva supuso un descenso del 20.3% de la acumulación de nitratos en las hojas, constatándose un mayor efecto cuanto más elevada fue la concentración de cloruros ($40\% > 20\% > 0$). Van der Boon *et al.*, (1988), en estudios con lechuga, obtuvo una menor concentración de nitratos al aumentar el porcentaje de cloruros en la solución nutritiva, lo que podría estar asociado a que el aporte de

ciertos iones, que como los cloruros pueden desempeñar una función de regulación osmótica, son capaces de suplir a los nitratos en la vacuola, lo que podría disminuir el contenido de los mismos.

La utilización de amonio en la solución nutritiva conlleva una acidificación del medio, condición que resulta más favorable 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 más bajos y las concentraciones más elevadas se aportaron a partir de los 21 días después del trasplante, no constatándose la esperada acidificación del medio (Figura 7) ni la mayor absorción de fósforo con las soluciones más ricas en amonio.

La elevada correlación entre porcentaje de nitrógeno y las medidas SPAD obtenidas en este experimento fue observada anteriormente en cultivos como la escarola (Carrión *et al.*, 2011), en las hojas bandera de maíz (López-Bellido *et al.*, 2004), en tomate (Rodríguez *et al.*, 1998), y en uva (Li *et al.*, 1998), debido a que el nitrógeno es componente de las clorofilas (Chapman and Barreto, 1997). Esta correlación permitiría emplear dicho medidor para estimar el contenido de nitrógeno en las hojas de manera indirecta y no destructiva. Sin embargo, otros estudios en escarola (Suárez-Rey *et al.*, 2012) no encontraron una correlación e.s. entre las medias SPAD y el porcentaje de nitrógeno.

Se encontró una alta correlación e.s. entre los parámetros de color C (croma) y H° (hue angle) y el contenido de nitratos ($r=0,6950^{**}$ y $r=0,6597^{**}$ respectivamente). Esta misma correlación la encontró Tuncay (2011) en rúcula y perejil, con ($r=0,589^{**}$ y $r=0,881^{**}$ respectivamente), lo que permitiría establecer estas medidas como un método fiable para determinar la concentración de nitratos. La correlación entre las medidas SPAD y el contenido de nitratos no fue suficientemente elevada para considerar los medidores de clorofila como un instrumento adecuado en la determinación indirecta de nitratos, corroborando los resultados obtenidos en escarola por Carrión *et al.*, (2011). Sin embargo, en ensayos llevados a cabo con espinaca (Liu *et al.*, 2006) y acelga (Papasavvas *et al.*, 2008) se constató una elevada correlación entre las medidas SPAD y el contenido de nitratos, lo que permitiría emplear este método para llevar a cabo un control de la fertilización de los cultivos.

La alta correlación presentada entre la acumulación de nitratos y el porcentaje de nitrógeno también fue obtenida por Liu *et al.* (2006) en cultivo de espinaca.

Las distintas soluciones empleadas no parecieron ejercer una influencia significativa en la tasa de crecimiento de las plantas.

4. CONCLUSIONES:

- El rango de concentraciones de cloruro y amonio en las soluciones nutritivas estudiadas fue óptimo y permitió alcanzar una producción comercial significativa. La concentración de nitratos en las hojas de escarola fue inferior a los valores máximos establecidos por la UE para estas fechas (<5000 mg NO₃ kg⁻¹).
- Las concentraciones de cloruro y amonio en las soluciones nutritivas no influyeron significativamente en el peso medio de las piezas comerciales ni el porcentaje de plantas afectadas por “tipburn”.
- La acumulación de nitratos en las hojas de escarola disminuyó significativamente al aumentar la concentración de cloruro, (0%-20%-40%) en la solución nutritiva. Sin embargo, un aumento de la concentración de amonio en la solución nutritiva no llevó asociado una reducción de la concentración de nitratos en las hojas. La concentración de estos iones en la solución nutritiva no afectó a la concentración de nitrógeno y fósforo total en las hojas de la planta.
- Los parámetros de color estudiados, L, H° y C, obtenidos a través de la escala CIEL*a*b, se encuentran relacionados significativamente con la acumulación de nitratos en las hojas de escarola. Además, estos parámetros podrían utilizarse como indicadores para estimar el porcentaje de nitrógeno total en las hojas de escarola.
- Se han obtenido correlaciones positivas entre la estimación del contenido de clorofilas (SPAD) y el parámetro de color H°.

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.

Andreu J., Betrán J., Delgado I., Espada J.L., Gil M., Gutiérrez M., Iguácel F., Isla R., Muñoz F., Orús F., Pérez M., Quílez D., Sin E., Yagüe M.R. 2006. Cap. 2. Revisión de la fertilización nitrogenada Fertilización nitrogenada. Edita: Gobierno de Aragón Departamento de Agricultura y Alimentación. pp 23-30

Anjana, S.U. and Iqbal, M. 2007 Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. *Agron. Sustain. Dev.* 27 (2007) 45–57.

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

Burns, I.; Zhang, K.; Turner, M. and Edmondson, R. 2010 Iso-osmotic regulation of nitrate accumulation in lettuce (*Lactuca sativa* L.)

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.

Chapman, S. and Barreto, H. 1997. Using a Chlorophyll Meter to Estimate Specific Leaf Nitrogen of Tropical Maize during Vegetative Growth. *Agron. J.* 89:557-562

Demšar J, Osvald J. 2003. Influence of NO₃⁻ : NH₄⁺ ratio on growth and nitrate accumulation in lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) in an aeroponic system. *Agrochimica*, 47, 112-121.

DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea) 2011. Reglamento (UE) N° 1258/2011 De la comisión de 2 de diciembre de 2011 que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por lo que respecta el contenido máximo de nitratos en los productos alimenticios.

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), 2016. Avances estadísticos de importación y exportación defrutadas y hortalizas. En www.fepex.es

Gonella, M., Serio, F., Santamaria, P., 2002. Factores genéticos e ambientales e contenido de nitrato de los cultivos. Suplemento a *Culturas Protegidas*. Nº12.

Gromaz A. 2013. Comportamiento productivo, fisiopatías y acumulación de nitratos en dos cultivos de espinaca (*Cichorium endivia L.*) bajo distintos sistemas de manejo y ciclos. Tesis 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.

León, A., Viña, S., Frezza, D., Chaves, A. and Chiesa, A. 2007. Estimation of Chlorophyll contents by correlations between SPAD-502 meter and chroma meter in Butthead lettuce. *Communications in soil science and plant analysis*. 38: 2877-2885

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.

Liu, Y. Tong, Y. Zhu, Y-G.Ding, H and Smith, F. 2006. Leaf Chlorophyll Readings as an Indicator for Spinach Yield and Nutritional Quality with Different Nitrogen Fertilizer Applications. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 1207–1217

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.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, alimentación y medioambiente), 2016. Superficies y producciones de cultivos. En www.magrama.gob.es

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

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

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.

Neely, H.; Koenig, R.; Miles, C.; Koenig, T.; Karlsson, M. 2010 Diurnal Fluctuation in Tissue Nitrate Concentration of Field-grown Leafy Greens at Two Latitudes. *HortScience* 45(12):1815–1818.

Pavlou, G; Ehalotis, C; Kavvadias, V. 2007. Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. *Scientia Horticulturae* 111 (2007) 319–325.

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.

Peterson, T.A., Blackmer, T.M., Francis, D.D. 1993. Using a chlorophyll meter to improve N management. Nebguide G93-1171A. University of Nebraska, Lincoln.

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

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)

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

Rodríguez Mendoza, M., Alcántar González, G., Aguilar Santelises, A., Etchevers Barra, J.D., Santizó Rincón, J.A. (1998). Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados. Terra Volumen 6, numero 2.

Sandoval-Villa M., 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.

Santamaria P., Elia A., Gonnella M., Serio F. 1997. Effects of two N levels and two $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratios on endive (*Cichorium endivia* L. var. *crispum* Hegi). I. Growth, yield and water use. Adv. Hort. Sci., 11: 41-46

Santamaria P., Elia A., Serio F., Gonnella M., Parente A. 1999a. Comparison between nitrate and ammonium nutrition in fennel, celery, and swiss chard. Journal of plant nutrition, 22(7), 1091-1106

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

Santamaria, P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. J Sci Food Agric 86:10–17

Saure M.C. 1998. Causes of the tipburn disorder in leaves of vegetables. Scientia Horticulturae, 76, 131-147.

Savvas D, Passam HC, Olympios C, Nasi E, Moustaka E, Mantzos N, Barouchas P. 2006. Effects of ammonium nitrogen on lettuce grown on pumice in a closed hydroponic system. HortScience, 41, 1667-1673.

Shao-ting, D; Yong-song, Z and Xian-yong, L. 2007. Accumulation of Nitrate in Vegetables and Its Possible Implications to Human Health. Agricultural Sciences in China, 6(10): 1246-1255

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.

Torres J.F., San Bautista, A., Pascual-España, B., Bono, Lopez Galarza, S., Pascual-Seva, N., Alagarda, J., Maroto, J.V., 2012a. Influencia de dos soluciones nutritivas sobre los parámetros productivos, fisiopatías y acumulación de nitratos en dos cvs. de escarola (*Cichorium endivia* L.) en distintos ciclos productivos bajo invernadero y manejo en sustrato. Agrícola vergel 358: 230-236

Torres J.F., San Bautista, A., Pascual-España, B., Bono, Lopez Galarza, S., Pascual-Seva, N., Alagarda, J., Maroto, J.V., 2012b. Producción comercial, incidencia de “Tipburn”, floración prematura y acumulación de nitratos en dos cvs. de escarolas (*Cichorium endivia* L.), en cultivo al aire libre y bajo invernadero en tres ciclos diferentes. Agrícola vergel 359: 268-275

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.

Van der Boon, J; Steenhuizen, J.W; Steingröver, E. 1988. Effect of EC, and CL and NH₄ concentration of nutrient solutions on nitrate accumulation in lettuce. Institute for Soil Fertility. Acta Horticulture 222.

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.

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.

ANEJOS

ANEJO FOTOGRÁFICO



Foto 1. Vista general del experimento



Foto 2. Colorímetro



Foto 3. Medidor SPAD



Foto 4. Destilador método Kjeldhal



Foto 5. Reflectómetro medida nitratos

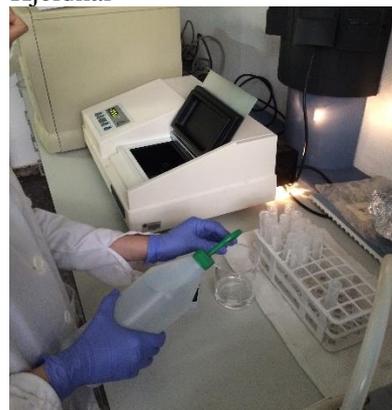


Foto 6. Espectrofotómetro para medidas de fósforo

ANEJO GRÁFICAS

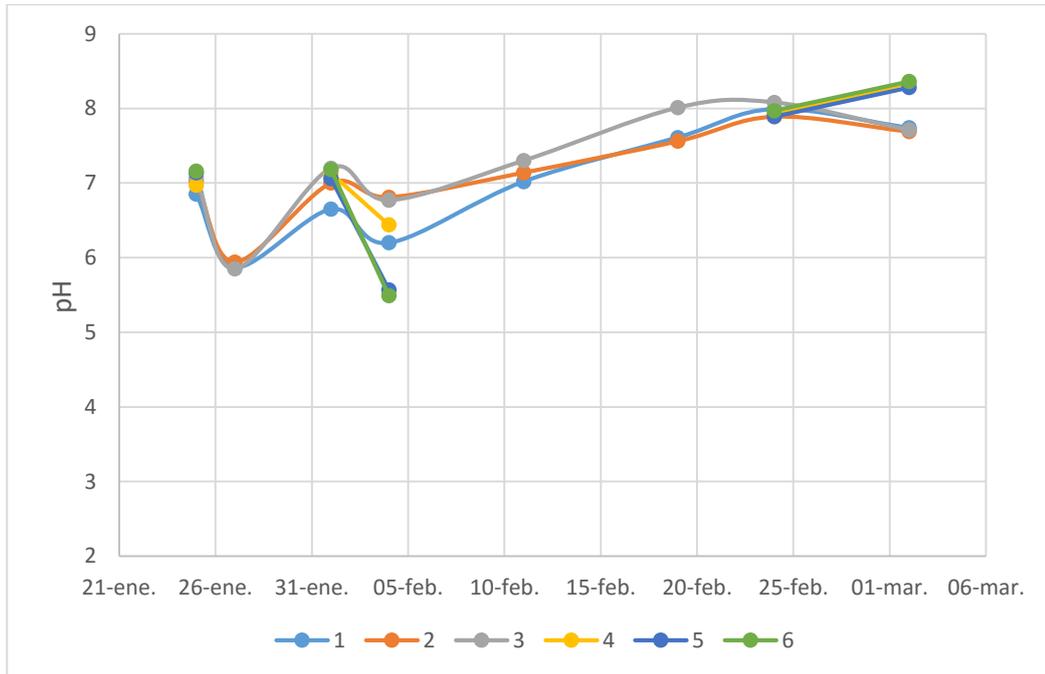


Figura 7. Variación del pH en las distintas soluciones nutritivas a lo largo del ciclo de cultivo.

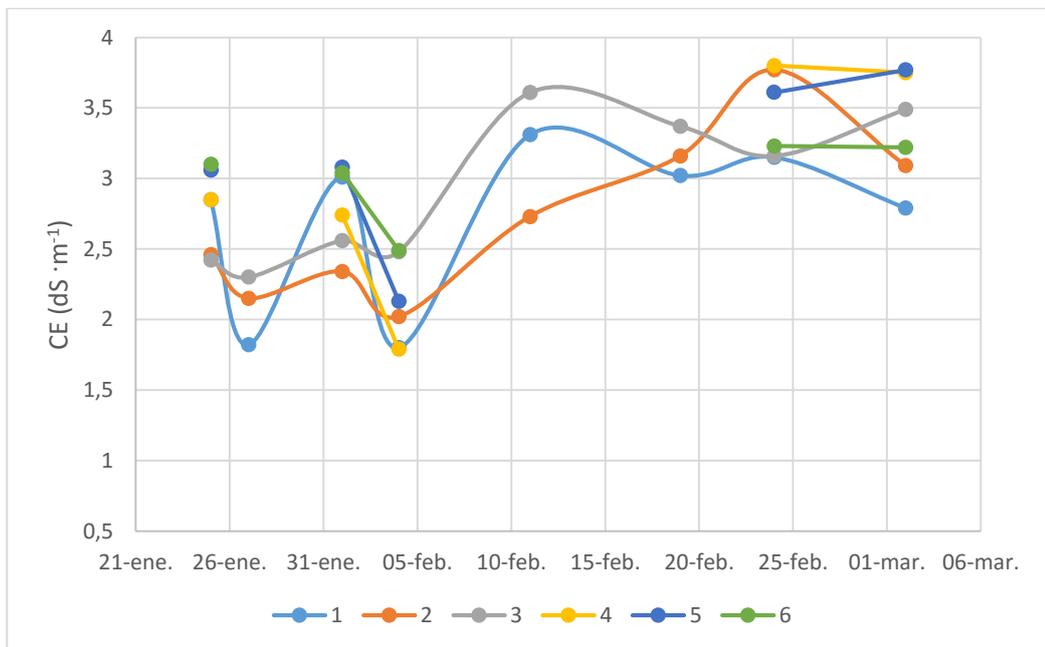


Figura 8. Variación de la CE en las distintas soluciones nutritivas a lo largo del ciclo de cultivo.

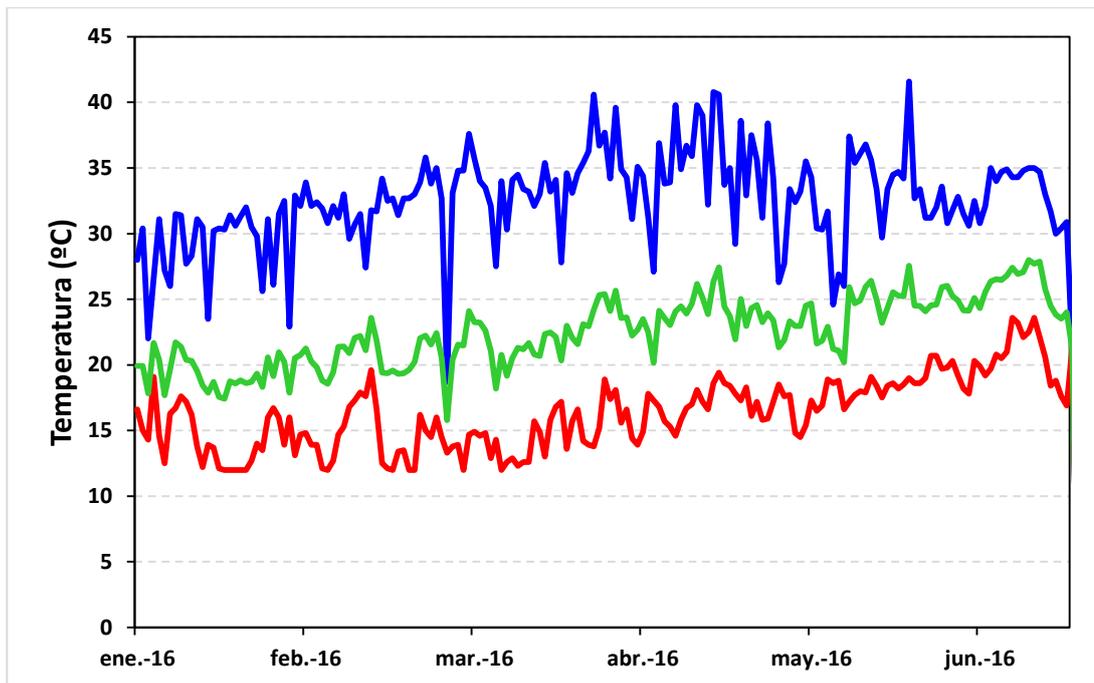


Figura 9. Variación de la temperatura a lo largo del ciclo de cultivo.

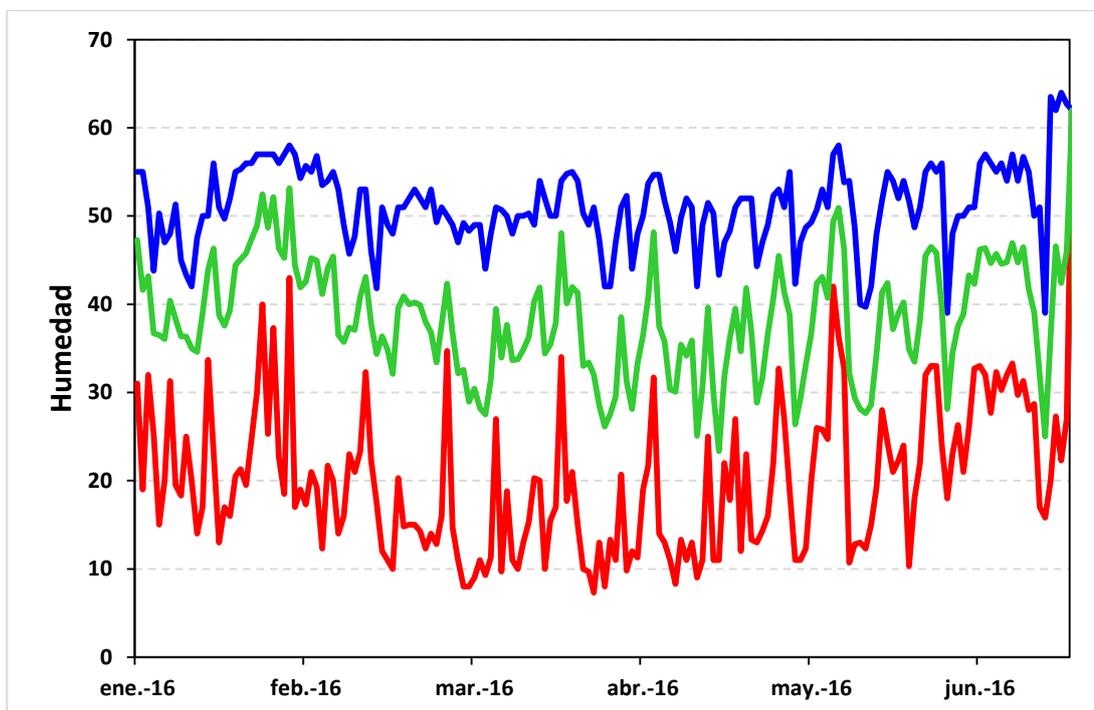


Figura 10. Variación de la humedad a lo largo del ciclo de cultivo.