

ENSAYO PRELIMINAR SOBRE LA UTILIZACIÓN DE UN MEDIDOR PORTÁTIL DE CLOROFILA PARA ESTIMAR EL NITRÓGENO FOLIAR EN ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*)

Fecha de recepción: 27 de septiembre de 2011 • Fecha de aceptación: 15 de noviembre de 2011

PRELIMINARY ASSAY ABOUT THE USE OF A PORTABLE CHLOROPHYLL METER TO QUANTIFY FOLIAR NITROGEN IN OREGANO (*Origanum vulgare L.*)

Luz Andrea Calderón Medellín¹ • Adriana Marcela Bernal Rozo² • María Mercedes Pérez Trujillo^{3,4}

RESUMEN

El nitrógeno es el elemento esencial que las plantas requieren en mayor cantidad para su nutrición, por tanto, una baja disponibilidad en los suelos limita la productividad de los cultivos. Existen diferentes métodos para determinar su concentración en el suelo y el tejido foliar. Se ha comprobado que la cuantificación de clorofila en el tejido foliar tiene relación directa con su contenido de nitrógeno. Por ello, los medidores portátiles de clorofila permiten estimar de manera indirecta, instantánea y sin destrucción de tejidos, el contenido de clorofila y nitrógeno en hojas de diferentes plantas cultivadas. En este trabajo se evaluó de manera preliminar el medidor portátil de clorofila Minolta SPAD[®]-502 como indicador del nitrógeno foliar en orégano vegetativo, por la importancia de éste en el mercado de aromáticas. Se realizó en UMNG (Cajicá, Cundinamarca, 4° 56.705' N, 74°00.704' O, 2580 m.s.n.m). En un primer ensayo con el cultivar Inglés, bajo un DCA se probaron diferentes dosis de N (0, 0.18, 0.36, 0.55 y 0.73 mg-planta⁻¹), empleando urea granulada incorporada al sustrato de plantas en materia. En un segundo ensayo con orégano Griego, se realizaron fertirrigaciones con diferentes concentraciones de N (0, 52.5, 105, 157.5 y 210 ppm), empleando NH₄NO₃. Para cada tratamiento se realizaron lecturas de los valores SPAD sobre hojas expandidas de los tercios superior, medio e inferior de las plantas. El contenido de nitrógeno foliar se determinó por el método de Kjendahl. Se realizaron correlaciones entre las lecturas SPAD y el porcentaje de nitrógeno foliar. Se encontró una relación lineal entre las dos variables, con P=0.0005, r=0.99 y R²=0.99 para el primer ensayo y P=0.001, r=0.8 y R²=0.64 para el segundo ensayo. Se comprobó que el clorofilómetro utilizado es potencialmente confiable para estimar el nitrógeno foliar en plantas de orégano vegetativas.

Palabras clave: Fertilización nitrogenada, orégano griego e inglés, SPAD

- 1 Bióloga, Grupo de Agrobiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada.
- 2 Estudiante de pregrado de Biología Aplicada, Grupo de Agrobiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada.
- 3 Ingeniero Agrónomo cM.Sc., Grupo de Agrobiología, Docente Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada.
- 4 Autor para correspondencia: agrobiologia@unimilitar.edu.co

ABSTRACT

Nitrogen is the essential element plants require a greater amount for nutrition, therefore, a low availability in the soil limits yield crops. There are different methods to determine its concentration in soil and leaf tissue. It has been found that the quantification of chlorophyll in the leaf tissue is directly related to their nitrogen contents. Therefore, portable chlorophyll meters estimate chlorophyll and nitrogen contents in leaves of various cultivated plants, indirectly and without tissue destruction. Minolta SPAD®-502 portable was evaluated as an indicator of foliar nitrogen of oregano under greenhouse conditions. This assay took place at UMNG (Cajicá, Cundinamarca, 4° 56.705' N, 74°00.704' O, 2580 m.a.s.l). In the first step, English cultivar was evaluated under CRD with different nitrogen dosages (0, 0.18, 0.36, 0.55 y 0.73 mg·plant⁻¹), aggregating urea to substrate in pot plants. In the second step, fertirrigation on Greek oregano were made with different nitrogen concentrations (0, 52.5, 105, 157.5 y 210 ppm), using NH₄NO₃. For each treatment SPAD measures were made on expanded leaves for all plant thrids: upper, medium and lower. Foliar nitrogen was established by Kjendahl method. Correlations between SPAD measures and foliar nitrogen were made. A linear relation was found between both variables with P=0.0005, r=0.99 y R²=0.99 for the first step and with P=0.001, r=0.8 y R²=0.64 for the second step. It was proved the chlorophyll meter used is a trusty tool to estimate foliar nitrogen percentage of vegetative stage oregano plants.

Key words: Nitrogen fertilization, English and Greek oregano, SPAD

El nitrógeno es un macroelemento que se encuentra presente en muchos compuestos esenciales en las plantas y es un constituyente de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos, componentes de la pared celular (Salisbury y Ross, 2000; Taiz y Zeiger, 2006). Dado que el nitrógeno es el elemento que éstas requieren en mayor cantidad, su baja disponibilidad en los suelos limita la productividad de la mayor parte de los ecosistemas agrícolas y naturales (Taiz y Zeiger, 2006).

La mayor parte del nitrógeno en el suelo está asociado a la materia orgánica y su liberación es un proceso lento y que pasa por varias etapas. En la mayoría de los casos, si se tiene un suelo pobre en materia orgánica, las concentraciones de nitrógeno son muy bajas y por consiguiente, las plantas cultivadas en este tipo de suelos tendrán un crecimiento limitado. Es por ello que la mayoría de

cultivadores recurren a fertilizantes nitrogenados (Baker y Pillbeam, 2007).

El muestro y seguimiento del nitrógeno en las plantas cultivadas es indispensable para determinar si responden positiva o negativamente a la fertilización y establecer cuándo es necesario realizar aplicaciones de este elemento, con el fin de evitar deficiencias o excesos de nitratos (Argenta *et al.*, 2001; Scharf *et al*, 2006; Varvel *et al.*, 2007). Cuando la aplicación de la fuente de nitrógeno no es sincronizada con la demanda del cultivo, las pérdidas en el sistema suelo-planta son elevadas. Por lo anterior, la aplicación de este elemento basada en las necesidades de la planta es crucial para alcanzar una alta productividad y aumentar la eficiencia en el uso de fertilizantes (Sing *et al.*, 2002).

Las necesidades de nitrógeno en las plantas son determinadas a través de métodos directos e

indirectos, que miden el nitrógeno mineral en el suelo y en las plantas y la respuesta de éstas al fertilizante. En las plantas, los métodos directos incluyen la medición de la concentración de nitratos en los peciolo, el contenido de nitrógeno total de la hoja y la actividad de la nitrato-reductasa (López, 2002). Sin embargo, estos métodos además de ser destructivos, resultan costosos, dispendiosos y tienen la desventaja de tardar varios días para arrojar el resultado, lo que dificulta la toma inmediata de decisiones para corregir posibles problemas en la fertilización (Bronson *et al.*, 2003).

Por lo anterior, se recurre a métodos indirectos mediante los cuales es posible diagnosticar deficiencias de este elemento en forma rápida y sin realizar muestreos destructivos de las plantas. Entre dichos métodos se destacan el uso de tablas de colores, fotografías aéreas, sensores del cultivo en tiempo real, medidores portátiles de clorofila y el uso de modelos basados en la fisiología del cultivo (Blackmer *et al.*, 1996; López, 2002; Scharf y Lory, 2002; Singh *et al.*, 2002; Varvel *et al.*, 2007).

Dentro de los requerimientos primarios para que se dé el proceso de fotosíntesis en las plantas, está la absorción de la radiación por parte de los cloroplastos. Los receptores de esta radiación son precisamente las clorofilas, que tienen una absorción máxima en la luz roja y azul, y otros pigmentos como los carotenos y los xantofilos que absorben la luz azul y la radiación UV. Por lo tanto, la absorción de la radiación depende en gran medida de la concentración de estos pigmentos fotosintéticamente activos (Larcher, 2003).

El contenido de clorofila está influenciado por diversos factores entre los que se incluyen el tipo de material vegetal (híbrido, cultivar, variedad, etc.), el estado de crecimiento y la disponibilidad de nitrógeno en el suelo (Rashid y Voroney, 2005). Debido a que más del 75% del nitrógeno orgánico total se encuentra en los cloroplastos, principalmente en

forma de enzimas, un aporte limitado del nitrógeno afecta la tasa fotosintética debido a la disminución en la síntesis y contenido de clorofila y en la actividad de la Rubisco, según reportan Marschner (1986) y San Clemente y Peña (2008).

Los medidores de clorofila son instrumentos que miden la cantidad de relativa de clorofila en la hoja y generalmente presentan los resultados en valores SPAD (Soil Plant Analysis Development). Particularmente el modelo Minolta SPAD®-502 cuenta con dos LEDs los cuales emiten luz en el haz de la hoja, uno rojo y uno infrarrojo con un pico de longitud de onda de 650 y 940 nm respectivamente. La medición de la clorofila con este instrumento se realiza a partir de la diferencia en la atenuación de la luz a 430 y 730 nm. Para las clorofilas *a* y *b*, el máximo de transmitancia del espectro ocurre a una longitud de onda de 430 nm y en la longitud de onda de 750 nm no ocurre transmitancia, ya que se encuentra en la zona de infrarrojo cercano (Konica Minolta, 2009; López, 2002). El valor SPAD arrojado por el clorofilómetro se fundamenta en que parte de la luz que llega a la hoja es absorbida por la clorofila y la luz reflejada entra en contacto con el fotodiodo de silicón de la celda detectora y es convertida en una señal eléctrica (Krugh *et al.*, 1994). La luz roja absorbida indica la cantidad de clorofila, mientras que la cantidad de luz cercana a la infrarroja sirve como referencia interna para compensar el grosor de la hoja y su contenido de humedad (Schroder *et al.*, 2000). La cantidad de luz captada por la celda es inversamente proporcional a la cantidad utilizada por la clorofila; posteriormente la señal es procesada y la absorbancia de las regiones de longitud de onda roja y cercana a la infrarroja es cuantificada en valores dimensionales desde 0 a 199, medidas que resultan ser proporcionales a la cantidad de clorofila presente en la hoja (Konica Minolta, 2009; Krugh *et al.*, 1994).

Dada la alta relación de los valores estimados a través del clorofilómetro con la concentración de

Dada la alta relación de los valores estimados a través del clorofilómetro con la concentración de nitrógeno en las hojas, esta herramienta se ha convertido en un indicativo del estado nutricional de las plantas para algunas especies

nitrógeno en las hojas, esta herramienta se ha convertido en un indicativo del estado nutricional de las plantas para algunas especies. Adicionalmente, este instrumento ofrece una gran ventaja sobre otros métodos destructivos para la determinación de los niveles del nitrógeno foliar, ya que se puede realizar el seguimiento durante el crecimiento del cultivo de manera rápida, precisa y no destructiva, lo que hace posible la toma oportuna de decisiones sobre el manejo de la fertilización y la realización de correcciones en las dosis aplicadas de forma oportuna para obtener mejores rendimientos del producto cosechado (Novoa y Villagrán, 2002; Singh *et al.*, 2002, Echeverría *et al.*, 2005). Sin embargo, Varvel *et al.* (1997), llama la atención sobre la limitación en el uso del clorofilómetro para la predicción de excesos de nitrógeno, ya que el equipo no arroja lecturas superiores a las detectadas cuando el nivel es óptimo, lo que no hace posible distinguir entre las áreas en campo que presentan niveles adecuados de aquellas en donde el nivel del elemento es excesivo. En contraposición, las deficiencias en nitrógeno son inmediatamente detectadas a través de valores bajos en las lecturas SPAD debido a la baja concentración de clorofila en la planta (Schroder *et al.*, 2000).

Echeverría y Sainz (1998), Novoa y Villagrán (2002), Singh *et al.* (2002), Bronson *et al.* (2003), Rashid y Voroney (2005) y Scharf *et al.* (2006), han demostrado que el clorofilómetro es una herramienta confiable para la determinación de la concentración

de nitrógeno foliar y que es un instrumento de gran precisión para detectar posibles deficiencias de este elemento, especialmente en estados reproductivos avanzados de cultivos de maíz, trigo, arroz y sorgo.

Este tipo de ensayos se han realizado principalmente en las especies de gramíneas mencionadas anteriormente, pero existen algunos estudios en otras especies como tomate (Rodríguez *et al.*, 1998), papa (Giletto *et al.*, 2006), repollo, cebolla y zanahoria, presentando para estos dos últimos un uso limitado (Westerveld *et al.*, 2003). También se ha demostrado el uso de otro tipo de medidores portátiles de clorofila para la predicción del estado nitrogenado en frutales como mandarina, mango, guayaba y vid con el equipo Hydro N-Tester (Shahan *et al.*, 1999).

En hierbas aromáticas de la familia Lamiaceae, se ha recomendado el uso del clorofilómetro como indicador de la cantidad de clorofila y como alternativa a los métodos destructivos. Al respecto, Fenech *et al.* (2009), trabajando con albahaca (*Ocimum basilicum* L.), obtuvieron una relación cuadrática entre el contenido extraíble de la clorofila y las lecturas SPAD. Obtuvieron una correlación del 99.9 % entre las medidas de SPAD halladas a través del clorofilómetro Minolta SPAD®-502 y la clorofila total determinada por los métodos de extracción destructivos, consistentes en una calibración por extracción y análisis en espectrofotómetro.

Por tanto, el objetivo de esta investigación fue experimentar de manera preliminar si existía una

relación entre las lecturas SPAD tomadas con el medidor portátil de clorofila Minolta SPAD®-502 y el contenido de nitrógeno foliar, en orégano (*Origanum vulgare*), una planta aromática, medicinal y condimentaria de la familia Lamiaceae de origen mediterráneo, especie de interés comercial para ser cultivada en Colombia.

Materiales y métodos

La investigación se realizó bajo condiciones de invernadero en el Laboratorio de Horticultura de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Militar Nueva Granada (Cajicá, Cundinamarca). La zona de estudio se ubicó a 4° 56.705' N, 74°00.704' O y a una altura de 2580 m.s.n.m. Las condiciones ambientales del invernadero durante el estudio fueron en promedio: temperatura media, máxima y mínima de 17, 39 y 6 °C y humedad relativa media, máxima y mínima de 68, 93 y 24 %.

La metodología que se empleó consistió en someter plantas jóvenes que estuvieran en estado vegetativo, a diferentes y contrastantes niveles de fertilización nitrogenada, para poder establecer la relación entre el contenido de clorofila estimado a través de las lecturas efectuadas con el medidor Minolta SPAD®-502 y el porcentaje de nitrógeno presente en el tejido foliar. Se realizaron dos ensayos en el que se varió el cultivar, la fuente de nitrógeno, el tipo de fertilización y la dosis de nitrógeno aplicado por planta.

Ensayo No. 1

Se realizó un primer ensayo entre los meses de abril y mayo de 2010. El material vegetal consistió en esquejes enraizados del cultivar Inglés de ocho semanas de edad, que fueron transplantados en macetas plásticas de 250 g de capacidad, con un sustrato comercial compuesto por la mezcla de turba-vermiculita y cascarilla de arroz en proporción 1:1. Las

plantas fueron ubicadas bajo invernadero dentro de cámaras con polisombra negra del 70% y sistema de riego por nebulización. La fuente de nitrógeno utilizada fue urea sólida con un porcentaje de nitrógeno del 46%. Los tratamientos evaluados correspondieron a un testigo sin aplicación de urea y a cuatro dosis incrementales del fertilizante (Tabla 1). Se empleó un DCA; para cada tratamiento se adecuaron 18 unidades experimentales, donde cada una correspondió a una planta de orégano contenida en una maceta.

Tabla 1. Tratamientos de fertilización nitrogenada empleando urea, aplicados al orégano (*Origanum vulgare* 'Inglés') en el ensayo No. 1.

Tratamiento	Cantidad de N (mg · planta ⁻¹)	Cantidad de urea (mg · planta ⁻¹)
T1 (Control)	0	0
T2	82.8	180
T3	165.6	360
T4	253	550
T5	335.8	730

Dos semanas después del trasplante se realizó la aplicación de la urea y dos semanas después de dicha fertilización se realizó el muestreo de todas las unidades experimentales para medir el contenido de clorofila y el porcentaje de nitrógeno foliar. En cuanto al contenido de clorofila, en cada unidad experimental de cada tratamiento se tomaron lecturas con el medidor portátil Minolta SPAD-502®, seleccionando una hoja completamente expandida de cada tercio de la planta. En cada hoja muestreada para cada tercio, se realizaron tres lecturas en puntos diferentes de la misma y con esta información se obtuvo el promedio por planta y luego por tratamiento.

Luego de realizar las lecturas con el clorofilómetro, se retiraron todas las hojas de las plantas,

se les efectuó un lavado con agua destilada y posteriormente fueron secadas con papel absorbente. Se conformó una muestra de 2 g de tejido vegetal, tomados de las 18 unidades experimentales de cada tratamiento. El material vegetal fue enviado a un laboratorio químico especializado (GR Chía, Chía, Colombia), para la determinación del contenido de nitrógeno total en el tejido foliar por el método de Kjendahl.

Ensayo No. 2

Este ensayo se realizó entre los meses de septiembre y octubre de 2010. El material vegetal utilizado correspondió a plantas del cultivar Griego, propagadas a partir de esquejes que una vez enraizaron (12 semanas), se trasplantaron a materas plásticas de 250 g de capacidad, con un sustrato compuesto por la mezcla de tierra negra y cascarilla de arroz en proporción 1:1. Cada unidad experimental correspondió a una planta dispuesta en una matera.

Las unidades experimentales fueron ubicadas sobre mesones en condiciones de invernadero. El riego de las mismas se realizó de forma manual aplicando un volumen de 50 mL por planta directamente al sustrato, con una frecuencia de tres veces por semana.

El ensayo se organizó bajo un DCA. Los tratamientos aplicados a las plantas de orégano en este ensayo consistieron en un control, en el que las plantas fueron fertirrigadas con una solución nutritiva estándar, correspondiente a la propuesta por Hoagland y Arnon (1950) (Salisbury y Ross, 2000) (Tabla 3), pero carente de nitrógeno. Se establecieron otros cuatro tratamientos para los que se empleó la misma solución pero con la adición del nitrógeno empleando NH_4NO_3 (26-0-0), en dosis incrementales: 25, 50, 75 y 100% de la concentración de nitrógeno total de referencia en la solución estándar (Tabla 4). Los fertilizantes de uso agrícola que se emplearon para la preparación de la solución nutritiva estándar se presentan en la Tabla 5.

Para cada tratamiento se dispusieron tres repeticiones, cada una de las cuales comprendió 15 unidades experimentales. Las soluciones nutritivas empleadas en cada tratamiento fueron aplicadas una vez por semana mediante fertirriego al sustrato de cada planta, empleando 50 mL.

Tabla 3. Concentración de nutrientes en la solución nutritiva estándar que se empleó para el ensayo No. 2 (Solución de Hoagland y Arnon No. 2, tomada de Salisbury y Ross, 2000)

Elemento	ppm
N (NO_3)	196
N (NH_4)	14
N (N total)	210
P	31
K	235
Ca	160
Mg	49
S	64
Fe	0.8
B	0.5
Cu	0.02
Zn	0.05
Mn	0.5
Mo	0.01

Tabla 4. Concentración de nitrógeno en las soluciones nutritivas y cantidad de NH_4NO_3 aplicado por planta de orégano (*Origanum vulgare* 'Griego') en cada evento de fertirrigación, en los diferentes tratamientos del ensayo No. 2.

Tratamiento	Concentración de N en la solución nutritiva ppm	N aportado mg-planta ⁻¹	Cantidad de NH_4NO_3 (mg-planta ⁻¹)
T1: Control sin N	0	0	0
T2: 25% de la dosis de N	52.5	50	190
T3: 50% de la dosis de N	105.0	100	380
T4: 75% de la dosis de N	157.5	150	580
T5: 100% de la dosis de N	210.0	200	770

Tabla 5. Fertilizantes empleados para la preparación de la solución nutritiva estándar (Adaptación de la Solución de Hoagland y Arnon No. 2 tomada de Salisbury y Ross, 2000) utilizada en el ensayo No. 2.

Fuente	mg · L ⁻¹
Nitrato de amonio (26 %)	770
Bórax (11 %)	4.5
Sulfato de magnesio 11% Mg y 20% S	490
Quelato de zinc (9 %)	0.5
Quelato de hierro (9 %)	5
Quelato de manganeso (9 %)	5.5
Quelato de cobre (9 %)	0.2
Cloruro de potasio (50 %)	471.6
Oxido de calcio (71 % Ca)	560 mL
Ácido fosfórico (32 %)	113.9 mL
Molibdato de amonio (60 %)	0.02

A la cuarta semana de fertirrigación de las plantas de los diferentes tratamientos (29 días después de iniciado el ensayo), se realizaron las mediciones empleando el medidor portátil Minolta SPAD®-502. Las lecturas se efectuaron en todas las unidades experimentales, tomando tres hojas por planta, procurando seleccionar una de cada tercio de la misma. En cada hoja de cada tercio se tomaron tres lecturas con el instrumento; con los datos obtenidos se calculó el promedio por planta.

Posterior a la toma de las lecturas con el clorofilómetro, se retiraron todos los tallos con sus hojas en las 15 plantas de cada réplica. Este material fue lavado con agua destilada y posteriormente se llevó a un horno de secado universal a 70 °C durante 72 horas, hasta obtener su peso seco. De cada una de las tres réplicas por tratamiento, se conformó una muestra de al menos 2 g de solo hojas. El material vegetal fue remitido a un laboratorio químico especializado (GR Chía, Chía, Colombia), para la determinación del contenido de nitrógeno total en el tejido foliar por el método de Kjendahl.

Para la determinación del crecimiento de las plantas de orégano bajo los distintos tratamientos, al inicio del ensayo se tomó una muestra de 30 esquejes,

para determinar el peso seco promedio individual de la parte aérea. Al finalizar el ensayo, se realizó un muestreo destructivo de la parte aérea (tallos y hojas), de todas y cada una de las unidades experimentales por réplica, para determinar el peso seco promedio por planta para cada tratamiento. Para el secado de las muestras, estas fueron llevadas a un horno de secado a 70°C durante 72 horas. El crecimiento se calculó a través de la diferencia entre el peso seco final y el inicial, de la masa foliar por planta.

Análisis de datos

Los análisis de regresión fueron efectuados empleando el software estadístico SPSS, versión 15.0, con el fin de seleccionar el modelo matemático que más se ajustara para la estimación de algunas de relaciones entre las variables medidas. Previo a este

análisis se verificó el ajuste de los datos a una distribución normal de acuerdo al test Shapiro-Wilk.

RESULTADOS

Ensayo No. 1

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para el orégano 'Inglés' en cada tratamiento. Tanto las mediciones de la cantidad de clorofila, empleando el equipo Minolta SPAD®-502, como el contenido de nitrógeno foliar, mostraron variaciones ante el incremento de la cantidad de nitrógeno aportado a través de la urea. Se obtuvo una respuesta positiva en los tratamientos 2 y 3 frente al control sin aporte de nitrógeno, mientras que para el tratamiento 4 se apreció un descenso tanto en los valores SPAD como en el porcentaje de nitrógeno foliar.

Tabla 6. Efecto de diferentes niveles de fertilización nitrogenada empleando urea, sobre los valores SPAD medidos con el medidor de clorofila Minolta SPAD®-502 y sobre el contenido de nitrógeno foliar en plantas de orégano (*Origanum vulgare* 'Inglés') (Ensayo No. 1).

Tratamiento	N aportado mg·planta ⁻¹	SPAD*	% N en tejido foliar**
1	0	37.61±1.23	2.98
2	82.8	40.86±0.93	3.59
3	165.6	43.72±2.25	3.96
4	253	42.72±1.64	3.74
5	335.8	-	-

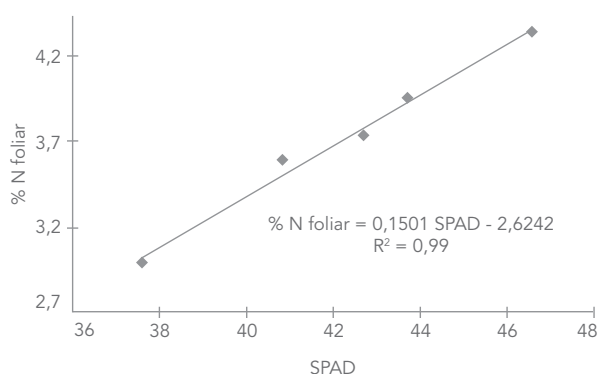
*Promedio ± error estándar; T1 n=135; T2 n= 135; T3 n= 129; T4 n= 129

**n=1 para cada tratamiento

A partir del quinto día después de la fertilización con urea, en las plantas de los tratamientos 4 y 5 se observaron signos de deshidratación, defoliación, clorosis en el ápice y márgenes de las hojas necróticas. Las afecciones más severas ocurrieron en todas las unidades experimentales del tratamiento 5, lo que impidió tomar los datos de las variables de respuesta en este tratamiento.

Lo anterior quizás se debe a la aplicación de urea en niveles excesivos para estas plantas en las condiciones del ensayo, lo que pudo haber incrementado el efecto del biuret que contiene este fertilizante, ya que obstruye la síntesis normal de proteínas e interfiere con el metabolismo del nitrógeno en las plantas (Arauz, 1998). Algunos de los efectos que se presentaron en el orégano 'Inglés', posiblemente a causa de este compuesto, se asocian con las deformaciones y clorosis foliar, entorchamiento y márgenes necróticos. Esto a su vez puede explicar la disminución de los valores SPAD en el tratamiento 4, ya que se pudo causar una disminución en la cantidad de clorofila (Finck, 1988).

Respecto a la relación entre el contenido de clorofila y el nitrógeno foliar, en la Figura 1 se presenta la regresión lineal que se efectuó entre los valores SPAD y el porcentaje de nitrógeno foliar. Esta fue altamente significativa según el análisis de varianza practicado ($P=0.0005$), presentó una buena correlación entre ambas variables y un buen ajuste de los datos al modelo ($r=0.99$ y $R^2=0.99$).



De acuerdo a lo anterior, se puede afirmar que para el orégano 'Inglés' en las condiciones del ensayo, el medidor de clorofila fue un indicador confiable del contenido de nitrógeno foliar y que la variación de éste puede ser determinada indirectamente empleando el equipo portátil.

Sin embargo, es importante considerar que en este ensayo se contó con pocos datos para el análisis de regresión, ya que solamente se pudo tomar una sola muestra de hojas para determinar el porcentaje de nitrógeno foliar en cada tratamiento. Por lo anterior, se efectuó un segundo ensayo, en el que se incluyeron más réplicas. Adicionalmente, se cambió el sustrato de las plantas, la fuente de nitrógeno y la forma de fertilización debido a los inconvenientes relacionados con la fitotoxicidad que se presentaron con la utilización de la urea en las materas. También se modificó la ubicación de las unidades experimentales a un lugar que permitiera mayor ventilación y menor humedad ambiental y el sustrato de las materas debido a su baja capacidad de retención de humedad.

Ensayo No. 2

Los resultados de los valores SPAD, el porcentaje de nitrógeno foliar y el peso seco de las plantas de orégano 'Griego' obtenidos para cada tratamiento, se presentan en la Tabla 7.

Figura 1. Relación entre los valores SPAD obtenidos con el medidor de clorofila Minolta SPAD®-502 y el porcentaje de nitrógeno en el tejido foliar del orégano (*Origanum vulgare* 'Inglés'), fertilizado con urea en condiciones de materia (Ensayo No. 1).

Tabla 7. Mediciones tomadas con el medidor portátil de clorofila Minolta (SPAD-502), porcentaje de nitrógeno foliar y biomasa de la parte aérea de plantas de orégano (*Origanum vulgare* 'Griego'), tratadas con diferentes niveles de NH_4NO_3 en solución nutritiva aplicada por fertirrigación (Ensayo No. 2).

Tratamiento	N aportado $\text{mg}\cdot\text{planta}^{-1}$	SPAD*	%N foliar**	Biomasa aérea seca*** $\text{g}\cdot\text{planta}^{-1}$
1	0	34.50±0.5	2.22±0.17	1.01±0.03
2	50	37.12±0.7	2.50±0.17	1.30±0.04
3	100	40.59±0.5	2.14±0.13	1.45±0.01
4	150	43.39±0.4	2.46±0.18	1.63±0.03
5	200	46.13±0.6	2.88±0.09	1.42±0.00

*Promedio ± error estándar; T1 n=135; T2 n= 135; T3 n= 129; T4 n= 129; T5 n= 135 | **Promedio ± error estándar; para todos los tratamientos n= 3
*** Promedio ± error estándar; T1 n= 45; T2 n= 45; T3 n= 43; T4 n= 43; T5 n= 45

Se encontró una correspondencia entre las dosis de nitrógeno aplicadas en cada tratamiento y los valores SPAD arrojados por el clorofilómetro, mostrando que el contenido de clorofila incrementó en la medida en que aumentó el aporte de nitrógeno en las soluciones nutritivas. En el tratamiento 1, la carencia del nitrógeno en la solución nutritiva condujo a un menor contenido de clorofila, estimado por los menores valores SPAD. Similar tendencia se observó para el contenido de nitrógeno foliar, el cual fue mayor a medida que se incrementó el nitrógeno aplicado. Sin embargo, el tratamiento 3 presentó un comportamiento atípico, ya que el porcentaje de nitrógeno foliar fue bajo a pesar de registrar un alto valor de SPAD (Tabla 7).

La relación entre las unidades SPAD y el porcentaje de nitrógeno foliar, se estableció a través de un análisis de regresión, aplicando un modelo lineal (Fig. 2). Se evidenció una alta correspondencia entre ambas variables, siendo altamente significativa según el análisis de varianza ($P=0.001$). Respecto a los parámetros que componen la regresión, se encontró un

coeficiente de correlación de $r=0.8$ y de determinación de $R^2=0.64$. Los anteriores resultados sugieren que el medidor portátil de clorofila Minolta SPAD®-502 es un instrumento confiable para la determinación de la concentración de nitrógeno en plantas de orégano 'Griego' jóvenes y en estado vegetativo. De este modo, dicho equipo podría convertirse en una alternativa para diagnosticar el estado nutricional de esta especie, en lo que a nitrógeno respecta.

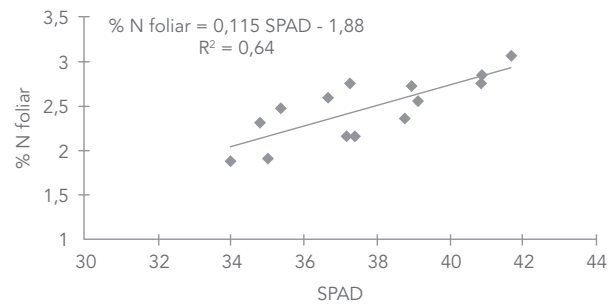


Figura 2. Relación entre los valores SPAD obtenidos con el medidor de clorofila Minolta SPAD®- 502 y los porcentajes de N foliar en orégano (*Origanum vulgare* 'Griego'), en plantas jóvenes en estado vegetativo en condiciones de materia y tratadas con diferentes niveles de NH_4NO_3 en la solución estándar de fertirrigación (Ensayo No. 2)

Adicionalmente y con el fin de validar la metodología que se empleó, se practicó un análisis de regresión para establecer si las diferentes dosis de nitrógeno que se les aportó a las plantas tuvieron un efecto sobre el contenido de clorofila estimado con el clorofilómetro. Efectivamente, las variaciones en la cantidad de N aportado a las plantas de orégano 'Griego' a través del fertirriego, influyeron positivamente en el nivel de clorofila, ya que se encontró una relación altamente significativa ($P < 0.0001$), un buen ajuste al modelo lineal con un $R^2 = 0.93$ (Fig. 3), y una alta correspondencia entre los valores observados y predichos de la variable dependiente ($r = 0.96$).

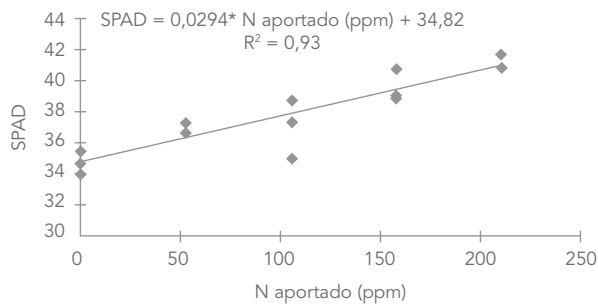


Figura 3. Relación entre la cantidad de nitrógeno aportado a través de fertirrigación en plantas de orégano (*Origanum vulgare* 'Griego') y el contenido de clorofila estimado a través de las lecturas SPAD efectuadas con el medidor de clorofila Minolta SPAD®-502 (Ensayo No. 2).

Por otra parte, el crecimiento de las plantas de orégano 'Griego', medido a través de la biomasa seca de la parte aérea, también presentó una respuesta dependiente del incremento en la cantidad de nitrógeno que les fue aportado a través de la solución nutritiva, ya que se encontró un valor de probabilidad significativo ($P = 0.003$), de acuerdo al análisis de regresión efectuado entre ambas variables. También se encontró una buena asociación entre las variables ($r = 0.8$) y un buen ajuste de los datos a un modelo cuadrático, ya que el coeficiente de determinación fue $R^2 = 0.63$ (Fig. 4).

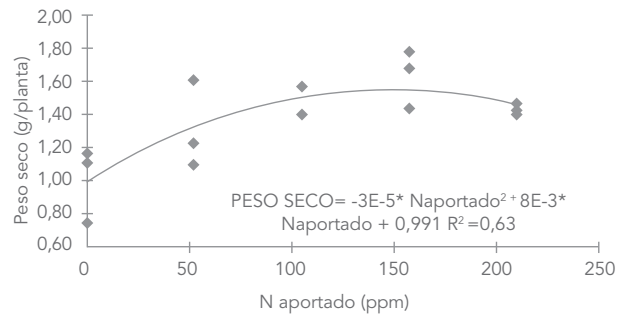


Figura 4. Relación entre la concentración del nitrógeno aportado en la fertirrigación y la biomasa seca total de la parte aérea en plantas de orégano jóvenes (*Origanum vulgare* 'Griego'), en estado vegetativo y en condiciones de materia.

DISCUSIÓN

Existe una relación estrecha entre la concentración de clorofila en la hoja y el contenido de nitrógeno foliar. El nitrógeno es un compuesto esencial para la formación de clorofila, ya que hace parte del anillo tetrapirrol que conforma químicamente esta molécula, por lo tanto, en ausencia de éste, además de presentar los efectos típicos de la deficiencia de nitrógeno en las plantas, hay una disminución en el contenido de clorofila (Salisbury y Ross, 2000). Los resultados del presente estudio son consistentes con lo anterior, ya que en los modelos de regresión obtenidos para los dos ensayos, realizados con las dos fuentes y formas de fertilización nitrogenada, existió una buena correlación entre el contenido de clorofila estimado mediante las lecturas SPAD realizadas con el clorofilómetro Minolta SPAD®-502 y el contenido de nitrógeno en el tejido foliar de plantas jóvenes de orégano de los cultivares Inglés y Griego.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Novoa y Villagrán (2002) y Scharf et al. (2006), en maíz y por Westerveld et al. (2003) en cebolla, entre otros, quienes también obtuvieron una relación lineal entre las unidades SPAD y el nitrógeno foliar y aportado a las plantas de cada especie. En otros estudios, como es el caso de algunos

materiales de maíz reportados por Netto *et al.* (2005), de hojas de papaya por Scharf *et al.* (2006) y de col por Westerveld *et al.* (2003), se obtuvieron modelos cuadráticos, mientras que en el caso del café (Netto *et al.*, 2005) obtuvieron una relación polinómica.

Parte de la variación entre las lecturas SPAD y el porcentaje de N foliar que no es explicada por el modelo, especialmente en el ensayo No. 2 que presentó un $R^2=0.64$, puede obedecer a la influencia de factores como el grosor diferencial de las hojas muestreadas, así como su posición dentro de la planta, que además tendría relación con la distribución de nitrógeno en las diferentes hojas según su edad. Lo anterior se debe a que las plantas empleadas en el Ensayo No. 2 fueron de mayor edad que las del Ensayo No. 1 y a que el periodo de aplicación de los tratamientos y evaluación fue mayor. Otros autores también han atribuido las diferencias entre las lecturas, a variaciones tanto en el contenido de humedad de las hojas, como a las condiciones ambientales en el momento de las lecturas (Chang y Robinson, 2003; Westerveld *et al.*, 2003).

Este porcentaje de subestimación observado en mayor o menor grado en todos los modelos, puede deberse también a errores en la toma de muestras, al realizar mediciones en hojas con coloración amarilla o verde menos intensa, como es el caso de hojas senescentes, afectadas por deficiencias nutricionales, salinidad, daño mecánico, etc. (Tsuda, 1999). Es por ello que sería necesario realizar más calibraciones para validar el método de manera más precisa en otros escenarios, teniendo en cuenta el efecto de la variación en las condiciones ambientales, del vigor de la planta, de la edad de las hojas, de las condiciones de cultivo, así como otros rangos de concentraciones de nitrógeno en el suelo o sustrato.

En otros estudios realizados en cultivos de maíz, arroz, algodón y plantas leñosas, se sugiere que para obtener una mejor calibración del instrumento se requiere que en el análisis de regresión, el nitrógeno

foliar sea expresado como masa de nitrógeno por área foliar, lo cual incrementa el valor de R^2 que al emplear solamente el porcentaje de nitrógeno foliar (Chang y Robinson, 2003).

Como se observa en las figuras 3 y 5, una baja disponibilidad de nitrógeno afectó tanto la concentración de clorofila en las hojas del orégano, como el crecimiento de las plantas. En ausencia del elemento quizás se produjo una reducción en la fotosíntesis y con ello, retardos en el crecimiento de las plantas. De acuerdo a San Clemente y Peña (2008), existe una relación positiva entre la concentración de nitrógeno y la fotosíntesis en las plantas C3 y C4, siendo el contenido de nitrógeno en la hoja un factor determinante en la tasa fotosintética por unidad de área foliar. Debido a que más del 75% del nitrógeno orgánico total se encuentra en los cloroplastos, principalmente en forma de enzimas, un aporte limitado del elemento afecta la tasa fotosintética debido a la disminución en la síntesis y contenido de clorofila y en la actividad de la Rubisco, según reportan Marschner (1986) y San Clemente y Peña (2008). Sin embargo la correlación entre la concentración de nitrógeno aportado a las plantas y la fotosíntesis no siempre es generalizada y puede ser variable por efectos del hábitat natural de la planta y factores ambientales como la temperatura y la radiación (Evans, 1989 citado en San Clemente y Peña, 2008).

Los incrementos en la concentración de nitrógeno, hasta las 150 ppm aplicadas a través del fertirriego, generaron una respuesta positiva en los valores SPAD medidos en las hojas de orégano. Sin embargo, las concentraciones superiores (210 ppm) ocasionaron retrasos en el crecimiento de las plantas de orégano en estado vegetativo bajo las condiciones del ensayo (Figura 5), indicando quizás que la tasa de crecimiento puede inhibirse con un aumento en el suplemento de este elemento, como reportan San Clemente y Peña (2008). Por su parte, las plantas de orégano sometidas a restricción en el aporte de nitrógeno, mostraron

deficiencias de este elemento, manifestadas en su coloración, en un bajo nivel de clorofila estimado con el clorofilómetro, en un bajo porcentaje de nitrógeno presente en el tejido foliar y en un retardo en el crecimiento, situación que coincide con lo encontrado por Morales y Suárez (2009) en plantas de orégano con fertilización nitrogenada restringida.

La respuesta de las plantas de orégano a la fertilización nitrogenada también se manifestó en la coloración de sus hojas, la cual se tornó más intensa a medida que este elemento se aplicó en mayor dosis en la solución nutritiva. Las plantas que crecen con deficiencias en este elemento presentan clorosis por causa de la proteólisis e inhibición en la síntesis de clorofila y la senescencia precoz de la planta (Coelho, 2008). Dicha clorosis es generalizada, aunque se evidencia mejor en las hojas más antiguas, que en casos extremos se tornan totalmente amarillas y mueren; por otro lado, las hojas más jóvenes presentan una coloración verdosa ya que reciben cantidades solubles de nitrógeno que proviene de las hojas más antiguas. Esto se debe a que el N hace parte de los nutrientes móviles, es decir, aquellos que tienen la capacidad de removilizarse y lo pueden hacer desde las hojas más maduras hasta las hojas más nuevas (Taiz y Zeiger, 2006).

De acuerdo a estos experimentos preliminares, se concluye que el medidor portátil de clorofila Minolta SPAD®-502 es una herramienta potencialmente confiable para estimar el contenido de nitrógeno en el tejido foliar de plantas jóvenes de orégano (*O. vulgare* 'Inglés' y 'Griego') que se encuentran en estado vegetativo. Sería recomendable realizar otros estudios para confirmar la relación que existe entre este método no destructivo de estimación de la clorofila, con uno destructivo de determinación directa. Así mismo, realizar la calibración del método propuesto en plantas de orégano cultivadas en otras condiciones ambientales y de suelo y en otros estados fenológicos. También se sugiere a futuro llevar a cabo estudios que permitan establecer el efecto de la edad de las hojas de orégano sobre las lecturas de clorofila y del contenido de nitrógeno. Esta información, sumada a la determinación de los niveles óptimos de nitrógeno foliar en el orégano, apoyarían la aplicación práctica de este método de diagnóstico para orientar las decisiones de fertilización nitrogenada para el cultivo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Militar Nueva Granada por el patrocinio de este Proyecto de Iniciación Científica a través del proyecto PIC CIAS 597.

El medidor portátil de clorofila Minolta SPAD®-502 es una herramienta potencialmente confiable para estimar el contenido de nitrógeno en el tejido foliar de plantas jóvenes de orégano

BIBLIOGRAFÍA

1. Arauz L. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 461 p.
2. Argenta G, Ferreira P, Bortolini C, Forsthofer E, Strieder M. 2001. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 13 (2): 158-167.
3. Baker A, Pillbeam D. 2007. Handbook of plant nutrition. CRC Press. 613 p.
4. Blackmer T, Schepers J, Varvel G, Meyer G. 1996. Analysis of aerial photography for nitrogen stress within corn fields. Agronomy Journal 88: 729-733
5. Bronson K, Chua T, Booker J, Keeling J, Lascano R. 2003. In-season nitrogen status sensing in irrigated cotton II. Leaf nitrogen and biomass. Soil Society of American Journal 67(5): 1439-1448.
6. Chang S, Robison D. 2003. Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. Forest Ecology and Management 181(3): 331-338
7. Coelho L. 2008. Resposta a nitrogênio por plantas de alho (*Allium sativum* L.) livres de vírus. Tesis de Grado. Maestría en Agronomía (Horticultura). Faculdade de Ciências Agrônomicas. Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho". 84 p.
8. Echeverría H, Sainz H. 1998. Relación entre las lecturas del medidor de clorofila (Minolta SPAD 502) en distintos estadios del ciclo del cultivo de maíz y el rendimiento en grano. Revista Facultad de Agronomía 103 (1): 37-44.
9. Echeverría H, Sainz H, Barbieri P. 2005. Métodos de diagnóstico de requerimiento de nitrógeno en maíz. Congreso Nacional del Maíz. Agroactiva. <http://usuarios.multimania.es/notamaiz>, consulta Enero 2010.
10. Fenech L, Troyo E, Trasviña M, Ruiz F, Beltrán A, Murillo B, García J, Zamora S. 2009. Relación entre un método no destructivo y uno de extracción destructivo, para medir el contenido de clorofila en hojas de plántula de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). Revista Universidad y Ciencia 25(1): 99-102.

11. Finck, A. 1988. Fertilizantes y Fertilización. Editor Reverte .439 p.
12. Giletto M, Rattín J, Echeverría H, Caldiz D. 2006. Evaluación de la nutrición nitrogenada en nuevas variedades de papa aptas para el procesamiento industrial. Revista Ciencia del Suelo 24 (1) versión on-line ISSN 1850-2067.
13. Krugh B, Bichham L, Miles D. 1994. The solid-state chlorophyll meter, a novel instrument for rapidly and accurately determining the chlorophyll concentrations in seedling leaves. Maize Genetics Cooperation News Letter 68: 25-27.
14. Konika Minolta Seneing. Inc. 2009. Chlorophyll meter SPAD-502. Japón. 4 p.
15. Larcher M. 2003. Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups. 4th ed. Springer. Germany. 513 p.
16. López L. 2002. Cultivos industriales. Ediciones Mundi-Prensa. España. 1071 p.
17. Marschner H. 1986. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich. Florida. USA. 543 p.
18. Morales L, Suárez D. 2009. Efecto de la ausencia de ciertos elementos nutritivos en la fertilización del orégano (*Origanum vulgare*) y el romero (*Rosmarinus officinalis*) cultivados en suelos de Zipaquirá (Cundinamarca, Colombia). Trabajo de Grado. Biología Aplicada. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia. 118 p.
19. Novoa R, Villagrán N. 2002. Evaluación de un instrumento medidor de clorofila en la determinación de niveles de nitrógeno foliar en maíz. Agric. Tec. Chillán 62 (1): 166-171. <http://www.scielo.cl/>, consulta Noviembre de 2010.
20. Netto A, Campostrini E, Goncalves J, Bressan-Smith R. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. Scientia Horticulturae 104: 199-209.
21. Rashid M, Voroney R. 2005. Predicting nitrogen requirements for corn grown on soils amended with oily food waste. Soil Society of American Journal 69(4): 1265-1265 p.
22. Rodríguez M, Alcántar G, Aguilar A, Etchevers J, Santizó J. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. Terra 16 (2): 135-141.
23. Salisbury F, Ross C. 2000. Fisiología de las plantas. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Volumen 3. 1907 p.
24. San Clemente M, Peña E. 2008. Crecimiento y eficiencia fotosintética de *Ludwigia decurrens* Walter (Onagraceae) bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. Acta Biológica Colombiana 13(1): 175 – 186.
25. Scharf P, Brouder S, Hoefl R. 2006. Chlorophyll meter readings can predict nitrogen need and

- yield response of corn in the North-Central USA. *Agronomy Journal* 98 (3): 655-665.
26. Scharf P, Lory J. 2002. Calibrating corn color from aerial photographs to predict sidedress nitrogen need. *Agronomy Journal* 94: 397-404
 27. Schroder J, Neetson J, Oenema O, Struik P. 2000. Does the crop or the soil indicate how to save nitrogen in maize production? Reviewing the state of art. *Field Crop Res.* 66: 151-164.
 28. Shaahan M, El-Sayed A, Abou E. 1999. Predicting nitrogen, magnesium and iron nutritional status in some perennial crops using a portable chlorophyll meter. *Scientia Horticulturae* 82: 339-348.
 29. Singh B, Singh Y, Ladha J, Bronson K. 2002. Chlorophyll meter- and leaf color chart-based nitrogen management for rice and wheat in Northwestern India. *Agronomy Journal* 94 (4): 821-829
 - 30- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. 2da. Ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 764 p.
 31. Tsuda M. 1999. Errors in leaf area measurement with an automatic area meter due to leaf chlorophyll in crop plants. *Annals of Botany* 84: 799-801.
 32. Varvel G, Schepers J, Francis D. 1997. Chlorophyll meter and stalk nitrate techniques as complementary indices for residual nitrogen. *J. Prod. Agric.* 10: 147-151.
 33. Varvel G, Wilhelm W, Shanahan J, Schepers J. 2007. An algorithm for corn nitrogen recommendations using a chlorophyll meter based on sufficiency index. *Agronomy Journal* 99 (3): 701-706.
 34. Westerveld S, McKeown A, McDonald M, Scott-Dupree C. 2003. Chlorophyll and nitrate meters as nitrogen monitoring tools for selected vegetables in Southern Ontario. *Acta Horticulturae (ISHS)* 627: 259-266. http://www.actahort.org/books/627/627_33.htm, consulta Febrero de 2011.