

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

Evaluación del contenido de nitrógeno y clorofila en chile dulce (*Capsicum annuum* L.) var.
Dulcítico, en respuesta al manejo del fertirriego en ambiente protegido.

María Alejandra Angulo Guillén

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA CON
EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

Evaluación del contenido de nitrógeno y clorofila en chile dulce (*Capsicum annuum* L.) var.
Dulcítico, en respuesta al manejo del fertirriego en ambiente protegido.

María Alejandra Angulo Guillén

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA CON
EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA

2021

Evaluación del contenido de nitrógeno y clorofila en chile dulce (*Capsicum annuum* L.) var.
Dulcítico, en respuesta al manejo del fertirriego en ambiente protegido.

María Alejandra Angulo Guillén

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERA AGRÓNOMA CON
EL GRADO DE LICENCIADA EN AGRONOMÍA

_____ Freddy Soto Bravo. Ph. D.	_____ Director tesis
_____ Gustavo Quesada Roldán. Ph. D.	_____ Miembro tribunal
_____ Cristina Chinchilla Soto. Ph. D.	_____ Miembro tribunal
_____ Javier Espeleta	_____ Miembro tribunal
_____ Luis Gómez Alpízar. Ph. D.	_____ Director escuela
_____ María Alejandra Angulo Guillén	_____ Sustentante

Dedicatoria

A mis padres y a mi hermana por haberme acompañado y aconsejado durante toda mi carrera profesional, por no dejarme caer en los momentos más difíciles y por siempre creer en mis capacidades como hija, hermana y profesional.

Agradecimientos

En primer lugar, a Dios por permitirme cumplir una de las metas más importantes en mi vida.

A mi familia, amigos y pareja por apoyarme en cada decisión tomada durante el transcurso de esta etapa.

A la Universidad de Costa Rica por brindarme la oportunidad de ser parte de tan admirable institución.

Al profesor Freddy Soto Bravo director de la tesis por el acompañamiento y la oportunidad de realizar esta tesis.

A los profesores Cristina Chinchilla y Gustavo Quesada por el apoyo brindado durante la tesis.

Al CIPRONA por brindarme la oportunidad de realizar parte de mi tesis en el centro de investigación.

A los funcionarios de la Universidad de Costa Rica, en especial a los funcionarios de la EEFBM Julio Vega y Luis Oreamuno por el gran apoyo recibido durante la ejecución de la tesis.

A FITTACORI, por el apoyo económico para la ejecución de este gran proyecto de investigación.

Índice

Agradecimientos.....	3
Lista de Cuadros	6
Lista de Figuras.....	6
Resumen.....	9
1.Introducción	11
2. Objetivos	13
3. Revisión de literatura	14
3.1 Cultivo de chile dulce (<i>Capsicum annuum</i>) var. Dulcítico.....	14
3.1.1 Generalidades	14
3.1.2 Características morfológicas.....	14
3.1.3 Condiciones agroecológicas	15
3.2 Ambientes protegidos.....	16
3.3 Sistemas hidropónicos.....	17
3.4 Clorofila, el proceso fotosintético y su relación con el contenido de N y el estado hídrico.....	20
3.5 Sensores ópticos para la cuantificación del contenido de clorofila	23
3.5.1 Sensores basados en la transmitancia y absorbancia.....	24
3.5.2 Sensores basados en la fluorescencia	25
3.5.3 Sensores basados en la reflectancia	25
3.6 Extracción de clorofila in vivo.....	27
4. Materiales y métodos	27
4.1 Sitio experimental.....	27
4.1.2 Condiciones climáticas del sitio experimental.....	28
4.2 Sistema de cultivo	30
4.3 Manejo del cultivo	31
4.4 Descripción de los tratamientos	32
4.6 Variables de respuesta	38
4.6.1 Medición del contenido de clorofila.....	38
4.6.2 Determinación directa del contenido de clorofila.....	40
4.6.3 Determinación del contenido de N en las hojas	41
4.6.4 Rendimiento.....	41

4.7 Análisis estadístico.....	41
5. Resultados.....	42
6. Discusión.....	55
Conclusiones.....	67
Recomendaciones.....	68
Literatura consultada.....	69
Anexos.....	78

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Ecuaciones para la determinación del contenido de clorofila según el tipo de solvente (Croft & Chen, 2017). Ecuaciones para la determinación del contenido de clorofila según el tipo de solvente (Croft & Chen, 2017). abs= absorbancia.	27
Cuadro 2. Características físicas de la fibra de coco utilizada como sustrato para el cultivo de chile dulce hidropónico bajo condiciones de invernadero.	31
Cuadro 3. Descripción de los tratamientos evaluados (B: nutrición baja, M: nutrición media, A: nutrición alta; 10: 10% de agotamiento hídrico, 30: 30% de agotamiento hídrico).	33
Cuadro 4. Concentración de nutrientes en las soluciones nutritivas utilizadas en los tratamientos con un nivel de nutrición bajo (B), medio (M) y alto (A).	33
Cuadro 5. Tipos de agua presentes en la tabla de fibra de coco utilizadas en la investigación.	36
Cuadro 6. Porcentaje de humedad volumétrica para la activación del riego y volumen de riego a aplicar.	36
Cuadro 7. Análisis de varianza que muestra los efectos individuales o la interacción de la condición de agotamiento (A) y del nivel de nutrición (N) sobre las variables directas de contenido de clorofila (mg g ⁻¹), contenido de nitrógeno (N%) y rendimiento (Kg planta ⁻¹).	42
Cuadro 8. Comparación de medias del efecto del nivel de concentración de nutrientes (Baja, Media y Alta) en las variables evaluadas directamente en plantas de chile dulce hidropónico var. Dulcítico, Alajuela, Costa Rica, 2019, mediante la prueba Tukey. Las letras distintas indican las diferencias significativas entre los tratamientos (P<0,05).	43

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo del nitrógeno (Bernhard, 2010).	18
Figura 2. Transmitancia y absorbancia según la radiación roja e infrarroja cercano (NIR).	21
Figura 3. Reflectancia del canopy con luz visible e infrarrojo cercano (NIR).	22
Figura 4. Fluorescencia según la longitud de onda.	22
Figura 5. Invernadero de la E.E.F.B.M utilizado para este estudio, el área demarcada con rojo corresponde a la ubicación del experimento.	28
Figura 6. Temperatura máxima, mínima y promedio del invernadero utilizado.	29
Figura 7. Humedad relativa máxima, mínima y promedio del invernadero utilizado.	29
Figura 8. Radiación total Kw/m ² día en el invernadero utilizado.	30
Figura 9. Contenido de partículas sólidas y capacidad de aireación según curva de desorción de agua a diferente potencial mátrico; y contenidos de agua fácilmente disponible (AFD), agua de reserva (AR) y agua total disponible (ATD), en la fibra de coco utilizada.	35

Figura 10. Bandeja de riego a la demanda utilizada para el control del riego en el experimento.	37
Figura 11. Distribución de los tratamientos en el área de cultivo según diseño experimental. Los colores indican el tratamiento: amarillo = Nutrición baja con 10% de agotamiento, rosado = Nutrición media con 10% de agotamiento, azul = Nutrición alta con 10% de agotamiento, verde = Nutrición media con 30% de agotamiento, naranja = Nutrición baja con 30% de agotamiento y morado = Nutrición alta con 30% de agotamiento, el color rojo “x” representa el borde.....	38
Figura 12. Parte de hoja donde se realizó la toma de mediciones con los distintos instrumentos.	39
Figura 13. Análisis de regresión entre el contenido de clorofila (mg g^{-1}) y el contenido de nitrógeno (%) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019. Cada punto representa el promedio de tres evaluaciones en una misma fecha.	44
Figura 14. Análisis de regresión entre el contenido de clorofila (mg g^{-1}) y las variables (a) índice de clorofila (CCI) y (b) desarrollo de análisis de plantas y suelo (SPAD) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019.	46
Figura 15. Análisis de regresión entre el contenido de clorofila (mg g^{-1}) y las variables (a) índice de clorofila (CCI) y (b) desarrollo de análisis de plantas y suelo (SPAD) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019.	47
Figura 16. Análisis de regresión para la variable del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVIG) y contenido de clorofila (mg g^{-1}) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica.	48
Figura 17. Análisis de regresión para la variable del índice de vegetación de diferencia normalizada determinado con el espectroradiómetro (NDVIE) y contenido de clorofila (mg g^{-1}) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019.....	49
Figura 18. Análisis de regresión para la variable del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVIG) y el contenido nitrógeno (%) en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero con nutrición baja. Alajuela, Costa Rica, 2019.....	50

Figura 19. Análisis de regresión para la variable del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVIE) y el contenido nitrógeno (%) en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero con nutrición baja. Alajuela, Costa Rica, 2019.....	51
Figura 20. Análisis de regresión para la variable $F_v F_m^{-1}$ y el contenido de clorofila ($mg\ g^{-1}$) en el cultivo de chile dulce chile hidropónico bajo invernadero con nutrición media. Alajuela, Costa Rica, 2019.	52
Figura 21. Análisis de regresión para la variable de fluorescencia ($F_v F_m^{-1}$) y contenido de nitrógeno (N%) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019.....	53
Figura 22. Análisis de regresión para el contenido de clorofila ($mg\ g^{-1}$) y el rendimiento ($kg\ planta^{-1}$) en el tratamiento de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero var. Dulcítico, Alajuela, Costa Rica, 2019.	54
Figura 23. Análisis de regresión para el contenido de nitrógeno (%N) y el rendimiento en los tratamientos de nutrición baja, media y alta, en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero var. Dulcítico, Alajuela, Costa Rica, 2019.	55

Resumen

La producción hortícola se caracteriza por el alto consumo de fuentes nutricionales, entre ellos los fertilizantes nitrogenados. El consumo de este tipo de fertilizantes es desmedido, lo que provoca bajas productividades y un aumento en la contaminación ambiental mediante la emisión de gases de efecto invernadero, así como la eutrofización de fuentes de agua por el aumento en el contenido de nitrógeno. Debido a esta problemática, los productores realizan monitoreos del N mediante metodologías donde es requerido eliminar tejido vegetal y además esperar días o semanas por los resultados, retrasando la corrección de las deficiencias o de los excesos de este nutriente. Se han implementado métodos no destructivos para su determinación, algunos de los cuales se basan en sensores ópticos como los cuantificadores de la transmitancia, reflectancia o fluorescencia del tejido fotosintético, presentando relaciones con el contenido de N foliar. Es por esto, que existe la necesidad de realizar investigaciones en cultivos hortícolas donde se pueda validar el uso de este tipo de instrumentos, tal es el caso del chile dulce. Por lo que el objetivo de esta investigación es determinar la relación existente entre las variables medidas por algunos de estos equipos de sensores ópticos y el contenido de nitrógeno y clorofila foliar.

Se utilizó un sistema hidropónico de chile dulce var. Dulcítico cultivado en un invernadero ubicado en la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno (E.E.F.B.M) de la Universidad de Costa Rica, situada en La Garita de Alajuela. El cultivo se estableció en tablas de fibra de coco con un sistema de riego por goteo con goteros autocompensados y antidrenantes. Se estableció un diseño factorial irrestricto al azar, combinando tres niveles de nutrición, alta (A), media (M) y baja (B) y dos niveles de agotamiento hídrico 10% y 35%, siendo los tratamientos B10%, B35%, M10%, M35%, A10% y A35%. Se realizaron mediciones mensuales del contenido de clorofila de manera directa mediante un método de extracción con etanol e indirectas con el uso de equipos para la medición de transmitancia (SPAD, CCI), la fluorescencia ($F_v F_m^{-1}$) y la reflectancia (NDVI). También se determinó el contenido de nitrógeno (N) mediante el método Kjeldahl y el rendimiento del cultivo mediante cosechas semanales. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), y posteriormente se realizó un análisis de regresión para cada variable con el contenido de clorofila y de nitrógeno.

Se observó un efecto por parte de la nutrición sobre el contenido de clorofila y de nitrógeno, pero ningún efecto del porcentaje de agotamiento hídrico. Asimismo, no se observó

interacción entre los factores de nivel de nutrición y porcentaje de agotamiento en las variables directas evaluadas.

El contenido de clorofila (mg g^{-1}) no presentó diferencias significativas entre tratamientos; mientras que en las variables del contenido de nitrógeno (%) y rendimiento (kg planta^{-1}), el tratamiento de nutrición baja fue estadísticamente inferior al de nutrición media y alta.

En cuanto al análisis de regresión, las variables del contenido de clorofila (mg g^{-1}) y de nitrógeno (%) mostraron coeficientes de determinación (R^2) bajos, siendo el más alto de 0,18 en el tratamiento de nutrición baja. En el análisis realizado entre el contenido de clorofila (mg g^{-1}) y las mediciones indirectas evaluadas, el SPAD, CCI y NDVI_G mostraron los mayores R^2 , siendo estos de 0,71, 0,75 y 0,63 respectivamente. En el análisis de regresión realizado entre las mediciones indirectas y el contenido de N, las variables $F_v F_m^{-1}$ y NDVI_G presentaron los mayores coeficientes de determinación con valores de 0,89 y 0,61 respectivamente en el tratamiento de nutrición baja. En cuanto al rendimiento, este mostró mayores valores de R^2 cuando este se analizó con el contenido de N con un valor de 0,5 en el tratamiento de nutrición media.

Las variables evaluadas son afectadas por las condiciones nutricionales en el cultivo, donde se observa que estas son mejores para la determinación del estado del nitrógeno y de clorofila ante una deficiencia nutricional. El CCI y SPAD resultan ser las variables más prometedoras cuando se quiere determinar el contenido de clorofila; mientras que, para determinar el estado del nitrógeno, las variables $F_v F_m^{-1}$ y NDVI son las que muestran el mejor comportamiento para dicha determinación.

Por último, el rendimiento presentó una mejor relación con el contenido de nitrógeno en comparación con el contenido de clorofila.

1. Introducción

El chile dulce (*Capsicum annuum*), pertenece a la familia de las Solanáceas y representa una de las principales hortalizas a nivel mundial. En Costa Rica es un cultivo de relevancia socioeconómica; así, para el año 2012 se dio la primera exportación de chile dulce cultivado en invernaderos hacia Estados Unidos, exportándose 1.374.865 Kg de chile dulce en el año 2014 (Salas, 2012; Bolaños *et al.*, 2018). Según INEC (2017), en el año 2016 en Costa Rica se cultivaron aproximadamente 479 ha de chile dulce principalmente en zonas productoras de los cantones de Grecia, San Ramón, Poás, Escazú y Paraíso. Las provincias de Cartago y Alajuela destacan como las principales zonas con producción bajo ambientes protegidos (SEPSA, 2016, Jiménez, 2007; Marín, 2010).

Tradicionalmente ha sido cultivado en sistemas a campo abierto, utilizando techos de plástico durante la época lluviosa y un sistema de fertilización convencional. Sin embargo, en los últimos años, debido a los efectos del cambio climático, han ido en aumento los sistemas de producción bajo ambientes protegidos. Dichos sistemas de producción permiten controlar una serie de factores que afectan directamente la producción, como el ataque de plagas y/o enfermedades, las condiciones ambientales, el sustrato, el uso del agua, así como la fertilización (Shany, 2004).

La fertilización en sistemas protegidos que utilizan sustratos inertes se realiza mediante el sistema de fertirriego, donde las fuentes a aplicar deben aportar el 100% de los requerimientos del cultivo. El nitrógeno (N), es uno de los principales elementos a considerar en la nutrición de las plantas, ya que se encuentra involucrado en procesos como la síntesis de proteínas, la fotosíntesis, producción de follaje y por ende en el rendimiento del cultivo (Leghari *et al.*, 2016). Ante una deficiencia se observa tejido foliar clorótico, una disminución en el crecimiento, en el desarrollo de la planta y en la producción. De manera contraria, una sobredosificación promueve el crecimiento vegetativo con tejido más succulento, el cual facilita el ataque de microorganismos fitopatógenos. Esto, también puede ocasionar una disminución en el tamaño y la calidad del fruto, repercutiendo directamente sobre la producción (Leghari *et al.*, 2016).

Habitualmente, muchos agricultores realizan la aplicación de dicho elemento sin criterios técnicos adecuados, lo cual ha generado aplicaciones excesivas y consecuentemente un incremento en la contaminación ambiental. La contaminación por parte de las fuentes nutricionales ricas en N se debe a las formas de nitrógeno diatómico no reactivo a otras formas reactivas como lo es el amonio, amoniaco, nitritos, óxido nitroso, nitratos, entre otros (Science Communication Unit, 2013). Muchos de estos fomentan el efecto invernadero, por ejemplo, el óxido nitroso liberado por los fertilizantes al entrar en contacto con los suelos (Science Communication Unit, 2013). Asimismo, se da un aumento excesivo de N en la atmósfera mediante la volatilización del amoniaco de fuentes aplicadas al suelo. Además, las aplicaciones excesivas junto con altas precipitaciones y/o volúmenes de riego, favorecen la lixiviación de estos fertilizantes a cuerpos de agua superficiales, provocando la eutrofización (Byrnes, 1990; Science Communication Unit, 2013).

Por otra parte, la disponibilidad del recurso hídrico también afecta el desarrollo de las plantas. El exceso prolongado de agua en la rizósfera o anegamiento provoca cierre estomático, disminución en la absorción de minerales y muerte de raíces, entre otros efectos (Pardos, 2004). En chile dulce, el déficit hídrico provoca una disminución en la tasa fotosintética, aborto y daño en el fruto, marchitez y la muerte de la planta (Quesada, 2015). En la actualidad este es el principal recurso natural que se encuentra en peligro, por lo que el uso eficiente de este es de suma importancia para la producción agrícola.

La agricultura es altamente dependiente de insumos como los fertilizantes nitrogenados y del recurso hídrico, en especial las hortalizas como el chile dulce debido a su susceptibilidad a cambios bruscos en el contenido de agua y nutrientes. Debido a esto, se han desarrollado una serie de metodologías para la determinación del estado del N y del estado hídrico en las plantas, algunas de las cuales se basan en la determinación del contenido de clorofila o la eficiencia fotosintética. Para su determinación existen métodos destructivos y no destructivos; el primero de éstos se basa en la determinación espectrofotométrica del contenido de clorofila en el tejido mediante una extracción con acetona, etanol u otros compuestos (Porra *et al.*, 1989). Los métodos no destructivos y/o equipos de fotosíntesis, utilizan sensores ópticos como son los cuantificadores de la transmitancia, reflectancia o fluorescencia del tejido fotosintético, presentando correlaciones con el contenido de N foliar (Padilla *et al.*, 2018). Estos brindan información relevante, sin embargo, su aplicación está limitada por la falta de investigación en cultivos hortícolas, de ahí la importancia de generar investigación para su correcto uso en campo.

El estudio de las diferentes metodologías para la determinación del estado hídrico y del estado del N, tiene gran importancia para el sector agropecuario. El productor actualmente tiene la necesidad de eliminar tejido vegetal productivo para realizar análisis nutricionales y, aunado a esto, debe esperar días o semanas por los resultados, lo cual retrasa la corrección de las deficiencias o de los excesos de nutrientes como el N. Con el uso de algunos métodos indirectos no es necesario eliminar tejido y con los datos obtenidos es posible actuar de manera inmediata ante una deficiencia o un exceso de N y ante un déficit o exceso de agua, mejorando de esta manera la productividad del cultivo.

Gran parte de los estudios realizados sobre el contenido de clorofila y su relación con el contenido de N y estado hídrico, han sido en cultivos como el tomate (Ulissi *et al.*, 2011; Padilla *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2018; Padilla *et al.*, 2015) y el maíz (Gabriel *et al.*, 2019; Sánchez *et al.*, 1983; Rambo *et al.*, 2010), mientras que en el cultivo de chile dulce se ha comenzado muy recientemente a evaluar dicho efecto en condiciones hidropónicas. Es por esto por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de nutrientes en solución nutritiva y de agotamientos del contenido de humedad en el sustrato, sobre el contenido de nitrógeno, de clorofila y el rendimiento en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo condiciones de invernadero.

2. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de nutrientes en solución nutritiva y de agotamientos del contenido de humedad (%v.v-1) en el sustrato, sobre el contenido de nitrógeno, de clorofila y el rendimiento en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo condiciones de invernadero.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de tres niveles de nutrición y dos porcentajes de agotamiento hídrico en el sustrato sobre el contenido de nitrógeno y el contenido de clorofila mediante mediciones directas en el cultivo de chile dulce var. Dulcítico.
- Determinar la relación entre las mediciones directas del contenido de clorofila y el contenido de nitrógeno en el cultivo de chile dulce.

- Determinar la relación entre las mediciones indirectas de clorofila y las cuantificaciones directas del contenido de nitrógeno y clorofila para identificar el instrumento que presente la mayor correlación.
- Determinar la relación entre el contenido de nitrógeno y clorofila con el rendimiento en chile dulce var. Dulcítico.

3. Revisión de literatura

3.1 Cultivo de chile dulce (*Capsicum annuum*) var. Dulcítico

3.1.1 Generalidades

El cultivo de chile dulce (*Capsicum annuum*), pertenece a la familia de las solanáceas. Éste es originario de México, Centroamérica y Suramérica, siendo ahora cultivado en gran parte de las regiones tropicales y subtropicales (Bolaños *et al.*, 2018). Se caracteriza por poseer una gran cantidad de nutrientes tales como calcio, fósforo, hierro y potasio; asimismo, es rico en antioxidantes y vitaminas (Bolaños *et al.*, 2018).

Actualmente existen una gran cantidad de variedades mejoradas, tal como la variedad Dulcítico la cual fue desarrollada en el año 2013 en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno de la Universidad de Costa Rica, ubicada en la Garita de Alajuela. Ésta se desarrolló con el fin de proveer de semilla local a los productores nacionales con características como una alta productividad y con adaptación a las condiciones agroclimáticas costarricenses (Bolaños *et al.*, 2013).

3.1.2 Características morfológicas

La variedad Dulcítico es una planta de crecimiento indeterminado que llega a alcanzar más de 300 cm de altura en condiciones de invernadero. Se caracteriza por la presencia de un tallo erecto, cilíndrico y con ramificaciones dicotómicas. El sistema radical consiste en la raíz pivotante, raíces adventicias y absorbentes, con una longitud de hasta 120 cm de profundidad. Las hojas son simples, alternas y elípticas de mayor tamaño en comparación con otros cultivares, con la presencia de un peciolo alargado verde oscuro. En cuanto a las flores, ésta es una planta monoica de flores hermafroditas con alrededor de 5-7 estambres y un solo estigma; el cáliz posee una coloración verde con cinco sépalos y la corola tiene cinco pétalos blancos. Por último, el fruto es cónico, brillante y con la presencia de un pedúnculo alargado; este

cuando está inmaduro presenta una coloración verde y rojo cuando está maduro (Bolaños *et al.*, 2018; Jiménez *et al.*, 2007).

3.1.3 Condiciones agroecológicas

3.1.3.1 Temperatura y humedad relativa del aire

La variedad Dulcítico se desarrolla de manera óptima a una temperatura media entre los 20-25°C, mientras que, en temperaturas medias superiores a los 30°C e inferiores a los 15°C, se da el aborto floral y la afectación de los frutos (Bolaños *et al.*, 2018). Sin embargo, de manera general este cultivo requiere de temperaturas entre los 13 y 24°C; durante el periodo de germinación se ha demostrado que temperaturas entre los 25-35°C son necesarias para aumentar el porcentaje de germinación. Durante la etapa vegetativa son necesarias las temperaturas entre los 17-30°C, mientras que, durante la etapa de fructificación, se han conseguido mejores resultados a temperaturas entre los 18-27°C durante el día y entre 12-16°C durante la noche (Jiménez *et al.*, 2007).

En cuanto a la humedad relativa, esta variedad se desarrolla bien a valores entre el 60-80%, sin embargo, a humedades relativas más elevadas el crecimiento del cultivo se ve favorecido (Bolaños *et al.*, 2018).

3.1.3.2 Radiación solar

El chile dulce es un cultivo altamente demandante en cuanto a la cantidad de radiación necesaria para su óptimo crecimiento; un exceso de sombra puede provocar el aborto de flores y una disminución en el crecimiento del cultivo. A pesar de esto, la presencia de un poco de sombra puede tener ciertos efectos benéficos como evitar el daño en los frutos por quema de sol y una disminución del estrés hídrico (Jiménez *et al.*, 2007; Bolaños *et al.*, 2018).

3.1.3.3 Altitud y condiciones edáficas

Esta variedad se puede cultivar en gran parte del territorio costarricense, desde los 800 msnm hasta los 2300 msnm. Se puede producir en suelos arenosos-arcillosos, volcánicos con buena capacidad de drenaje, profundos con un pH entre 5.5 y 6.5 (Jiménez *et al.*, 2007; Bolaños *et al.*, 2018).

En cuanto a sustratos este cultivo ha sido evaluado en una serie de estos, tal es el caso del suelo, la fibra de coco, así como la combinación de fibra de coco con abono orgánico, todos

estos mostrando buenos resultados con respecto al desarrollo y la producción (Bolaños *et al.*, 2018; Quesada, 2015; Monge & Loría, 2018).

3.1.4.4 Densidad de siembra

En campo abierto la variedad Dulcítico se siembra a una distancia entre plantas entre los 30-45 cm y entre hileras a una distancia entre los 100-130 cm, para densidades entre las 17 000 y 30 000 plantas/ha. En condiciones de invernadero se utiliza una densidad aproximada de 20 000 plantas, éstas sembradas a una distancia de 0,25 cm entre plantas y 1,20 cm entre hileras (Bolaños *et al.*, 2018; Jiménez *et al.*, 2007)

3.2 Ambientes protegidos

Costa Rica se encuentra ubicada en el trópico con la presencia de una gran cantidad de microclimas provocados por el sistema montañoso que atraviesa el país. Esta gran cantidad de microclimas hacen que la producción agrícola se complique debido a la presencia de plagas y enfermedades durante todo el año. La producción de hortalizas en el país se da de manera no estacional, es decir se cultiva durante todo año, donde en la mayoría de los casos la rotación de cultivos es inexistente, lo que ocasiona la selección de plagas y patógenos perjudiciales para el cultivo. Si a esto se le suman las altas lluvias y las elevadas temperaturas, dicha afectación aumenta considerablemente (Ramírez & Nihenuis, 2012). Esto ha generado un uso irracional de agroquímicos, ocasionando un gran impacto negativo en el ambiente; por lo que la implementación de ambientes protegidos ha aumentado, al ser una alternativa de producción más eficiente y con un menor uso de agroquímicos.

Los invernaderos son sistemas que permiten el control parcial o total de las condiciones climáticas que rodean al cultivo como la luz, el CO₂, temperatura y humedad. Esto se logra con el uso de ventiladores, ventanas cenitales y coberturas plásticas. Así mismo, la nutrición y el uso de agua se puede controlar con el uso de sustratos y la automatización de riego (Ramírez & Nihenuis, 2012).

En Costa Rica, el empleo del suelo en estos sistemas es el más común, seguido por sustratos inertes como la fibra de coco, la cual es comúnmente utilizada ya que posee una serie de características que facilitan las prácticas de manejo, tal es el caso de la nutrición, el riego, el control de patógenos y plagas de suelo, entre otros (Marín, 2010). La implementación de estos sustratos es ideal cuando los suelos presentes en la zona se encuentran infectados por alguna plaga y/o enfermedad, o sus características físicas/químicas no son las mejores para la producción del cultivo de interés (Ramírez & Nihenuis, 2012). Asimismo, la producción se ve

favorecida por estos sistemas, donde la cantidad de chiles por planta puede aumentar de 20 frutos/planta en campo abierto a 50 frutos/planta en invernadero. Es por esto por lo que dichos sistemas se han desarrollado con la finalidad de producir más eficientemente y los cultivos puedan expresar su máximo potencial productivo, lográndose mediante el uso eficiente del agua, nutrientes, espacio, energía, radiación solar, entre otros factores (Castilla, 2007; Ramírez & Nihenuis, 2012).

3.3 Sistemas hidropónicos

Los sistemas hidropónicos consisten en la producción de plantas sin suelo, es decir con el uso de sustratos inertes como la fibra de coco. Este tipo de sustratos se caracterizan por poseer un excelente drenaje, pero muy poca retención de agua; por esto los sistemas de riego deben ser automatizados tomando en cuenta la demanda real del cultivo, las condiciones climáticas y el potencial hídrico (Quesada, 2015).

En estos sistemas de producción, la aplicación de los fertilizantes se realiza mediante el sistema de riego (fertirriego), donde para el uso eficiente de la solución nutritiva es necesario controlar una serie de factores como el pH y la conductividad eléctrica tanto en la solución como en los sustratos (Barbaro *et al.*, 2014). El pH refleja la acidez o basicidad del sustrato, determinando si los elementos aplicados estarán solubles o insolubles para su absorción por parte de las plantas. Por debajo del valor óptimo se pueden presentar deficiencias de nitrógeno, potasio, calcio y magnesio, mientras que por encima de este se pueden presentar deficiencias de hierro, fósforo, manganeso, zinc y cobre (Barbaro *et al.*, 2014). La conductividad eléctrica (CE) refleja la cantidad de sales presentes en la solución como una medida de salinidad dada en dS/m, donde a mayor cantidad de sales, mayor serán los valores de la CE. Mantener una CE adecuada es indispensable para evitar la fitotoxicidad de las plantas (Barbaro *et al.*, 2014).

Por otra parte, existen sistemas circulatorios donde el agua de drenaje se vuelve a incorporar en el sistema mediante el ajuste de la concentración de sales, pH y CE. Esto para lograr utilizarla nuevamente en el sistema de fertirriego y hacer del sistema uno más eficiente.

El manejo nutricional en estos sistemas es de suma importancia ya que, como se mencionó anteriormente, el sustrato es inerte y la presencia de nutrientes en él es nula o están presentes en muy pocas cantidades. Existen una serie de nutrientes necesarios para el correcto crecimiento de las plantas, entre los principales el nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) (Kirkby, 2012). El N es uno de los elementos más importantes como constituyente primario esencial para la vida, este es parte de ácidos nucleicos (ADN, ARN), proteínas y clorofila

(Bernhard, 2010). Su provisión en la tierra es limitada ya que se encuentra en la atmósfera principalmente como nitrógeno diatómico (N_2) gaseoso, constituyendo un 78% de la atmósfera (Science Communication Unit, 2013). El N_2 debe pasar por una serie de transformaciones para estar disponible en la producción primaria, donde pasa de moléculas de N_2 relativamente no reactivas a moléculas más reactivas (Science Communication Unit, 2013). Esto se da mediante procesos como la fijación, nitrificación, desnitrificación y amonificación, englobados por el llamado ciclo del N (Bernhard, 2010). La fijación es el proceso que hace disponible el N para muchos organismos, pasando de N_2 a amonio (NH_3), posterior a esto ocurre la nitrificación es la transformación del NH_3 a nitrito (NO_2^-) y el NO_2^- pasa a nitrato (NO_3^-) mediante su oxidación, para finalmente regresar a la atmósfera mediante la desnitrificación el cual consiste en el paso del NO_3^- a N_2 (Figura 1) (Bernhard, 2010). Por último, el proceso de la amonificación transforma el N orgánico a N inorgánico como NH_3 regresando este al ciclo del N (Figura 1) (Bernhard, 2010).

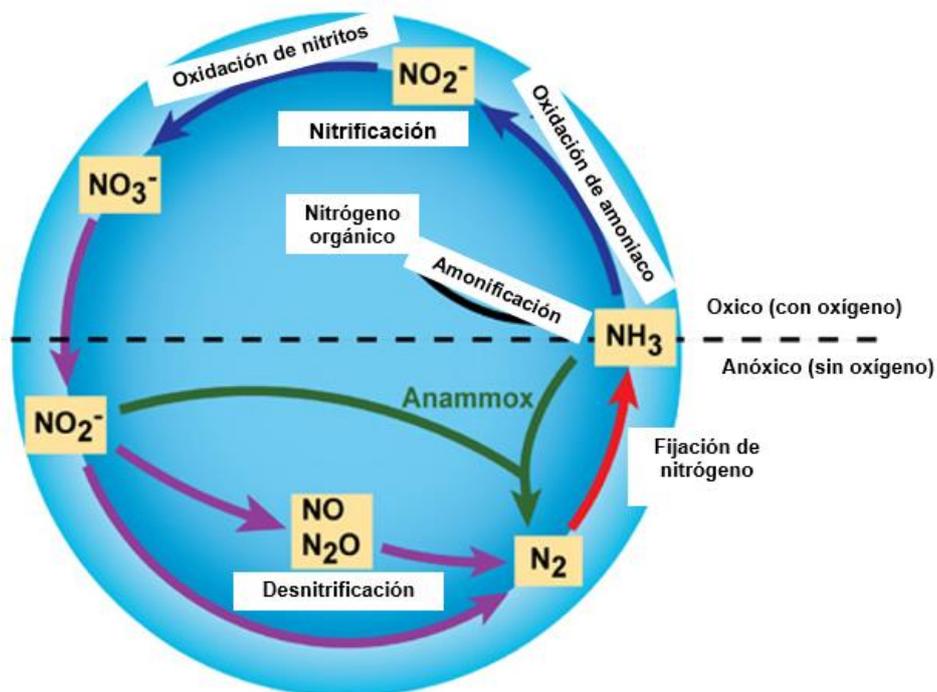


Figura 1. Ciclo del nitrógeno (Bernhard, 2010).

La agricultura utiliza cuatro principales fuentes de N reactivo, la primera de ellas son los fertilizantes sintéticos inorgánicos, la segunda es la fijación biológica de N realizada por bacterias asociadas a leguminosas las cuales tienen una gran capacidad de fijación, la tercera mediante la deposición de N atmosférico y la última es mediante la liberación de N orgánico (Bodirsky *et al.*, 2014). A pesar de todas las fuentes disponibles, la elaboración de fertilizantes

sintéticos ricos en N ha sido necesaria para lograr aumentar la productividad y suplir el incremento continuo de la demanda alimenticia, consumiéndose alrededor de 100 millones de toneladas de fertilizante nitrogenado desde el año 2010 hasta el 2020 (IFA, 2020).

Desde el inicio de la fabricación de estos fertilizantes con la revolución industrial, la fijación de nitrógeno terrestre y acuática se duplicó, lo cual ha ocasionado un desequilibrio a nivel ambiental; así, el sector agrícola se posiciona como el mayor contribuyente en la contaminación ambiental ocasionada por el N (Bodirsky *et al.*, 2014, Science Communication Unit, 2013). La contaminación ambiental producida por el exceso de N terrestre-acuático y atmosférico se define como la ruptura o la interferencia en el ciclo del N. Una serie de fuentes contaminantes contribuyen al incremento del N en la Tierra; primero se tiene la fijación de N por parte del proceso Haber- Bosch, el cual transforma el N_2 a NH_3 , siendo un 70% para la producción de fertilizantes, luego la fijación por parte de leguminosas y por último la combustión de combustibles fósiles (Science Communication Unit, 2013). Estos procesos producen compuestos como el óxido nitroso (N_2O) y el amoníaco (NH_3) que incrementan la contaminación atmosférica contribuyendo al cambio climático, mientras que compuestos como los nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) y el amonio (NH_4) incrementan la contaminación hídrica y terrestre ocasionando la eutrofización en fuentes de agua (Science Communication Unit, 2013). Dichos tipos de contaminación no son excluyentes, ya que los compuestos gaseosos pueden ser depositados en la tierra, así como los compuestos que ocasionan la contaminación terrestre o acuática pueden evaporarse hacia la atmósfera (Science Communication Unit, 2013).

Debido a esto, se ha tomado mayor importancia a la implementación de una serie de prácticas para aumentar la eficiencia en el uso de fertilizantes nitrogenados (Bauder *et al.*, sf; Barranco, 2011). Entre ellos se encuentran:

- Monitoreo del suelo para realizar las recomendaciones de fertilizante nitrogenado.
- Establecimiento de rendimientos reales para la correcta recomendación de fertilización.
- Tomar en cuenta todos los posibles aportes de N tales como la materia orgánica, el agua de irrigación, estiércol, el aporte de cultivos en ciclos anteriores como leguminosas.
- Tiempo y época de aplicación del fertilizante nitrogenado.
- Forma del fertilizante nitrogenado, por ejemplo, el NO_3 está fácilmente disponible para las plantas, sin embargo, este puede perderse mediante la lixiviación.
- Uso de fertilizantes de liberación lenta o uso de inhibidores de la nitrificación .
- Manejo del riego con el fin de evitar la lixiviación de fuentes nitrogenadas.
- Análisis del tejido vegetal y el uso de sensores para la determinación de deficiencias y/o excesos de nutrientes.

La última de estas se ha venido desarrollando con mayor fuerza en los últimos años. El uso de sensores ópticos se ha implementado en muchos sistemas productivos como es el caso de granos como el maíz, hortalizas, entre otros (O’neill *et al*, 2006; Padilla *et al.*, 2014, Padilla *et al.*, 2018). Con el uso de ellos es posible determinar el estado nutricional del N en las plantas, mediante el contenido de clorofila y/o el verdor de las plantas, por lo que es posible tomar decisiones sobre la fertilización con base en los datos obtenidos (Padilla *et al.*, 2018).

3.4 Clorofila, el proceso fotosintético y su relación con el contenido de N y el estado hídrico

Las clorofilas son pigmentos que se encuentran en las plantas, algas y cianobacterias, encargadas de otorgar la coloración verde de estas. Estos pigmentos forman parte del proceso fotosintético, facilitando la conversión de la radiación solar absorbida a energía química a través de la cosecha de luz, transferencia de energía a centros de reacción y mediante la conducción de la separación de cargas en los centros de reacción (Croft & Chen, 2017). Las moléculas de clorofila se encuentran en las membranas tilacoidales de los cloroplastos, ubicadas en las células del mesófilo de la hoja donde cada una de estas puede contener hasta 50 cloroplastos. Existen cinco tipos de clorofila: la clorofila a, b, c, d y f, las cuales presentan pequeñas diferencias en su estructura molecular. Dichas diferencias generan variaciones en sus propiedades de absorción de radiación. Las clorofilas a y b se encuentran en las plantas terrestres mientras que las clorofilas c, d y f en algas y cianobacterias (Croft & Chen, 2017). La clorofila a, es la más abundante en plantas terrestres. Está presente en los centros de reacción como primer donante y en los complejos de cosecha de radiación. Mientras que la clorofila b, es un pigmento accesorio que se encuentra en los complejos de la cosecha de radiación, con las funciones de aumentar la región espectral donde la radiación puede ser absorbida y de proveer protección para evitar daño en el tejido fotosintético (Croft & Chen, 2017).

En las membranas tilacoidales hay cientos de moléculas de clorofila, pigmentos accesorios y proteínas dispuestas en los dos fotosistemas existentes; el Fotosistema I el cual absorbe a una longitud de onda de 700 nm y el Fotosistema II que absorbe a 680 nm (Croft & Chen, 2017). En el Fotosistema II se da el primer paso de la fotosíntesis, iniciando con la absorción de fotones; éstos pasan por una serie de moléculas hasta llegar al centro de reacción conformado principalmente por clorofila a. Una vez aquí se da la transferencia del primer electrón excitado a una quinona receptora de electrones (Croft & Chen, 2017).

No toda la radiación que llega a la superficie de la hoja es absorbida para entrar en el proceso fotosintético. Cerca del 80% de la luz absorbida es utilizada en la fotosíntesis y el

porcentaje restante es reflejado (Croft & Chen, 2017). Un porcentaje considerable de la luz absorbida es transmitida y otra emite fluorescencia durante el primer paso de la fotosíntesis antes mencionado; así, al estar la quinona receptora de electrones reducida emite fluorescencia, mientras que al estar oxidada la emisión de fluorescencia es nula (Baker & Oxborough, 2004).

La radiación fotosintéticamente activa se denomina a la radiación que las plantas utilizan para el proceso fotosintético; esta se encuentra en un rango del espectro visible entre los 400 y 700 nm en los colores azul (+- 430 nm) y rojo (+- 620 -700 nm). Después de la radiación roja (620 - 700 nm), se encuentra la infrarroja cercano (NIR) en el espectro que va de 700 nm hasta 3000 nm. Dentro de la radiación NIR, en el espectro de 1300 - 2500 nm se da la transmitancia y entre las longitudes de onda 750-1300 nm domina la reflectancia sobre la absorbancia (Croft & Chen, 2017) (Figura 2 y 3).

La fluorescencia es la luz emitida por la clorofila al recibir algún tipo de radiación, ésta se determina mediante la tasa de fluorescencia. Esta tasa se basa en la eficiencia del fotosistema II (PSII), y el cociente entre la fluorescencia variable (F_v) y la fluorescencia máxima (F_m), es el más utilizado para su determinación (Figura 4) (Padilla *et al.*, 2018; Baker & Oxborough, 2004).

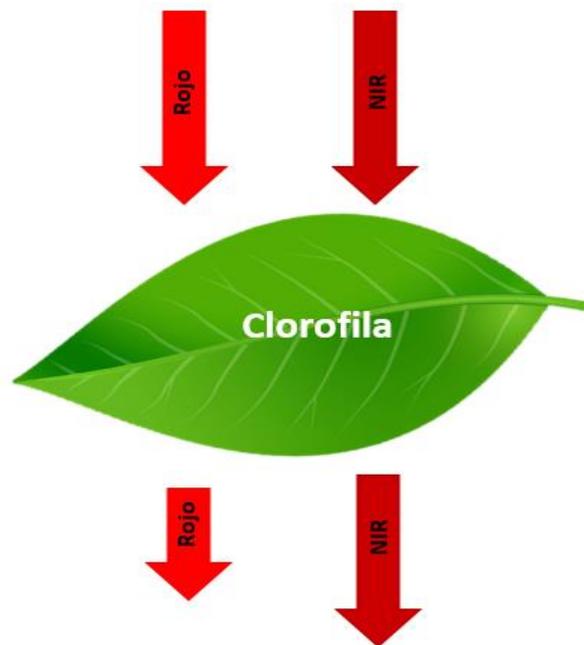


Figura 2. Transmitancia y absorbancia según la radiación roja e infrarroja cercano (NIR).

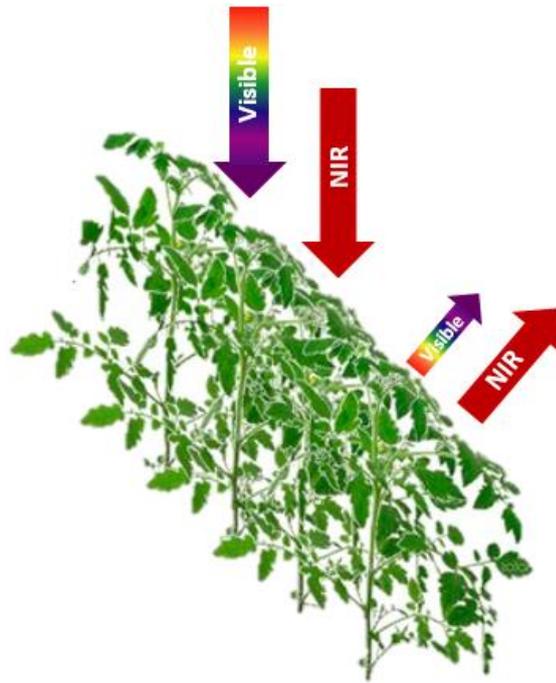


Figura 3. Reflectancia del canopy con luz visible e infrarrojo cercano (NIR).

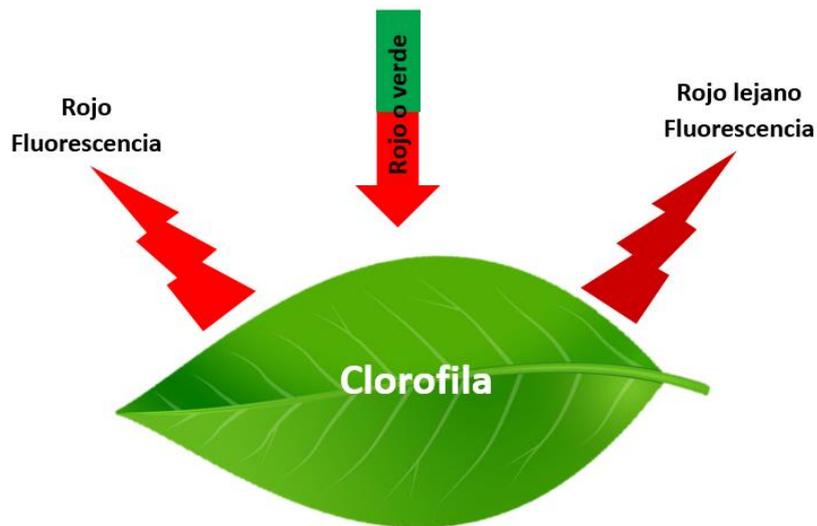


Figura 4. Fluorescencia según la longitud de onda.

La absorbancia, reflectancia y fluorescencia dependen de una serie de factores, como lo son la cantidad de pigmentos fotosintéticos, el agua, los nutrientes, la luz y el estado fisiológico. Elementos nutricionales como el N, están involucrados en el tejido fotosintético, siendo la proteína soluble dominada por la enzima Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (RuBP) y otras enzimas presentes en el ciclo de Calvin las mayores fuentes de N en las plantas (Evans, 1989). La segunda mayor fuente de N se encuentra en los centros de reacción, en los

componentes de la cadena de transferencia de electrones y en complejos de pigmentos fotosintéticos (Evans, 1989). En las proteínas de los cloroplastos y en los centros de reacción se encuentra entre un 75-80% del nitrógeno total presente en los tilacoides, es por esto que se han mostrado buenas correlaciones entre el contenido de N y el contenido de clorofila. Se ha observado que, ante dosis crecientes de N, es posible aumentar el contenido de tejido fotosintético en las plantas (Evans, 1989; Hokmalipour & Darbandi, 2011).

Aunado a esto, el estrés hídrico también influye en el sistema fotosintético, este provoca un decaimiento en la actividad de las enzimas fotosintéticas y en los contenidos de clorofila a y b. Esto debido a que puede ocasionar la degradación de la clorofila disminuyendo su concentración foliar y por ende la tasa fotosintética (Lin *et al.*, 2015).

Dado que el contenido de nitrógeno y la condición hídrica en cultivos como el chile dulce se encuentran relacionados con el contenido de clorofila, se han desarrollado una serie de técnicas que determinan mediante métodos directos e indirectos el contenido de este compuesto en las plantas. Esto permite determinar la relación entre el contenido de nitrógeno y clorofila, para establecer valores de contenido de clorofila o índices que indiquen el estado nutricional e hídrico de la planta y así obtener la información para corregir de manera inmediata los problemas presentes en el sistema. Entre las principales metodologías para esta determinación se encuentran las extracciones y el uso de sensores basados en mediciones de transmitancia, fluorescencia y reflectancia.

3.5 Sensores ópticos para la cuantificación del contenido de clorofila

Los sensores ópticos se clasifican en activos y pasivos. Los primeros se caracterizan por emitir su propia radiación o fuente de luz es decir son independientes de la luz externa. Los sensores pasivos, son dependientes de la radiación proveniente del sol, por lo tanto, poseen fotodetectores para la determinación de la medición, características que implican que las mediciones para los sensores pasivos se vean afectadas por las condiciones climáticas en el momento de la medición (Padilla *et al.*, 2018). Debido a esto, en la actualidad la mayoría de los sensores que se utilizan son activos, con el fin de evitar errores de este tipo en las mediciones y poder brindar datos válidos.

Estas mediciones también pueden resultar afectadas por factores como el cultivo y la variedad, ya que la morfología de la hoja varía e influye en los datos de clorofila, debido a que la presencia o ausencia de tricomas o de venas resaltadas en el tejido foliar interfieren con la medición. De igual manera, las deficiencias nutricionales, plagas y enfermedades pueden

provocar daños en el tejido foliar como clorosis, por lo que se deben evaluar hojas sanas (Padilla *et al.*, 2018).

3.5.1 Sensores basados en la transmitancia y absorbancia

La absorbancia y transmitancia se determinan mediante la emisión de dos rangos de radiación: la radiación roja (la cual es absorbida por la clorofila) entre 620-720 nm y la radiación infrarroja de onda corta (la cual es transmitida por la clorofila) entre 1300-2500 nm (Figura 2) (Padilla *et al.*, 2018). La medición de la transmitancia se realiza mediante la absorbancia en dos longitudes de onda, las cuales pueden variar según el instrumento; por lo tanto, al aumentar el contenido de clorofila, la transmitancia aumenta (Padilla *et al.*, 2018).

La transmitancia se puede determinar mediante instrumentos como el medidor del contenido de clorofila (Apogee MC-100) (Apogee Instruments Inc., Utah, E.E.U.U.) y desarrollo de análisis de plantas y suelo (SPAD-502) (Spectrum Technologies, Plainfield, Illinois, USA). El Apogee determina el índice de contenido de clorofila (CCI por sus siglas en inglés) mediante el porcentaje de transmitancia a 931 nm (radiación infrarroja cercana) y el porcentaje de transmitancia a 653 nm (radiación roja). Con este índice es posible determinar el contenido de clorofila ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$); entre más altos sean los valores del índice, mayor es el contenido de clorofila (Padilla *et al.*, 2018; Apogee instruments, 2018). Por otra parte, el SPAD-502 determina el índice del contenido relativo de clorofila mediante las unidades SPAD (Soil Plant Analysis Development). Este hace mediciones basadas en transmitancia y utiliza las longitudes de onda de 650 nm (radiación roja) y 940 nm (infrarroja cercana). Al pasar la luz transmitida por el tejido fotosintético, el receptor la recibe y convierte la luz transmitida en una señal eléctrica y ésta a una señal digital que, mediante una ecuación logarítmica, determina el contenido relativo de clorofila en el tejido (Padilla *et al.*, 2018; Spectrum technologies, 2009).

Padilla *et al.*, (2014), utilizaron el SPAD- 502 para evaluar el estado nutricional de un cultivo de tomate. En este estudio se determinó una buena correlación entre el SPAD con el contenido de N y con el índice de nutrición de nitrógeno (INN) y el contenido de nitrógeno. Por tanto, mediante la relación del contenido relativo de clorofila y el índice de nutrición del nitrógeno (INN) es posible determinar el estado nutricional del cultivo. Asimismo, Costa *et al.*, (2018) encontraron un aumento no lineal en el contenido de clorofila al aumentar las dosis de N, donde las plantas que presentaron un índice de 58,5 con el SPAD-502 en la etapa de floración, resultaron ser las más productivas. También, en el cultivo de chile dulce en hidroponía con dosis crecientes de N, fue posible determinar una buena correlación entre el

contenido de N y las unidades SPAD y el CCI. El SPAD fue el sensor más sensible a los excesos de N ocurriendo una saturación en la curva. De manera contraria el Apogee MC-100, tuvo un aumento progresivo al aumentar las dosis de N (Padilla *et al.*, 2018). Por otra parte, el SPAD también se ha utilizado para evaluar el efecto del déficit hídrico en un cultivo de chile, presentándose una disminución en el contenido de clorofila de hasta 25 unidades SPAD en plantas expuestas a un tratamiento sin irrigación (Deveci & Pitir, 2016).

3.5.2 Sensores basados en la fluorescencia

Las mediciones se realizan mediante un fluorómetro donde la hoja a evaluar se debe adaptar a la oscuridad, llegando a un estado donde el fotosistema II detiene su actividad. Posterior a esto, el fluorómetro emite una radiación fotosintéticamente activa por debajo de 1 $\mu\text{mol fotones/m}^2 \text{s}^2$ y determina el mínimo nivel de fluorescencia (F_0). Para la determinación de la fluorescencia máxima (F_m) se expone a la hoja adaptada a la oscuridad a una radiación PAR de varios miles de $\mu\text{mol fotones/m}^2 \text{s}^2$ por un tiempo menor a 1 s. La diferencia entre F_0 y F_m da el valor de la fluorescencia variable (F_v), por lo tanto, se determina el valor F_v/F_m y de esta manera la eficiencia del fotosistema II, los valores de este cociente tienden a encontrarse entre 0,6-0,8, indicando el valor más alto una mayor eficiencia del PSII (Padilla *et al.*, 2018; Baker & Oxborough, 2004).

El uso de fluorómetros para determinar la fluorescencia y el contenido de clorofila se han evaluado en una serie de cultivos y su uso en la determinación del efecto del déficit hídrico sobre la planta ha sido efectivo. O'Neill *et al.*, (2006) mencionan que, mediante mediciones de fluorescencia, se evaluó el contenido de clorofila, así como la eficiencia del fotosistema II y la tasa de transporte de electrones en plantas de maíz con déficit hídrico, encontrando una correlación entre dichas variables, donde la variable F_v/F_m disminuyó en las plantas bajo déficit hídrico.

3.5.3 Sensores basados en la reflectancia

La reflectancia es la radiación reflejada por las plantas. Esta se determina mediante dos rangos de radiación, la radiación roja y la infrarroja cercana. El tejido foliar normalmente absorbe cerca del 90% de la radiación visible y refleja alrededor del 50% de la radiación infrarroja cercana. Dicha absorbancia y reflectancia varía dependiendo del contenido de N en la planta; al disminuir los contenidos de N, el tejido va a reflejar más la radiación visible y menos la radiación infrarroja cercana (Padilla *et al.*, 2018). Los instrumentos como el espectro-

radiómetro y el GreenSeeker, se basan en esta medición, estos utilizan distintas longitudes de onda de luz roja y luz infrarroja cercana.

El espectroradiómetro brinda una serie de datos de mediciones de reflectancia de longitudes de onda, entre 350 y 2500 nm. Con estos datos es posible determinar cuáles longitudes de onda son las indicadas para la determinación de índices que indiquen el estado nutricional e hídrico de la planta. Existen una gran cantidad de índices que se pueden determinar mediante los datos suministrados por el espectroradiómetro, entre ellos se encuentran el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI, por sus siglas en inglés), índice de la diferencia normalizada del verdor de la vegetación (GNDVI, por sus siglas en inglés), índice del ratio rojo de la vegetación (RVI, por sus siglas en inglés), índice del ratio verde de la vegetación (GVI, por sus siglas en inglés), índice de clorofila (CI, por sus siglas en inglés), entre otros (Padilla *et al.*, 2018).

Por otra parte, el GreenSeeker utiliza las longitudes de onda de luz roja (570-680 nm) la cual es emitida hacia las plantas y mide la radiación que reflejan las plantas, la luz infrarroja cercana (725-1020 nm). Con estos valores determina el NDVI, el cual se determina mediante la siguiente ecuación:

$$NDVI = \frac{NIR - RED}{NIR + RED}$$

Los datos obtenidos por dicha fórmula van de -1 a 1, los valores más altos están entre 0,7- 0,8, indicando plantas en buenas condiciones (Gutiérrez *et al.*, 2011).

Padilla *et al.*, (2014), encontraron buena relación entre el NDVI con el contenido de N e INN, mostrando que es posible determinar el estado nutricional del N mediante el uso del NDVI. Por otro lado, mediante el uso de un espectroradiómetro, se determinó el efecto del déficit hídrico sobre el contenido de clorofila en el cultivo de maíz, donde se presentaron reducciones en el contenido de clorofila de hasta alrededor de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en plantas expuestas a estrés hídrico (Sánchez *et al.*, 1983). En otro estudio, mediante la medición de la reflectancia en un cultivo de tomate, se determinó que el rango de las longitudes de onda entre 400-700 nm es donde se encuentra una mejor correlación entre el contenido de N y la medición de la clorofila (Ulissi *et al.*, 2011). El equipo emite las dos longitudes de onda y la diferencia entre la radiación que este emite y la radiación que proviene del ambiente, por lo tanto, las mediciones se pueden realizar durante todo el día (Padilla *et al.*, 2018).

Entre muchas de las mediciones realizadas por los instrumentos mencionados anteriormente, es posible realizar comparaciones. En el cultivo de café fue posible

correlacionar las mediciones entre el SPAD y el fluorómetro (Netto *et al.*, 2005). Asimismo, los valores obtenidos mediante el Apogee MC-100 (CCI) se pueden transformar a $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ de clorofila y a unidades de SPAD (contenido relativo de clorofila) (Apogee instruments, 2018).

3.6 Extracción de clorofila in vivo

La extracción de pigmentos in vivo de tejido de hoja se realiza con el uso de solventes como el etanol, acetona o sulfóxido dimethyl. El solvente más utilizado es la acetona, sin embargo, el proceso es poco eficiente en comparación con el etanol y el metanol. Posterior a su extracción, la medición se realiza en un espectrofotómetro donde se mide la absorbancia a dos longitudes de onda definidas por el tipo de solvente utilizado. Una vez obtenidos los datos de absorbancia, se procede a determinar el contenido de clorofila a y b mediante una ecuación de calibración de acuerdo al solvente utilizado (Cuadro 1). Esta ecuación debe ser derivada de los coeficientes de extinción determinados para el solvente utilizado, ya que los picos de absorción de los pigmentos varían dependiendo de la solución extractora (Croft & Chen, 2017).

Cuadro 1. Ecuaciones para la determinación del contenido de clorofila según el tipo de solvente (Croft & Chen, 2017). Ecuaciones para la determinación del contenido de clorofila según el tipo de solvente (Croft & Chen, 2017). abs= absorbancia.

Solvente	Clorofila a	Clorofila b
Acetona 80%	$(12.25 \times \text{abs}_{663.6}) - (2.55 \times \text{abs}_{646.6})$	$(20.31/1646.6) - (4.91 \times \text{abs}_{662.6})$
Etanol 95%	$(13.36 \times \text{abs}_{664}) - (5.19 \times \text{abs}_{649})$	$(27.43 \times \text{abs}_{649}) - (8.12 \times \text{abs}_{664})$
Metanol	$(16.29 \times \text{abs}_{665.2}) - (8.54 \times \text{abs}_{652})$	$(30.66 \times \text{abs}_{652}) - (13.58 \times \text{abs}_{665.2})$

4. Materiales y métodos

4.1 Sitio experimental

El proyecto se realizó en la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno (E.E.F.B.M) de la Universidad de Costa Rica, ubicada en La Garita de Alajuela a una altitud de 840 msnm (coord. 10° 01' N, 84° 16' W). Esta zona presenta un promedio de precipitación anual de 1 940 mm y una temperatura promedio anual de 22° C y 78% de humedad relativa.

Se utilizó el invernadero multitunel destinado para la investigación de hortalizas, el cual tiene una orientación este-oeste, cerrado con malla anti-insectos 43 mesh y con una cubierta de

polietileno transparente, con un ground cover blanco que cubría el suelo, sobre el cual se colocaron las pacas de sustrato. Posee una altura de 6 m al centro de la nave y 4 m a la canoa, con un sistema de ventilación pasivo combinado con ventanas cenitales automatizadas según la intensidad de la lluvia y la velocidad del viento (Figura 5).



Figura 5. Invernadero de la E.E.F.B.M utilizado para este estudio, el área demarcada con rojo corresponde a la ubicación del experimento.

4.1.2 Condiciones climáticas del sitio experimental

Se realizaron monitoreos dentro del invernadero en tiempo real durante 24 semanas iniciando en abril y hasta el mes de octubre del año xxxx. Las condiciones monitoreadas consistieron en la radiación global mediante un piranómetro (LICOR Modelo LI-200SA), la temperatura y la humedad relativa (VAISALA Modelo HMP-35C) (Figura 6-8). En las Figuras 6, 7 y 8 se muestran las condiciones de temperatura, humedad relativa y radiación global.

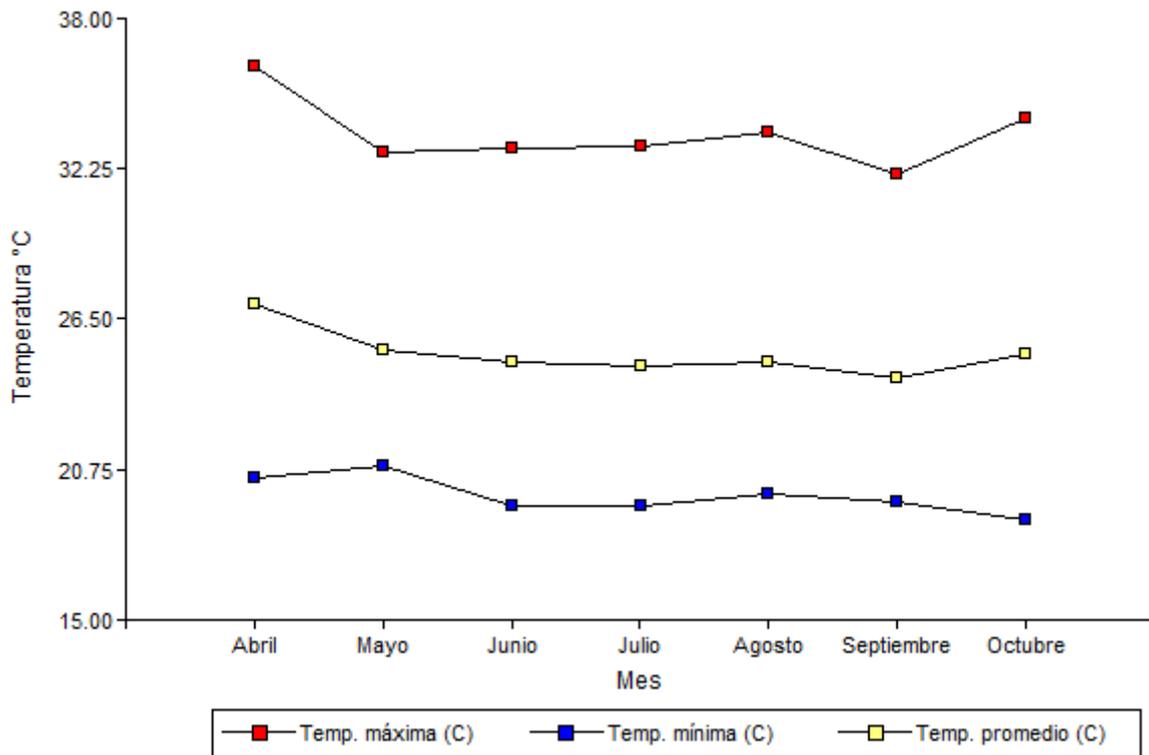


Figura 6. Temperatura máxima, mínima y promedio del invernadero utilizado.

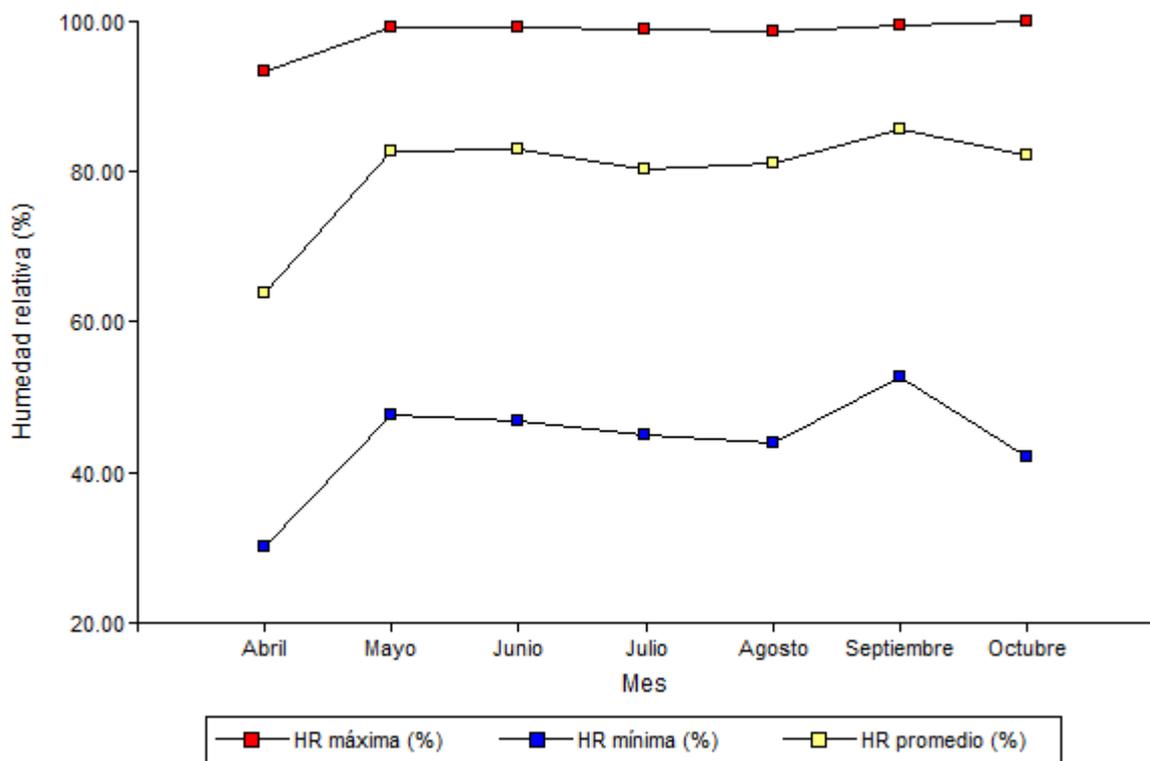


Figura 7. Humedad relativa máxima, mínima y promedio del invernadero utilizado.

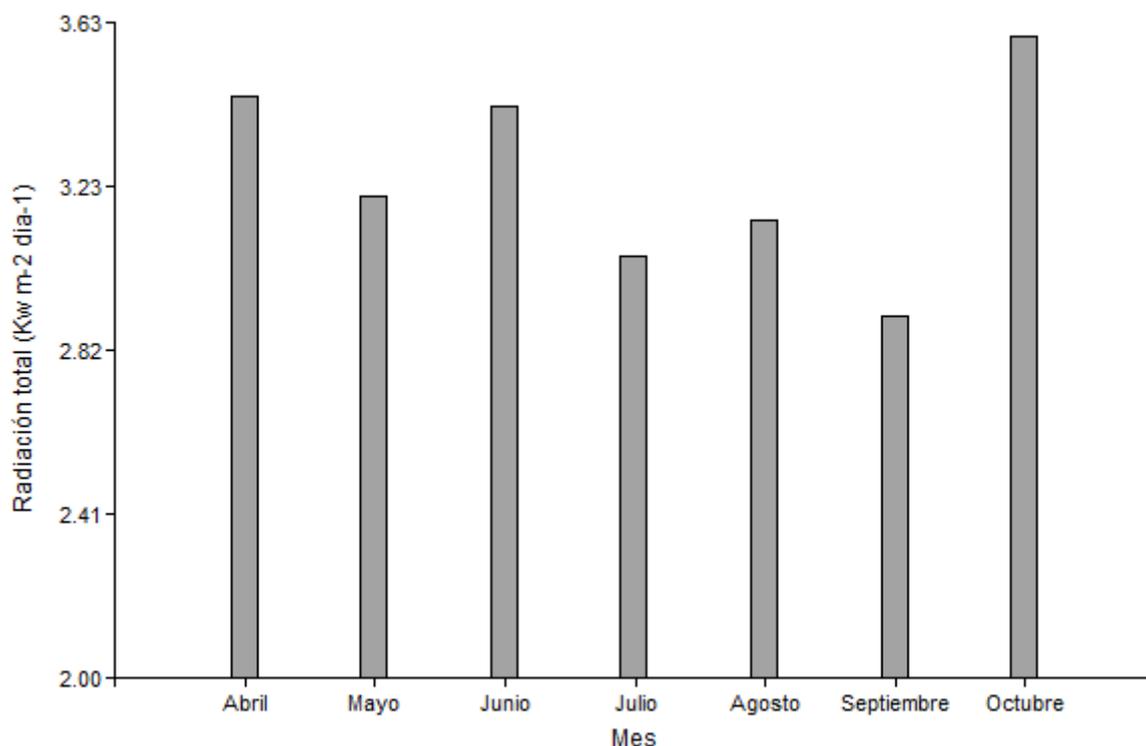


Figura 8. Radiación total Kw/m²día en el invernadero utilizado.

4.2 Sistema de cultivo

- **Material vegetal experimental**

Se utilizaron plantas de chile dulce de la variedad Dulcítico desarrollado en la EEFBM de la Universidad de Costa Rica. Esta variedad posee un crecimiento indeterminado que puede llegar a alcanzar más de 300 cm en condiciones de invernadero, caracterizado por la presencia de un tallo erecto, cilíndrico, con ramificaciones dicotómicas y con la presencia de frutos cónicos, brillantes y de pedúnculo alargado (Bolaños *et al.*, 2018; Jiménez *et al.*, 2007).

- **Sustrato**

El cultivo se estableció en tablas comprimidas de fibra de coco (FICO®) con dimensiones de 100 cm de largo x 18 cm ancho x 16 cm de alto. Las pacas fueron sometidas a un proceso de hidratación inicial mediante riegos cortos y frecuentes, hasta alcanzar un volumen final de 28,8 litros. Una vez hidratadas se le realizaron los agujeros de drenaje en la parte inferior de la paca, siendo tres en los extremos, uno en cada esquina y uno en el medio, así como dos agujeros a la mitad de la paca. Las características físicas del sustrato fueron determinadas utilizando la metodología propuesta por UNE-EN-13041 (2007). (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características físicas de la fibra de coco utilizada como sustrato para el cultivo de chile dulce hidropónico bajo condiciones de invernadero.

Características físicas	Fibra de coco	% Óptimo
Partículas < 1 mm = índice de grosor (%)	83,0	--
Partículas entre 1 y 4 mm (%)	58,0	--
Partículas > 4 mm (%)	25,0	--
Densidad aparente (g·cm ⁻³)	0,075	--
Densidad real (g·cm ⁻³)	0,650	--
Porosidad total (%)	88,5	> 85%
Partículas sólidas (%)	11,5	< 15%

4.3 Manejo del cultivo

- **Trasplante**

El trasplante se realizó a los 35 días después de la siembra con 4-5 hojas verdaderas. Para determinar la viabilidad del almácigo, previo al trasplante se realizaron evaluaciones del diámetro del tallo, área foliar, relación raíz/parte aérea y el peso seco (Anexo 1).

Se establecieron 12 hileras distanciadas a 1,5 m; cada una de las hileras estuvo conformada por 34 pacas de fibra de coco. Las plantas se establecieron cada 0,33 m en las pacas (3 plantas/paca), para un total de 1224 plantas, con 45 plantas por repetición. Alrededor de toda la parcela se estableció un borde con 138 pacas y 414 plantas de chile dulce (Figura 11).

- **Sistema de riego**

Se utilizó un sistema de riego por goteo superficial el cual estuvo compuesto por tanques de 2500 litros, bombas eléctricas (FORAS[®] PM 115, 1 HP), manómetros de glicerina y tuberías primarias de polietileno de 1". En cada hilera de cultivo se utilizaron laterales de riego de media pulgada provistos de goteros (NAANDANJAIN[®]) auto compensados y antidrenantes (3 L·h⁻¹). Cada unidad experimental correspondió a un sector de riego

independiente, controlados cada uno por medio de una válvula solenoide. El sistema de riego fue lavado con ácido nítrico para eliminar posibles residuos de sales en tuberías y goteros.

- **Sistema de entutorado**

El entutorado se realizó con nylon y anillos plásticos, los cuales se colocaron en la primera bifurcación de las plantas. Después, las ramas emergentes se sujetaron con nylon a los anillos colocados en el nylon principal, mientras que los brotes vegetativos por debajo de la primera bifurcación fueron eliminados.

- **Manejo fitosanitario**

Previo al establecimiento del sistema de cultivo, se realizó una desinfección de toda la infraestructura, incluyendo las superficies del invernadero cubierto con “ground cover” utilizando cloro al 5%.

El almácigo, antes de ingresar al invernadero y previo al trasplante fue sumergido en una solución de Rooting al 0,1%, vitaminas, citoquininas, ácido fosfórico y *Trichoderma* a una dosis de 6 Kg·ha⁻¹. Todas las semanas se realizaron monitoreos de plagas y patógenos con el fin de detectar su posible incidencia para la toma de decisiones y aplicaciones preventivas o curativas.

4.4 Descripción de los tratamientos

Se evaluaron seis tratamientos que combinaron dos niveles de agotamiento del contenido de humedad volumétrica en el sustrato: 10% y 30%; y tres niveles de concentración de nutrientes en solución nutritiva: bajo (B), medio (M) y alto (A) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos evaluados (B: nutrición baja, M: nutrición media, A: nutrición alta; 10: 10% de agotamiento hídrico, 30: 30% de agotamiento hídrico).

Descripción de tratamiento		Abreviatura
Nivel de nutrición	Agotamiento (%)	
Bajo	10	B ₁₀
	30	B ₃₀
Medio	10	M ₁₀
	30	M ₃₀
Alto	10	A ₁₀
	30	A ₃₀

Los tratamientos según nivel de concentración de nutrientes iniciaron el 10 de mayo del 2019; durante el establecimiento del cultivo en las primeras dos semanas se utilizó una sola solución nutritiva para la fertilización de todo el material. Esta consistió en la nutrición media (Cuadro 3), esta solución media fue un promedio de las concentraciones de nutrientes reportadas por distintos autores para la nutrición de chile dulce (Anexo 2). Posterior a esto, se definió la solución baja, la cual consistió en una reducción del 50% de la solución media, mientras que en la solución nutritiva alta se incrementó un 50% con respecto a la solución nutritiva media. El nivel de concentración de cada nutriente utilizado durante esta investigación para las tres soluciones nutritivas se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Concentración de nutrientes en las soluciones nutritivas utilizadas en los tratamientos con un nivel de nutrición bajo (B), medio (M) y alto (A).

Aporte	Concentración (mg·L ⁻¹)												CE (dS· m ⁻¹)	
	Mayores						Menores							Total (g·L ⁻¹)
	N	P	K	Mg	Ca	S	Fe	Cu	Mn	Zn	B	Mo		
B	58,4	18,9	118,6	18,1	74,4	42,9	1,03	0,05	0,22	0,20	0,20	0,14	0,33	0,66

M	116,8	37,7	237,1	36,1	148,7	85,8	2,07	0,09	0,43	0,40	0,39	0,28	0,67	1,15
A	175,2	56,6	355,7	54,2	223,1	128,7	3,10	0,14	0,65	0,60	0,59	0,42	1,00	1,65

En la preparación de las soluciones nutritivas se utilizó nitrato de potasio, nitrato de calcio, sulfato de potasio, sulfato de magnesio, fosfato monopotásico, ácido nítrico, ácido bórico, auge molibdeno, EDDHA de hierro y metalosatos de hierro, cobre, manganeso y zinc. Cada solución nutritiva B, M y A se aplicaron durante las distintas etapas fenológicas del cultivo, durante un periodo de cinco meses y medio.

Los porcentajes de agotamientos hídricos se realizaron con base en la curva de retención de humedad del sustrato determinada según la norma UNE-EN-13041 (2007). Para ello, se determinó el porcentaje de humedad volumétrica (θ) en muestras sometidas a valores de potencial mátrico (ψ_m) de 1, 2,5, 5,0, 7,5 y 10 kPa, utilizando un equipo de caja de arena (Eikelkamp, mod. 08.01). Para cada ψ_m se utilizaron tres repeticiones y se asumió que la θ a 1 kPa y a 10 kPa correspondieron a la capacidad de contenedor (θ_{CC}) y al punto de marchitez permanente (θ_{PMP}), respectivamente. La capacidad de aireación (%) del sustrato en cada ψ_m se obtuvo como la diferencia entre la P_t y el porcentaje de θ respectivo. El porcentaje de agua total disponible (%ATD) en el sustrato ($\theta_{CC} - \theta_{PMP}$), incluyó los porcentajes de agua fácilmente disponible (%AFD) y agua de reserva (%AR). El %AFD se obtuvo a partir de la diferencia entre θ_{CC} y θ a 5 kPa (θ_{5kPa}), mientras que el %AR correspondió a la diferencia entre θ_{5kPa} y θ_{PMP} .

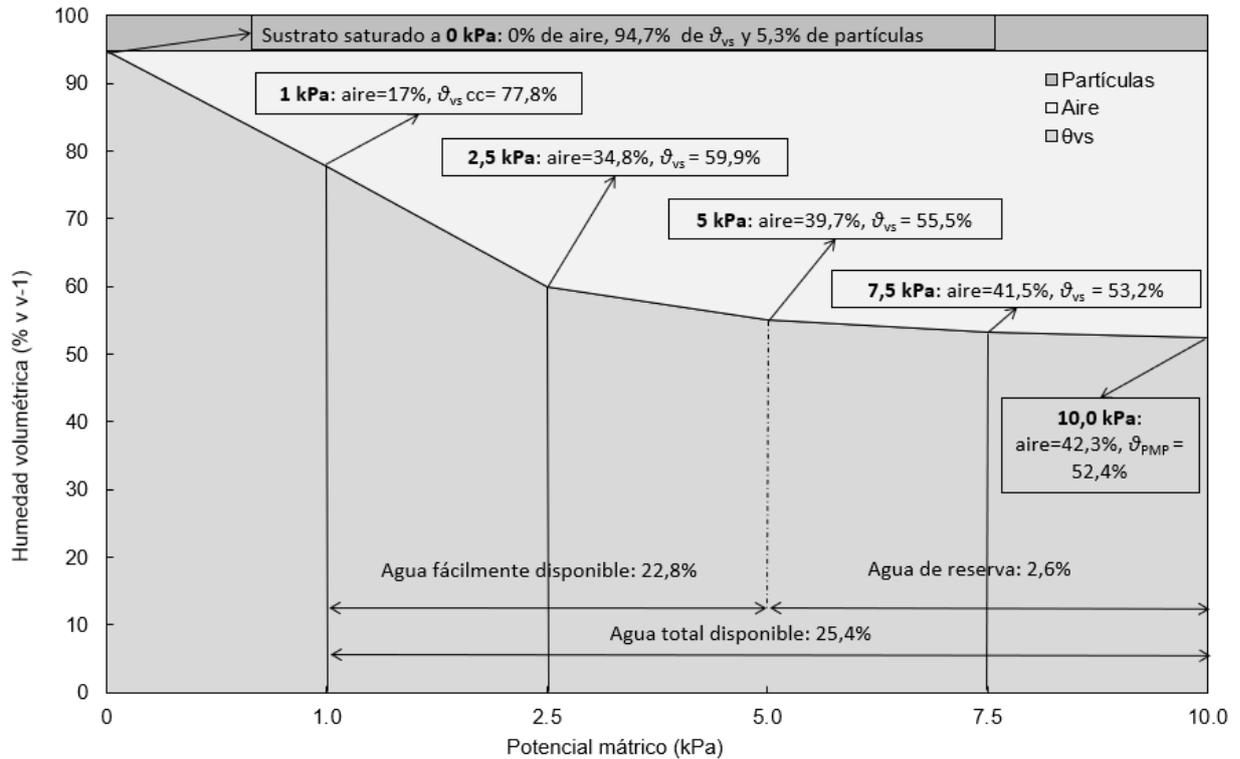


Figura 9. Contenido de partículas sólidas y capacidad de aireación según curva de desorción de agua a diferente potencial mátrico; y contenidos de agua fácilmente disponible (AFD), agua de reserva (AR) y agua total disponible (ATD), en la fibra de coco utilizada.

A partir de la disminución del contenido de θ_{CC} y del volumen de sustrato de la tabla de fibra de coco, se determinó el contenido humedad del sustrato al cual debió activarse el riego y el volumen de riego a aplicar según porcentaje de agotamiento (Cuadro 5). El sustrato de fibra de coco presentó una θ_{CC} de 77,8% (1 kPa) y una θ_{PMP} de 52,4% (10 kPa), para un 25,4% de ATD. El AFD almacenada entre θ_{CC} y θ_{5kPa} fue de 22,8% (Figura 9).

Con los datos obtenidos, se determinaron los volúmenes de agua almacenada en los 28,8 L que poseían las tablas utilizadas en el experimento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tipos de agua presentes en la tabla de fibra de coco utilizadas en la investigación.

Tipos de agua	Litros
Agua de reserva	0,75
Agua fácilmente disponible	6,6
Agua total disponible (fácilmente disponible + agua de reserva)	7,3
Agua no disponible	15,1

Dicha información fue utilizada para la determinación de los porcentajes de agotamiento hídrico, determinados mediante una regresión lineal de la humedad volumétrica del sustrato (θ) presente en los distintos potenciales mátricos (ψ_m), con el contenido de agua en litros para cada punto (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de humedad volumétrica para la activación del riego y volumen de riego a aplicar.

% de agotamiento	% Hv de activación del riego	Volumen de riego (L)
15	70,139	2,9
30	54,514	8,6

Para el control del volumen de riego anteriormente estimado y el manejo de la frecuencia entre riegos, se utilizó una bandeja de riego a la demanda (BRD) del cultivo, en respuesta a su etapa de crecimiento y las condiciones climáticas del día. La bandeja consistió en una canoa de madera impermeabilizada con plástico negro sobre la cual se colocó una tabla de fibra de coco con tres plantas. En cada BRD, una por cada UE, se instaló un tensiómetro (Irrometer Model LT y Model MLT con unidades de detección remota) y un pluviómetro (ECRN-100) para monitorear en tiempo real el potencial mátrico, y el volumen de agua drenado posterior a cada riego. Dicha información fue integrada mediante un algoritmo que activaba y

desactivaba el riego en función de la demanda del cultivo. Cuando la humedad del sustrato disminuía debido a la evapotranspiración del cultivo un 10% o un 30% según los tratamientos, el algoritmo enviaba una señal que activaba la bomba de riego y la válvula correspondiente al sector que demandaba agua en dicho momento, para reponer el agua faltante y nuevamente incrementar la humedad del sustrato hasta capacidad de campo. Una vez que alcanzaba el contenido de humedad a CC, el algoritmo permitía aplicar un volumen de agua extra con respecto al volumen suministrado previamente, con el objetivo de obtener un 15% de agua drenada. El cumplimiento de este punto se monitoreó y verificó con ayuda del pluviómetro.

En este trabajo, cada unidad experimental contó con una BRD ubicada en la parte central, para un total de 18 bandejas de control (Figura 10).



Figura 10. Bandeja de riego a la demanda utilizada para el control del riego en el experimento.

Aunado a los monitoreos antes mencionados, se realizaron mediciones de la conductividad eléctrica del sustrato en cada tratamiento mediante la metodología de pasta saturada. Este consistió en la toma de muestras de sustrato de las tablas, las que se colocaron en un beaker de 500 mL para su saturación con agua desionizada. La muestra se dejó reposar aproximadamente una hora para lograr que las sales presentes en el sustrato se disolvieran en el agua. Posteriormente, se filtró el agua mediante un sistema de succión (bomba de succión, Kitasato con embudo Buchner y papel filtro), para finalmente tomar la medición con el agua obtenida mediante el filtrado del sustrato.

4.5 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en un diseño irrestricto al azar, con un arreglo bifactorial que combinaba dos niveles de humedad de sustrato y tres niveles de nutrición con tres unidades experimentales por tratamiento. La unidad experimental estaba compuesta por tres hileras de cinco tablas de fibra de coco, con tres plantas cada una para un total de 45 plantas. Alrededor de toda la parcela experimental se estableció un borde con 138 pacas y 414 plantas de chile dulce, los bordes del lado este, oeste y norte contaron con dos hileras, mientras que el borde sur sólo contó con una hilera de borde (Figura 11).

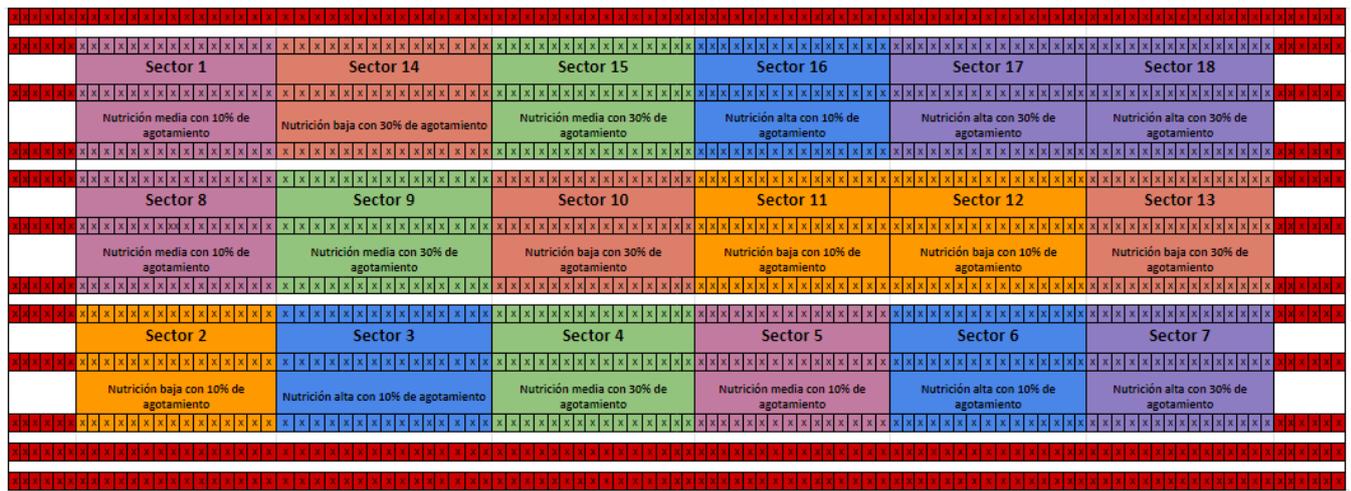


Figura 11. Distribución de los tratamientos en el área de cultivo según diseño experimental. Los colores indican el tratamiento: amarillo = Nutrición baja con 10% de agotamiento, rosado = Nutrición media con 10% de agotamiento, azul = Nutrición alta con 10% de agotamiento, verde = Nutrición media con 30% de agotamiento, naranja = Nutrición baja con 30% de agotamiento y morado = Nutrición alta con 30% de agotamiento, el color rojo “x” representa el borde.

4.6 Variables de respuesta

4.6.1 Medición del contenido de clorofila

Se realizaron evaluaciones mensuales del contenido de clorofila con cinco equipos de medición distintos y con la metodología convencional mediante una extracción con etanol. Los equipos utilizados fueron: SPAD-502, Apogee (MC-100), Fluorómetro, Espectroradiómetro (Field Spec 4) y Greenseeker.

Las mediciones iniciaron 15 días después de comenzar los tratamientos, para un total de cinco evaluaciones durante todo el ciclo del cultivo. Para el SPAD-502, Apogee MC-100, fluorómetro y espectroradiómetro, se tomaron tres plantas al azar por unidad experimental. Para cada evaluación, se seleccionó una de las hojas más nuevas totalmente expandidas de cada

planta y la medición se realizó en el centro de la lámina foliar, en la parte adaxial de la hoja y a un costado de la vena central (Figura 12) según la metodología descrita por Padilla *et al.*, (2017, 2018). Todas las mediciones para los cuatro sensores se realizaron en la misma hoja y en la misma planta, entre las 8 a.m. y 11 a.m. con el fin de evitar que las plantas estuvieran expuestas al estrés ocasionado por las condiciones ambientales.



Figura 12. Parte de hoja donde se realizó la toma de mediciones con los distintos instrumentos.

Las mediciones con el SPAD-502 tuvieron un área de medición de 6 mm^2 , utilizando las longitudes de onda 650 y 940 nm para la determinación del contenido relativo de clorofila en unidades SPAD.

El Apogee (MC-100) con un área de $71,22 \text{ mm}^2$, utiliza las longitudes de onda de 653 y 931 nm, con las cuales determina mediante la transmitancia y el índice de contenido de clorofila (CCI). Dicho índice es el cociente entre el % de transmitancia a 931 nm (radiación infrarroja cercana) y el % de transmitancia a 653 nm (radiación roja). A su vez, con este índice se determina el contenido de clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$) (Apogee Instruments, 2018).

El fluorómetro utilizado (Opti-Sciences OP 30 P), determina el cociente F_v/F_m . Para dicha determinación, se colocó el clip del fluorómetro en la parte adaxial de la hoja, en el centro de la lámina foliar a un costado de la vena principal y consecutivamente, dicho segmento de la hoja se adaptó a la oscuridad durante 30 minutos (Opti-Sciences, 2012).

El espectroradiómetro utilizado (Field Spec 4 Standard-Res), realiza mediciones en un rango de longitudes de onda de 350 a 2500 nm y un área de medición de alrededor de 10 mm^2 (Neuwirthová *et al.*, 2017). Las mediciones se tomaron en la hoja más nueva recientemente

expandida, en la parte adaxial, tomando una medida puntual, las longitudes de onda utilizadas para la determinación del NDVI fueron, 670 y 760 nm.

El GreenSeeker (modelo RT100, NTech, California, EE. UU.) utiliza las longitudes de onda comprendidas entre 570 y 680 nm (luz roja) y entre 725 y 1020 nm (luz infrarroja cercana) para la determinación del NDVI. Para la medición, se recorre con el equipo 5 m a lo largo de una hilera por unidad experimental a una distancia del cultivo entre 80-120 cm (Gutiérrez *et al.*, 2011).

Ambos NDVI, se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{NDVI} = \text{NIR}_{(760, 680)} - \text{RED}_{(670, 570)} / \text{NIR}_{(760, 680)} + \text{RED}_{(670, 570)}$$

4.6.2 Determinación directa del contenido de clorofila

Se utilizó la metodología planteada por Ni *et al.*, (2015), Lichtenthaler & Wellburn (1995), Caesar *et al.*, (2018) y modificaciones realizadas por el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica. Se muestrearon entre dos y tres discos con un área de 6,16 cm² en cada hoja previamente evaluada con los sensores, para un total de seis a ocho discos por unidad experimental.

Extracto: Se pesaron aproximadamente 0,2 g (6-8 discos de hoja) de 6,16 cm² y se colocaron en tubos Falcon forrados con papel aluminio. Posterior a esto se agregó nitrógeno líquido y con ayuda de un mortero y pistilo se trituró la muestra, la cual una vez triturada, se le agregó 2 mL de etanol al 95% y se agitó en el vortex. La muestra se llevó al baño ultrasónico durante 35 minutos e inmediatamente se llevó a la centrífuga a 3000 rpm durante un periodo de 10 minutos a 4°C. El extracto se llevó a 6 mL con etanol al 95%, para luego tomar 1 mL del extracto y seguidamente diluirlo en 7 mL de etanol al 95%.

Determinación de la cantidad de clorofila: se midió la densidad óptica a 665 nm para la clorofila a y 649 nm para la clorofila b, el blanco se llenó con etanol y cada muestra se midió por triplicado. Posterior a esto, se anotaron las absorbancias y se determinó la cantidad de clorofila en mg g⁻¹ de tejido foliar mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g}) = 13,95 (A_{665}) - 6,88 (A_{649}) \times \text{FD} \times \text{S}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g}) = 24,96 (A_{649}) - 7,32 (A_{665}) \times \text{FD} \times \text{S}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu\text{g}) = \text{Clorofila a} + \text{clorofila b}$$

$$\text{Clorofila a + b } (\text{mg m}^{-2}) = \text{clorofila a + b} / \text{área} \times 1000$$

Donde:

A= absorbancia del extracto de clorofila leída a la longitud de onda indicada en el subíndice

FD= factor de dilución

S= cantidad de solvente (mL)

4.6.3 Determinación del contenido de N en las hojas

La determinación del contenido de N foliar se realizó mensualmente en las mismas hojas de las plantas muestreadas por los instrumentos durante los cinco meses del experimento, mediante el método de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883). Se tomaron las hojas evaluadas por el método directo y los métodos indirectos por unidad experimental (Padilla *et al.*, 2018). Dichas muestras se llevaron a analizar al Laboratorio de Foliares del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica.

4.6.4 Rendimiento

Para evaluar el rendimiento del cultivo se seleccionaron e identificaron 10 plantas por unidad experimental de cada tratamiento. Las cosechas se realizaron semanalmente y se realizó una clasificación de los frutos según calidad, en categorías de primera (peso > 119 g), de segunda (peso entre 86-118g), de tercera (<85g) y el desecho (fruto que presentó algún tipo de daño). Esto se realizó con el objetivo de realizar una correlación con el contenido de N y de clorofila de cada tratamiento.

4.7 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de los datos obtenidos de las mediciones directas para determinar el cumplimiento de supuestos de normalidad y homocedasticidad del análisis de varianza (ANDEVA). Cuando dichos supuestos se cumplieran, se realizó un ANDEVA para determinar si hubo interacción entre los niveles de nutrición y de porcentaje de agotamiento. Cuando hubo interacción entre ambos factores, se analizaron los efectos simples de los tratamientos mediante la comparación múltiple de medias según Tukey ($P < 0,05$). Cuando no hubo interacción

($P > 0,05$), se analizaron los efectos principales, agrupando los datos por nivel de factor o de ambos factores, que fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$).

Adicionalmente, se determinó la relación entre los contenidos de N y de clorofila. Se determinó cuál instrumento de medición de clorofila, presentó la mayor relación con los contenidos de N y de clorofila en la hoja, así como su relación con el rendimiento, todo este análisis se realizó mediante un análisis de regresión.

5. Resultados

Efecto de la nutrición y el agotamiento hídrico en el contenido de clorofila, nitrógeno y el rendimiento

En el presente estudio, únicamente se presentó efecto ($P < 0,05$) del nivel de nutrición (Cuadro 7) para las variables de contenido de N y rendimiento nutrición. No hubo efecto ($P > 0,05$) del nivel de agotamiento ni de la interacción entre los factores de nutrición y agotamiento hídrico sobre las variables directas evaluadas.

Cuadro 7. Análisis de varianza que muestra los efectos individuales o la interacción de la condición de agotamiento (A) y del nivel de nutrición (N) sobre las variables directas de contenido de clorofila (mg g^{-1}), contenido de nitrógeno (N%) y rendimiento (Kg planta^{-1}).

Efecto	Variable		
	Clorofila $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	N (%)	Rendimiento ($\text{Kg} \cdot \text{planta}^{-1}$)
A			
N		*	*
AxN			

* Indica interacción o efectos independientes ($P < 0,05$) de la condición de agotamiento (A) y del nivel de nutrición (N).

El cultivo de chile dulce no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los niveles de nutrición en el contenido de clorofila (mg g^{-1}); sin embargo, se observa una tendencia hacia un comportamiento creciente de las variables al aumentar el nivel de concentración de nutrientes en solución nutritiva (Cuadro 8).

Por otra parte, se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) en las variables del contenido de N (%) y rendimiento (Kg planta^{-1}) (Cuadro 8). En este caso, el tratamiento de nutrición baja fue estadísticamente distinto al de nutrición media y alta, donde estos últimos fueron estadísticamente iguales ($P > 0,05$) para ambas variables (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de medias del efecto del nivel de concentración de nutrientes (Baja, Media y Alta) en las variables evaluadas directamente en plantas de chile dulce hidropónico var. Dulcítico, Alajuela, Costa Rica, 2019, mediante la prueba Tukey. Las letras distintas indican las diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$).

Variable	Tratamiento	Media	n	E.E	
Clorofila mg g^{-1}	Baja	0,95	30	0,11	A
	Media	1,00	30	0,11	A
	Alta	1,23	30	0,11	A
N (%)	Baja	4,80	10	0,16	A
	Media	5,36	10	0,16	B
	Alta	5,47	10	0,16	B
Rendimiento Kg planta^{-1}	Baja	1,99	28	0,24	A
	Media	3,54	28	0,24	B
	Alta	3,56	28	0,24	B

E.E = error estándar.

Análisis de regresión entre medidas directas e indirectas

A continuación, se muestran los análisis de regresión entre las variables medidas directamente (nitrógeno (N), clorofila (Cl) y rendimiento) y las variables medidas indirectamente con diferentes equipos, de transmitancia (SPAD, CCI), de fluorescencia ($F_v F_m^{-1}$) y de reflectancia (NDVI_G y NDVI_E determinados con el greenseeker y con el espectroradiómetro, respectivamente). El análisis de regresión se realizó únicamente para los

niveles de nutrición ya que fue el único factor donde se presentó efecto ($P < 0.05$) de los tratamientos.

Análisis de regresión entre contenidos de clorofila y de nitrógeno

El análisis de regresión entre los contenidos de nitrógeno y clorofila presentó valores de R^2 bajos, con una ligera tendencia creciente conforme disminuyó el nivel de nutrición, siendo el tratamiento de nutrición baja el que presentó el mayor coeficiente de regresión (Figura 13).

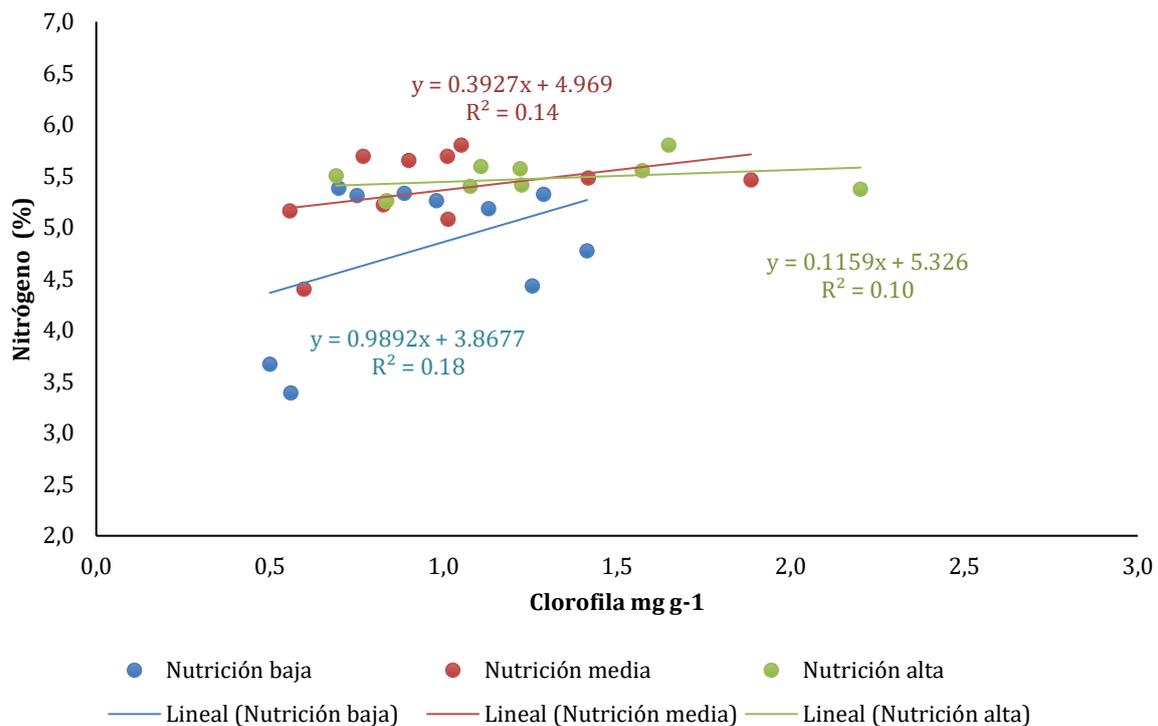
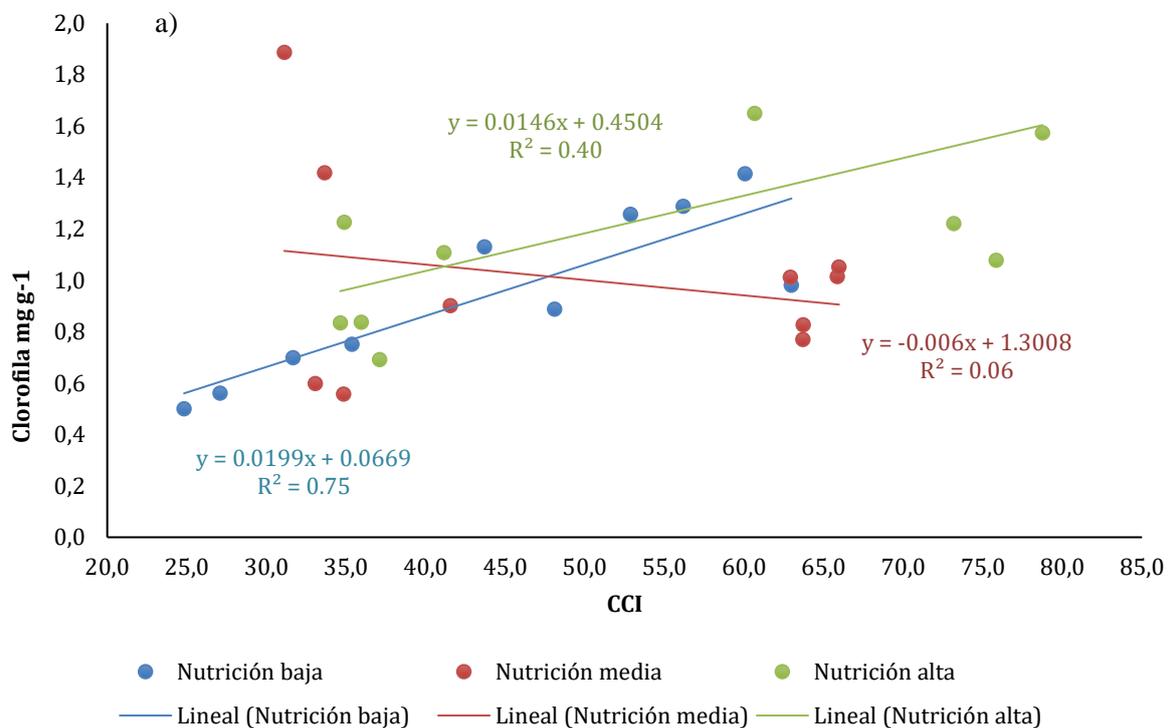


Figura 13. Análisis de regresión entre el contenido de clorofila (mg g^{-1}) y el contenido de nitrógeno (%) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019. Cada punto representa el promedio de tres evaluaciones en una misma fecha.

Contenido de clorofila y transmitancia (CCI, SPAD)

Las variables SPAD y CCI presentaron valores de R^2 muy similares, donde se observaron altos valores de R^2 en el tratamiento de nutrición baja en ambas variables en relación con el contenido de clorofila, presentando valores de R^2 de 0,75 para CCI (Figura 14a)

y de 0,71 para SPAD (Figura 14b). Por el contrario, las plantas con niveles de nutrición media y alta presentaron coeficientes de determinación bajos y similares entre ambas variables (Figura 14).



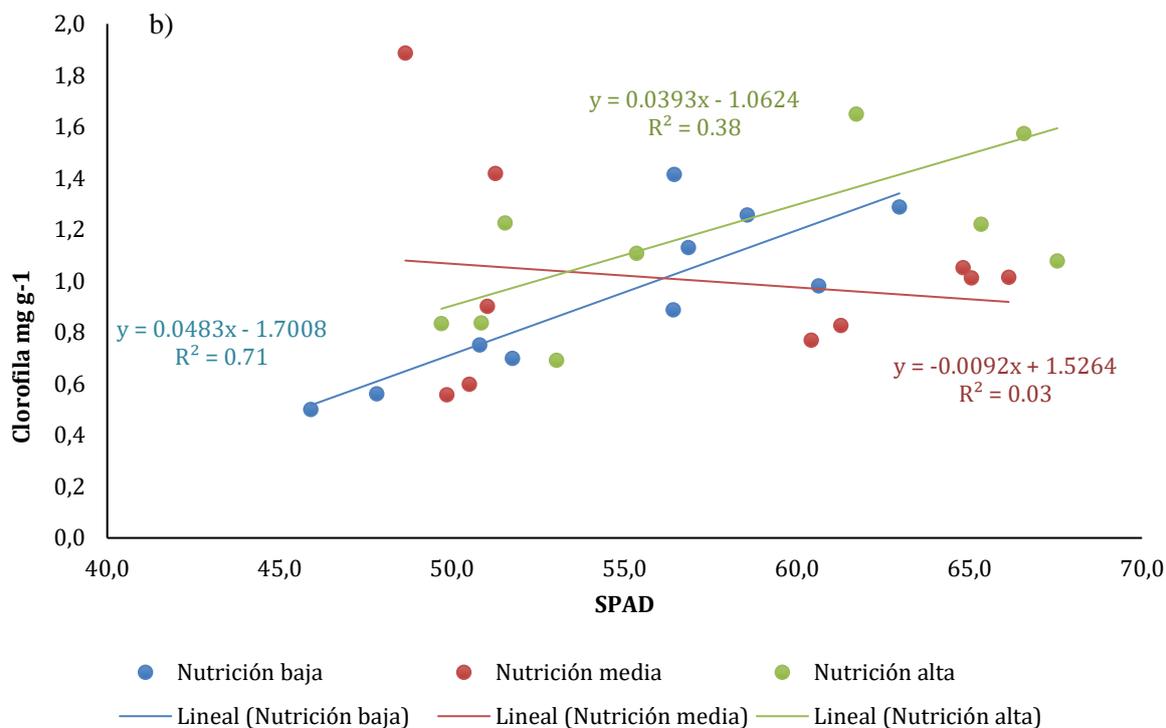


Figura 14. Análisis de regresión entre el contenido de clorofila (mg g^{-1}) y las variables (a) índice de clorofila (CCI) y (b) desarrollo de análisis de plantas y suelo (SPAD) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019.

Contenido de nitrógeno y transmitancia (CCI, SPAD)

La regresión entre el contenido de nitrógeno (%) y las variables SPAD (b) y CCI (a), presentaron bajos valores de R^2 , las plantas del tratamiento de nutrición baja presentaron coeficientes de determinación bajos, con valores de 0,40 y 0,26, respectivamente (Figura 15).

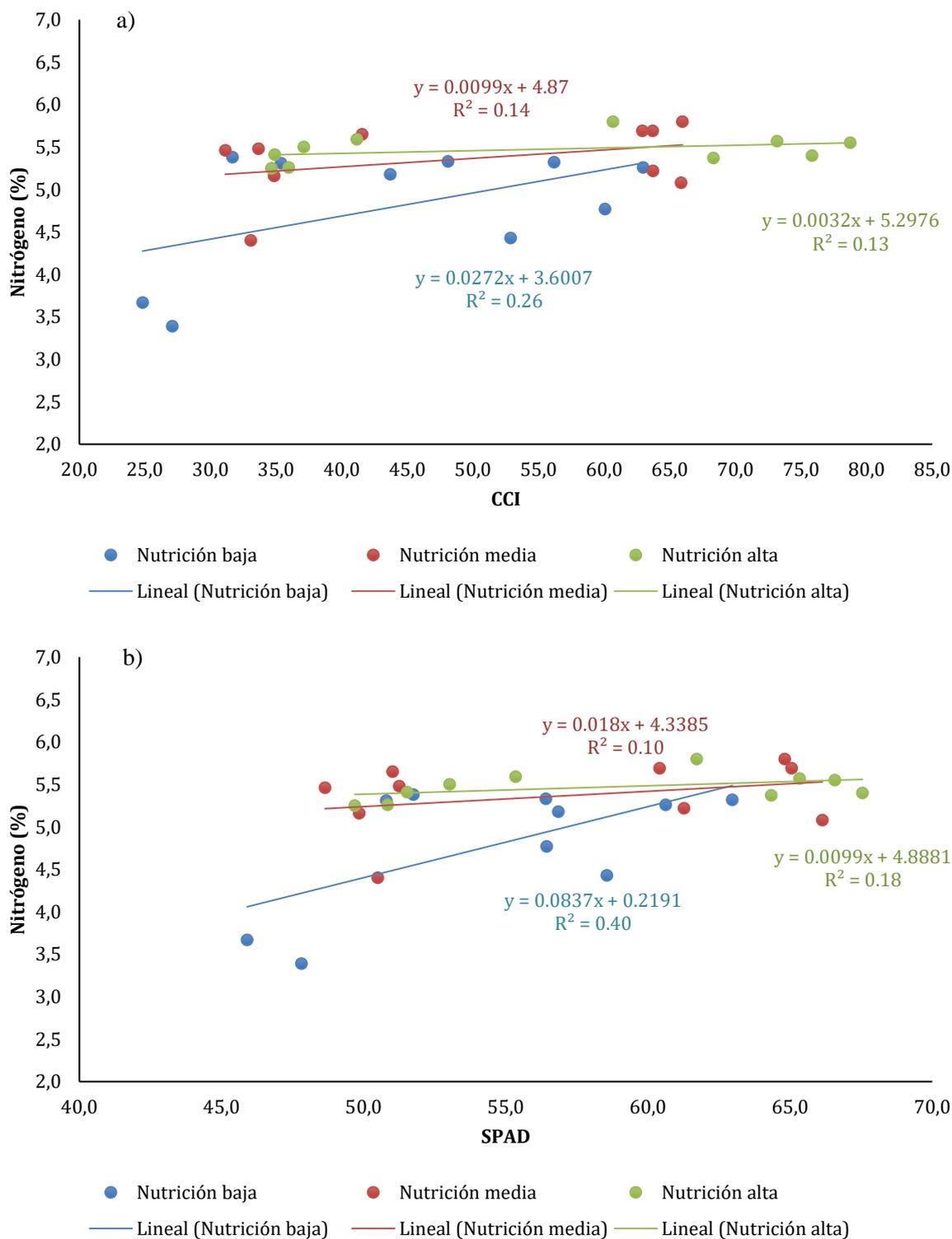


Figura 15. Análisis de regresión entre el contenido de clorofila (mg g^{-1}) y las variables (a) índice de clorofila (CCI) y (b) desarrollo de análisis de plantas y suelo (SPAD) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019.

Contenido de clorofila y reflectancia (NDVI_G, NDVI_E)

La regresión entre el contenido de clorofila y el NDVI_G medido con el Greenseeker presentó los mayores valores de R² cuando en la nutrición baja fue de 0,58 y alta 0,63 (Figura 16).

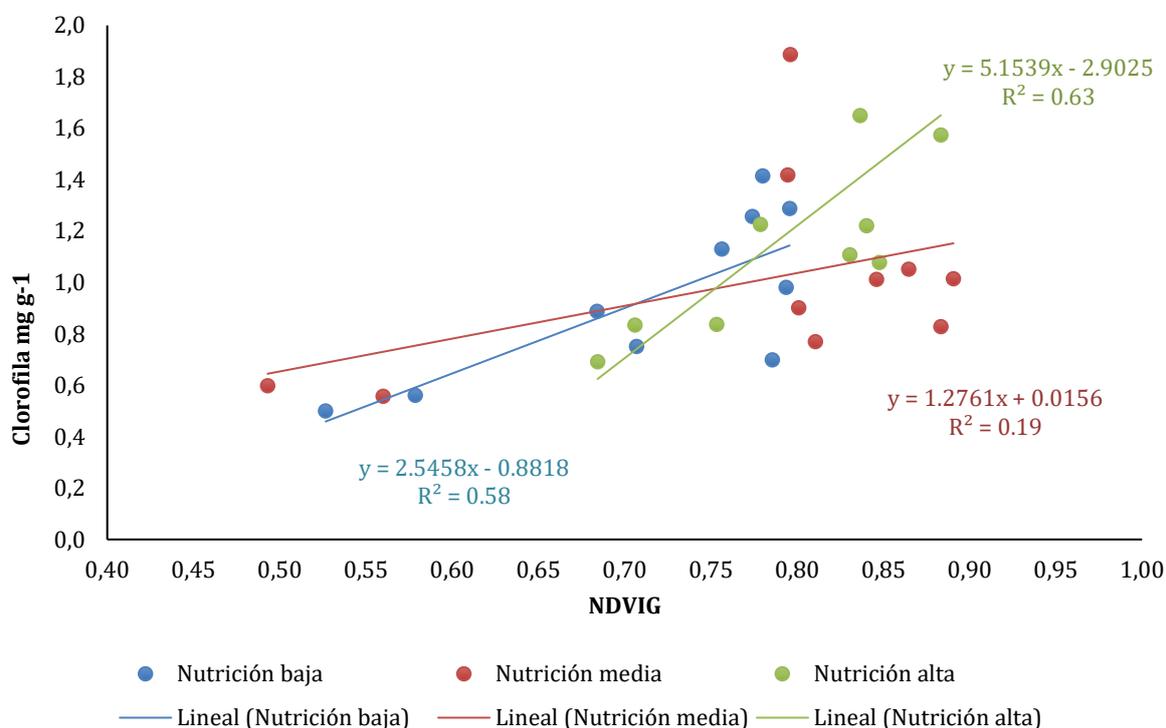


Figura 16. Análisis de regresión para la variable del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI_G) y contenido de clorofila (mg g⁻¹) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica.

El NDVI_E en relación con el contenido de clorofila, presentó el mayor coeficiente de determinación (0,61) en el tratamiento con nutrición media, con una apreciable reducción del valor R² al aumentar el nivel de nutrición (Figura 17).

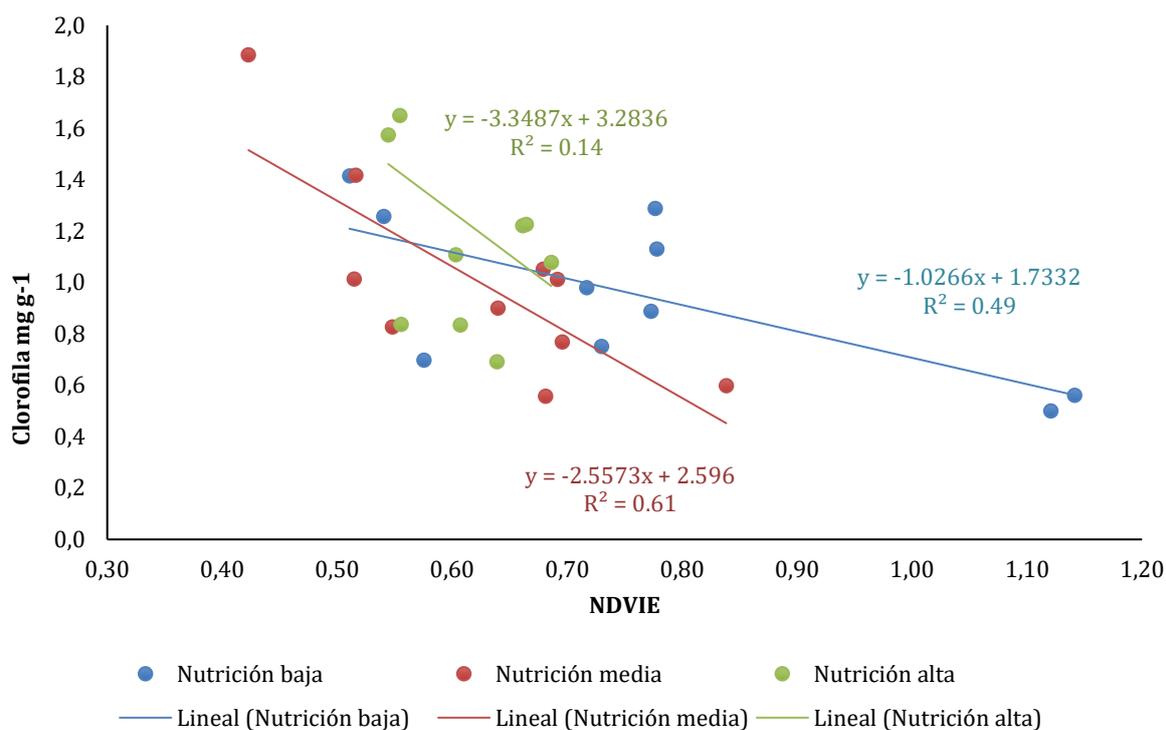


Figura 17. Análisis de regresión para la variable del índice de vegetación de diferencia normalizada determinado con el espectrorradiómetro (NDVIE) y contenido de clorofila (mg g⁻¹) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019.

Contenido de nitrógeno y reflectancia (NDVI_G, NDVI_E)

La regresión entre el contenido de N y el NDVI_G, obtuvo el mayor coeficiente de determinación en el tratamiento con nutrición baja, seguido por el tratamiento de nutrición media (R² = 0,47) (Figura 18).

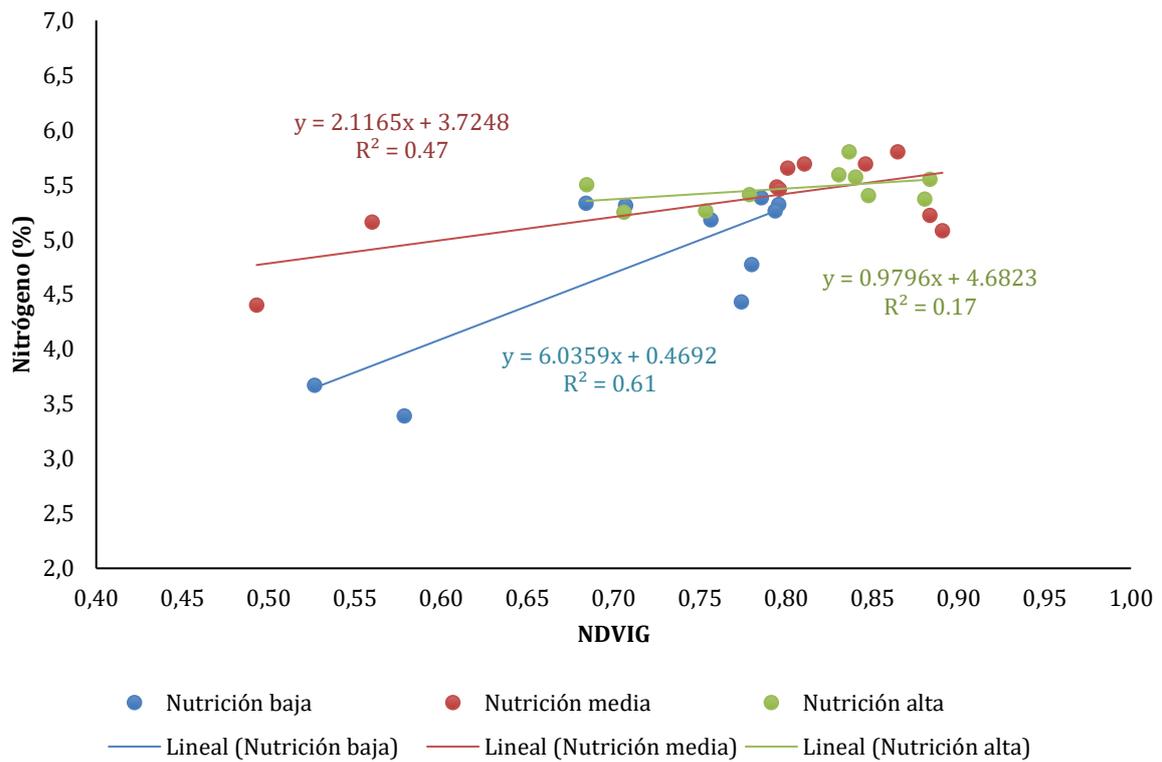


Figura 18. Análisis de regresión para la variable del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVIG) y el contenido nitrógeno (%) en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero con nutrición baja. Alajuela, Costa Rica, 2019.

El análisis de regresión entre el contenido de N y el NDVI_E, se obtuvo el mayor coeficiente de determinación (0,46) en el tratamiento de nutrición baja (Figura 19), mientras que los tratamientos con nutrición media y alta presentaron valores inferiores a 0,10.

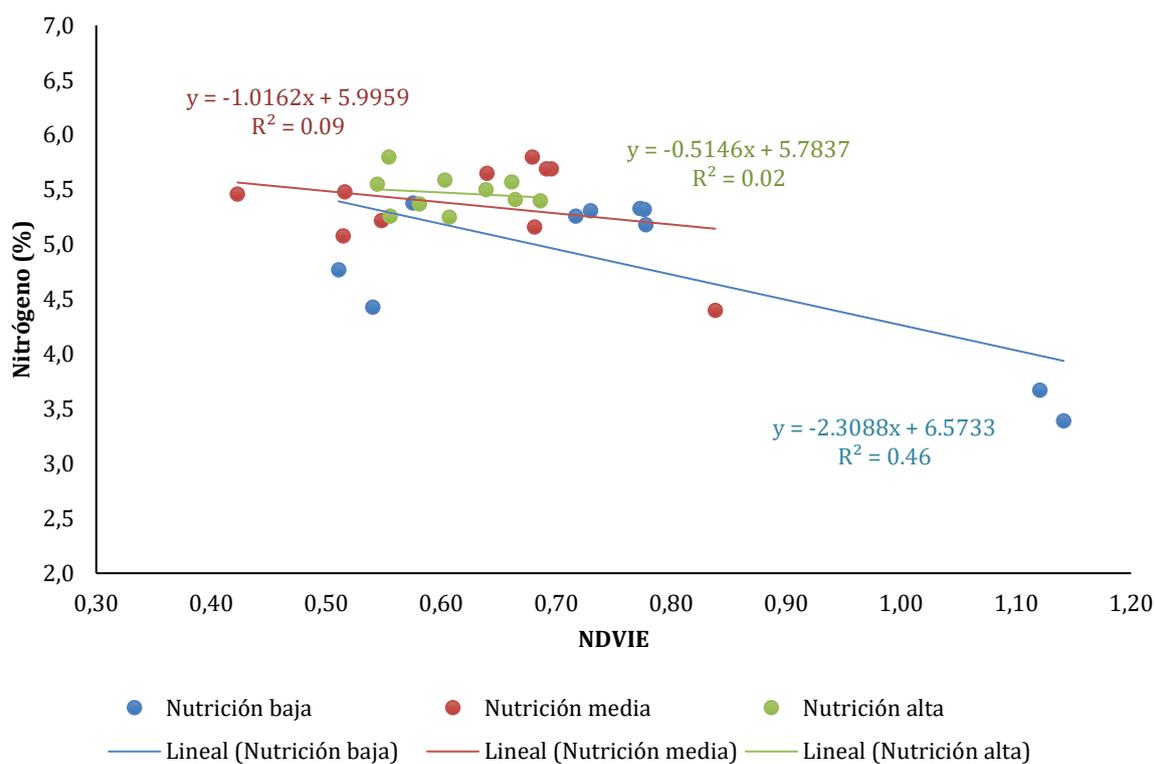


Figura 19. Análisis de regresión para la variable del índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVIE) y el contenido nitrógeno (%) en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero con nutrición baja. Alajuela, Costa Rica, 2019.

Contenido de clorofila y fluorescencia ($F_v F_m^{-1}$)

La regresión entre el contenido de clorofila y la $F_v F_m^{-1}$ obtuvo valores de R^2 bajos en el rango de 0,01 y 0,45, donde el tratamiento con nutrición media mostró el mayor coeficiente de determinación (0,45) (Figura 20).

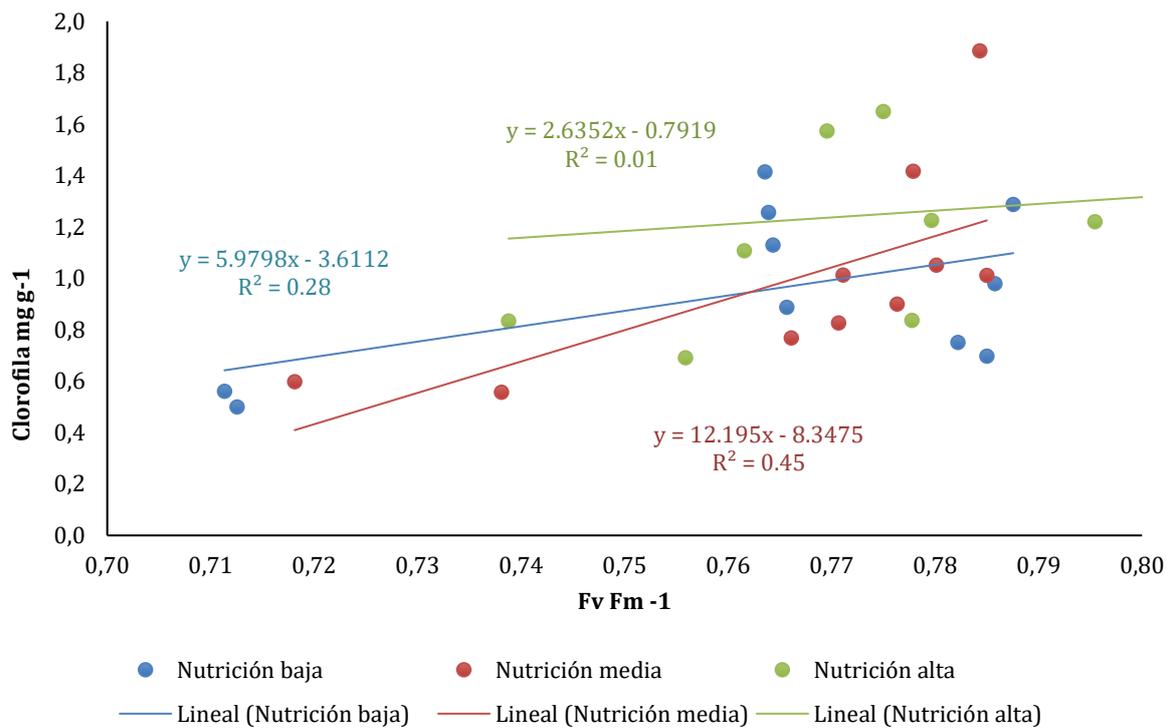


Figura 20. Análisis de regresión para la variable $Fv Fm^{-1}$ y el contenido de clorofila ($mg g^{-1}$) en el cultivo de chile dulce chile hidropónico bajo invernadero con nutrición media. Alajuela, Costa Rica, 2019.

Contenido de nitrógeno y fluorescencia ($Fv Fm^{-1}$)

Los mayores valores de R^2 entre el contenido de N y la $Fv Fm^{-1}$ se presentaron en las plantas con los tratamientos nutrición baja, seguido por el nivel con nutrición media mientras que el tratamiento con nutrición alta presentó un valor marginal de 0,05 (Figura 21),

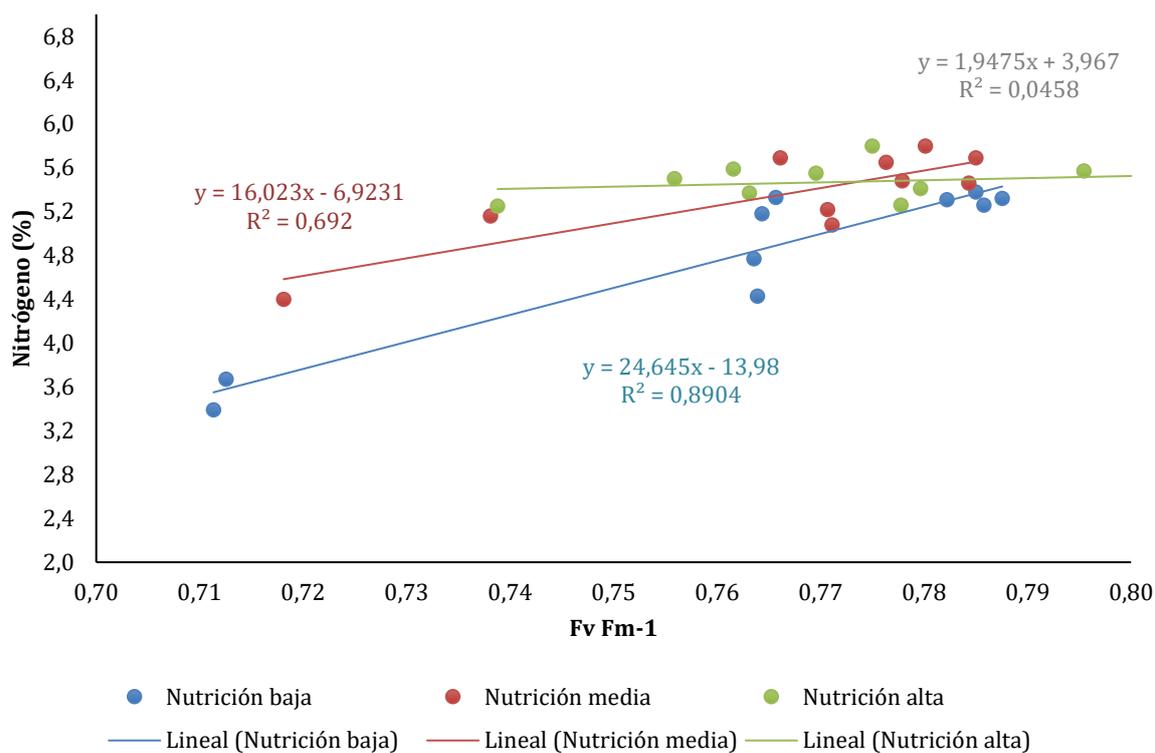


Figura 21. Análisis de regresión para la variable de fluorescencia ($Fv Fm^{-1}$) y contenido de nitrógeno (N%) en los tratamientos de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero, Alajuela, Costa Rica, 2019.

Contenido de clorofila y rendimiento

El rendimiento presentó una tendencia lineal negativa con el contenido de clorofila conforme disminuyó el nivel de nutrición con valores de R^2 entre 0,07 y 0,47, donde la nutrición baja presentó el mayor valor de R^2 (Figura 22).

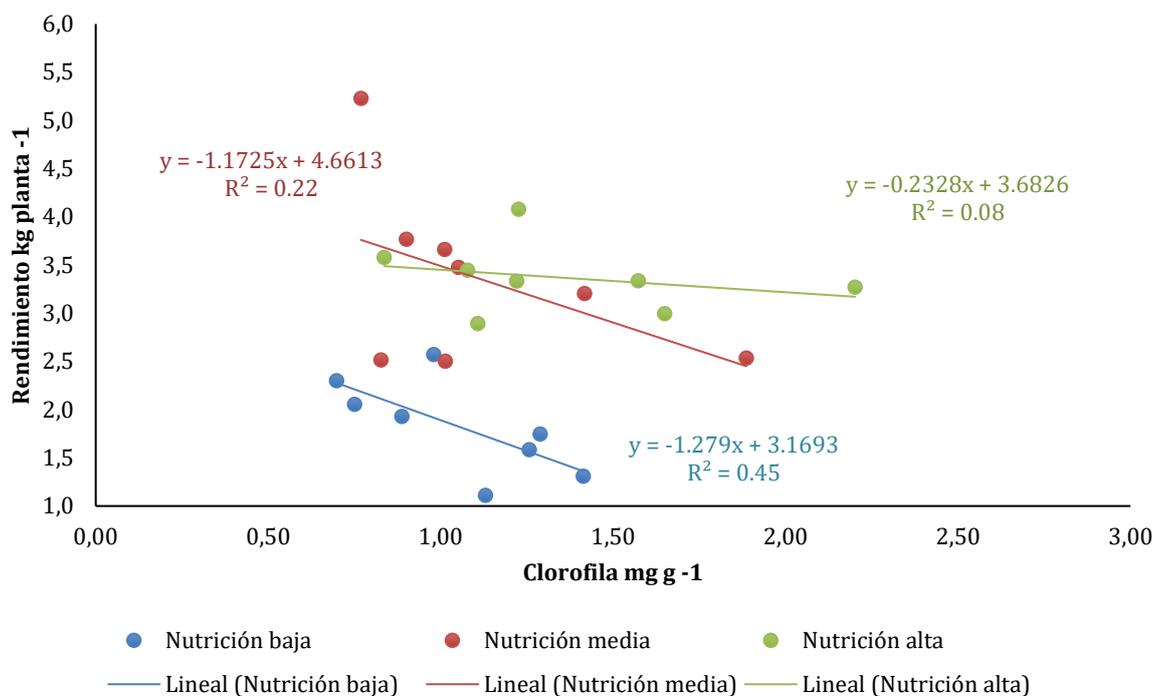


Figura 22. Análisis de regresión para el contenido de clorofila (mg g^{-1}) y el rendimiento (kg planta^{-1}) en el tratamiento de nutrición baja, media y alta en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero var. Dulcítico, Alajuela, Costa Rica, 2019.

Contenido de nitrógeno y rendimiento

La capacidad de predecir el rendimiento (y) a partir del contenido de N en hoja por medición directa (x) en general fue baja, con valores de R^2 en el rango de 0,25 a 0,50 (Figura 23). En los tratamientos con nutrición baja y media, presentó una tendencia lineal positiva, aumentando el rendimiento conforme aumentó el contenido de nitrógeno, siendo el tratamiento de nutrición media, el que presentó el mayor valor de R^2 (Figura 23). Por el contrario, en el tratamiento con nutrición alta, hubo una relación lineal negativa, ya que, al aumentar el contenido de N, el rendimiento disminuyó, siendo este el segundo R^2 más alto (0.39) (Figura 23).

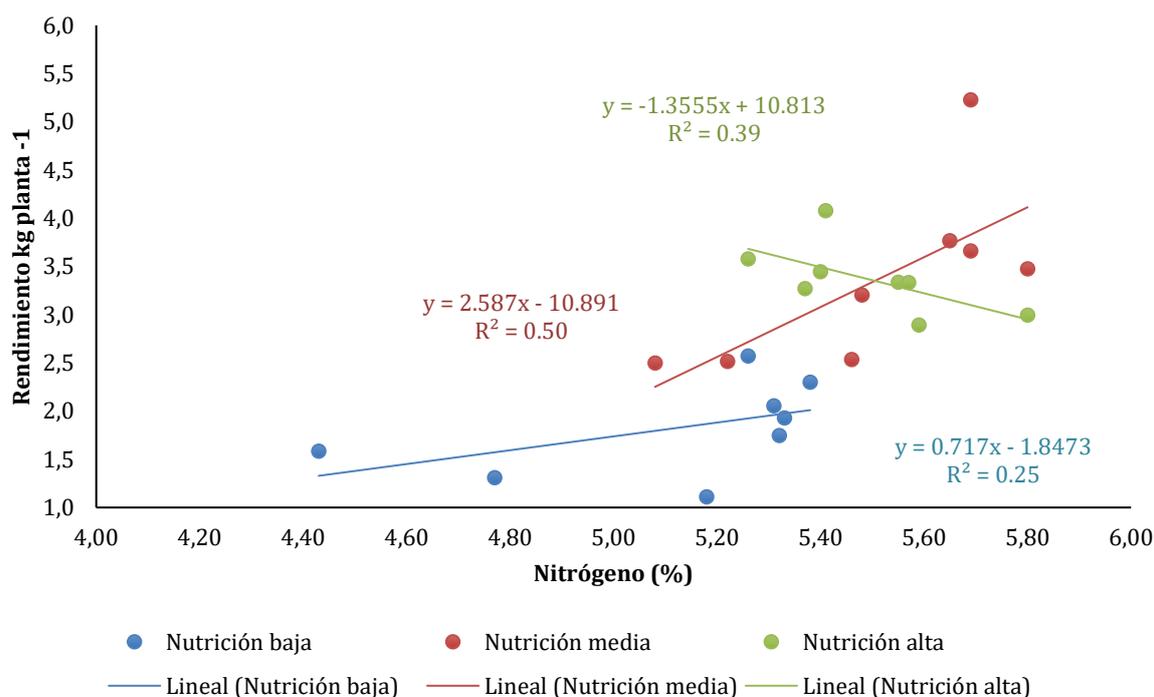


Figura 23. Análisis de regresión para el contenido de nitrógeno (%N) y el rendimiento en los tratamientos de nutrición baja, media y alta, en el cultivo de chile dulce hidropónico bajo invernadero var. Dulcítico, Alajuela, Costa Rica, 2019.

6. Discusión

Los valores de parámetros medidos de forma directa, tales como el contenido de clorofila, el porcentaje de nitrógeno y el rendimiento, mostraron un comportamiento creciente conforme incrementó el nivel de nutrición (Cuadro 8). El contenido de clorofila (mg g^{-1}), fue la única variable que no presentó diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$) (Cuadro 8).

Contenido de nitrógeno (N) en hoja

El N es parte fundamental para el crecimiento de las plantas, ya que es constituyente de una gran cantidad de enzimas y proteínas presentes en el tejido fotosintético y clorofila. Asimismo, forma parte de la proteína encontrada en las membranas de los tilacoides conformando el complejo pigmento-proteína involucrado en la cadena de transporte de electrones, en este complejo se encuentra entre el 60-85% del N tilacoidal (Evans, 1989).

El porcentaje de N determinado en la lámina foliar del tratamiento con nutrición baja fue estadísticamente inferior a los tratamientos con nutrición media y alta (Cuadro 8). A nivel práctico, en la agricultura es difícil conocer o establecer la cantidad de nutrientes que la planta necesita para su óptimo desarrollo. Sin embargo, se conoce que el incremento en las dosis de nitrógeno no significa necesariamente un mayor aprovechamiento por parte de las plantas, debido a que estas ante un exceso de nutrientes, tienden a consumir de manera excesiva los nutrientes disponibles (Yasour *et al.*, 2013). Yasuor *et al.*, (2013), realizaron un estudio donde evaluaron dosis crecientes de N en el cultivo de chile y determinaron que no hubo diferencias significativas en la concentración de N en el tejido foliar a partir de la dosis de 56,2 mg·L⁻¹. Resultados similares se obtuvieron en la presente investigación, donde se observaron diferencias en el contenido de N en la hoja solamente en el tratamiento nutricional bajo con una concentración de N de 58,4 mg L⁻¹.

La ausencia de diferencias significativas en el contenido de N foliar entre los tratamientos de nutrición media y alta, probablemente se debe al concepto de concentración crítica de N. Este se refiere a la concentración de N en la planta que permite la máxima tasa de crecimiento, por encima de la cual no hay respuesta por parte de la planta. Esta concentración va a depender de la cantidad de biomasa de la planta, ya que, al aumentar, disminuye la concentración de N ya sea en un solo tejido o en toda la planta, debido al efecto de dilución de los nutrientes (Jarrel & Beverly, 1981; de Caram *et al.*, 2007). La tasa de acumulación de materia seca incrementa más rápidamente que la acumulación de los nutrientes es por esta razón que plantas con mayores dosificaciones de N pueden incluso presentar concentraciones foliares o totales inferiores a una planta con poca o ninguna dosificación de N, ya que estas últimas van a presentar hojas de menor tamaño y por tanto el N se va a encontrar más concentrado (Jarrel & Beverly, 1981; de Caram *et al.*, 2007). En el estudio realizado se encontraron valores muy similares del %N en hoja en los distintos tratamientos, pese a que las concentraciones de N suministrado variaron en un 50% entre tratamientos. Esto como se mencionó anteriormente, ocasionó una disminución en el crecimiento de las hojas (datos no mostrados) en los tratamientos con menor suministro de N, por lo tanto, la concentración de N no va a presentar mucha variación con respecto a los tratamientos de mayor nutrición por el efecto de dilución.

Por otra parte, el N es un elemento móvil que se transloca de las hojas más viejas a las hojas nuevas, por lo que ante una deficiencia la sintomatología se va a mostrar en hojas inferiores maduras del dosel y no en hojas nuevas recientemente expandidas. De Ávila *et al.*, (2019) encontró que las hojas de la parte superior de la planta contienen el mayor nivel de N,

por lo que, para observar diferencias entre tratamientos con diferente nivel de N, deben utilizarse hojas que sean más representativas del estado nutricional de la planta.

Contenido de clorofila y la relación con nitrógeno en hoja.

El contenido de clorofila (mg g^{-1}) no presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos de nutrición. Al respecto, una serie de estudios realizados, por Huang *et al.*, (2004), demostraron que el contenido de clorofila foliar en plantas de arroz disminuye al presentarse una deficiencia de N, mientras que Ávila *et al.*, (2019), observaron que la concentración de clorofila (mg g^{-1}) en *Capsicum chinense* no se vio afectada por dosis de N superiores a los 50 mg L^{-1} . Dichos resultados fueron coincidentes con los obtenidos en la investigación actual, donde la dosis inferior de N fue de $58,4 \text{ mg L}^{-1}$.

Por otra parte, la regresión entre clorofila y el porcentaje de N en hoja, presentaron bajos coeficientes de determinación ($R^2 < 0,18$) (Figura 13). Dichos resultados contrastan con otros estudios realizados en trigo, por Bojović & Markovic (2009) quienes obtuvieron valores de R^2 entre 0,6 y 0,97 y por Padilla *et al.* (2018) que encontraron coeficientes de determinación de 0,72, entre el contenido de clorofila y el contenido de N. Sin embargo, según Padilla *et al.* (2018), cuando el contenido de N se encontraba entre el 6 y 11%, el contenido de clorofila a y b tendían a saturarse, disminuyendo los valores de R^2 . Aunque la concentración de N en el presente estudio no superó el 5,4%, es posible que esto haya afectado las mediciones, ya que esto puede variar entre especies, variedades, condiciones climáticas y el sistema de cultivo (suelo o sustrato). En la investigación actual se utilizó un sistema hidropónico, mientras que Padilla *et al.* (2018) utilizó un sistema de cultivo en suelo. En el cultivo en sustrato, el manejo del riego y la nutrición es diferente debido a las diferencias intrínsecas entre un sustrato y el suelo lo cual pueden influir directamente en la relación entre ambas variables.

En primera instancia, el 80% del N foliar está ubicado en los cloroplastos; de este un 50% se destina a la producción de proteínas fotosintéticas, mientras que solo entre un 0,5 y 1,5% se destina a la producción de clorofila. Así, la planta destina sólo una pequeña porción del total de N en la síntesis de clorofila (Xiong *et al.*, 2015). Dicho porcentaje está sujeto a cambios, por lo que la relación entre el contenido de clorofila y N puede cambiar por la distribución de N en la planta, donde el N destinado a la síntesis de proteínas varía según las condiciones lumínicas y el tipo de cultivo (Xiong *et al.*, 2015). Estos ajustes en la distribución del N en las distintas partes del aparato fotosintético demuestran la habilidad de las plantas para adaptarse a distintos ambientes durante su desarrollo.

Por otra parte, los tratamientos nutricionales no solo involucran la reducción o el aumento en el contenido de N, sino también la cantidad e interacciones con otros elementos como el magnesio (Mg), hierro (Fe) y potasio (K). Por tanto, sería importante que los estudios realizados consideren las posibles relaciones entre dichos elementos y el N, ya que este no actúa aisladamente, ya que pueden existir múltiples interacciones entre nutrientes. Güler & Büyük (2004), mencionan que la proporción entre dichos elementos y el N, puede influir considerablemente en los contenidos de clorofila y de N foliar. El Mg y el K, por ejemplo, poseen funciones de organización estructural de las granas y estromas afectando la integridad de los cloroplastos y la eficiencia de la absorción de luz. Ante una deficiencia o ausencia de Mg y K, se han observado daños en la estructura de los cloroplastos, dándose una reducción en la cantidad de granas y tilacoides presentes (Trankner *et al.*, 2018).

En el caso de la interacción entre Mg,y N, se sabe que el Mg es parte esencial de los cloroplastos y elemento central en el anillo del tetrapirrol de las clorofilas a y b, también, la síntesis de la proteína RuBisCO disminuye al presentarse una deficiencia (Trankner *et al.*, 2018; Hermans & Verbruggen, 2005). Hermans & Verbruggen (2005), observaron que la concentración de clorofila empezó a decrecer en los tratamientos deficientes de Mg en plantas de *Arabidopsis*. A su vez, la deficiencia de K también provoca una disminución en el contenido de clorofila y una disminución en el proceso fotosintético. La baja disponibilidad de este elemento disminuye la difusión del dióxido de carbono (CO₂) de la atmósfera al interior de los cloroplastos, debido a que se encuentra involucrado en los cambios de turgencia de las células guarda estomáticas que permiten la entrada del CO₂ necesario para el proceso fotosintético. Aunado a esto, la conductancia en el mesófilo se ve afectada por una disminución en el espacio aéreo en el interior de la hoja, ocasionando resistencia en la transferencia del CO₂ (Trankner *et al.*, 2018).

Otro elemento que altera la síntesis de clorofila, la estructura del cloroplasto y la tasa fotosintética es el Fe, que se encuentra involucrado en la cadena de transporte de electrones; las proteínas presentes en los complejos de captación de luz disminuyen ante una deficiencia del elemento (Briat *et al.*, 2015). A su vez, el Fe de manera indirecta afecta la síntesis de porfirina, compuesto que deriva a la clorofila (Briat *et al.*, 2015). Por otra parte, Medellín *et al.*, (2011), mencionan que las condiciones ambientales como la temperatura y la radiación pueden influir en las mediciones de clorofila y consecuentemente en la relación con el N. También, durante esta investigación, el análisis del contenido de clorofila se realizó en la zona central de la lámina foliar, tomando una porción de la hoja de 6,16 cm², mientras que el análisis del contenido de N se realizó en toda la hoja evaluada. Medellín *et al.*, (2011), mencionan que

la concentración de nitrógeno y clorofila no siempre se distribuye equitativamente en todo el tejido foliar, por lo que la medición puede variar a lo largo de toda la lámina foliar afectando la relación entre ambas variables.

Análisis de planta y suelo (SPAD) e índice del contenido de clorofila (CCI)

En relación con el contenido de clorofila, de todos los índices evaluados, el CCI, SPAD y NDVI mostraron valores altos de R^2 . Las variables SPAD y CCI presentan un comportamiento muy similar en cuanto a su relación con el contenido de clorofila, en los tratamientos de nutrición baja y alta, con valores de R^2 de 0,75 (CCI), 0,71 (SPAD), 0,37 (CCI) y 0,38 (SPAD), respectivamente (Figura 14). Resultados similares han sido obtenidos en estudios realizados en el cultivo de arroz, donde se obtuvo un R^2 de 0,77 al relacionar el contenido de clorofila con la variable SPAD (Zhang *et al.*, 2019). Asimismo, en el cultivo de chile dulce, con valores de clorofila entre 0 y 80 mg cm^{-2} , se obtuvieron valores altos de R^2 entre el contenido de clorofila y los índices SPAD (0,85) y CCI, (0,78) (Padilla *et al.*, 2018). De igual forma, se han reportado altos valores de R^2 entre estas variables en cultivos como canola, tomate, pepino y melón (Wu *et al.*, 2012; Padilla *et al.*, 2017; Azia & Stewart, 2001; Zhu *et al.*, 2012).

En la investigación actual, los valores de clorofila se mantuvieron dentro del rango de 0 a 80 mg cm^{-2} . En el presente estudio, las variables CCI y SPAD presentaron valores similares, debido a que ambas se basan en el mismo principio, es decir, determinan la absorbancia y transmitancia mediante la emisión de dos radiaciones, la radiación roja y la infrarroja cercana. Estos instrumentos utilizan longitudes de onda muy similares, para la radiación infrarroja cercana (NIR) 931 nm (Apogee) y 940 nm (SPAD), mientras que en la radiación roja las longitudes son de 653 nm (Apogee) y 650 nm (SPAD) (Padilla *et al.*, 2018; Apogee instruments, 2018, Spectrum technologies, 2009; Taskos *et al.*, 2015).

El uso de estas longitudes de onda se debe a que un aumento en la concentración de la clorofila provoca un incremento en la absorción de radiación roja. Lo contrario ocurre en el espectro infrarrojo cercano, donde gran parte de las plantas transmiten una mayor fracción a estas longitudes de onda, las cuales no son absorbidas por los fotorreceptores, por lo que dicha transmitancia se utiliza como una longitud de onda de referencia (Parry *et al.*, 2014).

A pesar de lo anterior, en la investigación actual no se obtuvieron coeficientes de determinación más altos en ninguno de los tratamientos, probablemente debido a que la absorción y la transmitancia de la luz en las longitudes de onda roja e infrarroja cercana, se ven

afectados por la presencia de otros componentes y/o pigmentos, donde la transmitancia en NIR es primeramente afectada por componentes diferentes a la clorofila. Las membranas también pueden afectar las mediciones, tal es el caso de la pared celular la cual puede absorber y transmitir de manera muy similar a la clorofila (Parry *et al.*, 2014).

Por otra parte, en el contenido de N con los valores SPAD y CCI, los mayores coeficientes de determinación se obtuvieron en el tratamiento con nutrición baja, con un R^2 de 0,4 para SPAD, y de 0,26 para CCI (Figura 15). Un estudio en maíz reportó resultados similares, con coeficientes de determinación para SPAD entre 0,42 y 0,62 (Gabriel *et al.*, 2019); mientras que Medellín *et al.*, (2011) reportó altas relaciones entre SPAD y contenido de N, siendo el valor más bajo de 0,64.

Como se mencionó en el apartado referente a los resultados obtenidos entre el contenido de clorofila y nitrógeno, únicamente entre un 0,5 y 1,5% del N se destina a la producción de clorofila, por lo que la relación con indicadores del estado de clorofila, obtenidos con el SPAD y el CCI, se ve afectada directamente, ocasionando bajas relaciones entre el SPAD, CCI y el contenido de N foliar (Xiong *et al.*, 2015). También, los contenidos de N también pueden ser subestimados ante altos contenidos de N, debido a que la distribución del N en los diferentes tejidos de la planta es afectada por el ambiente, principalmente ante cambios en la intensidad lumínica (Xiong *et al.*, 2015). Este es un factor que, en ambientes protegidos, se altera debido a la cubierta plástica que poseen, que ocasiona que la cantidad de luz que llega al cultivo sea inferior en comparación con cultivos que se encuentran expuestos a plena luz solar, por lo que es más probable que esta se vea afectada en sistemas protegidos. Estos cambios en la distribución foliar de N evidencian la habilidad de las plantas para adaptarse a diferentes condiciones ambientales.

También hay un efecto tamiz, el cual consiste en la poca eficiencia del tejido fotosintético en la absorción de radiación PAR, lo cual ocurre en ausencia de tejido absorbente al darse el paso de la radiación en el tejido fotosintético, aumentando con una disminución en la concentración de los cloroplastos y un incremento en la desuniformidad de los mismos (Parry *et al.*, 2014). Esto pudo haber afectado las mediciones foliares con los distintos instrumentos, ya que, al presentarse dicho efecto por problemas presentados durante la investigación como deficiencias nutricionales o el ataque de patógenos, los datos pudieron haberse subestimado ocasionando falta de diferencias entre tratamientos y/o bajas relaciones entre variables.

Estudios han reportado que incrementos en las dosificaciones de N solo reflejan ligeros aumentos en los valores brindados por el SPAD. Por lo cual, dicho parámetro no logra estimar

el contenido de N en hojas con elevados contenidos de N (Zhang *et al.*, 2019). De esta forma, los valores SPAD tienden a disminuir ocasionando bajos R^2 entre ambas variables.

Además, la medición se realiza en un solo segmento de la hoja, mientras que el N se encuentra distribuido de manera desuniforme en toda la hoja; asimismo, dicha medición puede tener fluctuaciones producto de la morfología de la hoja (Zhang *et al.*, 2019; Gabriel *et al.*, 2019). De acuerdo a lo anterior y a lo observado en el presente estudio, coincidente con otros estudios realizados (Padilla *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Parry *et al.*, 2014), para el sistema de cultivo hidropónico bajo invernadero es necesario realizar nuevos estudios enfocados en la estandarización de la toma de muestras, la etapa fenológica, la hora del día, cantidad de muestras, zona de la toma de muestras, dosis de N, entre otros factores; con el fin de lograr mayor exactitud y precisión en la estimación del contenido de N en dicho sistema.

Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI)

El NDVI determinado con el Greenseeker (NDVI_G) y con el espectroradiómetro (NDVI_E), utilizaron longitudes de onda de 570 y 680 nm y de 670 y 730 nm, respectivamente, con el fin de evaluar la reflectancia en el espectro rojo. Asimismo, en dichas longitudes de onda se ha observado un incremento en el NDVI_E (Sharma *et al.*, 2015).

En el análisis de regresión entre el contenido de nitrógeno y ambos NDVI, los mayores coeficientes de determinación se obtuvieron cuando el nivel de nutrición fue medio para NDVI_G (R^2 0,61) con una tendencia lineal positiva (Figura 18); y con una tendencia lineal negativa y un R^2 de 0,46 para el NDVI_E con nivel de nutrición bajo (Figura 19). En cuanto al tratamiento de nutrición alta, ambos índices presentaron el menor coeficiente de determinación (Figura 18-19).

Dichos resultados contrastan con otras investigaciones que han reportado coeficientes de determinación superiores a 0,91 (Padilla *et al.*, 2015). Sin embargo, dichos autores realizaron la relación entre el contenido de N de toda la planta (hojas-tallo y frutos). Asimismo, Rambo *et al.*, (2010), realizaron un estudio en maíz donde obtuvieron valores de R^2 entre 0,27 - 0,59, considerando que un R^2 de 0,59 representó una buena relación entre el NDVI y el contenido de N. Según esto, los coeficientes de determinación de nutrición baja y media para el NDVI_G y baja para el NDVI_E, respectivamente, presentan una relación aceptable con el contenido de N. Sin embargo, sería recomendable para futuras investigaciones el uso del dato del contenido de N total de la planta, el cual podría brindar más información y relaciones más elevadas con el NDVI.

Ambos índices (NDVI_G, NDVI_E) mostraron una buena relación con el contenido de clorofila (Figura 16, 17), donde para NDVI_G se obtuvieron R² de 0,63 y 0,58 en los tratamientos nutricionales alto y medio, mientras que para NDVI_E un R² de 0,61 en el tratamiento de nutrición media. Estudios similares, muestran coeficientes de determinación similares, tal es el caso de un estudio realizado en *Carpinus betulus* que obtuvo un R² de 0,75 al relacionar el NDVI con el SPAD como medición del contenido de clorofila (Hashemi & Chenani, 2011). Asimismo, en un estudio realizado en pasto, se obtuvieron coeficientes de determinación entre 0,53 y 0,92, dependiendo de la época de medición y del tipo de pasto (Bell *et al.*, 2004).

Este tipo de índices también son muy sensibles a la clorosis presente en el follaje de los cultivos, debido a que perciben con mayor sensibilidad la reflectancia en la radiación verde y roja, especialmente ante altos contenidos de clorofila (Padilla *et al.*, 2018). Dado esto, el NDVI ha mostrado estar fuertemente relacionado con el estado del N y la clorofila en cultivos como cereales y hortalizas como el tomate, brócoli, siendo este uno de los índices más utilizados para el manejo de este nutriente en los cultivos (Padilla *et al.*, 2018; Padilla *et al.*, 2015). Al presentar relaciones relativamente buenas con el contenido de N y de clorofila en la presente investigación y al ser una medición más representativa del estado nutricional del cultivo, este tiene un alto potencial de funcionar como instrumento para el monitoreo del estatus del N en el cultivo de chile dulce (Padilla *et al.*, 2018).

Padilla *et al.* (2018), mencionan que una de las ventajas de utilizar instrumentos como el Greenseeker para la determinación del contenido de N y clorofila, es que esta toma mediciones integradas de un área mucho más grande y representativa que la medición de una única sección de la hoja, disminuyendo la variabilidad entre mediciones: por tanto, al evaluar la planta en su totalidad se puede reflejar mejor el estatus del N en el cultivo.

Por otra parte, los bajos valores de R² entre el NDVI y los contenidos de N y de clorofila, puede deberse a que dichos índices se pueden ver afectados por una serie de condiciones en el cultivo. En primera instancia Rambo *et al.*, (2010) indican que la reflectancia entre las longitudes de onda infrarrojo cercano 700 - 1300 nm se ven influenciadas por las propiedades ópticas del tejido foliar como lo es la estructura celular, las interfaces aire- pared celular - protoplastos- cloroplastos. Asimismo, las mediciones varían entre los contenidos de N, estado fenológico y el tipo de suelo.

La etapa fenológica pudo haber influido en la relación NDVI con el contenido de clorofila, con bajos valores de R² debido a que, en etapas tempranas del cultivo, el dosel no cubre en su totalidad la superficie del suelo, por lo que la reflectancia del suelo domina.

En el caso del presente estudio el suelo estaba cubierto con “ground cover” color blanco, lo cual pudo afectar parcialmente la reflectancia influenciada por la relación entre el área de la planta y el área del suelo, durante la medición (Longchamps & Khosla, 2014; Ramirez *et al.*, 2015). La literatura menciona que los suelos blancos presentan un valor de NDVI iguales a -1 indicando la reflectancia de la luz emitida (Gutiérrez *et al.*, 2011). Esto ocasiona que las variaciones en la biomasa, área foliar y la estructura del dosel enmascaren los contenidos de clorofila y N en el cultivo en etapas tempranas; mientras que en etapas más avanzadas el dosel tiende a cerrarse, haciendo que la influencia de estas variables disminuya.

Otro factor que pudo afectar el potencial del NDVI para estimar el contenido de N en plantas con nivel de nutrición alto, es el hecho de que se ha observado que mediciones con el Greenseeker pueden presentar saturación cuando la biomasa de la planta alcanza valores máximos en etapas fenológicas más avanzadas, resultando en datos poco representativos del estado nutricional de la planta (Muñoz *et al.*, 2015). Por esto que existe la necesidad de crear modelos para las distintas etapas fenológicas, así como índices que omitan el efecto del suelo en las mediciones (Li *et al.*, 2010). Por ejemplo, en el cultivo de algodón, Ramirez *et al.*, (2015) señalan que la validez del contenido de N en hoja utilizando sensores ópticos mostró resultados promisorios únicamente cuando el canopy del cultivo alcanzaba el 30% de cobertura.

Por otra parte, la manipulación del Greenseeker pudo afectar negativamente los coeficientes de determinación entre el NDVI_G y el % de N y el contenido de clorofila. Al respecto, Gutiérrez *et al.*, (2011) mencionan que dicho instrumento, se debe mantener a una distancia entre 80-120 cm y un ángulo definido del cultivo durante toda la medición. Dicha recomendación fue difícil de seguir durante las mediciones, ya que la distancia entre hilera era de 1.5 m aproximadamente, lo cual, asociado a la densidad del follaje de algunos tratamientos, impedían la ejecución de una trayectoria sin cambios en la distancia y en el ángulo con respecto al cultivo.

Asimismo, no fue posible realizar las mediciones en la parte superior del cultivo donde se realizaba el análisis del contenido de N, ya que tratamientos como los de nutrición alta y media en etapas más avanzadas presentaron plantas de alturas superiores a 2 m, razón por lo que la evaluación se realizaba en la parte baja-media del cultivo, alterando de esta manera la medición.

Además, el valor del NDVI_G se puede ver afectado por el ataque de plagas, patógenos, radiación, estado hídrico, entre otros. En la investigación realizada, se presentó una alta incidencia de mosca blanca (*Bemisia tabaci*), lo que ocasionó la afectación por parte de la fumagina (*Capnodium magniferar*) provocando el oscurecimiento de las hojas por la presencia

del hongo. Asimismo, se presentaron problemas con mildiú polvoso y deficiencias nutricionales afectando el verdor del follaje y como se menciona anteriormente, el NDVI_G es sensible a la falta de follaje verde, por lo que la presencia de estos problemas pudo influir en las mediciones realizadas.

También, algunos autores han mencionado el uso de las longitudes de onda del margen del espectro rojo para la determinación de la reflectancia en los cultivos, ya que penetra de manera más profunda en el dosel del cultivo, siendo la sensibilidad de la absorbancia y la reflectancia, mayor en el espectro rojo (Li *et al.*, 2014). Es por esto que el uso de índices como el NDVI que reemplacen las bandas rojas por una banda del borde rojo han demostrado ser indicadores confiables para la determinación del estado del N y de la clorofila en los cultivos, por lo que se puede implementar dicho cambio de banda en investigaciones futuras con el uso del espectroradiómetro, y así evaluar su relación con el contenido de N en el cultivo de chile dulce hidropónico (Li *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2018).

Fluorescencia (Fv Fm⁻¹)

En el presente estudio, la regresión entre Fv Fm⁻¹ y el contenido de clorofila en hoja, presentó valores de R² bajos con un máximo de 0,46 en el tratamiento con nivel de nutrición media (Figura 20). Las medidas de dicha variable pueden verse afectada por diversos factores bióticos, abióticos, genéticos y de manejo agronómico.

La fluorescencia es un proceso que se da durante la primera fase de la fotosíntesis, en el cual la clorofila y otros pigmentos accesorios se encargan de la absorción de la radiación solar. La absorción de la radiación puede verse afectada por la estructura y la concentración de dichos pigmentos. Ante una deficiencia de N, la planta no sólo modifica la concentración de clorofila, sino también la concentración de pigmentos como flavonoides y carotenoides; por ejemplo, la concentración de zeaxantina incrementa ante una limitación de N (Pérez-Molina *et al.*, 2020; Longchamps & Khosla, 2014; Rambo *et al.*, 2010). Esto indica que, al existir más de un pigmento involucrado en dicho proceso y al existir en la planta un mecanismo para reorganizar la concentración de pigmentos en la hoja, puede existir un efecto por parte de estos en la medición de la fluorescencia.

Existen una serie de regiones de emisión de fluorescencia que pueden ser utilizadas para la determinación del crecimiento bajo distintas dosificaciones de N, tal es el caso de un inductor de fluorescencia que utiliza una longitud de onda de 375 nm, el cual ha demostrado ser un buen indicador del estado del N en el cultivo de maíz (Rambo *et al.*, 2010).

En el análisis de regresión entre $F_v F_m^{-1}$ y el contenido de N se obtuvieron mayores valores coeficientes de determinación (Figura 21). Los tratamientos con nutrición baja y media presentaron valores R^2 aceptables, 0,89 y 0,69 respectivamente, para estimar el %N en hoja utilizando el medidor de fluorescencia. Los resultados obtenidos en el presente estudio, fueron coincidentes con los resultados de Yang *et al.*, (2016), quienes reportaron una buena relación entre el contenido de N foliar e índices de fluorescencia, con valores de R^2 entre 0,7 y 0,9.

Los elevados R^2 entre $F_v F_m^{-1}$ y N en la nutrición baja y media y los bajos R^2 en el tratamiento de nutrición alta, pueden deberse a la variabilidad en los datos obtenidos para ambas variables. En el tratamiento de nutrición baja (Figura 21), se observa que la mayor cantidad de $F_v F_m^{-1}$ se encuentran entre valores 4,4 y 5,4 de contenido de N, seguido de la nutrición media encontrándose entre 5,0 y 5,8, y por último la nutrición alta donde la mayoría de datos están ubicados entre 5,5 y 5,8. Como se aprecia en las variaciones, el tratamiento de nutrición baja, es el que presenta las mayores variaciones, seguido por el tratamiento de nutrición media, siendo estos los que presentaron los mayores coeficientes de determinación. De manera contraria, la nutrición alta presentó el menor valor de R^2 , donde a su vez mostró la menor variación en el contenido de N. Esto sugiere que todas las hojas muestreadas en el tratamiento de nutrición alta presentaban altos porcentajes de N en las distintas mediciones disminuyendo la variabilidad, mientras que la fluorescencia al presentar mayor variación va a provocar una baja relación con el % de N; por lo que, según lo observado en el presente estudio, dicho índice no funciona bajo altos contenidos de N.

La eficiencia del fotosistema dos ($F_v F_m^{-1}$) es un parámetro que brinda información importante acerca del estatus de la planta. Se menciona que en una planta sana solamente cerca del 2% de la energía absorbida se pierde a través de la emisión de fluorescencia, mientras que, al someter esta planta ante un estrés, esta pérdida de energía puede aumentar seis veces su valor inicial (Rambo *et al.*, 2010). La deficiencia de N afecta la integridad del aparato fotosintético de muchas formas. Pérez-Molina *et al.*, (2020), mencionan que la primera de ellas es mediante la síntesis de enzimas necesarias para reparar los centros de reacción del fotosistema II en la membrana tilacoidal. Al no existir enzimas para reparar los centros de reacción, se genera una acumulación de especies reactivas de oxígeno, incrementando de esta manera el daño en la membrana tilacoidal lo que ocasiona una disminución en la eficiencia del fotosistema II ($F_v F_m^{-1}$).

Con base en los resultados obtenidos y en la literatura mencionada, el parámetro $F_v F_m^{-1}$ tiene potencial para determinar el estatus del N en plantas de Chile. Sin embargo, es recomendable realizar muestreos preliminares para la determinación del tipo y número de

muestras, ya que estudios realizados han mostrado que la hoja más nueva recientemente expandida no presenta diferencias entre tratamientos de N, mientras que hojas más antiguas sí presentan una reducción en $F_v \cdot F_m^{-1}$ en los tratamientos sin o con una reducción de N (Živčák *et al.*, 2015).

Por su parte, la regresión entre $F_v \cdot F_m^{-1}$ y el contenido de clorofila presentó el mayor R^2 (0,45) en el tratamiento de nutrición media (Figura 20). La complejidad que conlleva la correcta medición de la fluorescencia, al involucrar más de un pigmento fotosintético, puede alterar los valores de $F_v \cdot F_m^{-1}$, ocasionando variaciones en las mediciones y a su vez bajas relaciones con el contenido de clorofila, ya que, al sólo considerar dicho pigmento en la investigación actual, se desconoce el efecto que otros pigmentos pueden ocasionar en la medición.

Rendimiento y su relación con el contenido de N y clorofila

En rendimiento de fruto fresco (Kg planta^{-1}), el tratamiento con nutrición baja fue estadísticamente diferente a los tratamientos de nutrición media y alta (Cuadro 8), siendo estos últimos estadísticamente similares. Coincidentemente, Rambo *et al.*, (2010), tampoco observó diferencias significativas en el rendimiento bajo dosis elevadas de N en el cultivo de maíz.

En cuanto al rendimiento y su relación con las variables medidas directamente (%N y concentración de clorofila (mg g^{-1})), en ambos casos se obtuvo valores de R^2 bajos, siendo el más elevado en el tratamiento de nutrición baja para la clorofila (0,47) y la nutrición media para el N ($R^2 = 0,50$) (Figura 22-23). En los tratamientos de nutrición baja y media, el rendimiento tuvo un comportamiento creciente conforme aumenta la cantidad de clorofila y de N foliar.

Por el contrario, en el tratamiento con nutrición alta, al incrementar el contenido de N foliar el rendimiento disminuye (Figura 23). Dicho comportamiento ha sido observado en diversos estudios con dosis crecientes de N. De Ávila Silva *et al.*, (2019) en dos cultivares de chile obtuvieron una disminución en el peso del fruto al incrementar la dosificación de N, puesto que el tratamiento con la dosificación más elevada presentó una considerable disminución en el rendimiento. En cuanto al nitrógeno, se tienen una serie de curvas donde este determina el rendimiento directamente, se tiene la curva de N crítico, la cual es la mínima concentración de N para alcanzar la tasa de crecimiento máxima. Por debajo de esta curva, el crecimiento está limitado (Ley del mínimo de Liebig) y por encima de la misma estará en su concentración óptima (Gómez, 2016). El incremento en el crecimiento vegetativo puede

generar alteraciones en el balance fuente-sumidero. Ante un aporte excesivo de N en los cultivos, la planta se enfoca en el crecimiento vegetativo, dejando de lado la producción de órganos reproductivos, ya que las hojas actúan como un sumidero bastante fuerte, creando de esta manera una competencia entre el crecimiento vegetativo-reproductivo, que repercute en la producción de flores y frutos y por tanto en el rendimiento (Sainju *et al.*, 2019; de Ávila Silva *et al.*, 2019).

En cuanto al rendimiento con el contenido de clorofila foliar medido, el tratamiento de nutrición baja presentó la mayor relación con el rendimiento (R^2 0,47), seguido del tratamiento de nutrición media (R^2 0,22) (Figura 22). La literatura menciona que la aplicación y/o limitación de otros nutrientes como el K, Mg, Ca y Fe puede influir en la relación del rendimiento con el contenido de clorofila. Por ejemplo, el déficit de Fe que se presentó en el cultivo pudo haber influido directamente en la productividad de la planta, ya que al ser constituyente de la clorofila puede afectar la tasa fotosintética proceso que da como resultado la biomasa de la planta (Güler & Büyük, 2009).

La tasa fotosintética y el rendimiento se ve afectado por una serie de factores internos (la actividad de la RuBisCO, la clorofila y el metabolismo de la planta) y externos (condiciones ambientales, el suelo y/o sustrato, condiciones hídricas) (Gutiérrez- Rodríguez *et al.*, 2005), por lo que el contenido de clorofila, puede que no sea suficiente como criterio único y aislado para explicar el comportamiento del rendimiento. Por tanto, su análisis debe tener un enfoque más integral con otros factores. En este caso, la tasa fotosintética podría ser un parámetro más integral y robusto para explicar el rendimiento de un cultivo. Al respecto, Gutiérrez- Rodríguez *et al.*, (2005), mencionan que, para obtener buenas relaciones entre la fotosíntesis y el rendimiento, es necesario que el cultivo crezca en condiciones idóneas sin limitaciones lumínicas e hídricas, factores que, en el presente estudio, pudieron influir en la relación entre ambas variables.

Conclusiones

Las variables directas evaluadas de contenido de nitrógeno y de clorofila muestran que existe un efecto por parte de los tratamientos nutricionales, presentando resultados prometedores para la evaluación in situ del contenido de clorofila y de nitrógeno.

En cuanto al contenido de clorofila, se observó que las variables SPAD, CCI y NDVI pueden determinar el contenido de clorofila en campo: en el presente estudio, los índices SPAD

y CCI presentaron buen potencial para determinar el contenido de clorofila aun en condiciones de deficiencias nutricionales como el caso del Fe, mientras que el NDVI en condiciones de deficiencia y de exceso.

Por otra parte, los índices $NDVI_G$, Fv/Fm y $NDVI_E$ mostraron buena capacidad para la estimación del contenido de N por lo que pueden ser utilizados para la evaluación del estado del N en la planta, aún ante una deficiencia de N. Asimismo el $NDVI_E$ demostró que puede ser un parámetro útil para determinar el estado del N ante un nivel intermedio de aportes de N, más que ante un exceso.

El tratamiento con nivel de nutrición media presentó los mejores rendimientos en comparación con los demás tratamientos, mostrando un comportamiento decreciente ante una deficiencia o exceso de N.

Recomendaciones

Se recomienda para investigaciones futuras, el uso de fórmulas nutricionales que sólo tengan como limitante el elemento de N, esto para evitar el efecto de otros elementos en el contenido de clorofila y en las variables evaluadas. Asimismo, se debe realizar la determinación del sitio de la hoja y/o planta a evaluar según cada instrumento.

Con respecto a nuevas variables, la literatura menciona que, ante una deficiencia de N, la concentración de flavonoides y carotenoides puede cambiar, por lo que estos parámetros también pueden ser indicadores del estado del N en la planta (Zhang *et al.*, 2019). Aunado a esto, se puede considerar el uso de otras longitudes de onda como el borde rojo (Li *et al.*, 2014).

Literatura consultada

Apogee instruments. 2018. Chlorophyll concentration meter. (en línea). Consultado el 9 feb. 2019. Disponible en <https://www.apogeeinstruments.com/content/MC-100-manual.pdf>

Azia, F., & Stewart, K. A. 2001. Relationships between extractable chlorophyll and SPAD values in muskmelon leaves. *Journal of Plant Nutrition*. 24(6): 961-966.

Baker, NR; Oxborough, K. 2004. Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. In *Chlorophyll a Fluorescence. Advances in Photosynthesis and Respiration*. (1994). Eds. G, Papageorgiou; C, Govindjee. Dordrecht, Holanda. Springer, Dordrecht. Vol. 19. p. 65-82.

Barbaro, L; Karlanian, M; Mata, D. 2014. Importancia del pH y la Conductividad Eléctrica (CE) en los sustratos para plantas. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca. Buenos Aires, Argentina.

Barranco Martín, JD. 2011. Efecto de los inhibidores de la nitrificación y de los productos derivados de la menadiona en la calidad de los frutos de la sandía.

Bauder, TA; Waskom, RM; Wardle, EM. sf. *Agricultural Nitrogen Management*. Colorado State University.

Bell, GE; Howell, BM; Johnson, GV; Raun, WR; Solie, JB; Stone, ML. 2004. Optical sensing of turfgrass chlorophyll content and tissue nitrogen. *HortScience*. 39(5): 1130-1132.

Bernhard, A. 2010. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge*. 3(10):25.

Bodirsky, BL; Popp, A; Lotze-Campen, H; Dietrich, JP; Rolinski, S; Weindl, I; Biewald, A. 2014. Reactive nitrogen requirements to feed the world in 2050 and potential to mitigate nitrogen pollution. *Nature communications*. 5(1): 1-7.

Bojović, B; Marković, A. 2009. Correlation between nitrogen and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.). Kragujevac Journal of Science. 31(5827): 69-74.

Bolaños, J; Echandi, C; Barrantes, L; Bonilla, K. 2018. Manual técnico basado en experiencias con el híbrido “Dulcítico” (*Capsicum annuum*). San José, Costa Rica. INTA. 80 p.

Briat, J. F; Dubos, C; Gaymard, F. (2015). Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. Trends in Plant Science. 20(1): 33-40.

Byrnes, BH. 1990. Environmental effects of N fertilizer use. Fertilizer research. 26(1-3): 209-215.

Caesar, J; Tamm, A; Ruckteschler, N; Leifke, AL; Weber, B. 2018- Revisiting chlorophyll extraction methods in biological soil crusts-methodology for determination of chlorophyll a and chlorophyll a + b as compared to previous methods. Biogeosciences. 15: 1415-1424.

Castilla, N. 2007. Invernaderos de plástico: tecnología y manejo. 2 ed. Madrid, España. Mundi prensa. 29-30 p.

Chemicals, H. 2016. Nutritional recommendations for pepper.

Corrales, M; Bertsch, F; Bejarano, J. A. 2005. Los laboratorios de análisis de suelos y foliares en Costa Rica: Informe del comité de laboratorios de análisis de suelos, plantas y aguas. Agronomía Costarricense. 29(3):125-135.

Costa, F; de Lima, A; Magalhães, ID; Garófalo, LH; Carvalho, HO. 2018. Fruit production and SPAD index of pepper (*Capsicum annuum* L.) under nitrogen fertilizer doses. Australian Journal of Crop Science. 12(1): 11-15.

Croft, H; Chen, JM. 2018. Leaf pigment content. In Comprehensive Remote Sensing; Liang, S., Ed.; Elsevier: Oxford, UK. 117–142 pp.

de Caram, Gladis A; Angeloni, Patricia; Prause, Juan. (2007). Determinación de la Curva de Dilución de Nitrógeno en Diferentes Fases Fenológicas del Girasol. Agricultura Técnica. 67(2): 189-195.

de Ávila Silva, L; Condori-Apfata, J. A; Marcelino, M. M; Tavares, A. C. A; Raimundi, S. C. J; Martino, P. B; Nunes-Nesi, A. 2019. Nitrogen differentially modulates photosynthesis, carbon allocation and yield related traits in two contrasting *Capsicum chinense* cultivars. Plant Science. 283: 224-237.

Deveci, M; Pitir, M. 2016. Effect of water deficiency on physiological and chemical properties of pepper grown in greenhouse. Applied ecology and environmental research.14(3): 587-596.

Evans, J R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. Oecologia. 78(1): 9-19.

Gabriel, JL; Quemada, M; Alonso-Ayuso, M; Lizaso, JI; Martín-Lammerding, D. 2019. Predicting N status in maize with clips sensors: choosing sensor, leaf sampling point, and timing. Sensors. 19(18): 3881.

Gómez, L. R. 2016. Evaluación de medidas de nitrógeno en planta para su uso como sistema de recomendación de abonado nitrogenado en el cultivo de coliflor (Doctoral dissertation, Universidad de La Rioja). 33 p.

Güler, S; Büyük, G. 2004, September. Relationships among chlorophyll-meter reading value, leaf N and yield of cucumber and tomatoes. In III Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes. 307-311 p.

Güler, S; Büyük, G. 2004. Relationships among chlorophyll-meter reading value, leaf N and yield of cucumber and tomatoes. In III Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes. 729: 307-311.

Gutiérrez, MV; Cadet, E; Rodríguez, W; Araya, JM. 2011. El Greenseeker y el diagnóstico del estado de salud de los cultivos. Agronomía mesoamericana. 22(2): 397-403.

Gutiérrez-Rodríguez, M; Reynolds, M. P; Estrada, J. A. E; Larqué-Saavedra, A. 2005. Algunas consideraciones en la relación entre fotosíntesis y el rendimiento de grano en trigo. CIENCIA ergo-sum. Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva. 12(2): 149-154.

Hashemi, S. A; Chenani, S. K. 2011. Investigation of NDVI index in relation to chlorophyll content change and phenological event. *Recent Advances in Environment, Energy Systems and Naval Science*. 22-28.

Hokmalipour, S; Darbandi, MH. 2011. Effects of nitrogen fertilizer on chlorophyll content and other leaf indicate in three cultivars of maize (*Zea mays* L.). *World Applied Sciences Journal*. 15(12): 1780-1785.

Huang, Z. A; Jiang, D. A; Yang, Y; Sun, J. W; Jin, S. H. 2004. Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica*. 42(3): 357-364.

Instituto Nacional de Estadística y Censos. 2017. Anuario estadístico 2014-2015. INEC. San José, Costa Rica. 46 p.

IFA. 2019. Global Sustainability Report 2019. Consultado el 15 mar. 2020. Disponible en https://www.fertilizer.org/public/resources/publication_detail.aspx?SEQN=5880&PUBKEY=E5784199-99B4-4DCF-B2D1-B286D65AB905

Jarrell, W. M; Beverly, R. B. 1981. The dilution effect in plant nutrition studies. In *Advances in agronomy*. 34: 197-224.

Jiménez, U; Campos, H; Vicente, J; Marín, S., Barrantes, L; Carrillo, M. 2007. *Agrocadena regional: cultivo del chile dulce*. Dirección Regional Central Occidental, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Grecia, Alajuela, Costa Rica.

Jin, X; Yang, G; Tan, C; Zhao, C. 2015. Effects of nitrogen stress on the photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and sugar-nitrogen ratio in corn. *Scientific reports*. 5(1): 1-9.

Kirkby, E. 2012. Introduction, Definition and Classification of Nutrients. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3–5 p.

Kjeldahl, J.G.C.T. 1883. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. 22(1): 366-382.

Leghari, SJ; Wahocho, NA; Laghari, MG; Laghari, AH; Bhabhan, MG; Talpur, KH; Bhutto, TA; Wahocho, SA; Lashari, AA. 2016. Role of nitrogen for plant growth and development: A review. Advances in Environmental Biology. 10(9): 209-218.

Lichtenthaler, HK; Wellburn, AR. 1955. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents Biochemical Society Transactions. 11: 591-592.

Lin, C; Popescu, SC; Huang, SC; Chang, PT; Wen, HL. 2015. A novel reflectance-based model for evaluating chlorophyll concentrations of fresh and water-stressed leaves. Biogeosciences. 12(1): 49-66.

Li, F; Miao, Y; Feng, G; Yuan, F; Yue, S; Gao, X; Chen, X. 2014. Improving estimation of summer maize nitrogen status with red edge-based spectral vegetation indices. Field Crops Research. 157: 111-123.

Longchamps, L; Khosla, R. 2014. Early detection of nitrogen variability in maize using fluorescence. Agronomy Journal. 106(2): 511-518.

Lu, C. M; Zhang, J. H. 2000. Photosynthetic CO₂ assimilation, chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. Plant Sci. 151: 135-143.

Marín, F. 2010. Cuantificación y valoración de estructuras y procesos de producción agrícola bajo ambientes protegidos en Costa Rica: informe final Proyecto Fittacori F-02-08. (en línea). Consultado el 2 oct. 2019. Disponible en http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual/bibliotecavirtual/a00290.pdf

Medellín, L. A. C; Roza, A. M. B; Trujillo, M. M. P. 2011. Ensayo preliminar sobre la utilización de un medidor portátil de clorofila para estimar el nitrógeno foliar en orégano (*Origanum vulgare* L.). Revista Facultad de Ciencias Básicas. 7(2): 150-165.

Monge-Pérez, J. E; Loría-Coto, M. 2018. Producción de chile dulce (*Capsicum annuum*) en invernadero: efecto de densidad de siembra y poda. Posgrado y Sociedad. Revista Electrónica Del Sistema De Estudios De Posgrado. 16(2): 19-38.

Muñoz-Huerta, R. F; Guevara-Gonzalez, R. G; Contreras-Medina, L. M; Torres-Pacheco, I; Prado-Olivarez, J; Ocampo-Velazquez, R. V. 2013. A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. Sensors. 13(8): 10823-10843.

Netto, AT; Campostrini, E; Oliveira, JG; Bressan, RE. 2005. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. Scientia Horticulturae. 104(2005): 199-209.

Neuwirthová, E; Lhotáková, Z; Albrechtová, J. 2017. The effect on leaf reflectance and vegetation indices measured by contact probe during the season. Sensors. 17(6): 1-23.

Ni, Z; Kim, ED; Chen, ZF. 2015. Chlorophyll and starch assays: Protocol exchange. Nature publishing group.

O'neill, PM; Shanahan, JF; Schepers, JS. 2006. Use of Chlorophyll Fluorescence Assessments to Differentiate Corn Hybrid Response to Variable Water Conditions. Crop Science. 46(2): 681-687.

Onoda, Y; Hikosaka, K; Hirose, T. 2004. Allocation of nitrogen to cell walls decreases photosynthetic nitrogen-use efficiency. Functional Ecology. 419-425.

Opti-Sciences. 2012. OS-30 p+ Chlorophyll fluorometer: Field portable hand held instrument designed for F_v/F_M , F_v/F_0 , and advanced OJIP measurements. (en línea). Consultado el 12 feb. 2019. Disponible en <https://www.optisci.com/os30p.html>

Padilla, FM; De Souza, R; Peña, MT, Gallardo, M; Giménez, C; Thompson, RB. 2018. Different responses of various chlorophyll meters to increasing nitrogen supply in sweet pepper. Frontiers in Plant Science. 9: 1752.

Padilla, FM; Gallardo, M; Peña, MT; de Souza, R; Thompson, RB. 2018. Proximal optical sensors for nitrogen management of vegetable crops: a review. *Sensors* 2018.

Padilla, FM; Peña, MT; Gallardo, M; Giménez, C, Thompson, RB. 2017. Derivation of sufficiency values of a chlorophyll meter to estimate cucumber nitrogen status and yield. *Computers and Electronics in Agriculture*. 141(2017): 54-64.

Padilla, FM; Peña, MT; Gallardo, M; Thompson, RB. 2014. Threshold values of canopy reflectance indices and chlorophyll meter readings for optimal nitrogen nutrition of tomato. *Annals of Applied Biology*. 166(2015): 271-285.

Padilla, FM; Thompson, RB; Peña, MT; Gallardo, M. 2018. Reference values for phenological phases of chlorophyll meter readings and reflectance indices for optimal N nutrition of fertigated tomato. *Acta Horticulturae*. (1192): 65-72.

Pardos, JA. 2004. Respuestas de las plantas al anegamiento del suelo. *Investigación Agraria*. (2004): 101-107.

Parry, C; Blonquist Jr, J. M; Bugbee, B. 2014. In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship. *Plant, cell & environment*. 37(11): 2508-2520.

Pérez-Molina, J. P; Castro Lara, R; Portuguese Brenes, I; Araya Trejos, V, Quesada Traña, A. 2020. Chlorophyll fluorescence and biomass partitioning within light and nitrogen deficiency: An example of the use of the R programming language for teaching. *Cuadernos de Investigación UNED*. 12(1): 92-105.

Porra, RJ; Thompson, WA; Kriedemann, PE. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 975(1989): 384-394.

Quesada, G. 2015. Producción de chile dulce en invernadero bajo diferentes niveles de agotamiento en la humedad del sustrato. *Agronomía Costarricense*. 39(1): 25-36.

Ramirez, M. B; Allen, P. B; Freeland, R. S.; Wilkerson, J. B. 2015. Ground-Based NDVI Sensing: Separating the Ground Surface from the Cotton Canopy. *Transactions of the ASABE*. 58(3): 597-605.

Ramírez, Vargas, C; Nienhuis, J. 2012. Cultivo protegido de hortalizas en Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*. 25(2): 10-20.

Sainju, UM; Ghimire, R; Pradhan, GP. 2019. Nitrogen Fertilization I: Impact on Crop, Soil, and Environment. In *Nitrogen Fixation*. IntechOpen.

Salas, L. 2012. Chile dulce se exportó por primera vez a EE. UU. *CRHoy.com Noticias* 24, 7, 23.

Sánchez, RA; Hall, AJ; Trapani, N; Hunau, RC. 1983. Effects of water stress on the chlorophyll content, nitrogen level and photosynthesis of leaves of two maize genotypes. *Photosynthesis Research*. 4(1): 35-47.

Science Communication Unit. 2013. Nitrogen pollution and the European environment. University of the West of England. (en línea). Consultado el 3 oct. 2019. Disponible en https://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/IR6_en.pdf

Silva, J; Torres, P; Madera, C. 2008. Domestic wastewater reuse in agriculture. *Agronomía Colombiana*. 26(2): 347-359.

Shany, M. 2004. Producción de hortalizas en condiciones tecnificadas. IICA.

Sonneveld, C; Voogt, W. 2009. Nutrient management in substrate systems: Plant nutrition of greenhouse crops- 277-312 pp.

Spectrum technologies. 2009. SPAD 502 Plus Chlorophyll meter: Product manual. (en línea). Consultado el 10 feb. 2019. Disponible en

https://www.specmeters.com/assets/1/22/2900P_SPAD_502.pdf

Taskos, D. G; Koundouras, S; Stamatiadis, S; Zioziou, E; Nikolaou, N; Karakioulakis, K; Theodorou, N. 2015. Using active canopy sensors and chlorophyll meters to estimate grapevine nitrogen status and productivity. *Precision Agriculture*. 16(1): 77-98.

Ulissi, V; Antonucci, F; Benincasa, P; Farneselli, M; Tosti, G; Guiducci, M; Tei, F; Costa, C; Pallottino, F; Pari, L; Menesatti, P. 2011. Nitrogen concentration estimation in tomato leaves by VIS-NIR non-destructive spectroscopy. *Sensors*. 11: 6411-6424.

UNE-EN 13041 :2001: Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo: Determinación de propiedades físicas. Densidad aparente seca, volumen de aire, de agua, valor de contracción y porosidad total. AENOR. Madrid, España. 25 p.

Wu, Y. W, Qiang, L. I; Rong, J. I. N; Wei, C. H. E. N; Liu, X. L, Kong, F. L; Yuan, J. C. 2019. Effect of low-nitrogen stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics of maize cultivars with different low-nitrogen tolerances. *Journal of Integrative Agriculture*. 18(6): 1246-1256.

Wu, X; Guo, J; Zhao, C; Chen, L; Zhang, Y; Fang, Z; Yang, Y. Y. 2012. Research and application of non-destructive testing diagnosis technology of tomato. *Sensor Letters*. 10(1-2): 666-669.

Xiong, D; Chen, J; Yu, T; Gao, W; Ling, X; Li, Y; Huang, J. 2015. SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics. *Scientific reports*: 5.

Yang, J; Gong, W; Shi, S; Du, L; Sun, J; Song, S; Chen, B; Zhang, Z. 2016. Analyzing the performance of fluorescence parameters in the monitoring of leaf nitrogen content of paddy rice. *Sci. Rep*. 6.

Yasuor, H; Ben-Gal, A; Yermiyahu, U; Beit-Yannai, E; Cohen, S. 2013. Nitrogen management of greenhouse pepper production: Agronomic, nutritional, and environmental implications. *HortScience*. 48(10): 1241-1249.

Zhang, K; Liu, X; Ma, Y; Zhang, R; Cao, Q; Zhu, Y; Tian, Y. 2019. A comparative assessment of measures of leaf nitrogen in rice using two leaf-clip meters. *Sensors*. 20(1): 175.

Živčák, M; Olšovská, K; Slamka, P; Galambošová, J; Rataj, V; Shao, H. B; & Brestič, M. 2015. Application of chlorophyll fluorescence performance indices to assess the wheat photosynthetic functions influenced by nitrogen deficiency. *Plant, Soil and Environment*. 60(5): 210-215.

Zhu, J; Tremblay, N; Liang, Y. 2012. Comparing SPAD and atLEAF values for chlorophyll assessment in crop species. *Canadian Journal of Soil Science*. 92(4): 645-648.

Anexos

Anexo 1. Datos de la prueba de viabilidad realizada en el almácigo.

Variable	Dato
PF tallo (g/pl)	0,68295
PF hoja (g/pl)	1,054
PF Raíz (g)	1,24655
PF total (g/pl)	2,9835
PS tallo (g/pl)	0,0625
PS hoja (g/pl)	0,1122
PS Raíz (g)	0,09835
PS total (g/pl)	0,27305
Grosor tallo (mm)	2,935
Long tallo (cm)	10,825
Long raíz (cm)	9,065
# Hojas	5,9

Anexo 2. Datos de soluciones nutritivas consultadas en fuentes literarias para la determinación de la solución utilizada en el proyecto.

Fuente	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Mn	Zn	B	Mo	Na	Cl
Castellanos, 2008	95	8,8	24,9	120,7	21	7,5	3	0,2	1	0,6				
González <i>et al.</i> , 2008	49,69	16,84	253,50	200,00	60,00								92,00	14,2
Prieto <i>et al.</i> , 2007							2,33	0,03	0,5	0,05	0,1	0,03		
Charlo <i>et al.</i> , 2012	15,6	52	270,1	9,9	6,6	92,1	0,4	0,1	0,1	0,5	0,5		12,6	
Jara-Delgado, 2016	190	35	210	150	45	70	1	0,10	0,5	0,15	0,5	0,05		
Wamser <i>et al.</i> , 2017	168	40,3	351	112	28,8	19,2	3,7	0,05	0,4	0,3	0,3			
Hoagland & Arnon (1938)														
	210	31	234	160	34	64	2,5	0,02	0,5	0,05	0,5	0,01		
Steiner, 1984	168	31	273	180	48	336	2,1	0,02	0,62	0,11	0,44			
Haifa, sf	62,42	77,75	254,2	190,5	36,5	111,57								
Van der Lugt <i>et al.</i> , 2016	61,46	39,00	264,00	200,00	36,00	56,00								
Promedio	116,8	37,7	237,1	148,7	36,1	94,4	2,3	0,2	0,7	0,3	0,4	0,4	52,3	14,2