



Departamento de Agronomía  
Escuela Superior de Ingeniería  
Universidad de Almería

**Agronomic tools to optimize N management in  
greenhouse horticultural crops with fertigation**

**Ph.D. Dissertation**

Alejandra Cristina Rodríguez Chaves

Almería, noviembre de 2021



**Agronomic tools to optimize N management in  
greenhouse horticultural crops with fertigation**

Ph.D. Dissertation

**Herramientas agronómicas para optimizar  
la gestión del N en cultivos hortícolas en  
invernadero con fertirriego**

Tesis Doctoral

Alejandra Cristina Rodríguez Chaves

Almería, noviembre de 2021



## **Autorización de los Directores**

Esta tesis, “Herramientas agronómicas para optimizar la gestión del N en cultivos hortícolas en invernadero con fertirriego”, se presenta para aspirar al título de Doctor por la Universidad de Almería de:

Alejandra Cristina Rodríguez Chaves

Esta tesis se realizó en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Almería, dentro del programa de doctorado “Agricultura Protegida”, en la línea de investigación “Control Climático y Gestión del Agua en Agricultura Protegida”.

Almería, noviembre de 2021

Rodney B. Thompson  
Director

María L. Gallardo  
Tutora



## **Agradecimientos**

A Dios Todopoderoso, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por acompañarme y protegerme a lo largo de mi vida. Él nunca me ha abandonado.

A la Universidad de Costa Rica, por permitirme continuar con mi formación profesional en el exterior. Además, a la Oficina de Asuntos Internacionales por la realización de su trabajo, y por estar siempre pendientes del bienestar de sus becarios.

A mi director de tesis Rodney B. Thompson, por su paciencia y sus consejos, por compartir conmigo sus valiosos conocimientos y animarme en los momentos difíciles. Gracias por ser un guía y un ejemplo profesional y ayudarme a concluir con éxito esta etapa académica.

A mi tutora Marisa Gallardo, por compartir conmigo su experiencia profesional y aportes durante el desarrollo de esta tesis doctoral. A Paco Padilla, por sus sugerencias y por toda su ayuda en el análisis de datos, principalmente con estadística. Gracias por enseñarme siempre. A Tere Peña, quién además de ser un apoyo profesional que me enseñó todo lo que pudo en los análisis y procesos de laboratorio y sobre todo en la ejecución del trabajo de campo, fue una amiga siempre, ella con su carisma me hizo sentir en casa muchas veces. A todos ellos gracias por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y darme la mejor formación científica.

Al personal de la finca UAL-ANECOOP, que con su labor en el manejo de los cultivos colaboraron en el desarrollo de esta tesis.

A los compañeros docentes de la Sede Guanacaste de la Universidad de Costa Rica que me apoyaron, confiaron y motivaron para la realización de este proyecto profesional, especialmente a Razziel Acevedo, Vidal Vega, Jacqueline Cerdas, Patricia Vásquez, Lang Ying Hernández, Herbert Dormond y Gabriel Garbanzo.

A mi esposo Pablo, por su infinita paciencia, apoyo, comprensión y ayuda desde el inicio de este camino de superación personal y profesional que emprendimos juntos. Ha estado a mi lado en los mejores y más difíciles momentos, juntos lo hemos logrado.

A todos mis familiares y amigos en Costa Rica, su gran apoyo fue muy importante para mí, gracias por sus oraciones y ánimos siempre.

A mi madre, quién siempre me ha dado su amor y apoyo incondicional, gracias por todo mami. A mis hermanos Diego y Fabi, quienes siempre confiaron en mí.





## Tabla de contenidos

<b>Scientific contributions during the predoctoral stage</b> .....	<b>i</b>
Published JCR articles included in the doctoral thesis .....	i
Other published JCR articles not included in the doctoral thesis .....	i
Proceedings and conference communications .....	i
<b>1. Summary</b> .....	<b>1</b>
1.1. Summary .....	3
1.2. Resumen.....	7
<b>2. Introducción</b> .....	<b>11</b>
2.1. Nitrógeno en la agricultura intensiva .....	13
2.2. Los problemas asociados con el uso de N en la agricultura.....	13
2.3. La lixiviación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y sus impactos medio ambientales .....	14
2.4. El sistema de producción de hortalizas en invernadero en el sureste de España .....	15
2.5. Prácticas para optimizar el manejo de N en los cultivos hortícolas .....	17
2.6. Métodos de monitorización para optimizar el manejo de N en los cultivos hortícolas .....	18
2.7. Referencias.....	20
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>29</b>
<b>4. CHAPTER ONE: Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss</b> .....	<b>33</b>
4.1. Abstract.....	35
4.2. Introduction.....	35
4.3. Material and methods.....	37
4.3.1. Experimental site .....	37
4.3.2. Pepper crops and experimental N treatments.....	38
4.3.3. Measurements .....	41
4.3.3.1. Climatic data .....	41
4.3.3.2. Soil mineral N .....	44
4.3.3.3. Irrigation volume, drainage, and nitrate leaching .....	44
4.3.3.4. Determination of crop dry matter production and N uptake.....	44
4.3.3.5. Determination of the critical N curve (CNC) for sweet pepper .....	46
4.3.3.6. Evaluation of the contribution of fruit to the CNC of sweet pepper .....	46

4.3.3.7. Calculation of nitrogen nutrition index and critical N uptake amount values .....	47
4.3.3.8. Total available nitrogen .....	47
4.3.3.9. Nitrogen use efficiency indices .....	48
4.3.4. Data analysis .....	48
4.4. Results .....	49
4.4.1. Determination and evaluation of a critical nitrogen dilution curve for sweet pepper .....	49
4.4.1.1. Crop biomass and crop nitrogen content .....	49
4.4.1.2. Critical N dilution curve for sweet pepper .....	49
4.4.1.3. Assessment of N dilution in sweet pepper CNC .....	50
4.4.1.4. Nitrogen nutrition index .....	51
4.4.1.5. Critical N uptake .....	53
4.4.2. Agronomic response .....	54
4.4.2.1. Effect of N treatments on yield, dry matter production, and N uptake .....	54
4.4.2.2. Total yield response to total available nitrogen (TAN) .....	55
4.4.2.3. Nitrogen use efficiency .....	57
4.4.2.4. Effect of N treatments on N loss and residual soil mineral N .....	60
4.5. Discussion .....	62
4.5.1. Critical N curve .....	62
4.5.1.1. Critical N dilution in sweet pepper .....	62
4.5.1.2. NN <i>i</i> – maximum relative yield and luxury N uptake .....	63
4.5.2. Response of sweet pepper to total available N .....	63
4.5.2.1. Recommended N supply .....	64
4.5.2.2. Nitrogen use efficiency .....	65
4.5.2.3. Potential for NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> leaching loss to the environment .....	66
4.6. Conclusions .....	66
4.7. References .....	66

**5. CHAPTER TWO: Soil monitoring methods to assess immediately available soil N for fertigated sweet pepper .....** **73**

5.1. Abstract .....	75
5.2. Introduction .....	75
5.3. Materials and Methods .....	78
5.3.1. Experimental site and crops .....	78
5.3.2. Experimental design and treatments .....	79

5.3.3. Obtaining and analysis of samples of soil solution and 1:2 soil to water (v/v) extract.....	81
5.3.3.1. Soil solution.....	81
5.3.3.2. The 1:2 soil to water (v/v) extract method.....	81
5.3.4. Determination of crop Nitrogen Nutrition Index (NNI).....	82
5.3.5. Data analysis .....	83
5.4. Results.....	84
5.4.1. Soil solution [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ].....	84
5.4.1.1. Responses of soil solution [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] to N treatments .....	84
5.4.1.2. Response of NNI to N treatments.....	86
5.4.1.3. Relationship between NNI and soil solution [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ].....	86
5.4.1.4. Sufficiency values of soil solution [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] for optimal N nutrition.....	89
5.4.2. [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] in the 1:2 soil to water (v/v) extract.....	89
5.4.2.1. Response of [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] in the 1:2 soil to water (v/v) extract to N treatments .....	89
5.4.2.2. Response of NNI to N treatments.....	90
5.4.2.3. Relationship between NNI and [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] of the 1:2 soil to water (v/v) extract .....	90
5.4.2.4. Sufficiency values of [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] of the 1:2 soil to water (v/v) extract for optimal N nutrition.....	93
5.4.3. Relationship between soil solution [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] and applied nutrient solution [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] .....	93
5.4.4. Relationship between [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] of the 1:2 soil to water (v/v) extract and the applied nutrient solution [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] .....	95
5.4.5. Relationship between soil solution [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] and [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] of the 1:2 soil to water (v/v) extract.....	98
5.4.6. Variability of the measurements of the soil solution [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] and [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] of the 1:2 soil to water (v/v) extract.....	99
5.5. Discussion.....	99
5.5.1. Relationships of [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] in soil solution and 1:2 soil to water (v/v) extract, to N supply and NNI.....	99
5.5.2. Sufficiency values.....	100
5.5.3. General considerations of the use of the soil solution and 1:2 soil to water (v/v) extract methods .....	101
5.5.4. General application of results .....	102
5.6. Conclusions .....	102
5.7. References .....	103

**6. CHAPTER THREE: Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper ..... 107**

6.1. Abstract.....	109
6.2. Introduction.....	109
6.3. Materials and Methods.....	112
6.3.1. Experimental site.....	112
6.3.2. Pepper crops and N treatments.....	112
6.3.3. Petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] measurements.....	116
6.3.4. Determination of crop dry matter production, crop N concentration, crop N uptake, and yield.....	116
6.3.5. Determination of crop Nitrogen Nutrition Index (NNI).....	117
6.3.6. Data analysis.....	118
6.3.6.1. Relationship between crop NNI and petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N].....	118
6.3.6.2. Determination of integrated petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] and NNI values.....	118
6.3.6.3. Determination of petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] sufficiency values for maximum growth.....	119
6.4. Results.....	120
6.4.1. Effect of N on petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] of sweet pepper crops.....	120
6.4.1.1. Petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] throughout the crops.....	120
6.4.1.2. Integrated petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] values.....	121
6.4.2. Effect of N on NNI of sweet pepper crops.....	122
6.4.2.1. NNI throughout the crops.....	122
6.4.2.2. Effect of N on integrated NNI values.....	125
6.4.3. Relationship between NNI and petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] for entire crop.....	125
6.4.4. Relationships between NNI and petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N], and derivation of sufficiency values, for each phenological stage.....	129
6.5. Discussion.....	131
6.5.1. Petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] during the crop.....	131
6.5.2. Relationship of petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] to crop NNI.....	132
6.5.3. Petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] sufficiency values.....	133
6.5.4. General observations.....	134
6.6. Conclusions.....	134
6.7. References.....	134

**7. CAPÍTULO CUATRO: Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero ..... 139**

7.1. Introducción .....	141
7.2. Materiales y métodos .....	143
7.2.1. Sitio experimental.....	143
7.2.2. Cultivos y tratamientos experimentales.....	144
7.2.3. Medidas .....	146
7.2.3.1. Savia del peciolo.....	146
7.2.3.2. Contenido de N en la hoja (%N) .....	147
7.2.3.3. Producción de materia seca y producción total.....	147
7.2.3.4. Índice de nutrición de N (Nitrogen Nutrition Index; NNI) .....	148
7.2.4. Análisis estadístico de datos.....	148
7.3. Resultados .....	149
7.3.1. Efecto de la concentración de N aplicado sobre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pepino.....	149
7.3.1.1. Diferencias en la medida de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) entre cultivares de pepino .....	149
7.3.1.2. La $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo en pepino .....	149
7.3.1.3. El contenido de N en la hoja (%N) en pepino .....	151
7.3.1.4. Relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y contenido de N en la hoja (%N) durante el ciclo del cultivo de pepino.....	152
7.3.2. Efecto de la concentración de N aplicado sobre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de melón .....	159
7.3.2.1. Diferencias en la medida de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) entre cultivares de melón.....	159
7.3.2.2. La $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo en melón.....	159
7.3.2.3. El contenido de N en la hoja (%N) en melón.....	161
7.3.2.4. Relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y contenido de N en la hoja (%N) durante el ciclo del cultivo de melón .....	164
7.3.3. Efecto de la concentración de N aplicado sobre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pimiento .....	168
7.3.3.1. Diferencias en la medida de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) entre cultivares de pimiento .....	168
7.3.3.2. La $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo en pimiento .....	169
7.3.3.3. El contenido de N en la hoja (%N) en pimiento .....	171
7.3.3.4. Relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y contenido de N en la hoja (%N) durante el ciclo del cultivo de pimiento .....	174
7.4. Discusión.....	180
7.4.1. Respuesta del cultivar sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo .....	180

7.4.2. Respuesta del cultivar sobre las medidas del contenido de N en la hoja (%N)	182
7.4.3. Evaluación de la relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia y el contenido de N en la hoja.....	182
7.4.4. Evaluación de la relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y NNI.....	183
7.5. Conclusiones.....	184
7.6. Referencias.....	184
<b>8. CAPÍTULO CINCO: Evaluación del muestreo y almacenamiento de los peciolo y la savia sobre la medida de nitrato en savia de peciolo en cultivos hortícolas en suelo en invernadero.....</b>	<b>189</b>
8.1. Introducción .....	191
8.2. Materiales y métodos.....	192
8.2.1. Sitio experimental.....	193
8.2.2. Cultivos y tratamientos de N.....	194
8.2.3. Medidas climáticas .....	195
8.2.4. Medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia.....	195
8.2.5. Experimentos.....	196
8.2.5.1. Experimento 1: Efecto de la hora de muestreo de los peciolo sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia.....	196
8.2.5.2. Experimento 2: Gestión de los peciolo muestreados y savia diluida sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia.....	196
8.2.5.2.1. Gestión de peciolo.....	197
8.2.5.2.2. Gestión de savia diluida.....	197
8.2.5.3. Experimento 3: Influencia de la posición de los peciolo de las hojas muestreados en la planta sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia.....	198
8.2.6. Análisis de datos.....	199
8.2.6.1. Experimento 1.....	199
8.2.6.2. Experimento 2.....	199
8.2.6.3. Experimento 3.....	199
8.3. Resultados .....	200
8.3.1. Experimento 1: Efecto de la hora del día sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia.....	200
8.3.1.1. Medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia en el cultivo de pimiento .....	200
8.3.1.2. Medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia en el cultivo de melón.....	201
8.3.2. Experimento 2: Gestión de los peciolo muestreados y savia diluida sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia.....	203
8.3.2.1. Gestión de los peciolo .....	203

8.3.2.1.1. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las medidas de la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] en la savia de peciolo almacenados .....	204
8.3.2.2. Gestión de la savia diluida.....	205
8.3.2.2.1. Efecto del tipo de almacenamiento sobre las medidas de la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] en la savia almacenada.....	205
8.3.2.2.2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las medidas de la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] en la savia almacenada.....	206
8.3.2.3. Relación entre el almacenamiento no refrigerado y refrigerado en las medidas de la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] de la savia.....	207
8.3.2.4. Comparación entre la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] de la savia previamente extraída y almacenada con la savia de los peciolo almacenados .....	208
8.3.3. Experimento 3: Influencia de la posición de los peciolo de las hojas muestreados en la planta sobre las medidas de la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] en la savia .....	209
8.4. Discusión.....	212
8.4.1. La [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] en la savia del peciolo durante el día.....	212
8.4.2. Respuesta de la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] sobre la gestión de peciolo y savia almacenada.....	213
8.4.2.1. Cambios en la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] a través del tiempo.....	213
8.4.2.2. Efecto de la refrigeración en la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] en la savia.....	214
8.4.2.3. Efecto de la congelación de los peciolo en la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] en la savia.....	214
8.4.2.4. Comparación de la [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] en peciolo almacenados y en savia almacenada .....	215
8.4.2.5. Recomendaciones generales sobre la gestión de las muestras de peciolo y savia .....	215
8.4.3. Efecto de la posición de la hoja muestreada.....	216
8.5. Conclusiones.....	217
8.6. Referencias.....	217
<b>9. Discusión.....</b>	<b>221</b>
9.1. Referencias.....	227
<b>10. Conclusiones .....</b>	<b>229</b>
10.1. Capítulo uno .....	231
10.2. Capítulo dos.....	231
10.3. Capítulo tres.....	232
10.4. Capítulo cuatro.....	233
10.5. Capítulo cinco .....	233
<b>11. Material suplementario .....</b>	<b>235</b>

11.1. Chapter one: Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss .....	237
11.1.1. Supplementary Table .....	237
11.1.2. Supplementary Figure .....	238
11.2. Chapter three: Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper .....	239
11.2.1. Supplementary Table .....	239
11.3. Capítulo cuatro: Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero .....	240
11.3.1. Tabla Suplementaria .....	240
11.4. Capítulo cinco: Evaluación del muestreo y almacenamiento de los peciolo y la savia sobre la medida de nitrato en savia de peciolo en cultivos hortícolas en suelo en invernadero .....	241
11.4.1. Figura Suplementaria .....	241
<b>12. Lista de Tablas y Figuras .....</b>	<b>243</b>
12.1. Lista de Tablas .....	245
12.2. Lista de Figuras .....	253
<b>13. Anexo .....</b>	<b>261</b>
13.1. Relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y el NNI en diferentes cultivares de pepino, melón y pimiento .....	263
13.1.1. Introducción .....	263
13.1.2. Metodología .....	263
13.1.2.1. Determinación del Índice de Nutrición de N (Nitrogen Nutrition Index; NNI) .....	263
13.1.2.2. Análisis de datos de la relación de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y NNI. ....	264
13.1.3. Resultados .....	264
13.1.3.1. Relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y el estado de N .....	264
13.1.3.1.1. Cultivo de pepino .....	264
13.1.3.1.2. Cultivo de melón .....	267
13.1.3.1.3. Cultivo de pimiento .....	270
13.1.4. Referencias .....	272



## Scientific contributions during the predoctoral stage

### Published JCR articles included in the doctoral thesis

**Rodríguez, A.**, Peña-Fleitas, M.T., Padilla, F.M., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2021. Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 285, 110157. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110157>. JCR impact factor: 3.463. Quartile: Q1.

**Rodríguez, A.**, Peña-fleitas, M.T., Padilla, F.M., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2020. Soil monitoring methods to assess immediately available soil N for fertigated sweet pepper. *Agronomy*. 10, 2000. <https://doi.org/10.3390/agronomy10122000>. JCR impact factor: 3.417. Quartile: Q1.

**Rodríguez, A.**, Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., de Souza, R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2020. Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss. *Eur. J. Agron.* 117, 126046. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126046>. JCR impact factor: 5.124. Quartile: Q1.

### Other published JCR articles not included in the doctoral thesis

Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Padilla, F.M., **Rodríguez, A.**, Thompson, R.B., 2021. Use of a portable rapid analysis system to measure nitrate concentration of nutrient and soil solution, and plant sap in greenhouse vegetable production. *Agronomy*. 11, 819. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050819>. JCR impact factor: 3.417. Quartile: Q1.

Gallardo, M., Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., de Souza, R., **Rodríguez, A.**, Thompson, R.B., 2020. Crop response of greenhouse soil-grown cucumber to total available N in a Nitrate Vulnerable Zone. *Eur. J. Agron.* 114, 125993. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2019.125993>. JCR impact factor: 5.124. Quartile: Q1.

### Proceedings and conference communications

**Rodríguez, A.**, Peña-Fleitas, M.T., Thompson, R.B., 2019. Dterminación del estado de N usando análisis de savia en peciolo en el cultivo de pimiento. In: II Congreso Jóvenes

Investigadores Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Almería. 17 October 2019. Almería, España. 271 pp. Tipo de presentación: póster.

**Rodríguez, A.**, Peña-Fleitas, M.T., Thompson, R.B., 2019. Determination of crop N status using petiole sap analysis in sweet pepper. In: EUVRIN-3rd-Workshop Fertilization and Irrigation. 09-11 september 2019. Pisa. Italy. 58-59 pp. Type of presentation: poster.

## **1. Summary**

---



## 1.1. Summary

Intensive greenhouse vegetable production systems are commonly characterized by abundant applications of nitrogen (N) fertilizers and of irrigation. Commonly, N applications appreciably exceed what is required to ensure high levels of production. The nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) leaching losses associated with excessive N application, in these greenhouse production systems, has resulted in  $\text{NO}_3^-$  contamination of aquifers and N enrichment of surface water bodies. In Almeria in southeastern (SE) Spain, the greenhouse-based vegetable production system is associated with considerable on-going  $\text{NO}_3^-$  contamination of underlying aquifers.

A crucial requirement for reducing N losses to the environment is to optimize N applications according to crop needs. To do so, it is necessary to have approaches and/or tools that provide information of crop N status or on the adequacy of the immediate N supply. Regular monitoring with such approaches/tools will facilitate the provision of a N supply that meets crop N demand thereby optimizing crop N status while avoiding excessive or insufficient N application. Such monitoring can be done in the soil or directly on the plant. This thesis evaluated the use of monitoring procedures to optimize crop N management N of vegetable crops. Different soil and plant monitoring procedures were examined in cucumber, muskmelon and pepper crops grown in greenhouse in Almeria, SE Spain.

The experimental work was carried out at the Experimental Farm of the University of Almeria in a greenhouse with similar characteristics to those used for commercial production in SE Spain. The data used to develop this thesis were obtained from four pepper crops (*Capsicum annuum* L.), one cucumber crop (*Cucumis sativus* L.) and two muskmelon crops (*Cucumis melo* L.). These were grown in soil with fertigation and drip irrigation. During the crops, complete nutrient solutions were applied in each irrigation. In each crop, different N treatments were applied as different N concentrations throughout the crops. The treatments consisted of N concentrations that were deficient, sufficient or excessive for crop N requirements.

Three pepper (cultivar 'Melchor') crops were grown during 2014–2015, 2016–2017 and 2017–2018, five N treatments were applied (very deficient, deficient, sufficient, excessive, and very excessive). Three additional individual crops were grown, each with three different N treatments (deficient, sufficient, excessive) applied to three different cultivars of the same species. In a cucumber crop grown in 2018, the three cultivars were 'Strategos', 'Pradera', and 'Miter'. In a muskmelon crop grown in 2020, the three cultivars were 'Tezac', 'Magiar', and 'Jacobo'. In a sweet pepper crop grow in 2020–2021, the three

cultivars were 'Melchor', 'Machado', and 'CLX PLRJ731'. Another muskmelon crop (cultivar 'Bosito') was grown in 2021, also with three different N treatments.

With the first three pepper crops, the Critical N Curve (CNC)  $\%Nc = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  was determined for greenhouse-grown pepper. The CNC enabled calculation of the N Nutrition Index (NNI), as an indicator of crop N status, to determine whether a pepper crop had deficient, optimal or excessive N status. These crops were also used to (i) develop recommendations for optimal N supply, as Total Available N (TAN) considering all N sources for maximum growth, (ii) to examine the relationship of N Use Efficiency (NUE) with TAN, and (iii) to examine the relationship of potential  $\text{NO}_3^-$  leaching loss to TAN.

In these three pepper crops, the relationships between NNI (as an indicator of crop N status) and the  $\text{NO}_3^-$  concentration of (i) the root-zone soil solution, (ii) the 1:2 soil:water extract, and (iii) petiole sap were evaluated. Additionally, sufficiency values based on maximum crop growth were established for these three parameters. Nitrate concentration measured in soil solution and in the 1:2 soil:water extract was strongly related to NNI throughout these pepper crops. The relationships between both of these parameters and NNI were described by segmented linear regressions. The general relationship for the entire pepper crop between NNI and soil solution  $\text{NO}_3^-$  concentration was  $y = 0.1116x + 0.7029$  (if  $x < x_0$ )  $y = 1.05$  (if  $x \geq x_0$ ), with an  $R^2$  of 0.70. That between NNI and the  $\text{NO}_3^-$  concentration in the 1:2 soil:water extract was determined as  $y = 0.4132x + 0.6588$  (if  $x < x_0$ )  $y = 1.04$  (if  $x \geq x_0$ ), with an  $R^2$  of 0.68. Similar relationships were obtained for each of the phenological stages, vegetative, flowering, and early fruit growth and harvest. Both of these methods were sensitive to excessive N application; the results indicating that they can be used to identify excessive N supply.

The plant-based measurement of petiole sap  $\text{NO}_3^-$  concentration was strongly related to NNI throughout these three pepper crops. The relationship between NNI and sap  $\text{NO}_3^-$  concentration was described by either polynomial regression or segmented linear regression. The general relationship between the NNI and the sap  $\text{NO}_3^-$  concentration for the entire pepper crop was determined by  $\text{NNI} = -1.10E - 07 \times \text{Sap}^2 + 0.000473 \times \text{Sap} + 0.5514$  with an  $R^2$  of 0.84, and  $\text{NNI} = 0.00034 \times \text{Sap} + 0.572$  (if  $x < x_0$ )  $y = 1.04$  (if  $x \geq x_0$ ), with an  $R^2$  of 0.83. Similar relationships were obtained for each of the phenological stages, vegetative, flowering, and early fruit growth and harvest. Sap  $\text{NO}_3^-$  concentration was particularly sensitive to N deficient application; the results indicating that it is useful to identify an insufficient N supply.

Sufficiency values or ranges for sweet pepper were determined for these three approaches. The sufficiency ranges for  $\text{NO}_3^-$  concentration in soil solution and the 1:2 soil:water extract were 5.0–15.0  $\text{mmol L}^{-1}$ , and 1.0–2.5  $\text{mmol L}^{-1}$  respectively. The sufficiency value derived for sap  $\text{NO}_3^-$  concentration in pepper was 1400  $\text{mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1}$ , this value is for the entire crop. The three approaches were all sensitive to crop N status. The sufficiency values and ranges determined can be used to improve N management of greenhouse pepper crops.

Petiole sap  $\text{NO}_3^-$  concentration and leaf N content were measured in cucumber, pepper and muskmelon crops, with three different cultivars, that received three different N treatments. Significant differences were detected between cultivars for a given N treatment, in muskmelon when the N supply was sufficient, and in cucumber and pepper when the N supply was excessive. Sap  $\text{NO}_3^-$  concentration and leaf N content were strongly related to one another in each crop species; for each cultivar in each species, this relationship was similar. The results indicated that cultivar can affect the petiole sap  $\text{NO}_3^-$  concentration and leaf N content of these species, and that the relationship between the two measures was consistent for different cultivars of a given species. The results suggested that it may be necessary to derive specific sufficiency values for different cultivars or different groups of related cultivars.

In the 2020–2021 pepper and 2021 muskmelon crops, several different methodological studies were conducted to examine the effects of time (hour of the day) of sampling, petiole and sap storage, and leaf position, on petiole sap  $\text{NO}_3^-$  concentration. The effect of the time of sampling was evaluated by collecting petioles at 08:00, 10:00, 12:00 and 14:00 hours, two times in each of the pepper and muskmelon crops. On each occasion, only one N treatments and one cultivar was sampled. The effect of storage and refrigeration of petioles and diluted sap (extracted immediately after petiole sampling) was examined by storing samples either in refrigeration at 5°C or un-refrigerated at 20°C, for 2, 3, 6 and 24 hours. The  $\text{NO}_3^-$ -concentration of petiole sap was also determined immediately after petiole sampling and in petioles that had been frozen for 7 days. The effect of leaf position was assessed by sampling petioles in high (the most recently fully expanded leaf), medium (five leaves below the high position) and low (ten leaves below the high position) positions of plants that three different N treatments (excessive, sufficient and deficient).

The effect of time of sampling on sap  $\text{NO}_3^-$ -concentration was inconsistent in the four different studies. While, it could not be concluded that the hour of sampling definitely affected the sap  $\text{NO}_3^-$  concentration, the results suggested that petiole sampling should be

done at the same time of day, between 10:00 h and 14:00 h to minimize possible effects from time of sampling. The effect of time of storage on the  $\text{NO}_3^-$  concentration of both petiole and diluted sap samples was very similar. Compared to immediate extraction, the  $\text{NO}_3^-$  concentration increased to 6 h, and then decreased between 6 and 24 h. The frozen petiole samples had similar  $\text{NO}_3^-$  concentration to that of petioles that were immediately extracted after sampling. The position of the sampled leaf did not significantly affect the sap  $\text{NO}_3^-$  concentration; however, there was a tendency to increase in the lower position of the leaf when the N supply was excessive.

In general, the results of this thesis demonstrated that monitoring the  $\text{NO}_3^-$  concentration of the root-zone soil solution, of the 1: 2 soil:water extract, and of petiole sap are methods strongly related to the NNI of pepper crops. The consistency of the results obtained in different crops demonstrates that these methods have the potential to evaluate the crop N status and to assess the adequacy of the immediately available N supply of pepper crops. The sufficiency values and ranges determined in this thesis will be useful for improving N management of pepper crops. The effect of cultivar in cucumber, muskmelon and pepper crops on sap  $\text{NO}_3^-$  concentration and leaf N content suggests that it is important to consider possible cultivar effects on sufficiency values, and that it may be necessary to derive sufficiency values for different cultivars or groups of cultivars. Regarding measurement factors that could affect sap  $\text{NO}_3^-$  concentration, such as the effect of time of day, petiole or sap sample storage and leaf position; it appears that time of day, refrigeration, and leaf position do not significantly affect measurements, but sample storage time can influence measurements. It is recommended that consistent procedures be used for all sampling. However, further research is needed to fully elucidate the effect of different sampling and handling factors on sap  $\text{NO}_3^-$  concentration measurement.



## 1.2. Resumen

Los sistemas intensivos de producción hortícola bajo invernadero han sido caracterizados por abundantes aplicaciones de fertilizantes nitrogenados y excesivos volúmenes de riego aplicados. Comúnmente las aplicaciones de nitrógeno (N) exceden las necesidades de los cultivos para asegurar altos niveles de producción. Sin embargo, los excesos de N han provocado la contaminación ambiental de acuíferos y cuerpos superficiales de agua debido a las pérdidas por lixiviación de nitratos. Al sureste de España, en los invernaderos de Almería los sistemas de producción hortícolas están asociados a una considerable contaminación de los acuíferos subyacentes con nitratos.

Un factor fundamental para reducir las pérdidas de N al medio ambiente es optimizar las aplicaciones de N según las necesidades de los cultivos. Para esto, es necesario mejorar la gestión del N haciendo uso de herramientas que permitan determinar el estado de N o ajustar el suministro de N en los cultivos. Con el uso de estas herramientas se puede mantener un monitoreo regular en los cultivos, esto facilitará un suministro adecuado para satisfacer la demanda de N, optimizando el estado de N del cultivo mientras se evitan aplicaciones excesivas de N. Una manera de realizar esta monitorización es enfocándose en algunas medidas que pueden hacerse en el suelo o directamente en la planta. Esta tesis ha evaluado el uso de herramientas para optimizar la gestión del estado de N realizando medidas en el suelo y en las plantas de cultivos de pepino, melón y pimiento en invernadero en el sureste de España.

El trabajo experimental se llevó a cabo en la Estación Experimental de la Universidad de Almería en un invernadero con características similares a los usados para la producción comercial del sureste de España. Los datos utilizados para desarrollar esta tesis se obtuvieron de cuatro cultivos de pimiento (*Capsicum annuum* L.), un cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) y dos cultivos de melón (*Cucumis melo* L.), todos fueron cultivados en suelo con fertirriego y riego por goteo. Durante los cultivos fueron aplicadas soluciones nutritivas en cada riego con todos los nutrientes. En cada cultivo, tratamientos de N fueron aplicados con concentraciones diferentes de N durante el cultivo. Los tratamientos consistieron en concentraciones de N que fueron deficientes, suficientes o excesivas para las necesidades de los cultivos.

En tres cultivos de pimiento ('Melchor') cultivados durante los años 2014–2015, 2016–2017 y 2017–2018 se aplicaron cinco tratamientos de N (muy deficiente, deficiente, suficiente, excesivo, muy excesivo). En cultivos individuales se usaron tres cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera', 'Mitre') cultivado en el año 2018, de melón ('Tezac', 'Magiar',

‘Jacobo’) cultivado en el año 2020, y pimiento (‘Melchor’, ‘Machado’, ‘CLX PLRJ731’) cultivado en los años 2020–2021, se aplicaron tres tratamientos de N (deficiente, suficiente, excesivo). Otro cultivo de melón (‘Bosito’) fue cultivado en el año 2021, también con tres tratamientos con N.

Con los tres primeros cultivos de pimiento, la curva crítica de N (Critical N Curve; CNC)  $\%Nc = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  se determinó para pimiento en invernadero. Con el desarrollo de la CNC se logró calcular el Índice de Nutrición del Nitrógeno (N Nutrition Index; NNI) como un indicador para determinar si el cultivo de pimiento se encuentra en un estado deficiente, óptimo o excesivo de N. También se desarrollaron recomendaciones para realizar aplicaciones óptimas de N para un crecimiento máximo, examinando la eficiencia en el uso de N y la relación con la cantidad de N total disponible (Total Available N; TAN), considerando todas las fuentes de N, con las pérdidas potenciales por lixiviación de nitratos.

En estos tres cultivos de pimiento se evaluó la relación entre el NNI (para determinar el estado de N de los cultivos) y la concentración de nitrato en la solución del suelo, en el extracto 1:2 suelo:agua y en la savia del peciolo. También, se establecieron valores de suficiencia basados en el crecimiento, para estas tres medidas. La concentración de nitrato medida en la solución del suelo y en el extracto 1:2 suelo:agua estuvo fuertemente relacionada con el NNI durante todo el ciclo de los cultivos de pimiento. Las relaciones entre ambos métodos y el NNI fueron descritas usando regresiones de rectas segmentadas. Las relaciones generales para todo el ciclo del cultivo de pimiento entre el NNI y la concentración de nitrato medida en la solución del suelo fue determinada como  $y = 0.1116x + 0.7029$  (si  $x < x_0$ ) y  $y = 1.05$  (si  $x \geq x_0$ ), con un  $R^2$  de 0.70, y entre el NNI y la concentración de nitrato medida en el extracto 1:2 suelo:agua fue determinada como  $y = 0.4132x + 0.6588$  (si  $x < x_0$ ) y  $y = 1.04$  (si  $x \geq x_0$ ), con un  $R^2$  de 0.68. Se analizó la relación para cada una de las etapas fenológicas (vegetativa, floración y crecimiento temprano de la fruta y cosecha). Ambos métodos fueron sensibles a la aplicación excesiva de N.

Las medidas realizadas en la planta de la concentración de nitrato en la savia estuvieron fuertemente relacionadas con el NNI durante todo el ciclo del cultivo. La relación entre el NNI y la concentración de nitrato en la savia fue descrita usando la regresión polinomial y la regresión de rectas segmentadas. La relación general entre el NNI y la concentración de nitrato en la savia para todo el ciclo del cultivo de pimiento fue determinada como  $NNI = -1.10E - 07 \times Sav^2 + 0.000473 \times Sav + 0.5514$  con un  $R^2$  de 0.84, y  $NNI = 0.00034 \times Sav + 0.572$  (si  $x < x_0$ ) y  $NNI = 1.04$  (si  $x \geq x_0$ ), con un  $R^2$  de 0.83. Además, se

analizó la relación para cada una de las etapas fenológicas (vegetativa, floración y crecimiento temprano de la fruta y cosecha). Este método fue sensible a la aplicación deficiente de N.

Las concentraciones de nitrato derivadas como rangos o valores de suficiencia se determinaron analizando estas relaciones. Los rangos de suficiencia para la concentración de nitrato medida en la solución del suelo y en el extracto 1:2 suelo:agua fueron de 5.0–15.0 mmol L<sup>-1</sup> y 1.0–2.5 mmol L<sup>-1</sup> respectivamente. El valor de suficiencia derivado para la concentración de nitrato en savia en el pimiento fue de 1400 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> durante todo el cultivo. Estos métodos determinados en suelo y planta usados para derivar rangos y valores de suficiencia fueron buenos indicadores del estado de N y pueden ser usados para mejorar el manejo de N en el cultivo de pimiento.

En los cultivos de pepino, pimiento y melón con tres diferentes cultivares se midió la concentración de nitrato en la savia del peciolo y el contenido de N en las hojas. Se presentaron diferencias significativas entre los cultivares de cada cultivo en los tres tratamientos de N en el melón y cuando el suministro de N fue suficiente y excesivo en el pepino y pimiento. La concentración de nitrato en la savia y el contenido de N en la hoja estuvieron fuertemente relacionados, en cada especie de cultivo y para cada cultivar las relaciones fueron similares. Se determinó que el cultivar podría tener un efecto sobre la concentración de nitrato en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja en estos cultivos hortícolas en invernadero, aunque parece que el comportamiento en la relación entre ambas medidas no se vio afectado. Posiblemente, para ambos parámetros sea necesario derivar valores de suficiencia específicos para los diferentes cultivares.

En un cultivo de pimiento y melón se realizaron diferentes muestreos de los peciolos midiendo la concentración de nitrato en la savia evaluando la hora del muestreo, el almacenamiento de los peciolos y la savia y la hoja muestreada. El efecto de la hora del día se evaluó midiendo a las 08:00, 10:00, 12:00 y 14:00 horas en un solo cultivar de pimiento y melón. La gestión de los peciolos y savia diluida de melón después del muestreo se analizó almacenando las muestras en refrigeración a 5°C y dejando las muestras sin refrigeración a 20°C aproximadamente durante 2, 3, 6 y 24 horas. También se realizó una medida de la savia inmediatamente después del muestreo de los peciolos y se congeló durante 7 días una muestra de peciolos. Además, se muestrearon en el cultivo de melón peciolos ubicados en una posición alta (última hoja completamente expandida), media (cinco hojas por debajo de la posición alta) y baja (diez hojas por debajo de la posición alta) de plantas que recibieron tres concentraciones de N.

Respecto a la hora de muestreo sobre la concentración de nitrato en la savia en los cuatro ensayos, el efecto no fue consistente. Sobre el almacenamiento de las muestras de peciolo y de savia refrigerada o no refrigerada, el efecto en la concentración de nitrato en estas condiciones fue el mismo en ambos casos, aunque se recomienda no almacenar la muestra por más de 3 horas. La posición de la hoja de muestreo parece no ser un factor significativo que afecte la concentración de nitrato en la savia, sin embargo, se presentó una tendencia a incrementar en la posición baja de la hoja en condiciones excesivas de N. Estos análisis sugieren que el muestreo de peciolo se realice siempre a la misma hora del día, principalmente entre las 10:00 h y las 14:00 h para minimizar los posibles efectos.

En general, los resultados de esta tesis muestran que la monitorización de la concentración de nitrato medida en la solución del suelo o en el extracto 1:2 suelo:agua y en la savia son métodos que estuvieron fuertemente relacionados con el NNI. La consistencia de los datos demuestra que estos métodos tienen potencial para evaluar el estado del N en el cultivo de pimiento y los rangos y valores de suficiencia derivados son útiles para mejorar el manejo del N. El efecto del cultivar en el cultivo de pepino, melón y pimiento sobre la concentración de nitrato en la savia y el contenido de N en la hoja sugieren que es importante tomar en cuenta que los valores de suficiencia han sido determinados para un cultivar específico y es posible que sea necesario derivar valores de suficiencia para los diferentes cultivares. En cuanto a los factores que podrían afectar las medidas de la concentración de nitrato en la savia como el efecto de la hora del día, el almacenamiento de la muestra de peciolo o savia y la selección de la hoja muestreada no parecen ser factores que afectan significativamente las medidas, aunque el tiempo de almacenamiento de las muestras podría alterar las medidas. Es recomendable que el procedimiento que se utilice sea en forma consistente para todos los muestreos. Sin embargo, es necesario seguir investigando para demostrar el efecto de los factores sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia en diferentes condiciones de muestreo y almacenamiento.

## **2. Introducción**

---



## **2.1. Nitrógeno en la agricultura intensiva**

Para los cultivos, el nitrógeno (N) es el elemento esencial requerido en mayor cantidad y su disponibilidad es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Es indispensable para la producción del tejido vegetal debido a que es el componente principal de los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y clorofila (Gianquinto et al., 2013; Haynes, 1986). De forma natural, las formas disponibles de N para los cultivos se encuentran en bajas cantidades, siendo un nutriente bastante limitante en los suelos agrícolas (Vitousek et al., 1997). Por este motivo, para la producción de altos rendimientos de cultivos vegetales es necesario el aporte de fertilizantes nitrogenados sintéticos al suelo (Fowler et al., 2013; Galloway et al., 2002). En los últimos 30 años, el N creado debido a las actividades humanas ha incrementado un 70%, en su mayoría debido al uso de fertilizantes nitrogenados para incrementar los rendimientos de la producción agrícola y satisfacer la demanda de alimentos por el incremento de la población mundial (Galloway and Cowling, 2021) que ha crecido tres veces desde 1950.

Las cantidades de N añadidos como fertilizantes minerales o por la fijación biológica de cultivos de leguminosas han crecido rápidamente después de la Segunda Guerra Mundial y ahora son más grandes que el suministro natural a la superficie de la tierra por la fijación biológica en ecosistemas naturales (Galloway et al., 2002). A nivel mundial, aproximadamente 170 Tg N año<sup>-1</sup> (Tg = 10<sup>12</sup> g) son provenientes de N antropogénico y 90 Tg N año<sup>-1</sup> provienen de la fijación biológica de N de los sistemas terrestres naturales (Galloway et al., 2002). La actividad humana por medio de la agricultura ha duplicado la cantidad de N que entra al ciclo del N (Vitousek et al., 1997).

## **2.2. Los problemas asociados con el uso de N en la agricultura**

Es muy común que las aplicaciones de N como fertilizantes minerales y estiércol en la agricultura intensiva superen apreciablemente las cantidades requeridas para satisfacer la demanda de N en los cultivos (Di and Cameron, 2002; Gruber and Galloway, 2008). Cuando hay un exceso de N, la eficiencia en el uso del N (N use efficiency; NUE) en los cultivos tiende a disminuir. Esto indica que se presenta una baja eficiencia en la capacidad de absorción del N y en el uso del N absorbido por el cultivo (Benincasa et al., 2011; Moll et al., 1982), las cantidades de N aplicadas en el cultivo no son aprovechadas y se presenta poca retención de N en el suelo, por lo que las excesivas aplicaciones de N en la producción agrícola son susceptibles a provocar pérdidas potenciales en el medio ambiente (Cameron et al., 2013; Di and Cameron, 2002).

En términos generales, las pérdidas de N más importantes desde las tierras agrícolas hasta el medio ambiente son por las vías gaseosas de volatilización del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), desnitrificación como dinitrógeno ( $\text{N}_2$ ) y óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y la producción de  $\text{N}_2\text{O}$  durante nitrificación, las pérdidas por lixiviación de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en el agua de drenaje y en escorrentía (Fowler et al., 2013; Galloway et al., 2002). Del suministro global de 135 Tg N año<sup>-1</sup> como fertilizante a las tierras agrícolas, aproximadamente la mitad es absorbido por las plantas (Galloway et al., 2002; Smil, 1999; Vitousek et al., 1997). El resto de N se pierde; entre 26–60 Tg N año<sup>-1</sup> a la atmósfera por desnitrificación y volatilización de  $\text{NH}_3$ , y entre 32–45 Tg N año<sup>-1</sup> a las aguas por lixiviación y erosión (Smil, 1999). Aproximadamente, unas 80–100 Tg N año<sup>-1</sup> están involucradas en la producción de alimentos por medio de las cosechas de los cultivos.

Las pérdidas de N al medio ambiente tienen efectos negativos sobre los recursos y ecosistemas naturales. El N perdido como  $\text{NH}_3$ , con el tiempo se deposita en la tierra causando eutrofización terrestre con efectos sobre los ecosistemas naturales (Bonsdorff, 2021; Vitousek et al., 1997). El  $\text{N}_2\text{O}$  perdido por desnitrificación y durante la nitrificación es un factor contribuyente muy importante en el aumento de  $\text{N}_2\text{O}$  en la atmósfera. El  $\text{N}_2\text{O}$  es un gas del efecto invernadero importante (Cameron et al., 2013; Winiwarter and Klimont, 2011). El N perdido desde tierras agrícolas por escorrentía puede terminar en las aguas naturales superficiales y puede provocar eutrofización de ecosistemas acuáticos (Grizzetti et al., 2011).

### **2.3. La lixiviación de $\text{NO}_3^-$ y sus impactos medio ambientales**

El  $\text{NO}_3^-$  en el suelo es susceptible a la lixiviación, debido a que no hay retención por las partículas y la materia orgánica del suelo. Cuando hay drenaje, se transporta el  $\text{NO}_3^-$  a través del perfil del suelo (Cameron et al., 2013). Las prácticas de manejo de los cultivos que resultan en la acumulación de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo como las aplicaciones excesivas de N, los drenajes y los riegos en exceso contribuyen a la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$ .

Los impactos medio ambientales provocados por las pérdidas por lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  desde los cultivos tienden a ser altos, principalmente por los excesivos riegos y suministros de N (Di and Cameron, 2002). La lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  al suelo y al agua contribuyen a perjudicar la salud humana y el medio ambiente (Di and Cameron, 2002; Grizzetti et al., 2011). Los efectos principales relacionados con la salud se deben al consumo humano de  $\text{NO}_3^-$  por medio del agua de acuíferos contaminados. Se ha relacionado la enfermedad denominada metahemoglobinemia en lactantes (conocida como el “síndrome del bebé azul”) con el consumo de agua contaminado con  $\text{NO}_3^-$  (Di and Cameron, 2002; Grizzetti et



al., 2011). También existe la preocupación de que el consumo de altos niveles de  $\text{NO}_3^-$  podrían estar asociados con el cáncer de estómago en adultos (Grizzetti et al., 2011; Padilla et al., 2018; Vitousek et al., 1997). Los acuíferos contaminados con  $\text{NO}_3^-$  eventualmente descargan el  $\text{NO}_3^-$  en cuerpos de agua superficiales, este aumento de N en los ecosistemas acuáticos pueden provocar eutrofización (Gruber and Galloway, 2008; Qasim et al., 2021; Vitousek et al., 2009).

Debido al incremento de las pérdidas por lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  (Ju et al., 2009; Padilla et al., 2018; Pulido-Bosch et al., 2018), existe la necesidad de reducir la contaminación del agua subterránea y superficial por las excesivas cantidades de N provenientes de la agricultura (Tei et al., 2020). Con el fin de mejorar la problemática de la contaminación de las aguas naturales y por interés social y político, las legislaciones vigentes son cada vez más estrictas.

En 1991, la Unión Europea (UE) estableció la legislación de la Directiva de Nitratos (Anonymous., 1991), la cual considera dos apartados importantes. Como primer apartado, establece la adopción de las zonas vulnerables a los nitratos (Nitrate Vulnerable Zones; NVZ) las cuales se encuentran o están en riesgo de contaminación por  $\text{NO}_3^-$  con una concentración máxima aceptable de  $50 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  en los acuíferos subterráneos. En el segundo apartado, se determinan las obligaciones que deben cumplir las NVZs con la implementación de los planes de actuación que se deben adoptar para reducir la contaminación del agua por  $\text{NO}_3^-$ .

Dentro de los planes de actuación aplicables se incluyen diferentes prácticas de manejo de los cultivos, muestreos para análisis de aguas y proyectos de investigación y divulgación sobre mejoras de las técnicas de riego (BOJA., 2015). Además, la Directiva de Nitratos ha sido incorporada en la Directiva del Marco del agua (Anonymous., 2000) que tiene como objetivo garantizar el mantenimiento de una buena calidad de las masas de agua de la UE (Winiwarter et al., 2015).

En España, la mayoría de las áreas al sureste con considerables zonas ocupadas por invernaderos hortícolas fueron declaradas NVZ por la Directiva de Nitratos de la UE (BOJA., 2015, 2009). Anteriormente, en la Comunidad Autónoma de Andalucía se habían declarado 24 NVZ (BOJA., 2009), actualmente se encuentran declaradas 35 NVZ (BOJA., 2020), las cuales requieren la adopción urgente de prácticas y medidas que mejoren la gestión del N.

#### **2.4. El sistema de producción de hortalizas en invernadero en el sureste de España**

En la cuenca del Mediterráneo se encuentran alrededor de 203,000 ha de invernaderos de plástico (Rabobank Group, 2018), de las cuales 42,000 ha son usados para la producción

intensiva de cultivos hortícolas en la región al SE de España (Pardossi et al., 2004). En la provincia de Almería hay una concentración de 33,000 ha (Junta de Andalucía, 2018), y en las provincias cercanas como Murcia, Granada y Málaga hay aproximadamente 11,000 ha (Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería y Pesca de Murcia, 2017; Junta de Andalucía, 2018).

En el sistema productivo de Almería, un 92% de los cultivos se realizan en suelo, usando un suelo típico de la zona llamado “enarenado” (Bretones, 2003; Gázquez et al., 2017), el resto se desarrollan como cultivos sin suelo. El suelo enarenado es un suelo artificial que consiste en una capa de 30 cm de suelo de textura franco limosa importada y colocada sobre el suelo franco original, encima cuenta con un mantillo de una capa de 10 cm de grava fina (en su mayoría de 2 a 5 mm de diámetro) (Padilla et al., 2014; Thompson et al., 2007). Los cultivos se desarrollan con riego por goteo y con fertirriego, usando tanques de fertilización simples o manuales (Thompson et al., 2020) que pueden contar con sistemas de programación de riego. Comúnmente, se realizan cada 1–4 días aplicaciones de N en cada riego, permitiendo el aporte de pequeñas cantidades de fertilizante (Thompson et al., 2007). Sin embargo, aunque el sistema permite mantener el control de las aplicaciones, el problema de la contaminación por lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  ocurre por la tendencia a aplicar abundantes cantidades de fertilizante nitrogenado en los cultivos vía fertirriego durante algunas etapas del cultivo. También, el hecho de omitir el N mineral presente en el suelo, el N orgánico del suelo y las previas aplicaciones de estiércol a los cultivos (Jadoski et al., 2013; Thompson et al., 2007).

Dentro de la horticultura intensiva en invernadero en Almería, predomina la producción del cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Es la mayor o la segunda mayor cantidad de superficie de invernaderos, ocupada por aproximadamente 11,000 ha dependiendo de los precios que se establezcan en la campaña anual (MAPAMA, 2019). El valor anual de la producción de hortalizas en Almería es de 2.120 M € y la producción del cultivo de pimiento es de 700 M € (Junta de Andalucía, 2019). En la producción hortícola se usa la combinación de riego y fertirriego, donde la excesiva fertilización vinculada a riegos desmedidos puede aumentar de forma drástica las pérdidas de N por lixiviación. Por otro lado, se considera que el uso adecuado de esta práctica puede reducir las pérdidas de N, ya que permite que haya precisión en la dosificación, ajustar rápidamente un plan de fertilización de N para evitar deficiencias o excesos en las plantas y uniformidad en el área del cultivo.

En el sistema de producción agrícola almeriense, la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  es la pérdida de N considerada de mayor importancia. Las abundantes aplicaciones de N se generan principalmente al no considerar dentro de la planificación de la fertilización nitrogenada otras fuentes como las del N aportado en las aplicaciones de estiércol, el N mineral del suelo y el N mineralizado de la materia orgánica del suelo (Jadoski et al., 2013; Soto et al., 2015; Thompson et al., 2007). De esta forma, cuando el N mineral es aplicado al suelo en forma de  $\text{NO}_3^-$  comúnmente, con el exceso de riego es lavado del sistema radical de las plantas y se mueve libremente en la solución del suelo, ya que no es retenido por las partículas del suelo, y de esta forma es removido fácilmente a los acuíferos cercanos.

Es por este motivo que la legislación vigente establece medidas para el manejo de las aplicaciones de N dentro del sistema productivo de Almería. Para ello, se debe considerar el grupo de fertilizante que se debe usar, la época de aplicación, las condiciones climáticas y el balance efectivo de las necesidades de N por los cultivos, estos son algunos puntos establecidos dentro del programa de actuación aplicables para las ZVN (BOJA., 2008). Para gestionar el riego se han implementado mejoras en las infraestructuras de distribución de aguas para modernizar de forma sostenible los regadíos, y se promueve la reutilización de aguas residuales.

El desarrollo de las medidas adoptadas junto con los programas de actuación establecidos promueve que la certificación de los productos sea cada vez más exigente y que las prácticas mejoradas de riego y fertilizantes sean cada vez más reguladas. En Almería, los valores de contaminación por  $\text{NO}_3^-$  aceptables en los acuíferos subterráneos ha alcanzado valores de hasta  $300\text{--}400 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  (Domínguez, 2014), destacando la zona del Campo de Dalías como zona crítica por tener la mayor concentración de invernaderos en la zona. Por lo tanto, como medida para reducir los efectos sobre el ambiente y la salud humana por la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  principalmente, es importante realizar un uso eficiente del N. Esto requiere mejorar el uso de la combinación del riego y fertirriego junto a la disponibilidad de herramientas de monitorización del N en suelo y planta.

## **2.5. Prácticas para optimizar el manejo de N en los cultivos hortícolas**

El manejo mejorado del N usado como una estrategia para optimizar las aplicaciones en los cultivos hortícolas en combinación de un manejo prescriptivo–correctivo puede ser usado para reducir la cantidad de agua y fertilizante usado (Granados et al., 2013; Thompson et al., 2017a), resultando apreciables reducciones en la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  sin afectar la producción (Magán et al., 2019), según Quemada et al., (2013), de hasta 40%. Un manejo prescriptivo–correctivo asegura el suministro adecuado de agua y fertilizante

(Granados et al., 2013). El manejo prescriptivo incluye la preparación de recomendaciones y el manejo correctivo las técnicas de monitoreo (Thompson et al., 2017a). La gestión del riego es un factor influyente para reducir las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , por lo que un enfoque prescriptivo del riego estaría orientado al uso de datos climáticos históricos para conocer las condiciones de la zona y un enfoque correctivo a la lectura de tensiómetros adecuadamente instalados. Para la gestión prescriptiva del N se considera que los modelos de simulación de la dinámica del N en el suelo y planta proporcionan una alternativa de manejo, como el uso del VegSyst-DSS (Gallardo et al., 2016, 2014) el cual calcula la concentración de N aplicado y el volumen de riego diario para diferentes especies hortícolas. Como sistema correctivo de las aplicaciones de N, la concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $[\text{NO}_3^-]$ ) de la solución del suelo, el análisis de savia y el uso de sensores ópticos son algunas herramientas para optimizar las aplicaciones de N (Padilla et al., 2020; Thompson et al., 2020).

La aplicación del manejo prescriptivo-correctivo siguiendo las técnicas de manejo óptimas permiten altos rendimientos, calidad en los productos y la posible reducción de la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  (Incrocci et al., 2017). También es posible ajustar las dosis en los planes de la fertilización nitrogenada, considerando todas las fuentes de N total disponible (TAN; suma de N mineralizado del estiércol y materia orgánica, N mineral del suelo y el fertilizante mineral) como enfoque recomendado para el manejo del N. Al comprender la respuesta del cultivo de pimiento a los incrementos de TAN es posible determinar una aplicación óptima de N y reducir las pérdidas de lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  asociadas al sistema de producción.

## **2.6. Métodos de monitorización para optimizar el manejo de N en los cultivos hortícolas**

La monitorización del N en el cultivo de pimiento puede enfocarse en medidas realizadas en el suelo y la planta. Como alternativa para el monitoreo del N en el suelo se puede medir en la zona radical de las plantas la  $[\text{NO}_3^-]$  disponible en la solución del suelo. También, otro método usado para evaluar el suministro inmediatamente disponible de N en el suelo es el método de extracción 1:2 suelo:agua (v/v) (Sonneveld et al., 1990; Sonneveld and Voogt, 2009). Se considera que estos métodos de monitorización en el suelo tienen potencial para determinar valores de suficiencia de N, pero principalmente para determinar si el cultivo se encuentra en condiciones de exceso de N (Granados et al., 2013). Por otro lado, están las medidas de la  $[\text{NO}_3^-]$  que se pueden monitorizar en la planta directamente. Las medidas de la concentración de  $\text{NO}_3^-$ -N ( $[\text{NO}_3^-$ -N]) de la savia del peciolo de las hojas tienden a ser más

susceptibles al suministro deficiente de N (Padilla et al., 2020; Thompson et al., 2017b) y son un indicador sensible del estado de N (Farneselli et al., 2014; Goffart et al., 2008).

Los enfoques de la monitorización del suelo y de la planta como el análisis de la solución del suelo, el método 1:2 suelo:agua (v/v) y de las medidas de savia aportan valores de la situación actual de la  $[\text{NO}_3^-]$  en la planta. Sin embargo, pocos estudios han determinado valores de referencia para comparar si el estado de N del cultivo es deficiente, suficiente o excesivo. Para optimizar estas herramientas es necesario determinar valores límites que puedan indicar el estado de N y puedan facilitar la toma de decisiones de los agricultores.

Los muestreos de la  $[\text{NO}_3^-]$  de la solución del suelo se realizan con sondas de succión de cerámica. Las sondas requieren cuidados especiales para un adecuado uso y se deben instalar en un sitio apropiado para disminuir la variabilidad espacial (Granados et al., 2013; Hartz, 2003; Padilla et al., 2020), la muestra se extrae tras aplicar un vacío de  $-70$  kPa a la sonda 24 horas antes e inmediatamente puede ser medida in situ con algún análisis rápido de medidas en campo (Thompson et al., 2009). Esta técnica es conocida por los agricultores en el SE de España, y comúnmente la interpretación de las medidas se enfocan en la tendencia que muestran los datos medidos (Padilla et al., 2020). Por medio del muestreo de la  $[\text{NO}_3^-]$  de la solución del suelo, han sido reportado valores mínimos de  $5.0 \text{ mmol L}^{-1}$  (Burt et al., 1995; Hartz and Hochmuth, 1991) para el cultivo de pimiento en general, y valores máximos de  $12\text{--}15.0 \text{ mmol L}^{-1}$  (Granados et al., 2013; Magán et al., 2019) para el cultivo de pimiento en Almería.

Otro método de monitoreo del suelo es el análisis de la  $[\text{NO}_3^-]$  con el método 1:2 suelo:agua (v/v). Se debe tomar una muestra de suelo compuesta y extraer un volumen de suelo fresco con dos volúmenes de agua. La  $[\text{NO}_3^-]$  se determina de la suspensión de la solución decantada. Ha sido usado comúnmente en invernaderos en Holanda, recomendando valores de  $4.5 \text{ mmol L}^{-1}$  (Incrocci et al., 2017; Sonneveld and Voogt, 2009) para el pimiento. También ha sido usado como método de monitoreo en Italia (Sonneveld and Voogt, 2009) y Grecia (De Kreij et al., 2007). La extracción de la  $[\text{NO}_3^-]$  con el método 1:2 suelo:agua (v/v) no ha sido muy estudiado en el SE de España y algunos trabajos no han sido especialmente enfocados en determinar valores de suficiencia o rangos.

La monitorización de N en la planta usando la extracción de la savia del peciolo es un procedimiento simple, ha sido estudiado en diferentes cultivos hortícolas, y es más sensible a los cambios del estado de N que el análisis foliar (Majić et al., 2008; Olsen and Lyons, 1994). Los análisis de savia son sensibles principalmente a la deficiencia del N en los cultivos (Padilla et al., 2020; Thompson et al., 2017b). Esta condición permite que los

agricultores puedan tomar rápidas decisiones respecto a la fertilización de N y realizar correcciones, sin embargo, se requieren valores de suficiencia específicos para cada región y cultivar, ya que se ha demostrado que factores como estos podrían afectar las medidas (Bélec et al., 2001). Para cultivos de pimiento al aire libre, se han recomendado valores de 1400–1600 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> para las dos primeras etapas de desarrollo (Hochmuth, 2012, 1994).

Para evaluar los sistemas de monitorización de N enfocados al suelo y la planta se requiere de un indicador estable y fiable del estado nutricional del N (Lemaire and Gastal, 1997). El índice nutricional de N (NNI) es usado para desarrollar prácticas óptimas en el manejo de N (Lemaire et al., 2008; Lemaire and Gastal, 1997; Tremblay et al., 2011). Se define como la relación entre el contenido de N del cultivo ( $N_a$ ) y el contenido crítico de N ( $N_c$ ) (Greenwood et al., 1990). Un valor de NNI de 1.0 indica suficiencia de N para una máxima producción de materia seca (DMP), valores <1.0 indican deficiencia de N y valores >1.0 indican exceso de N. Para determinar el  $N_c$  se requiere de una curva crítica de N (CNC) específica para el cultivo de pimiento.

La CNC es usada como un método de diagnóstico para reducir las pérdidas de N y para mejorar la eficiencia en la utilización de N. Se basa en la concentración crítica de N, es decir, en la concentración mínima de N requerida para lograr el máximo crecimiento del cultivo (Greenwood et al., 1990). La curva se ajusta a una ecuación potencial negativa definida como  $\%N_c = a \times DMP^{-b}$ , donde  $N_c$  es el contenido mínimo de N total del cultivo (como %N) asociado con el crecimiento máximo (como DMP) del cultivo, el coeficiente  $a$  representa la concentración de N cuando la DMP es de 1 t ha<sup>-1</sup>, y el coeficiente  $b$  es el valor de un parámetro estadístico que describe la pendiente de la relación.

Con el NNI se pueden relacionar los valores de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] medidas en la monitorización del suelo y la planta. La sensibilidad de los valores de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] medidas en el suelo y planta permiten determinar relaciones con el NNI para definir límites o rangos que puedan ser usados por agricultores para identificar condiciones de deficiencia, suficiencia o exceso de N durante el cultivo. Con la respuesta de los cultivos al N, los agricultores pueden optimizar el uso del N en sus cultivos con el uso de herramientas para monitorear el estado actual del N.

## **2.7. Referencias**

Anonymous., 1991. Council directive 91/676/EEC concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. Off. J. Eur. Commun. L375, 1–8.

- Anonymous., 2000. Council directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Commun.* L327, 1–73.
- Bélec, C., Villeneuve, S., Coulombe, J., Tremblay, N., 2001. Influence of nitrogen fertilization on yield, hollow stem incidence and sap nitrate concentration in broccoli. *Can. J. Plant Sci.* 81, 765–772. <https://doi.org/10.4141/P00-108>
- Benincasa, P., Guiducci, M., Tei, F., 2011. The Nitrogen Use Efficiency: Meaning and Sources of Variation—Case Studies on Three Vegetable Crops in Central Italy 21.
- BOJA., 2008. DECRETO 36/2008, de 5 de febrero, por el que se designan las zonas vulnerables y se establecen medidas contra la contaminación por nitratos de origen agrario. (In Spanish) [WWW Document]. <https://www.juntadeandalucia.es/boja/2008/36/1> (accessed 5.10.21).
- BOJA., 2009. Orden de 7 de julio de 2009, por el que se designan las zonas vulnerables y se establecen medidas contra la contaminación por nitratos de origen agrario. *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía*. N°157, 48-51. (In Spanish) [WWW Document]. URL [http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/cocow/archivos/orden\\_7\\_julio\\_2009\\_modificacion\\_decreto\\_36\\_2008.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/cocow/archivos/orden_7_julio_2009_modificacion_decreto_36_2008.pdf) (accessed 10.22.20).
- BOJA., 2015. Orden de 1 de junio de 2015, por la que se aprueba el programa de actuación aplicable en las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos de fuentes agrarias designadas en Andalucía. *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía*. N°111. (In Spanish) [WWW Document]. URL <https://www.juntadeandalucia.es/boja/2015/111/index.html> (accessed 10.22.20).
- BOJA., 2020. Orden de 23 de noviembre de 2020, por la que se aprueba la modificación de las zonas vulnerables definidas en el Decreto 36/2008, de 5 de febrero, por el que se designan las zonas vulnerables y se establecen medidas contra la contaminación por nitratos de origen agrario, al amparo de su disposición adicional primera. (In Spanish) [WWW Document]. URL <https://www.juntadeandalucia.es/organismos/agriculturaganaderiapescaydesarroll osostenible/areas/agricultura/contaminacion-procedente-fuentes-agrarias-nitratos.html> (accessed 5.10.21).
- Bonsdorff, E., 2021. Eutrophication: Early warning signals, ecosystem-level and societal responses, and ways forward. *Ambio* 50, 753–758. <https://doi.org/10.1007/s13280-020-01432-7>
- Bretones, F., 2003. El Enarenado, in: Camacho, F. *Técnicas de Producción En Los Cultivos Protegidos*, Vol.1. Caja Rural de Almería. España. (In Spanish), pp. 109–118.
- Burt, C., O'Connor, K., Ruehr, T., 1995. *Fertigation*. San Luis Obispo, CA: Irrigation Training and Research Center, California Polytechnic State University.
- Cameron, K.C., Di, H.J., Moir, J.L., 2013. Nitrogen losses from the soil/plant system: A review. *Ann. Appl. Biol.* 162, 145–173. <https://doi.org/10.1111/aab.12014>

- Consejería de Agua, Agricultura, G. y P. de M., 2017. Estadística Agraria de Murcia. Comunidad Autónoma de Murcia. (In Spanish) [WWW Document]. URL [http://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=2589&IDTIPO=100&RASTRO=c1415\\$m1174](http://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=2589&IDTIPO=100&RASTRO=c1415$m1174) (accessed 5.21.19).
- De Kreijl, C., Kavvadias, V., Assimakopoulou, A., Paraskevopoulos, A., 2007. Development of Fertigation for Trickle Irrigated Vegetables under Mediterranean Conditions. *Int. J. Veg. Sci.* 13, 81–99. [https://doi.org/10.1300/J512v13n02\\_08](https://doi.org/10.1300/J512v13n02_08)
- Di, H.J., Cameron, K.C., 2002. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: Sources, factors and mitigating strategies. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 64 (3), 237–256. <https://doi.org/10.1023/A:1021471531188>
- Domínguez, P., 2014. Estado Actual de los Acuíferos del Sur de la Sierra de Gádor-Campo de Dalías. Instituto Geológico y Minero de España. Ministerio de Economía y Competitividad. (In Spanish) [WWW Document]. URL <http://info.igme.es/ConsultaSID/presentacion.asp?Id=166757> (accessed 5.21.19).
- Farneselli, M., Tei, F., Simonne, E., 2014. Reliability of Petiole Sap Test for N Nutritional Status Assessing in Processing Tomato. *J. Plant Nutr.* 37, 270–278. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.859696>
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M.A., Cape, J.N., Reis, S., Sheppard, L.J., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J.N., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A.F., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Stevenson, D., Amann, M., Voss, M., 2013. The global nitrogen cycle in the Twentyfirst century. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>
- Gallardo, M., Thompson, R.B., Giménez, C., Padilla, F.M., Stöckle, C.O., 2014. Prototype decision support system based on the VegSyst simulation model to calculate crop N and water requirements for tomato under plastic cover. *Irrig. Sci.* 32, 237–253. <https://doi.org/10.1007/s00271-014-0427-3>
- Gallardo, M., Fernández, M.D., Giménez, C., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2016. Revised VegSyst model to calculate dry matter production, critical N uptake and ET<sub>c</sub> of several vegetable species grown in Mediterranean greenhouses. *Agric. Syst.* 146, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2016.03.014>
- Galloway, J.N., Cowling, E.B., Seitzinger, S.P., Socolow, R.H., 2002. Reactive Nitrogen: Too Much of a Good Thing? *Ambio* 31 (2), 60–63.
- Galloway, J.N., Cowling, E.B., 2021. Reflections on 200 years of Nitrogen, 20 years later. *Ambio* 50, 745–749. <https://doi.org/10.1007/s13280-020-01464-z>
- Gázquez, J.C., Pérez, C., Meca, D.E., Segura, M.D., Domene, M.A., De La Cruz, E., López, J.C., Buendía, D., 2017. Comparative study of tomato production strategies for long-cycle crop in enarenado and for inter-planting in different substrates systems in the Mediterranean area. *Acta Hort.* 1170, 773–776. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.98>



- Gianquinto, G., Muñoz, P., Pardossi, A., Ramazzotti, S., Savvas, D., 2013. Soil fertility and plant nutrition. *Good Agricultural Practices for Greenhouse Vegetable Crops. Principles for Mediterranean Climate Areas*. FAO, Rome, Italy, pp. 205–269.
- Goffart, J.P., Olivier, M., Frankinet, M., 2008. Potato Crop Nitrogen Status Assessment to Improve N Fertilization Management and Efficiency: Past-Present-Future. *Potato Res.* 51, 355–383. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9118-x>
- Granados, M.R., Thompson, R.B., Fernández, M.D., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., 2013. Prescriptive-corrective nitrogen and irrigation management of fertigated and drip-irrigated vegetable crops using modeling and monitoring approaches. *Agric. Water Manag.* 119, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.12.014>
- Greenwood, D.J., Lemaire, G., Gosse, G., Cruz, P., Draycott, A., Neeteson, J.J., 1990. Decline in Percentage N of C3 and C4 Crops with Increasing Plant Mass. *Ann. Bot.* 66, 425–436. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088044>
- Grizzetti, B., Bouraoui, F., Billen, G., van Grinsven, H., Cardoso, A.C., Thieu, V., Garnier, J., Curtis, C., Howarth, R., Johnes, P., 2011. Nitrogen as a threat to European soil quality, in: *The European Nitrogen Assessment*. Sutton, M. A Howard, C. M Erisman, J. W Billen, G Bleeker, A Grennfelt, P van Grinsven, H, Sutton, M.A., Howard, C.M., Erisman, J.W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., van Grinsven, H. (Eds.). Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 379–404. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511976988.024>
- Gruber, N., Galloway, J.N., 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451, 293–296. <https://doi.org/10.1038/nature06592>
- Hartz, T.K., Hochmuth, G.J., 1991. *Fertility Management of Drip-Irrigated Vegetables*. UC Davis, Vegetable Research and Information Center.
- Hartz, T.K., 2003. The assessment of soil and crop nutrient status in the development of efficient fertilizer recommendations. *Acta Hort.* 627, 231–240. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.627.30>
- Haynes, R.J., 1986. Origin, Distribution, and Cycling of Nitrogen in Terrestrial Ecosystems, in: *Mineral Nitrogen in the Plant–Soil System*. Academic Press, INC., pp. 1–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-123-34910-1.X5001-8>
- Hochmuth, G.J., 1994. Efficiency Ranges for Nitrate-nitrogen and Potassium for Vegetable Petiole Sap Quick Tests. *Horttechnology* 4, 218–222. <https://doi.org/10.21273/horttech.4.3.218>
- Hochmuth, G., 2012. *Plant Petiole Sap-Testing For Vegetable Crops*. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/CV/CV00400.pdf>.
- Incrocci, L., Massa, D., Pardossi, A., 2017. New trends in the fertigation management of irrigated vegetable crops. *Horticulturae*. 3. 37 <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020037>

- Jadoski, S., Thompson, R.B., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., 2013. Regional N balance for an intensive vegetable production system in South-Eastern Spain, in: Fontana, E., Grignani, C., Nicola, S. (Ed.), *Book of Abstracts, International Workshop on Nitrogen, Environment and Vegetables. NEV 2013*, Turín, Italy, 15-17 April. pp. 50–51.
- Ju, X.T., Xing, G.X., Chen, X.P., Zhang, S.L., Zhang, L.J., Liu, X.J., Cui, Z.L., Yin, B., Christie, P., Zhu, Z.L., Zhang, F.S., 2009. Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3041–3046. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813417106>
- Junta de Andalucía, 2018. Cartografía de invernaderos en Almería, Granada y Málaga. Secretaría General de Agricultura y Alimentación. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía, España. (In Spanish). [WWW Document]. URL [https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Cartografia\\_inv\\_AL\\_GR\\_MA\\_180725.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Cartografia_inv_AL_GR_MA_180725.pdf) (accessed 5.21.19).
- Junta de Andalucía, 2019. Síntesis de la campaña de Hortícolas protegidos de Almería. Campaña 2018/19. Observatorio de precios y mercados. Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Almería, España. (In Spanish). [WWW Document]. URL <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?action=RecordContent&table=11030&element=2233136&ec=subsector&subsector=20&CODTIPOESTUDIO=1>. (accessed 5.13.20).
- Lemaire, G., Gastal, F., 1997. N uptake and distribution in plant canopies., in: Lemaire, G. (Ed) (Ed.), *Diagnosis of Nitrogen Status in Crops*. Springer, Berlin, Germany, pp. 3–41. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-60684-7>
- Lemaire, G., Jeuffroy, M.H., Gastal, F., 2008. Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. Theory and practices for crop N management. *Eur. J. Agron.* 28, 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.01.005>
- Magán, J.J., Gallardo, M., Fernández, M.D., García, M.L., Granados, M.R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2019. Showcasing a fertigation management strategy for increasing water and nitrogen use efficiency in soil-grown vegetable crops in the FERTINNOWA project. *Acta Hortic.* 1253, 17–24. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1253.3>
- Majić, A., Poljak, M., Sabljo, A., Knezović, Z., Horvat, T., 2008. Efficiency of use of chlorophyll meter and cardy-ion meter in potato nitrogen nutrition supply. VII. Alps-Adria Sci. Work. 36, 1431–1434.
- MAPAMA, 2019. Anuario de Estadística. Avance de superficies y producciones de cultivo 2018. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. (In Spanish) [WWW Document]. URL <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx>. (accessed 5.13.20).
- Moll, R.H., Kamprath, E.J., Jackson, W.A., 1982. Analysis and Interpretation of Factors Which Contribute to Efficiency of Nitrogen Utilization. *Agron. J.* 74, 562–564.

<https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400030037x>

- Olsen, J.K., Lyons, D.J., 1994. Petiole sap nitrate is better than total nitrogen in dried leaf for indicating nitrogen status and yield responsiveness of capsicum in subtropical Australia. *Aust. J. Exp. Agric.* 34, 835–843. <https://doi.org/10.1071/EA9940835>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2014. Evaluation of optical sensor measurements of canopy reflectance and of leaf flavonols and chlorophyll contents to assess crop nitrogen status of muskmelon. *Eur. J. Agron.* 58, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.04.006>
- Padilla, F.M., Gallardo, M., Manzano-Agugliaro, F., 2018. Global trends in nitrate leaching research in the 1960–2017 period. *Sci. Total Environ.* 643, 400–413. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.215>
- Padilla, F.M., Farneselli, M., Gianquinto, G., Tei, F., Thompson, R.B., 2020. Monitoring nitrogen status of vegetable crops and soils for optimal nitrogen management. *Agric. Water Manag.* 241, 106356. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106356>
- Pardossi, A., Tognoni, F., Incrocci, L., 2004. Mediterranean Greenhouse Technology. *Chron. Horticult.* 44, 28–34.
- Pulido-Bosch, A., Rigol-Sanchez, J.P., Vallejos, A., Andreu, J.M., Ceron, J.C., Molina-Sanchez, L., Sola, F., 2018. Impacts of agricultural irrigation on groundwater salinity. *Environ. Earth Sci.* 77, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7386-6>
- Qasim, W., Xia, L., Lin, S., Wan, L., Zhao, Y., Butterbach-Bahl, K., 2021. Global greenhouse vegetable production systems are hotspots of soil N<sub>2</sub>O emissions and nitrogen leaching: A meta-analysis. *Environ. Pollut.* 272, 116372. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116372>
- Quemada, M., Baranski, M., Nobel-de Lange, M.N.J., Vallejo, A., Cooper, J.M., 2013. Meta-analysis of strategies to control nitrate leaching in irrigated agricultural systems and their effects on crop yield. *Agric. Ecosyst. Environ.* 174, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.04.018>
- Rabobank Group, 2018. World Vegetable Map [WWW Document]. URL [https://www.rabobank.nl/images/world-vegetables-map-2018\\_29940342.pdf](https://www.rabobank.nl/images/world-vegetables-map-2018_29940342.pdf)
- Smil, V., 1999. Nitrogen in crop production : An account of global flows. *Global Biogeochem. Cycles* 13, 647–662. <https://doi.org/10.1029/1999GB900015>
- Sonneveld, C., Van den Ende, J., De Bes, S.S., 1990. Estimating the chemical compositions of soil solutions by obtaining saturation extracts or specific 1:2 by volume extracts. *Plant and Soil.* 122, 169–175. <https://doi.org/10.1007/BF02851971>
- Sonneveld, C., Voogt, W., 2009. *Plant Nutrition of Greenhouse Crops*, Springer. ed. The Netherlands.

- Soto, F., Gallardo, M., Thompson, R.B., Peña-Fleitas, M.T., Padilla, F.M., 2015. Consideration of total available N supply reduces N fertilizer requirement and potential for nitrate leaching loss in tomato production. *Agric. Ecosyst. Environ.* 200, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.10.022>
- Tei, F., De Neve, S., de Haan, J., Kristensen, H.L., 2020. Nitrogen management of vegetable crops. *Agric. Water Manag.* 240, 106316. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106316>
- Thompson, R.B., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., Giménez, C., Fernández, M.D., 2007. Identification of irrigation and N management practices that contribute to nitrate leaching loss from an intensive vegetable production system by use of a comprehensive survey. *Agric. Water Manag.* 89, 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2007.01.013>
- Thompson, R.B., Gallardo, M., Joya, M., Segovia, C., Martínez-Gaitán, C., Granados, M.R., 2009. Evaluation of rapid analysis systems for on-farm nitrate analysis in vegetable cropping. *Spanish J. Agric. Res.* 7, 200–211. <https://doi.org/10.5424/sjar/2009071-412>
- Thompson, R.B., Incrocci, L., Voogt, W., Pardossi, A., Magán, J.J., 2017a. Sustainable irrigation and nitrogen management of fertigated vegetable crops. *Acta Hortic.* 363–378. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1150.52>
- Thompson, R.B., Tremblay, N., Fink, M., Gallardo, M., Padilla, F.M., 2017b. Tools and Strategies for Sustainable Nitrogen Fertilisation of Vegetable Crops, in: Tei, F., Nicola, S., Benincasa, P. (Ed.), *Advances in Research on Fertilization Management of Vegetable Crops*. Springer, Cham, Switzerland, pp. 11–63. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2_2)
- Thompson, R.B., Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., 2020. Reducing nitrate leaching losses from vegetable production in Mediterranean greenhouses. *Acta Hortic.* 1268, 105–117. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1268.14>
- Tremblay, N., Fallon, E., Ziadi, N., 2011. Sensing of Crop Nitrogen Status: Opportunities, Tools, Limitations, and Supporting Information Requirements. *Horttechnology* 21, 274–281.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H., Tilman, D.G., 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecol. Appl.* 7 (3), 737–750. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1997\)007\[0737:HAOTGN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1997)007[0737:HAOTGN]2.0.CO;2)
- Vitousek, P.M., Naylor, R., Crews, T., David, M.B., Drinkwater, L.E., Holland, E., Johnes, P.J., Katzenberger, J., Martinelli, L.A., Matson, P.A., Nziguheba, G., Ojima, D., Palm, C.A., Robertson, G.P., Sanchez, P.A., Townsend, A.R., Zhang, F.S., 2009. Nutrient Imbalances in Agricultural Development. *Science* (80-. ). 324, 1519–1520. <https://doi.org/10.1126/science.1170261>
- Winiwarter, W., Klimont, Z., 2011. The role of N-gases (N<sub>2</sub>O, NO<sub>x</sub>, NH<sub>3</sub>) in cost-effective

strategies to reduce greenhouse gas emissions and air pollution in Europe. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 3, 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2011.08.003>

Winiwarter, W., Grizzetti, B., Sutton, M.A., 2015. Nitrogen Pollution in the EU: Best Management Strategies, Regulations, and Science Needs. *EM Air Waste Manag. Assoc.* 65, 18–23.



### **3. Objetivos**

---





El objetivo principal de esta tesis fue evaluar y analizar diferentes medidas en suelo y planta para optimizar la gestión del estado del nitrógeno en cultivos hortícolas bajo condiciones de invernadero. Para esto fue necesario analizar las relaciones de las medidas de la  $[\text{NO}_3^-]$  con el estado nutricional del N del cultivo. Los objetivos específicos de esta tesis fueron:

1. Evaluar la dosis óptima y la respuesta del cultivo de pimiento a cantidades crecientes del N total disponible para determinar necesidades óptimas de N requeridas para una máxima producción.
2. Determinar la  $[\text{NO}_3^-]$  en la solución del suelo con el uso de sondas de succión y el método de extracción 1:2 suelo:agua (v/v), relacionando las medidas con el NNI para derivar valores de suficiencia para el cultivo del pimiento.
3. Evaluar la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo de la hoja relacionando las medidas con el NNI para derivar valores de suficiencia para el cultivo del pimiento.
4. Determinar el efecto del cultivar sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%) en el cultivo de pepino, melón y pimiento.
5. Evaluar el efecto del muestreo y almacenamiento de los peciolo y savia diluida sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en el cultivo de pimiento y melón.



#### **4. CHAPTER ONE: Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss**

---

Rodríguez, A., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., de Souza, R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2020. Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss. *Eur. J. Agron.* 117, 126046. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126046>



#### 4.1. Abstract

Intensive vegetable production in soil is often associated with large N losses to the environment. To contribute to improved N management of sweet pepper, this work developed a critical nitrogen curve (CNC). It also developed N recommendations and examined N use efficiency (NUE) and potential NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss in relation to increasing total available nitrogen (TAN). TAN is the sum of the soil mineral N at planting, N mineralized from soil organic material, and mineral N fertilizer. Three sweet pepper crops were grown in soil with autumn–winter cropping cycles in greenhouse conditions. Five different N concentrations in the nutrient solution were applied throughout the crop cycle: very N deficient (N1), N deficient (N2), conventional N management (N3), excessive N (N4) and very excessive N (N5). A critical N curve of  $\%Nc = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  was determined for sweet pepper. Relative yield of the three crops had a strong linear–plateau relationship ( $R^2 = 0.66$ ) with integrated nitrogen nutrition index (NNI). Maximum yield was associated with an NNI of 0.86. In the three crops, total yield, dry matter production (DMP) and crop N uptake were generally strongly related to increasing TAN. An optimal TAN value (minimum TAN for maximum yield) of 425 kg N ha<sup>-1</sup> was determined using a linear–plateau regression model. N uptake efficiency (N<sub>upt</sub>E) decreased exponentially with increasing TAN, from almost 0.90 kg kg<sup>-1</sup> in the N1 treatment to 0.30 kg kg<sup>-1</sup> in the N5 treatment. The sum of residual mineral N and leached NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N was considered to be potential NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss. Potential NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss increased exponentially, with increasing TAN, to 686–1034 kg N ha<sup>-1</sup> in the highest N treatments. For the optimal TAN value, N<sub>upt</sub>E was 0.63 kg kg<sup>-1</sup> and the potential NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching was 125 kg N ha<sup>-1</sup>. The CNC and derived NNI values provide valuable information for N management of pepper. Consideration of TAN as the crop N supply enables maximize yield with less fertilizer N and less risk of N loss.

**Keywords:** *Capsicum annuum* L.; crop N status; nitrate leaching; nitrogen nutrition index; NUE; optimal N management; production; yield

#### 4.2. Introduction

Large amounts of N mineral fertilizer are applied in intensive vegetable production in greenhouses, and are commonly associated with appreciable N loss and consequent negative environmental impacts (Thompson et al., 2017a). There is increasing legislative and societal pressure to reduce the risk of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> contamination of natural water bodies from these and other intensive agricultural systems (Thompson et al., 2017a).

In the Mediterranean Basin, there are approximately 170,000 ha of greenhouses and large plastic tunnels (Pardossi et al., 2004). Nearly all of these greenhouses are used for intensive vegetable crop production. The 42,000 ha of plastic greenhouses in the coastal

regions of southeast (SE) Spain (Valera et al., 2016) are representative of Mediterranean greenhouses. In SE Spain, depending on prices, sweet pepper occupies either the largest or second-largest area of greenhouse cropping surface (Valera et al., 2016). Ninety percent of vegetable crops in greenhouses in SE Spain are grown in soil, the rest in free-draining soilless systems (García et al., 2016). All soil-grown crops are grown with drip irrigation and fertigation, which occur every 1–4 days (Thompson et al., 2017a, 2017b). Nutrients are generally applied in all irrigations throughout a crop (Thompson et al., 2007).

All of the greenhouse production areas in SE Spain have been designated Nitrate Vulnerable Zones in accordance with the European Union (EU) Nitrates Directive (Anonymous., 1991). Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) concentrations in underlying aquifers can exceed 200–300 mg  $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$  (Domínguez, 2014), which is 4–6 times the EU limit (Anonymous., 1991).  $\text{NO}_3^-$  leaching losses from commercial vegetable production in this system, are often appreciable (Thompson et al., 2013). Research studies have measured  $\text{NO}_3^-$  leaching losses of 100–200 kg N  $\text{ha}^{-1}$  from sweet pepper crops grown with commercial N and irrigation management practices (Gallardo et al., 2006; Granados et al., 2007, 2013; Thompson et al., 2013). There is a strong requirement for adoption of improved N management practices to reduce these N losses in response to the applicable regional legislation (Anonymous., 1991; BOJA., 2015) and consumer pressure (Thompson et al., 2017a, 2017b).

Improved knowledge of crop response to N supply will greatly assist in improving N management of sweet pepper. A fundamental tool for the development of improved N management practices is the critical N curve (CNC) (Greenwood et al., 1990; Lemaire and Gastal, 1997). The CNC enables determination of the Nitrogen Nutrition Index (NNI), which is an effective and widely-used indicator of crop N status (Lemaire and Gastal, 1997). The NNI is used to develop optimal N management practices (Lemaire and Gastal, 1997; Lemaire et al., 2008) and to assess methods that monitor crop N status (Tremblay et al., 2011; Peña-Fleitas et al., 2015; Padilla et al., 2016; Thompson et al., 2017a). Specific CNCs have been determined for various crop species such as wheat (Justes et al., 1994), rice (Huang et al., 2018), maize (Yue et al., 2014), potato (Giletto and Echeverría, 2015; Abdallah et al., 2016), tomato (Tei et al., 2002; Padilla et al., 2015) and cucumber (Padilla et al., 2016). A species-specific CNC is a required tool for the development of improved N management practices for intensively managed pepper crops.

Optimal N management of sweet pepper crops requires recommendations of the optimal N supply, which maximizes fruit production with minimal N supply. To be most effective, this should consider the amount of total available N (TAN), that is the combined supply of N mineralized from manure, the mineral N in the root zone at the beginning of the

crop and mineral N fertilizer (Soto et al., 2015; Thompson et al., 2017a). In the greenhouse system of SE Spain, manure can make a substantial contribution to the total amount of N supplied to a crop (Thompson et al., 2007; Jadoski et al., 2013), and large amounts of soil mineral N can be present at planting (Granados et al., 2013). Commercial N management practice in this greenhouse system is to apply a standard concentration of N, throughout a crop by fertigation, without considering other sources of N (Thompson et al., 2007). All mineral N fertilizer is applied by fertigation (Thompson et al., 2007). Studies of N balances of vegetable crops in commercial greenhouses in SE Spain, have demonstrated that the total N supply, considering all N sources (manure, soil organic N, soil mineral N, mineral N fertilizer) greatly exceeds crop N uptake (Thompson et al., 2007; Jadoski et al., 2013).

To fully understand crop response to increasing N supply, a range of parameters must be considered. Relevant parameters are total yield, dry matter production (DMP), crop N uptake, residual soil mineral N, N loss, and the various Nitrogen Use Efficiency (NUE) indices. In addition to Nitrogen Use Efficiency ( $NUE_{Yield}$  or  $NUE_{DMP}$ ); (yield or dry matter production per unit of N supplied), the various component indices of N Uptake Efficiency ( $N_{upt}E$ ; N uptake per unit of N supplied), N Utilization Efficiency ( $N_{ut}E_{Yield}$  or  $N_{ut}E_{DMP}$ ; yield or dry matter production per unit of N uptake) (Moll et al., 1982; Gastal et al., 2015; Milroy et al., 2019) should also be considered.

The objectives of the present study were to examine the response of sweet pepper to increasing amounts of TAN, in order to (i) determine the CNC, (ii) determine crop response to NNI i.e. to crop N status, (iii) determine the minimum amount of TAN required for maximum yield, (iv) determine the responses of total yield, dry matter production (DMP), crop N uptake, NUE and component NUE indices to increasing TAN, and (v) assess the risk of  $NO_3^-$  leaching loss with increasing TAN.

### **4.3. Material and methods**

#### *4.3.1. Experimental site*

Three sweet pepper (*Capsicum annuum* L. 'Melchor') crops were grown in soil in a greenhouse, under similar conditions to those of commercial intensive vegetable production, in southeastern (SE) Spain, at the Experimental Station of the University of Almeria located in Retamar, Almeria, SE Spain (36°51' N, 2°16' W and 92 m elevation). The three crops were grown with an autumn-winter cropping cycle in 2014–2015 (2014 crop), 2016–2017 (2016 crop) and 2017–2018 (2017 crop).

The greenhouse had a multi-span structure of galvanized steel with polycarbonate walls and a roof of low-density polyethylene (LDPE) tri-laminated film (200- $\mu$ m thickness)

with transmittance to photosynthetically active radiation (PAR) of approximately 60% (Padilla et al., 2014). The greenhouse had passive ventilation with lateral side panels and flap roof windows, an east-west orientation, with crop rows aligned north-south. The cropping area was 1327 m<sup>2</sup>. The greenhouse had an artificial layered “enarenado” soil typical of the region (Bretones, 2003; Thompson et al., 2007; Gázquez et al., 2017) consisting of a 30-cm layer of imported silty loam textured soil placed over the original loam soil and a 10-cm layer of fine gravel (mostly 2- to 5- mm diameter) placed on the imported soil as a mulch (Padilla et al., 2014).

At greenhouse construction in July 2007, before adding the final gravel layer, 200 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> of sheep manure (63% dry matter, 1.7% N content and 0.7 t m<sup>-3</sup> density) was mixed into the top layer of the imported soil following local practices (Thompson et al., 2007). Above-ground drip irrigation was used for combined irrigation and mineral fertilizer application (i.e. fertigation). Drip tape was arranged in paired lines with 0.8-m spacing between lines within each pair, 1.2-m spacing between adjacent pairs of lines, and 0.5-m spacing between drip emitters within drip lines, giving an emitter density of 2 emitters m<sup>-2</sup>. The drip emitters had a discharge rate of 3 L h<sup>-1</sup>. The coefficient of uniformity of the drip system was >95%.

The greenhouse was organized into 24 plots, each measuring 6 m by 6 m; 20 plots were used in this study. Each plot contained three paired lines of drip tape with 12 drip emitters in each line. Sheets of polyethylene film (250- $\mu$ m thickness) buried to 30-cm depth acted as a hydraulic barrier between plots. Individual plants were positioned 6 cm from and immediately adjacent to each emitter, giving a plant density of 2 plants m<sup>-2</sup> and 72 plants per replicate plot. The greenhouse was divided longitudinally into northern and southern plots by a 2-m wide path along its east-west axis, with two plots of each N treatment in the northern and southern sectors. There were border areas along the edges of the greenhouse.

#### *4.3.2. Pepper crops and experimental N treatments*

Plants were transplanted as five-week-old seedlings. Dates of transplanting and of the end of each pepper crop are given in Table 1. For the first days after transplanting (DAT), seedlings were irrigated with water (<0.04 mmol N L<sup>-1</sup>) until the different N treatments commenced at 1, 9, and 10 DAT in 2014, 2016 and 2017 crops, respectively.

In each of the three crops, five experimental treatments of increasing N concentration were applied by fertigation in every irrigation. The different N concentrations were applied as part of complete nutrient solutions, the composition of which ensured that all other macronutrients and micronutrients were not limiting. Before transplanting each crop, a



series of large irrigations were applied to leach residual  $\text{NO}_3^-$  present in the soil, and to homogenize the soil profile between plots. The N treatments had increasing N concentration from very N deficient (N1), N deficient (N2), conventional N management (N3), excessive N (N4) to very excessive N (N5) (Table 1). The total amounts of irrigation and N applied to each treatment are presented in Table 1. Most of the mineral N was applied as  $\text{NO}_3^-$  (92% of applied), the rest was applied as ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ).

**Table 1.** General description for the three pepper crops and N treatments, including dates of transplanting and end of crop, total irrigation and drainage volumes, soil mineral N at transplanting, N fertigation treatments defined on the basis of N concentration of the applied nutrient solution, total amount of N applied and total available N (TAN) supplied to the crop. Apparent N mineralization, included in the calculation of TAN, was 24.3, 43.2 and 1.7 kg N ha<sup>-1</sup> in the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively.

Crop year	Date of transplanting	Date end of the crop (duration)	N treatment	Irrigation amount (mm) <sup>a</sup>	Drainage (mm)	Mineral N at planting (kg N ha <sup>-1</sup> )	N concentration in nutrient solution (mmol L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Total N applied (kg N ha <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	TAN (kg N ha <sup>-1</sup> )	N leached (kg N ha <sup>-1</sup> )
2014	12/08/2014	29/01/2015 (170 days)	N1	190	14	16	2.3	64	104	1
			N2	216	18	14	6.0	189	227	4
			N3	294	45	6	12.3	516	547	18
			N4	357	97	14	15.8	804	842	90
			N5	354	113	20	19.6	990	1035	168
2016	19/07/2016	24/03/2017 (248 days)	N1	319	16	87	2.0	88	218	3
			N2	404	20	81	5.3	302	426	4
			N3	414	14	85	9.7	561	689	8
			N4	557	143	74	13.5	1052	1169	165
			N5	532	144	119	17.7	1320	1483	250
2017	21/07/2017	20/02/2018 (214 days)	N1	304	5	34	2.0	86	122	0
			N2	383	5	46	5.7	304	351	1
			N3	383	3	51	9.7	519	571	0
			N4	475	37	49	12.1	870	921	10
			N5	513	56	85	15.7	1198	1284	46

<sup>a</sup>For the complete cropping cycle.

<sup>b</sup>For the period of N treatments, which commenced 1, 9 and 10 days after transplanting in the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively.

Irrigation was scheduled to maintain the soil matric potential in the root zone, at 15-cm depth, within -10 to -30 kPa; one tensiometer (Irrometer, Co., Riverside, CA, USA) per plot was used to measure soil matric potential. Irrigation was applied every 1–4 days, with irrigation being more frequent during warmer periods, and less frequent during cooler periods. To avoid excessive accumulation of salinity in the soil solution, additional irrigations were made at particular times when considered necessary. In the 2014 crop, additional nutrient solution was applied during 80–103 DAT to treatments N3, N4 and N5, the respective totals of additional volumes were 23, 44 and 45 mm. In the 2016 crop, additional nutrient solution was applied during 66–71, 104–111, and 178–180 DAT for treatments N1 to N5; the respective total additional volumes were 62, 79, 84, 115 and 107 mm. In the 2017 crop, additional irrigation was applied as water only during 72–110 DAT to the N4 and N5 treatments, and during 129–143, and 185–208 DAT to the N3 to N5 treatments; the total volumes applied were 31, 39 and 39 mm, respectively.

The crops were managed following local practices. The crops were physically supported using a system of nylon cords placed horizontally along the side of the crop, a system known locally as “enfajado”. Periodic pruning was conducted, in the early part of each crop cycle, to create a more open canopy to reduce the risk of fungal infection. High temperature within the greenhouse was controlled by white-washing the plastic cladding of the greenhouse with applications of CaCO<sub>3</sub> suspension. CaCO<sub>3</sub> suspension was applied in three separate applications to each crop; at planting and at 8 and 34 days after transplanting (DAT) in the 2014 crop, at 6 days before transplanting and at 10 and 36 DAT in the 2016 crop, and at 8 days before transplanting and at 12 and 62 DAT in the 2017 crop. The first two applications in the 2014 and 2016 crops were 0.65 kg L<sup>-1</sup> and in the 2017 crop were 0.50 kg L<sup>-1</sup>; the third application was 0.20 kg L<sup>-1</sup> in the 2014 crop, and 0.40 kg L<sup>-1</sup> in the 2016 and 2017 crops. Following these CaCO<sub>3</sub> suspension applications, PAR transmissivity was 15–50%.

### *4.3.3. Measurements*

#### 4.3.3.1. Climatic data

Average values for daily minimum, mean and maximum air temperature and relative humidity, average values for the duration of the crop of the daily integral of solar radiation and daily reference evapotranspiration (ET<sub>0</sub>), inside the greenhouse, for the three crops, are presented in Table 2.

Air temperature and relative humidity were measured inside the greenhouse with a relative humidity/temperature probe (Model 41382V, R.M. Young Company, MI, USA) encased in an aspirated protective radiation shield (Model 43502, R.M. Young Company, MI,

USA). Solar radiation was measured with a pyranometer (Model SKS 1110, Skye Instruments, Llandrindod Wells, Wales, UK). All data were recorded and stored using a data logger (Model CR10X, Campbell Scientific Inc., Utah, USA).

The climatic conditions during the three pepper crops were similar and were within the normal range of values for autumn-winter crops grown in plastic greenhouses on the Mediterranean coast.

**Table 2.** For each pepper crop, means values for the cropping period of 24-h minimum, average and maximum air temperature and relative humidity (RH) values, and average values for the duration of the crop of the daily integral of solar radiation and of daily reference evapotranspiration ( $ET_0$ ), inside the greenhouse.

Crop year	Temperature (°C)			RH (%)			Integral of solar radiation (MJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> )	$ET_0$ (mm d <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
	Minimum	Average	Maximum	Minimum	Average	Maximum		
2014	14.4	19.2	26.3	45.6	73.7	90.9	6.0	1.2
2016	14.1	19.0	26.0	54.4	75.7	89.9	6.1	1.2
2017	13.8	18.9	26.3	49.0	72.2	88.1	6.7	1.3

<sup>a</sup>Calculated using the modified FAO radiation equation of Fernández et al. (2010, 2011).

#### 4.3.3.2. Soil mineral N

The soil was sampled and analyzed immediately before planting and the end of each crop, for mineral N ( $\text{NO}_3^-$ -N plus  $\text{NH}_4^+$ -N). To deal with heterogeneity associated with combined drip irrigation and fertigation, each soil sampling in each plot was made in two associated sampling positions in relation to a representative emitter and plant; the first at 5 cm from the drip emitter and the second mid-way between two paired lines. Soil mineral N was calculated as:  $(0.65 \times \text{position 1}) + (0.35 \times \text{position 2})$ . Soil was sampled in each position to a depth of 60 cm relative to the surface, in four depth intervals (0–15, 15–30, 30–45, 45–60 cm) in the 2014 crop, and at three depth intervals (0–20, 20–40, 40–60 cm) in the 2016 and 2017 crops. Each depth increment from each sampling position within each replicate location was treated as a separate sample.

Soil mineral N content was determined following extraction with potassium chloride (KCl) solution (40 g moist soil: 200 mL 2 mol L<sup>-1</sup> KCl).  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  concentrations in the extracts were determined with an automatic continuous segmented flow analyzer (Model SAN++, Skalar Analytical B.V., Breda, The Netherlands).

#### 4.3.3.3. Irrigation volume, drainage, and nitrate leaching

Irrigation volume was measured in each treatment with volume meters. Three times per week, two replicate samples of applied nutrient solutions for each treatment were collected from separate drip emitters, to determine the concentration of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  in the applied nutrient solution. Drainage was collected from each treatment using two replicate, free draining, re-packed lysimeters (4 m long × 2 m wide × 0.7 m deep) located in the southern side of each greenhouse, the bottom and walls of the lysimeters were lined with butyl rubber. The soil profile in the lysimeter reproduced that of the outside area described above to a depth of 0.7 m, with a layer of gravel placed between the butyl rubber sheet and the layered soil.

Accumulated lysimeter drainage volumes were measured three times per week; representative sub-samples from each lysimeter were analyzed to measure the  $\text{NO}_3^-$  concentration using the automatic segmented flow analyzer system described previously; the concentration of  $\text{NH}_4^+$  was negligible.  $\text{NO}_3^-$  leaching was calculated for each lysimeter by multiplying  $\text{NO}_3^-$  concentration by drainage volume.

#### 4.3.3.4. Determination of crop dry matter production and N uptake

Above-ground dry matter production (DMP) was measured by sampling approximately every 21 days, by removing one complete and representative plant in each replicate plot. The dry matter content of each biomass component (stem, leaf, and fruit) was determined

by oven-drying all the material at 65°C until constant weight. At transplanting, dry matter mass was determined in 100 seedlings. At each pruning during the crop, pruned dry matter mass was determined as described previously, from eight selected plants marked in each replicate plot. The same eight plants were used for all prunings. The final biomass sampling at the end of the crop was conducted by sampling and weighing the eight marked plants, to determine total fresh weight. The percentage of leaf, stem, and fruit was determined in two representative plants from these eight plants.

Representative samples (approximately 20% of fresh weight) of each component (leaf, stem and fruit) from each plant were used to determine the dry matter content by oven-drying at 65°C until constant weight. Dry matter of the whole sample was calculated by multiplying the fresh weight and dry matter percentage of each component and then summing the mass of dry matter of the three biomass components. Total dry matter production (DMP), at each biomass sampling, was calculated as the sum of dry matter mass of leaf, stem and fruit on that sampling date plus all previously sampled pruned material and harvested fruit.

All fresh fruit were harvested periodically from same eight marked plants that were used for collection of pruned material, in each replicate plot. Fresh and dry weights were determined for all fruit harvested from each plot. Once harvests commenced, they were generally conducted every 7–14 days. In the 2014, 2016 and 2017 crops, harvests commenced at 98, 101 and 110 DAT, respectively, and there were, respectively seven, sixteen and eleven harvests. Total yield at the end of each crop was calculated as the cumulative fruit production of all harvests, including fruit that were not considered suitable for the commercial market because of size and imperfections.

Representative sub-samples of leaves, stems, and fruit from each biomass sampling, and of pruned material and harvested fruit, from each replicate plot, were each ground sequentially in knife and ball mills. Total N content (%N) of each sub-sample was determined using a Dumas-type elemental analyzer system (Model Rapid N, Elementar Analysen systeme GmbH, Hanau, Germany). The mass of N in each relevant component was calculated from the %N of the sub-sample and corresponding dry matter of the sample.

Total crop N uptake ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) in each replicate plot, at each biomass sampling, was the sum of N in all relevant components including previous pruned material and harvested fruit as was done for the calculation of total DMP. Total crop N content (%N) was calculated, for each replicate, as total crop N uptake divided by total DMP. Harvest index (HI) was calculated as the ratio between dry matter in fruit and total above-ground biomass, and

nitrogen harvest index (NHI) was calculated as the ratio between N uptake in fruit and total N uptake.

#### 4.3.3.5. Determination of the critical N curve (CNC) for sweet pepper

A critical N curve (CNC) that related total crop N content to total crop DMP was calculated using data of the three crops, following the methodology of Greenwood et al. (1990). For each biomass sampling date, an analysis of variance was conducted to determine the treatment with the largest total DMP with the lowest applied N; total crop N content (%N) of the selected treatment was used for the derivation of the CNC. Where the largest total DMP occurred in more than one N treatment, the one with the lowest total crop N content was selected. These points were used to fit a negative power relationship between critical total crop N content (% $N_c$ ) and total crop dry matter production (DMP):  $\%N_c = a \times DMP^{-b}$ , where  $N_c$  is the minimum total crop N content (as %N) associated with maximum crop growth (total DMP), coefficient  $a$  represents the N concentration in the DMP when total crop DMP was 1 t ha<sup>-1</sup>, and coefficient  $b$  is a statistical parameter governing the slope of the relationship (Greenwood et al., 1990). The curve cannot be applied to dry matter biomass of <1 t ha<sup>-1</sup> (Justes et al., 1994; Ziadi et al., 2010). This curve was derived from the DMP of the total crop and the N content of total crop DMP; total crop DMP being the sum of the dry matter mass of leaves, stems, and fruits.

#### 4.3.3.6. Evaluation of the contribution of fruit to the CNC of sweet pepper

To evaluate the contribution of fruit to N dilution in the CNC (in section 4.4.1.3), two approaches were used. Firstly, a CNC for only vegetative growth was determined for the three pepper crops. This vegetative growth CNC was derived from the DMP and N content of the sum of leaves and stems (vegetative DMP) for the entire crop, excluding DMP from the fruit. The vegetative DMP CNC was determined using the same criteria as for the whole crop CNC that included stems, leaves, and fruit. For each biomass sampling date, an analysis of variance was conducted to determine the treatment with the largest vegetative DMP (of stems and leaves) with the lowest applied N.

The second approach to evaluate the contribution of fruit to the dilution of N in the whole crop CNC was to consider the DMP and N content of the whole crop (stems, leaves and fruit) for two periods, which were before and after the commencement of fruit harvest. This was to examine whether the large contribution of fruit to total crop DMP during the fruit harvest period affected the dilution of the whole crop CNC. Natural logarithm (LN) values of the critical values of DMP and of crop N content of the whole crop (1) for the full duration of the crop, (2) until the commencement of fruit harvest, and (3) after the commencement of fruit harvest, were used.



Linear regression analyses were conducted to examine the relationship of LN of crop N content to LN of crop DMP, for (i) the entire crop cycle, (ii) the period of vegetative growth before harvest, and (iii) the fruit harvest period. Combined data from the three crops were used.

The vegetative growth period preceding the first harvest was from 42–84, 43–83 and 39–101 DAT for the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively. The harvest period was from the first fruit harvest to the end of crop, being 98–170, 101–248 and 110–214 DAT the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively. The dates referred to here are the dates of the biomass samplings in vegetative and harvest periods.

The precision of the three linear regression equations was evaluated by the root mean square error (RMSE). RMSE was calculated as follows:  $RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - O_i)^2}{n}}$ , where  $n$  is the number of samples,  $Y_i$  is the estimated value of the relationship, and  $O_i$  is the observed value. A value close to zero indicates an excellent fit.

#### 4.3.3.7. Calculation of nitrogen nutrition index and critical N uptake amount values

The nitrogen nutrition index (NNI) was used as a measure of crop N status. The NNI values for each treatment at each biomass sampling date, were determined as:  $NNI = \frac{N_{act}}{N_c}$ , where  $N_{act}$  is the total nitrogen content measured and  $N_c$  is the critical N content corresponding to the amount of shoot dry matter produced (Lemaire and Gastal, 1997).

In addition, NNI values were calculated as an integrated NNI value (NNI<sub>i</sub>) to characterize the treatments in terms of crop N status during the entire growing cycle of the crops. Integrated values were calculated as:  $NNI_i = 1/D \times \sum NNI_s \times ds$ , where  $D$  was the total number of days of each pepper crop,  $NNI_s$  was the NNI value determined at each biomass sampling measurement date, and  $ds$  was the interval between two successive biomass samplings (Lemaire and Gastal, 1997; Lemaire et al., 2008).

The CNC for sweet pepper was used to calculate the critical N uptake amount ( $N_{Cupt}$ ). The  $N_{Cupt}$  was calculated using the equation:  $N_{Cupt} = 10a \times DMP^{(1-b)}$ , where the term  $10a$  represents the crop N uptake (kg N ha<sup>-1</sup>), for crop biomass of 1 t DMP ha<sup>-1</sup> (Sadras and Lemaire, 2014).

#### 4.3.3.8. Total available nitrogen

In each crop, total available N (TAN) was calculated as the sum of soil mineral N at planting, mineral N applied by fertigation, and N mineralized from applied manure and soil organic matter. Mineralized N was calculated, for each crop cycle using an N balance

approach (Feller and Fink, 2002), from the experimental data of treatment N1, where very little N was applied, using the equation:  $mineralized\ N = (N\ uptake + N\ leached + N\ residual) - (N\ initial + N\ fertigation)$ ; where N uptake is the total crop N uptake, N leached is the total  $NO_3^-$ -N leached during the crop, and N residual is the residual mineral N at the end of the crop.

For the N balance calculation, it was assumed that gaseous N losses in the N1 treatments were negligible. It was assumed that N mineralized was equal for all treatments in each pepper crop. Using this N balance calculation, N mineralized was determined to be a 24.3, 43.2 and 1.7 kg N ha<sup>-1</sup> for 2014, 2016 and 2017 crops, respectively. The larger N mineralization during the 2016 crop was likely related to the cultivation of the imported soil to 20 cm depth (after removing the sand mulch) one month prior to transplanting. This was the first and only cultivation of the greenhouse soil, since greenhouse construction in 2007.

#### 4.3.3.9. Nitrogen use efficiency indices

Nitrogen use efficiency (NUE) was calculated for each treatment in each crop as the ratio between yield ( $NUE_{Yield}$ ) or DMP ( $NUE_{DMP}$ ) and total available N (TAN) (Moll et al., 1982; Huggins and Pan, 1993). The components of NUE, namely N uptake efficiency ( $N_{upt}E$ ) and N utilization efficiency ( $N_{ut}E$ ) were calculated following Moll et al. (1982).  $N_{upt}E$  was calculated as the ratio between crop N uptake and TAN. N utilization efficiency for total yield ( $N_{ut}E_{Yield}$ ) was calculated as the ratio between total yield and crop N uptake, and N utilization efficiency for biomass ( $N_{ut}E_{DMP}$ ) as the ratio between DMP and crop N uptake (Caviglia et al., 2014).

#### 4.3.4. Data analysis

The experimental data of the three crops were examined using analysis of variance (ANOVA) after verifying assumptions of normality and equal variance. If the main effects or interactions were significant at  $P < 0.05$ , the least significant difference (LSD) test was conducted for multiple comparisons of means. The results of the analysis of variance are presented as: no significant difference at  $P > 0.05$  (ns), significant at  $P < 0.05$  (\*), very significant at  $P < 0.01$  (\*\*), and highly significant at  $P < 0.001$  (\*\*\*). All statistical procedures were performed with Statistica 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

The response of total yield to TAN and  $NNI_i$  for the 2014, 2016 and 2017 crops was examined using the linear-plateau regression model. The linear-plateau regression model was defined by the equation:  $Y = a + bN$ , if  $N < N_0$ , and  $Y = P$ , if  $N > N_0$ , where Y was total pepper yield (t ha<sup>-1</sup>), N was TAN (kg N ha<sup>-1</sup>), a was the minimum yield achieved when no N

was applied to the crop (intercept), and  $b$  was the increase in yield in response to each kg of TAN ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) (the slope);  $N_0$  was the critical value of TAN, which occurred at the intersection of the inclined linear segment and the horizontal segment of the linear-plateau regression (Gianquinto et al., 2011; Li et al., 2015).

To determine the  $N_0$  value of TAN in the soil ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ), total yield was examined as either absolute or relative values.  $N_0$  values were determined for each of the three pepper crops using total yield ( $\text{t ha}^{-1}$ ) data. To determine a single  $N_0$  value for the three crops, relative yield (%) values were used; these were calculated as the percentage of the maximum yield of the given treatment in each crop. The linear-plateau regression model was examined using the software program RStudio2 (RStudio, Inc., Boston, MA, USA).

## 4.4. Results

### 4.4.1. Determination and evaluation of a critical nitrogen dilution curve for sweet pepper

#### 4.4.1.1. Crop biomass and crop nitrogen content

The range of total crop DMP (leaves + stems + fruit) data, that fitted the statistical criteria for determining the  $N_c$  dilution curve for sweet pepper (defined in section 4.3.3.5), using combined data from the 2014, 2016 and 2017 crops, was 1.0 to 15.8  $\text{t ha}^{-1}$ . The corresponding range for the vegetative DMP (leaves + stems, excluding fruit, see section 4.3.3.6) for the three crops was 1.0 to 8.2  $\text{t ha}^{-1}$ . Crop N content decreased during the growing season and with increasing shoot biomass, from 5.0 to 2.6%N for total crop DMP (leaves + stems + fruit) and from 5.0 to 2.8%N for vegetative DMP (leaves + stems).

#### 4.4.1.2. Critical N dilution curve for sweet pepper

Generally, throughout the 2014, 2016 and 2017 crops, for each biomass sampling, the N3 treatment was associated with the lowest crop N content required for maximum crop growth (Supplementary Table 1). Combining the data of the total crop critical N content and associated total crop DMP for each biomass sampling of the three crops, the following total crop CNC was obtained for sweet pepper:  $\%N_c = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  ( $R^2=0.94$ ) (equation 1), where  $\%N_c$  is the critical crop N content, 4.71 is the total crop N content (%N) for total DMP of 1  $\text{t ha}^{-1}$ , and  $-0.22$  is the value of a dimensionless parameter that describes the slope of the relationship with which %N declines with increasing DMP, the dilution coefficient.

This total crop CNC for sweet pepper has a notably lower N dilution with increasing biomass compared to the general CNC for C3 crops ( $\%N_c = 4.80 \times DMP^{-0.32}$ ) of Lemaire and Gastal. (1997), (Figure 1 a).

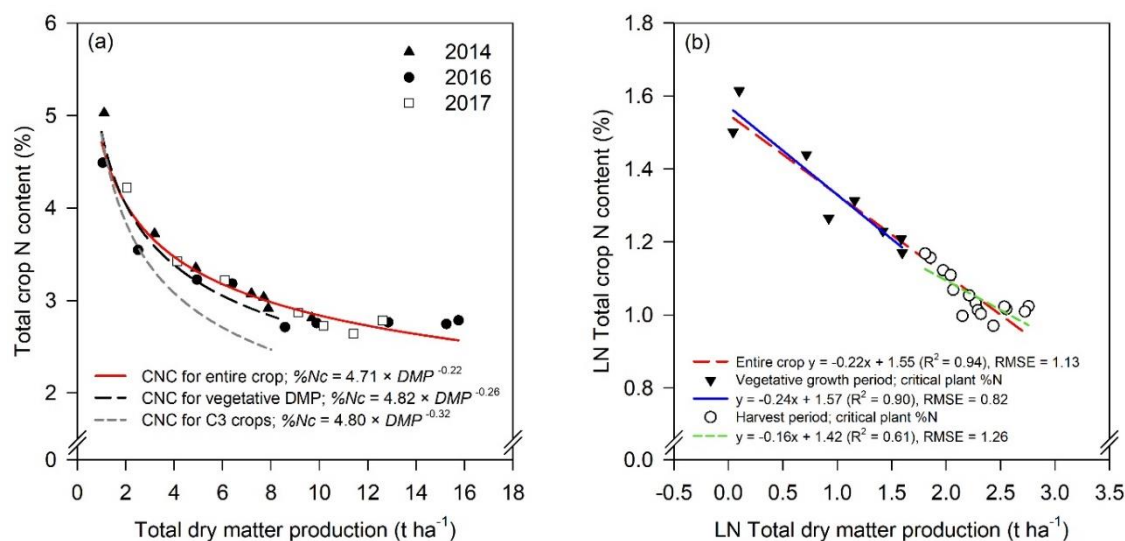
#### 4.4.1.3. Assessment of N dilution in sweet pepper CNC

To examine if fruit production contributed to the lesser dilution of the total crop sweet pepper CNC compared to the general CNC for C3 crops of Lemaire and Gastal. (1997), an additional CNC for vegetative DMP of sweet pepper was derived. The CNC for vegetative DMP, of the three crops, only used leaves and stems (i.e. fruit DMP was excluded) for the duration of the crops.

The CNC for vegetative DMP was  $\%Nc = 4.82 \times DMP^{-0.26}$ , ( $R^2=0.90$ ) (Figure 1 a). The CNC for vegetative DMP was very similar to the CNC for total crop DMP (Figure 1 a) and different to the general CNC for C3 crops of Lemaire and Gastal. (1997) (Figure 1 a). The dilution coefficient of the vegetative DMP CNC was 0.26 compared to 0.22 of the CNC for total crop DMP determined for sweet pepper, and to the value of 0.32 of Lemaire and Gastal. (1997).

The possible contribution of fruit production to the relatively limited N dilution of the total crop CNC (based on total DMP) for sweet pepper was further examined by plotting the natural logarithm of the critical N content (of the total crop) against the natural logarithm of total DMP (of the total crop) for (i) the entire duration of the crop, (ii) the vegetative growth period (i.e. prior to the first harvest), and (iii) the harvest period (when fruit were harvested), for the three crops considered together (Figure 1 b). For the duration of the entire crop, the vegetative growth period, and the harvest period, these three relationships were all described by negative linear regressions (Figure 1 b). The linear regression for the duration of the entire crop had a slope of  $-0.22$  and an RMSE of 1.13, while that for vegetative growth period had a slope of  $-0.24$  and an RMSE of 0.82, and that for harvest period had a slope of  $-0.16$  and an RMSE of 1.26 (Figure 1 b).

The similarity of the slopes and of the RMSE values indicate that there would be no clear advantage from separate CNCs for vegetative growth and harvest periods, compared to a single whole crop CNC, for assessing crop N status of sweet pepper.



**Figure 1.** (a) Critical N curve for pepper using (i) total crop N content and total DMP (red), (ii) vegetative DMP and vegetative crop N content (black broken line) from the 2014, 2016 and 2017 crops and (iii) CNC for C3 crops of Lemaire and Gastal, (1997) (gray broken line), and (b) relationship between the natural logarithm (LN) of total crop N content and the LN of total DMP for (i) the entire crop cycle (red), (ii) until harvest (blue), and (iii) harvest period (green). The CNC derived for total and vegetative DMP and N content was calculated following the methodology of Greenwood et al. (1990). Each data point is the critical treatment that maximized the production with the lowest amount of N. The values represented are means from four replicate plots. The lines and equations represent the best-fit equations.

The validity of using a single CNC for sweet pepper was verified by comparing NNI values derived from a double CNC with those derived from the single CNC obtained from the data of the three crops. The single CNC was  $\%Nc = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  (i.e. equation 1), and the double CNC consisted of  $\%Nc = 4.82 \times DMP^{-0.24}$ , ( $R^2=0.90$ ) (equation 2) for the vegetative growth period; and  $\%Nc = 4.13 \times DMP^{-0.16}$ , ( $R^2=0.61$ ) (equation 3); for fruit harvest period, as represented in Figure 1 b. in an NL-NL form. NNI values from the double CNC were compared to NNI values from the single CNC for (i) the vegetative growth period, until first fruit harvest, (ii) the period after first fruit harvest, and (iii) for the duration of the crop. Equation 2 was used for period (i), and equation 3 for period (ii); for the entire crop, the results of periods (i) and (ii) were combined. The linear regressions comparing NNI values calculated using the double CNC compared to using the single CNC were  $y = 1.01x - 0.02$ , ( $R^2=0.99$ ) for the vegetative growth period until first harvest;  $y = 0.95x + 0.05$ , ( $R^2=0.99$ ) after first harvest; and  $y = 0.99x + 0.01$ , ( $R^2=0.99$ ) for the entire crop (Supplementary Figures 1 a, b and c).

#### 4.4.1.4. Nitrogen nutrition index

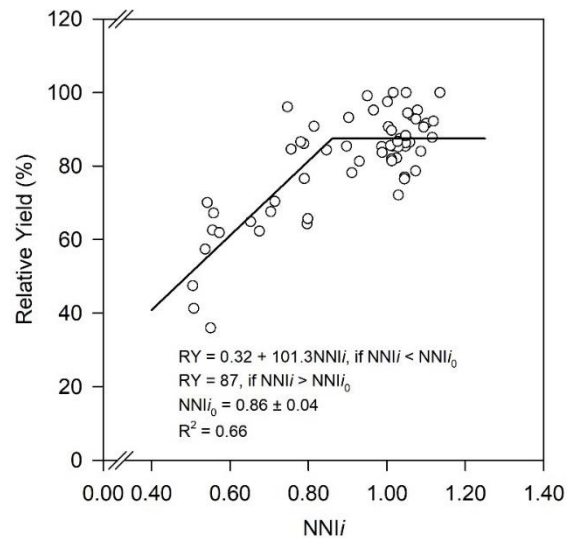
The NNI values were calculated using  $Nc$  values derived from the single CNC for the duration of the crop. In each of the three pepper crops, there were highly significant ( $P$

<0.001) differences in integrated nitrogen nutrition index (NNI<sub>i</sub>) values between the N treatments (Table 3). In the three crops, NNI<sub>i</sub> increased with increasing N supply (i.e. TAN) from N1 to N4, and thereafter was relatively constant (Table 3). In the three crops, there were statistically significant differences between treatments N1, N2, N3 and N4, and no significant differences between treatments N4 and N5 (Table 3). Treatment N3 had NNI<sub>i</sub> values that were very close to one in each of the three pepper crops.

**Table 3.** Integrated nitrogen nutrition index (NNI<sub>i</sub>) values for different N treatments for each of the three sweet pepper crops. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between means within each crop year, according to the procedure of least significant difference (LSD). A summary of the analysis of variance is presented as highly significant at  $P < 0.001$  (\*\*\*). The NNI<sub>i</sub> data are means  $\pm$  SE over all sampling dates, from four replicate plots.

Treatment	Integrated NNI		
	2014 crop	2016 crop	2017 crop
N1	0.56 $\pm$ 0.01 a	0.69 $\pm$ 0.01 a	0.52 $\pm$ 0.01 a
N2	0.77 $\pm$ 0.01 b	0.89 $\pm$ 0.01 b	0.80 $\pm$ 0.01 b
N3	1.01 $\pm$ 0.01 c	0.96 $\pm$ 0.02 c	1.02 $\pm$ 0.02 c
N4	1.05 $\pm$ 0.01 d	1.04 $\pm$ 0.02 d	1.09 $\pm$ 0.01 d
N5	1.04 $\pm$ 0.00 d	1.02 $\pm$ 0.01 d	1.10 $\pm$ 0.02 d
<i>Significance</i>	***	***	***

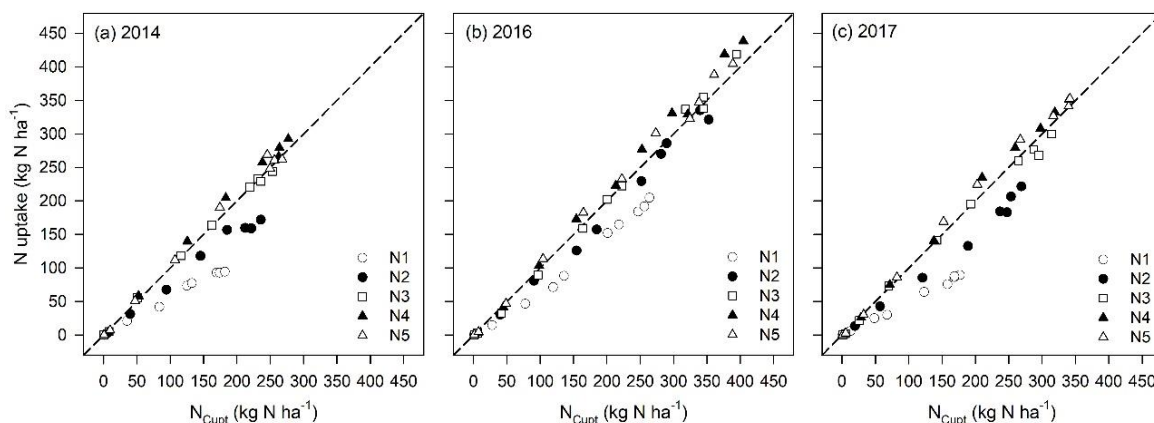
The relationship between relative yield and NNI<sub>i</sub> was described by a linear-plateau regression model for combined data from the three pepper crops (Figure 2). The NNI<sub>i</sub> value for maximum relative yield, under non-limiting N conditions, was 0.86 (Figure 2).



**Figure 2.** Relationship between relative yield and the integrated nitrogen nutrition index (NNI $\bar{i}$ ) of sweet pepper from 2014, 2016 and 2017 crops. The inclined line was described by  $Y = a + bNNI_i$  (if  $NNI_i < NNI_{i_0}$ ), the horizontal line by  $Y = P$  (if  $NNI_i > NNI_{i_0}$ );  $a$  is the intercept,  $b$  is the slope,  $NNI_{i_0}$  is the critical NNI $\bar{i}$  value (the intersection of the inclined and horizontal line). NNI $\bar{i}$  data were the NNI over all sampling dates, from four replicate plots. The line and equation represent the best-fit equation.

#### 4.4.1.5. Critical N uptake

The relationships between measured crop N uptake and the estimated critical N uptake amount ( $N_{Cupt}$ , the minimum amount of crop N uptake for maximum DMP), for the five N treatments in each of the three pepper crops are presented in Figure 3. Measured crop N uptake and critical N uptake were initially very similar in young plants with crop N uptake of 0–50 kg N ha $^{-1}$ , for all treatments in the three crops (Figure 3). Thereafter, as the crops grew, the following general tendencies were apparent in each crop: in treatment N1, crop N uptake was appreciably below  $N_{Cupt}$ ; in treatment N2, crop N uptake was below  $N_{Cupt}$ ; in treatment N3, crop N uptake was consistently very similar to  $N_{Cupt}$ ; and in treatments N4 and N5, crop N uptake was generally slightly higher than  $N_{Cupt}$ , particularly in the latter parts of the growing seasons. The very small difference between crop N uptake and  $N_{Cupt}$  for treatments N4 and N5 indicates that there was only a small amount of luxury N consumption with the highest N supply (i.e. TAN).



**Figure 3.** Measured crop N uptake and critical N uptake ( $N_{Cupt}$ ) calculated for DMP values following the equation  $N_{Cupt} = 47.1a \times DMP^{0.78}$  for the five N treatments in the (a) 2014, (b) 2016, and (c) 2017 pepper crops. The values represented are the means over all sampling treatment date. Dashed line represents the 1:1 line.

#### 4.4.2. Agronomic response

##### 4.4.2.1. Effect of N treatments on yield, dry matter production, and N uptake

There were highly significant ( $P < 0.001$ ) or very significant ( $P < 0.01$ ) effects of the N treatments on total yield in the 2014, 2016 and 2017 crops (Table 4). Total yield tended to increase with increasing N supply (i.e. TAN). In the 2014 and 2016 crops, treatments N2, N3, N4, and N5 were very similar to each other; treatment N2 had the highest yield with the lowest N supply (as TAN) in both years. For yield, in the 2017 crop, statistically  $N4 = N5$ , and  $N3 = N4$ , but  $N5 > N3$ ; treatment N3 had the highest yield with the lowest N supply.

Total dry matter production (DMP) increased with increasing N supply (Table 4). However, there were differences between crops in the DMP response to increasing N. The highest DMP with minimum N supply occurred with treatment N2 in the 2014, treatment N3 in 2016 crop, and with treatment N4 in the 2017 crop. The DMP of treatment N1 was significantly lower than that of the other N treatments, in each crop. There were no significant differences between treatments in Harvest Index (HI) in the three crops; however, there was a tendency for HI to decrease with increasing N application (Table 4).

Total crop N uptake was strongly affected by the N treatments in each of the three pepper crops (Table 4). Crop N uptake increased from N1 to N4 in 2014 and 2017, and increased from N1 to N3 in 2016; thereafter, despite additional N, crop N uptake remained relatively constant or declined. In 2014, the following differences in crop N uptake were significant,  $N4 > N3 = N5 > N2 > N1$ . In 2016, the following differences were significant,  $N5 = N4 = N3 > N2 > N1$ . In 2017, the following differences were significant,  $N5 = N4 > N3 > N2 > N1$ .



In the 2014 crop, there was a clear tendency for Nitrogen Harvest Index (NHI) to decrease with increasing N from N1 to N4, after which it remained constant (Table 4). In the 2016 crop, there was a tendency for NHI to decrease from N1 to N3, after which it remained relatively constant. In the 2014 and 2016 crops, the majority of these differences were statistically significant. In the 2017 crop, the effect of N supply on NHI was not significant.

**Table 4.** Total yield, total dry matter production (DMP), total crop N uptake, harvest index (HI) and nitrogen harvest index (NHI) for each treatment in the 2014, 2016 and 2017 pepper crops. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between means within each crop year, according to the procedure of least significant difference (LSD). A summary of the analysis of variance is presented as: no significant at  $P > 0.05$  (ns), significant at  $P < 0.05$  (\*), very significant at  $P < 0.01$  (\*\*) and highly significant at  $P < 0.001$  (\*\*\*). Data are means of four replicate plots.

Crop year/ Treatment	Total yield (t ha <sup>-1</sup> )	Total DMP (t ha <sup>-1</sup> )	Total crop N uptake (kg N ha <sup>-1</sup> )	HI	NHI
2014					
N1	38.7 a	5.7 a	95 a	0.64	0.64 a
N2	52.2 b	7.9 b	172 b	0.63	0.59 ab
N3	52.9 b	8.6 bd	244 c	0.63	0.56 bd
N4	51.1 bc	9.7 c	292 d	0.56	0.48 c
N5	46.4 c	9.3 cd	262 c	0.59	0.52 cd
<i>Significance</i>	***	***	***	n.s	**
2016					
N1	67.2 a	8.8 a	192 a	0.53	0.56 a
N2	86.4 b	12.6 b	335 b	0.50	0.50 b
N3	91.5 b	15.2 c	419 c	0.46	0.44 c
N4	94.2 b	14.4 cd	419 c	0.47	0.45 bc
N5	89.7 b	13.6 bd	388 c	0.51	0.45 bc
<i>Significance</i>	**	***	***	n.s	***
2017					
N1	33.3 a	5.1 a	88 a	0.54	0.49
N2	54.4 b	9.3 b	222 b	0.50	0.43
N3	61.0 c	10.5 c	268 c	0.51	0.44
N4	65.1 cd	12.6 d	351 d	0.46	0.41
N5	68.9 d	12.6 d	341 d	0.47	0.44
<i>Significance</i>	***	***	***	n.s	n.s

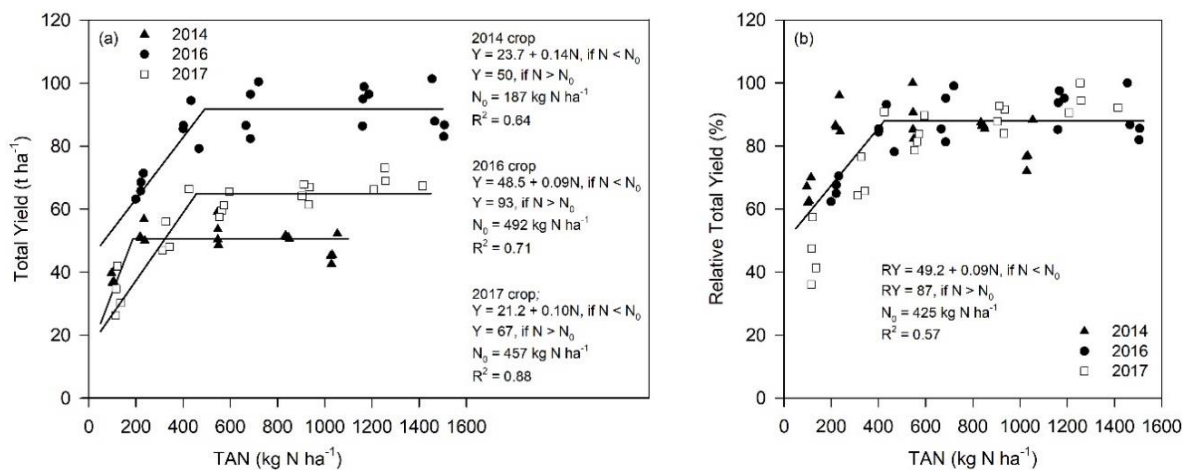
#### 4.4.2.2. Total yield response to total available nitrogen (TAN)

In the three pepper crops, total yield and relative yield responded to increasing TAN (Figures 4 a, 4 b). The relationships between total yield (expressed in absolute values) and TAN was described by the linear-plateau regression model for the 2014, 2016 and 2017 pepper crops (Figure 4 a). Using relative yield values (expressed as a percentage of

maximum total yield), the relationships between relative yield and TAN for the three crops were described by a single relationship using the linear-plateau regression model, with a  $R^2$  value of 0.57 (Figure 4 b).

Using the linear-plateau regression model with absolute yield values, the corresponding values for maximum total yield were 50, 93 and 67 t ha<sup>-1</sup> for the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively. The corresponding minimum TAN values associated with these maximum yield values were 187 kg N ha<sup>-1</sup>, 492 kg N ha<sup>-1</sup> and 457 kg N ha<sup>-1</sup>, respectively (Figure 4 a).

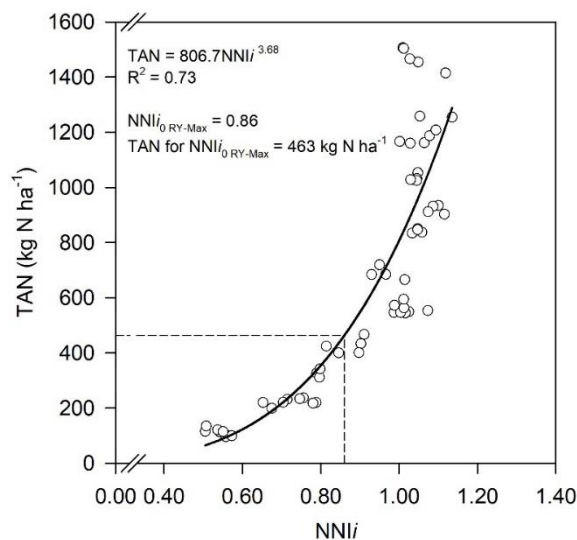
Using the linear-plateau regression model with relative values of total yield and combined data from the three crops, the maximum relative yield value was estimated to be 87%, and the minimum associated TAN value for this yield value was 425 kg N ha<sup>-1</sup> (Figure 4 b). The  $R^2$  value for fitting the linear-plateau regression model to these data from the three crops was 0.57 (Figure 4 b). The TAN value of 425 kg N ha<sup>-1</sup> corresponds to TAN values between treatments N2 and N3 in the three crops (Table 1).



**Figure 4.** Total yield in response to total available nitrogen (TAN) for 2014, 2016 and 2017 pepper crops applying a linear-plateau regression model with (a) absolute total yield and (b) relative yield values. The inclined line was described by  $Y = a + bN$  (if  $N < N_0$ ), the horizontal line by  $Y = P$  (if  $N > N_0$ );  $a$  is the intercept,  $b$  is the slope,  $N_0$  is the critical TAN value (the intersection of the inclined and horizontal lines). The values represented are individual replications. The lines and equations represent the best-fit equations.

The relationship between the total N supply, as TAN, and the means NNI throughout the crop for all N treatments in the three crops is presented in Figure 5. It was described by an exponential equation with a  $R^2$  value of 0.73. For the NNI value of 0.86 for maximum relative yield (from section 4.4.1.4 and Figure 2), the corresponding TAN value was 463 kg N ha<sup>-1</sup> (Figure 5). This optimal TAN value is similar to the TAN value of 425 kg N ha<sup>-1</sup> obtained from the linear-plateau analysis between relative yield and TAN reported in the

previous paragraph (Figure 4 b). For the pepper crops in this study, at  $NNI_i$  values  $>0.86$ , the exponential increase in associated TAN values suggested a substantial increase in the risk of applying excess N once optimal crop N status has been achieved.



**Figure 5.** Relationship between total available nitrogen (TAN) and the integrated nitrogen nutrition index ( $NNI_i$ ) of pepper from 2014, 2016 and 2017 pepper crops.  $NNI_{i_0 RY-Max}$  is the maximum value of  $NNI_i$  associated with maximum relative yield from Figure 2.  $NNI_i$  data were the  $NNI$  over all sampling dates, from four replicate plots for each crop. The line and equation represent the best-fit equation.

#### 4.4.2.3. Nitrogen use efficiency

The nitrogen use efficiency (NUE) values for each of the five N treatments of the 2014, 2016 and 2017 pepper crops are presented in Table 5. In the three crops,  $NUE_{Yield}$  and  $NUE_{DMP}$  decreased appreciably with increasing N supply.  $NUE_{Yield}$  values in the 2014, 2016 and 2017 crops decreased from 372 to 45, 308 to 61, and 274 to 54  $\text{kg kg}^{-1}$  respectively (Table 5).  $NUE_{DMP}$  values decreased from 54 to 9, 40 to 9, and 42 to 10  $\text{kg kg}^{-1}$  for the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively (Table 5). For both  $NUE_{Yield}$  and  $NUE_{DMP}$ , there were highly significant differences ( $P < 0.001$ ) between treatments. For both  $NUE_{Yield}$  and  $NUE_{DMP}$ , there were generally the following significant differences between treatments:  $N1 > N2 > N3 > N4 = N5$  (Table 5).

Nitrogen utilization efficiency in relation to total yield ( $N_{utE_{Yield}}$ ) and to DMP ( $N_{utE_{DMP}}$ ) decreased with increasing crop N uptake (Table 5). In the 2014 and 2016 crops, there were the following respective statistical differences between treatments:  $N1 > N2 > N3 = N4 = N5$ , and  $N1 > N2 = N3 = N4 = N5$ . In the 2017 crop, treatments N2 to N5 had generally similar values. A general observation, for the three crops, is that with increasing crop N uptake,  $N_{utE_{Yield}}$  decreased from values of approximately 350–400  $\text{kg kg}^{-1}$  to values of approximately

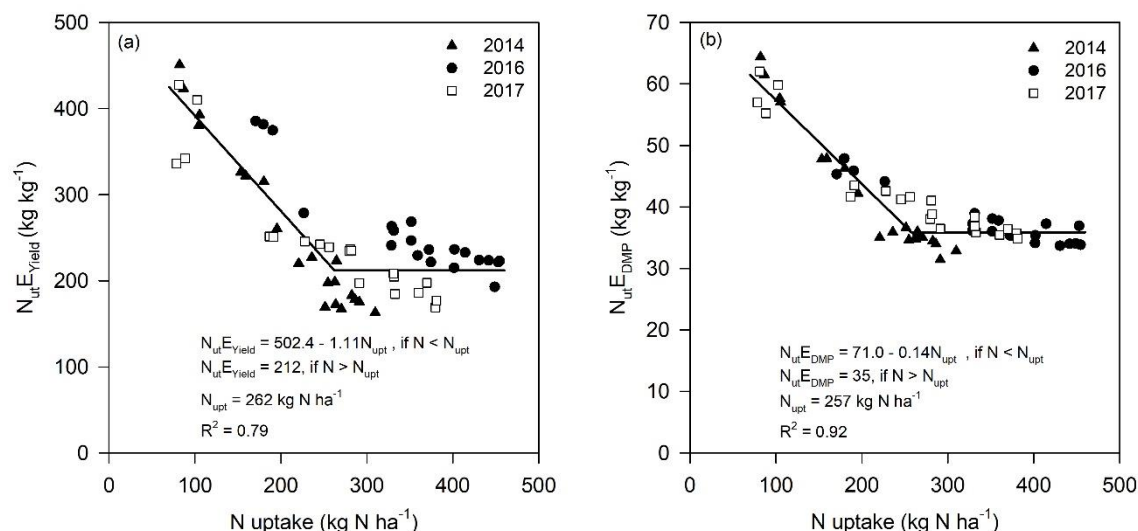
200 kg kg<sup>-1</sup>, after which  $N_{ut}E_{Yield}$  remained relatively constant despite increasing crop N uptake (Table 5, Figure 6 a). The relatively constant  $N_{ut}E_{Yield}$  values generally coincided with the N3 treatment in each of the three crops (Table 5). The relationship between  $N_{ut}E_{Yield}$  and crop N uptake was described by an inverse linear-plateau regression model (Figure 6 a); the corresponding minimum value of crop N uptake at which the plateau value of  $N_{ut}E_{Yield}$  first occurred was 262 kg N ha<sup>-1</sup> (Figure 6 a).

$N_{ut}E_{DMP}$  values ranged from 60 to 35, 46 to 35, and 58 to 37 kg kg<sup>-1</sup> in the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively (Table 5). As with  $N_{ut}E_{Yield}$ , the relationship of  $N_{ut}E_{DMP}$  with increasing crop N uptake, for the three crops, was described by an inverse linear-plateau regression model (Figure 6 b). The plateau value of  $N_{ut}E_{DMP}$  to increasing crop N uptake was 35 kg kg<sup>-1</sup> (Figure 6 b). The minimum value of crop N uptake at which the plateau value of  $N_{ut}E_{DMP}$  occurred was 257 kg N ha<sup>-1</sup> (Figure 6 b).

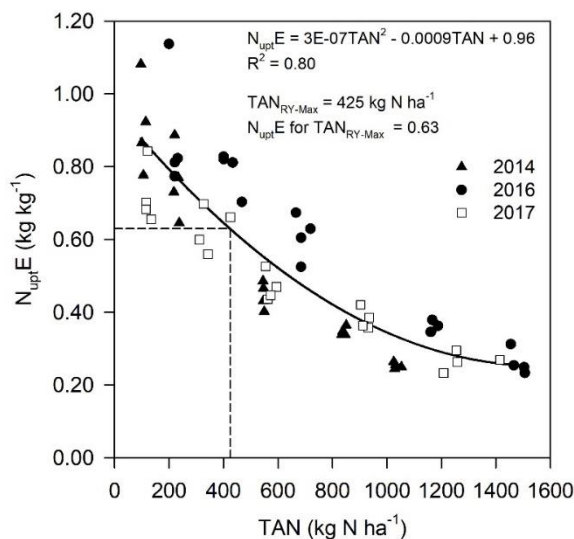
N uptake efficiency ( $N_{upt}E$ ) decreased exponentially with increasing TAN, from almost 0.90 kg kg<sup>-1</sup> in the N1 treatment to approximately 0.25 kg kg<sup>-1</sup> in the N5 treatment (Figure 7; Table 5). For the minimum TAN value for maximum relative yield of 425 kg N ha<sup>-1</sup>, the corresponding  $N_{upt}E$  value was 0.63 kg kg<sup>-1</sup> (Figure 7). The relationship of  $N_{upt}E$  to TAN was described by an inverse polynomial equation with a R<sup>2</sup> of 0.80 (Figure 7).

**Table 5.** Nitrogen use efficiency for total yield ( $NUE_{Yield}$ ) and for dry matter production ( $NUE_{DMP}$ ), N uptake efficiency ( $N_{upt}E$ ), and N utilization efficiency for total yield ( $N_{ut}E_{Yield}$ ) and for dry matter production ( $N_{ut}E_{DMP}$ ) for the different N treatments during the 2014, 2016 and 2017 pepper crops. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between means within each crop year according to the procedure of least significant difference (LSD). A summary of the analysis of variance is presented as highly significant at  $P < 0.001$  (\*\*\*). Data are means from four replicate plots.

Crop year/ Treatment	$NUE_{Yield}$ (kg kg <sup>-1</sup> )	$NUE_{DMP}$ (kg kg <sup>-1</sup> )	$N_{upt}E$ (kg kg <sup>-1</sup> )	$N_{ut}E_{Yield}$ (kg kg <sup>-1</sup> )	$N_{ut}E_{DMP}$ (kg kg <sup>-1</sup> )
2014					
N1	372 a	54.4 a	0.91 a	409 a	59.8 a
N2	230 b	34.6 b	0.76 b	304 b	45.8 b
N3	97 c	15.8 c	0.45 c	217 c	35.4 c
N4	61 d	11.5 cd	0.35 cd	175 c	33.1 c
N5	45 d	9.0 d	0.25 d	177 c	35.4 c
<i>Significance</i>	***	***	***	***	***
2016					
N1	308 a	40.2 a	0.88 a	350 a	45.7 a
N2	203 b	29.6 b	0.79 a	258 b	37.6 b
N3	133 c	22.1 c	0.61 b	218 b	36.4 bd
N4	81 d	12.3 d	0.36 c	225 b	34.3 ce
N5	61 d	9.2 d	0.26 c	231 b	35.0 de
<i>Significance</i>	***	***	***	***	***
2017					
N1	274 a	42.1 a	0.72 a	380 a	58.5 a
N2	155 b	26.6 b	0.63 b	245 b	42.1 b
N3	107 c	18.4 c	0.47 c	227 bc	39.2 bd
N4	71 cd	13.7 d	0.38 d	186 cd	35.9 c
N5	54 d	9.8 d	0.27 e	202 bd	36.9 cd
<i>Significance</i>	***	***	***	***	***



**Figure 6.** Nitrogen utilization efficiency for (a) yield per unit of N uptake ( $N_{ut}E_{yield}$ ), and for (b) dry matter production per unit of N uptake ( $N_{ut}E_{DMP}$ ), in relation to crop N uptake in the 2014, 2016 and 2017 pepper crops using a combined data set for the 2014, 2016 and 2017 pepper crops. The inclined line was described by  $Y = a + bN$  (if  $N < N_{upt}$ ), the horizontal line by  $Y = P$  (if  $N > N_{upt}$ );  $a$  is the intercept,  $b$  is the slope,  $N_{upt}$  is the critical N uptake value (the intersection of the inclined and horizontal lines). The values represented are individual replications. The lines and equations represent the best-fit equations.



**Figure 7.** Relationship between N uptake efficiency ( $N_{upt}E$ ) and total available N (TAN) for the different N treatments in the 2014, 2016 and 2017 pepper crops.  $TAN_{RY-Max}$  is the maximum amount of TAN associated with maximum relative yield from Figure 4 b. The values represented are individual replications. The line and equation represent the best-fit equation.

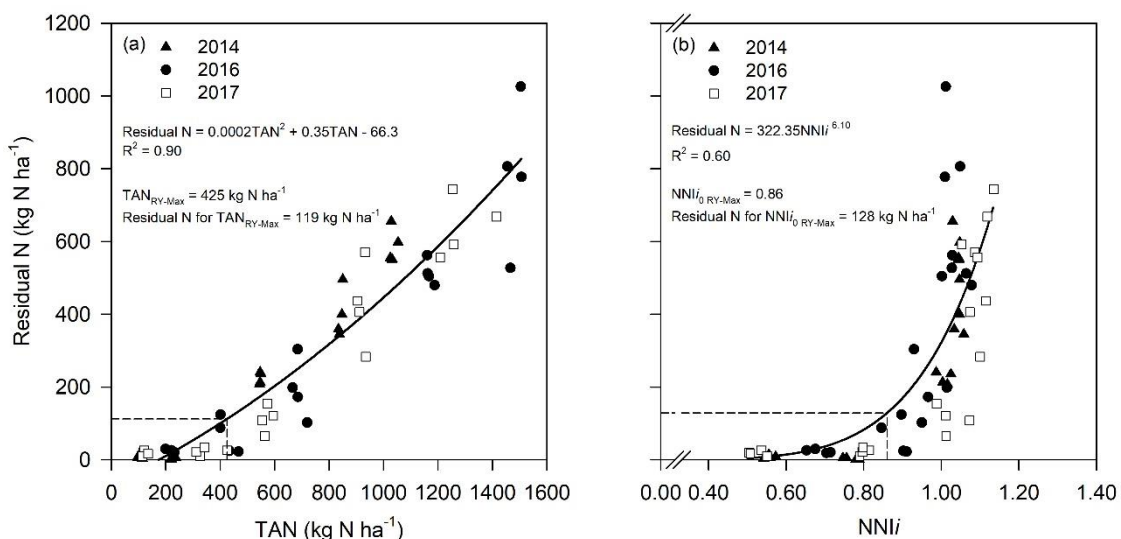
#### 4.4.2.4. Effect of N treatments on N loss and residual soil mineral N

In the three pepper crops,  $NO_3^-$  leaching increased with increasing TAN (Table 1), reaching maximum values of 168, 250 and 46 kg N ha<sup>-1</sup> in the N5 treatment in the 2014,

2016 and 2017 crops, respectively. The maximum amounts of  $\text{NO}_3^-$  leached in 2017 were lower than in 2016 and 2014 due to lower drainage volumes, which reflected the combined salinity and irrigation management practices used (Table 1).

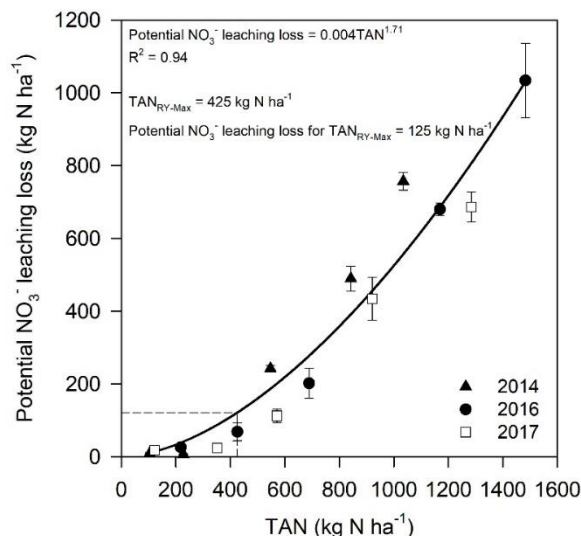
Residual soil mineral N increased with TAN, the relationship being described by a polynomial equation with a  $R^2$  of 0.90 (Figure 8 a). In the N5 treatments with TAN values of 1035, 1483 and 1284  $\text{kg N ha}^{-1}$ , the residual N values were 510, 893 and 713  $\text{kg N ha}^{-1}$  for 2014, 2016 and 2017 crops, respectively. For the TAN value of 425  $\text{kg N ha}^{-1}$ , which was the minimal TAN value for maximum relative yield (Figure 4 b), the corresponding residual N was 119  $\text{kg N ha}^{-1}$  (Figure 8 a).

The relationship between residual soil mineral N and  $\text{NNI}_i$  was described by a power equation with a  $R^2$  of 0.60 (Figure 8 b). For optimal crop N status at  $\text{NNI}_i = 0.86$  (Figure 2), the corresponding residual mineral N was 128  $\text{kg N ha}^{-1}$ , which represents a relatively small potential  $\text{NO}_3^-$  leaching loss.



**Figure 8.** Relationship between residual mineral N in the soil at the end of the 2014, 2016 and 2017 crops, and (a) total available nitrogen (TAN) and (b) integrated nitrogen nutrition index ( $\text{NNI}_i$ ).  $\text{TAN}_{\text{RY-Max}}$  is the maximum amount of TAN associated with maximum relative yield from Figure 4 b and  $\text{NNI}_{i0 \text{ RY-Max}}$  is the maximum value of  $\text{NNI}_i$  associated with maximum relative yield from Figure 2. The values represented are individual replications. The lines and equations represent the best-fit equations.

At the TAN value of 425  $\text{kg N ha}^{-1}$  for maximum production with minimum N supply, the potential  $\text{NO}_3^-$  leaching loss (i.e. the sum of the amount of N leached and the residual soil mineral at the end of each crop) was 125  $\text{kg N ha}^{-1}$  (Figure 9). Thereafter with increasing TAN, the potential  $\text{NO}_3^-$  leaching loss increased exponentially, reaching values of 757, 1034 and 686  $\text{kg N ha}^{-1}$  in the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively.



**Figure 9.** Relationship between potential  $\text{NO}_3^-$  leaching loss at the end of the 2014, 2016 and 2017 crops, and total available nitrogen (TAN).  $\text{TAN}_{\text{RY-Max}}$  is the maximum amount of TAN associated with maximum relative yield from Figure 4 b. The values represented are means  $\pm$  SE of four replicate plots. The line and equation represent the best-fit equation.

## 4.5. Discussion

### 4.5.1. Critical N curve

#### 4.5.1.1. Critical N dilution in sweet pepper

The critical N curve (CNC) equation of  $\%N_c = 4.71 \times \text{DMP}^{-0.22}$  determined from the three sweet pepper crops in the present study has a notably lower dilution of N with increasing dry matter production (DMP) (Figure 1 a) than the general CNC for C3 crops of Lemaire and Gastal. (1997). It was demonstrated that the CNC determined for sweet pepper, in the current work, was valid for the duration of the whole crop, including both the vegetative and fruit production phases. Two factors may have contributed to the lower N dilution, of these pepper crops, compared to the general CNC equation for C3 crops of Lemaire and Gastal. (1997). The two factors are: (1) the indeterminate nature of greenhouse-grown sweet pepper crops, and (2) the relatively low planting density. Being indeterminate, sweet pepper crops continually produce new shoot and fruit tissue, simultaneously. This is in marked contrast to determinate cereal crops where (i) shoot growth ceases at flowering, (ii) N is remobilized from ageing shoots to developing grain, and (iii) all grain development is homogenous for a crop. The on-going production of new green photosynthetically active tissue in indeterminate pepper crops results in the maintenance of a relatively high N content throughout the crop. In high-density cereal crops ( $\geq 10$  plants  $\text{m}^{-2}$ ), there is a rapid reduction in light availability within the canopy, and consequently in photosynthesis, which contributes to a rapid decline in crop N content (Greenwood et al.,



1990; Lemaire and Gastal, 1997). In low-density crops such as sweet pepper (2 plants m<sup>-2</sup>), the greater light availability within the canopy, likely contributes to the relatively limited dilution of crop N content as the crop grows. In other low-density greenhouse-grown vegetable crops, relatively limited dilution was also observed in cucumber (Padilla et al., 2016), but not in tomato (Padilla et al., 2015). Lemaire et al., (2007) and Seginer, (2004) described the effect of low density on N dilution.

#### 4.5.1.2. NNI<sub>i</sub> – maximum relative yield and luxury N uptake

The linear-plateau analysis of the relationship between relative yield and NNI<sub>i</sub> established a critical NNI<sub>i</sub> value of 0.86 for maximum relative yield. Below this value, relative yield decreased and, above it, there was no additional increase in relative yield. This NNI<sub>i</sub> identified situations of deficient and non-deficient N nutrition; it can be used to evaluate the N status of greenhouse-grown sweet pepper crops in SE Spain and probably throughout the Mediterranean Basin.

For the N3 (conventional N management), N4 (excessive N supply) and the N5 (very excessive N supply) treatments, NNI<sub>i</sub> values were close to one, and were very similar. This indicated that very little luxury N uptake occurred with a high N supply. This was supported by the generally strong relationship between crop N uptake and critical crop N uptake values throughout the three crops (Figure 3). Under conditions of excessive N supply, NNI values appreciably greater than 1.0 have been reported for crops such as tomato (maximum NNI = 1.30) (Padilla et al., 2015), and in potato (maximum NNI = 1.40–1.53) (Bélanger et al., 2001; Abdallah et al., 2016). However, in other crops, excessive N supply did not result in NNI values appreciably greater than 1.0, for example in cucumber (Padilla et al., 2016).

#### *4.5.2. Response of sweet pepper to total available N*

The highest yields, of up to 90 t ha<sup>-1</sup>, were obtained in the 2016 crop. For an equivalent N supply, yields were lower in the 2014 and 2017 crops, with respective maximum yields of 53 and 69 t ha<sup>-1</sup>. The durations of the crops and the transplanting dates were presumably influential contributing factors. The 2014 and 2017 crops were, respectively, 78 and 34 days shorter than the 2016 crop. The transplanting date of the 2014 crop was notably later than that of the 2016 and 2017 crops.

In indeterminate crops such as sweet pepper, the duration of the crop can appreciably affect yield. A comparatively late planting in the summer, as in the 2014 crop, further reduces yield because of reduced growth during the shortened summer-autumn growing period. The yields in the three crops of the present study were within the range of

commercial greenhouse production in Almeria, where average marketable yield is 68 t ha<sup>-1</sup> (MAPAMA, 2019).

#### 4.5.2.1. Recommended N supply

The minimum TAN for maximum relative yield (i.e. the optimal TAN value) of sweet pepper, determined in this study using linear-plateau regression analysis, was 425 kg N ha<sup>-1</sup> (Figure 4). A similar value of 463 kg N ha<sup>-1</sup> was obtained by relating the optimal NNI<sub>i</sub> value of 0.86 (Figure 3) to TAN (Figure 5). Using these results, the suggested minimum total N supply (as TAN) to maximize the production of sweet pepper crops in greenhouse production in Almeria is 430 kg N ha<sup>-1</sup>.

The greenhouse production areas in Almeria have been declared Nitrate Vulnerable Zones (NVZ; BOJA, 2015) in accordance with the EU Nitrates Directive (Anonymous., 1991). Recommended N supply for greenhouse-grown sweet pepper crops are for mineral fertilizer N (García-Serrano et al., 2010), and not for TAN. However, these current limits and recommendations for mineral fertilizer N do not consider N supplied by the soil (mineralization of organic N, residual mineral N from previous crops). These additional amounts supplied by soil can be considerable. Where mineral N fertilizer rates follow the recommendations and/or are within the NVZ limit, the additional N supplied by the soil may result in appreciable N loss. To be most effective, N fertilizer recommendations and limits should also consider the soil N supply.

In commercial greenhouse vegetable production in SE Spain, N is generally applied on the basis of concentration in the nutrient solution which is applied in each irrigation (Thompson et al., 2007; 2017b). Consequently, local growers and advisors are more familiar with N concentrations than with quantities or rates of N. For this reason, the suggested optimal TAN value was converted to a value of N concentration, by dividing 430 kg N ha<sup>-1</sup> by the irrigation volume applied to the N3 treatments (conventional management), with a respective concentration of 8.4 mmol L<sup>-1</sup>. The optimal N concentrations, considered as the total N supply, were 6.2 mmol L<sup>-1</sup> for the 2014 crop, 8.7 mmol L<sup>-1</sup> for the 2016 crop and 8.5 mmol L<sup>-1</sup> for the 2017 crop. The 2014 value can be considered as being excessively low because of the short and late growing season in 2014. A typical local recommended N concentration for mineral N fertilizer for commercial greenhouse production of pepper in SE Spain is 12 mmol L<sup>-1</sup> (Fernández and Camacho, 2008).

The N concentration supplied to crops would be higher than this recommended value if the soil N supply was included. Gallardo et al. (2006) reported that applied N concentrations from mineral fertilizer of 7–9 mmol N L<sup>-1</sup> maintained yield and decreased

$\text{NO}_3^-$  leaching when compared to conventional management of 10–12 mmol N L<sup>-1</sup> in soil-grown greenhouse pepper. The results of the present study and of Gallardo et al. (2006) suggest there is appreciable potential to reduce the N concentrations routinely applied to pepper crops in greenhouses in SE Spain, particularly if the soil N supply is considered.

Tools are required to assist vegetable growers to reduce N application with minimal risk of yield reductions. The VegSyst-DSS decision support system prepares site and crop-specific N fertilizer plans for this cropping system and recommends the applied N concentration after considering both soil mineral N at planting and N mineralized from organic material (Gallardo et al., 2014, 2016; Giménez et al., 2019). Using the VegSyst-DSS in combination with petiole sap analysis and soil solution monitoring, the average applied mineral N fertilizer was reduced by 38%, without yield reduction (Magán et al., 2019). Granados et al. (2013) reported that the use of a prescriptive-corrective management system for both N and irrigation, of greenhouse-grown sweet pepper, reduced applied fertilizer N by 35% without affecting yield.

#### 4.5.2.2. Nitrogen use efficiency

In the present study, NUE indices all declined with increasing N supply; similar results for pepper were reported by Van Eerd. (2007), Candido et al. (2009), and Yasuor et al. (2013). The relationships of both  $N_{\text{ut}}E_{\text{Yield}}$  and  $N_{\text{ut}}E_{\text{DMP}}$  with crop N uptake demonstrated that the efficiency of pepper to use absorbed N to produce fruit and dry matter was reduced with increasing crop N uptake, and was constant above crop N uptake values of approximately 260 kg N ha<sup>-1</sup>. These data demonstrate that reductions in  $\text{NUE}_{\text{Yield}}$  and  $\text{NUE}_{\text{DMP}}$  with increasing N supply are initially influenced by reductions in  $N_{\text{upt}}E$  and in  $N_{\text{ut}}E_{\text{Yield}}$  or  $N_{\text{ut}}E_{\text{DMP}}$ . However, above crop N uptake values of approximately 260 kg N ha<sup>-1</sup>, the reductions in  $\text{NUE}_{\text{Yield}}$  and  $\text{NUE}_{\text{DMP}}$  are only due to reduction in  $N_{\text{upt}}E$ . The relatively larger contribution of  $N_{\text{upt}}E$  compared to  $N_{\text{ut}}E$  in  $\text{NUE}_{\text{Yield}}$  and  $\text{NUE}_{\text{DMP}}$  with increasing N supply was also reported by Caviglia et al. (2014). Generally,  $N_{\text{ut}}E$ ,  $\text{NUE}_{\text{Yield}}$  and  $\text{NUE}_{\text{DMP}}$  are calculated only in relation to mineral fertilizer N, and not TAN as in the present study.

In a thorough review of these parameters in potato, Milroy et al. (2019) considered that initial soil mineral N and mineralized N appreciably affected the variability in values of  $N_{\text{upt}}E$ ,  $\text{NUE}_{\text{Yield}}$  and  $\text{NUE}_{\text{DMP}}$  reported for mineral N fertilizer. This suggests that using TAN as done in the present study, rather than just fertilizer N for calculating these indices, is likely to appreciably reduce the variability reported for a given species in NUE indices.

#### 4.5.2.3. Potential for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss to the environment

The potential NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss increased exponentially as the N supply exceeded the optimal TAN value. This is consistent with considerable NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss from this intensive vegetable production system (Pulido-Bosch, 2005; Peña-Fleitas et al., 2013; Thompson et al., 2013; Domínguez, 2014) and the very excessive N supply in commercial production (Thompson et al., 2007; Jadoski et al., 2013). Reducing the total amounts of N supplied to crops will contribute to a substantial reduction in the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss associated with this system.

The meta-analysis of Quemada et al. (2013) indicated that the combination of adequate consideration of TAN with good irrigation management reduced NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching losses by 40–80% without reducing total yield. Combined improved irrigation and N management have resulted in large reductions in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss compared to conventional management in pepper crops grown in greenhouses in Almeria, without yield reduction (Granados et al., 2013; Magán et al., 2019).

#### **4.6. Conclusions**

A critical N curve of  $\%Nc = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  was developed for sweet pepper. This CNC has appreciably less N dilution, with increasing DMP, than the general C3 CNC of Lemaire and Gastal, (1997). An NNI value of 0.86 was associated with maximum relative yield; the associated amount of total available N (TAN, i.e. the sum of the soil N at planting, N mineralized from organic material in soil, and mineral N fertilizer) was 463 kg N ha<sup>-1</sup>. Linear-plateau analysis of relative yield versus TAN suggested that 425 kg N ha<sup>-1</sup> is the minimum amount of TAN required for maximum yield of sweet pepper crops with an autumn-winter growing cycle, grown in soil, under SE Spain greenhouse conditions. This value was associated with a N<sub>uptE</sub> of 0.63 kg kg<sup>-1</sup> and with a potential NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss of 125 kg N ha<sup>-1</sup>. A TAN value of 430 kg N ha<sup>-1</sup> was recommended for sweet pepper in these conditions. With increasing TAN above the recommended value, N<sub>uptE</sub> progressively declined and the potential NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching loss increased considerably. The CNC for sweet pepper developed in this work will be very useful for future work developing and evaluating improved N management practices for sweet pepper. The use of TAN rather than just fertilizer N is a more comprehensive approach, which will result in N recommendations that optimize production, reduce N fertilizer use, and reduce N losses to the environment.

#### **4.7. References**

Abdallah, F. Ben, Olivier, M., Goffart, J.P., Minet, O., 2016. Establishing the Nitrogen Dilution Curve for Potato Cultivar Bintje in Belgium. *Potato Res.* 59, 241–258. <https://doi.org/10.1007/s11540-016-9331-y>

- 
- Anonymous., 1991. Council directive 91/676/EEC concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. *Off. J. Eur. Commun.* L375, 1–8.
- Bélangier, G., Walsh, J.R., Richards, J.E., Milburn, P.H., Ziadi, N., 2001. Critical Nitrogen Curve and Nitrogen Nutrition Index for Potato in Eastern Canada. *Am. J. Potato Res.* 78, 355–364.
- BOJA., 2015. Orden de 1 de junio de 2015, por la que se aprueba el programa de actuación aplicable en las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos de fuentes agrarias designadas en Andalucía. *Boletín Oficial de la Junta de Andalucía*. N°111. [WWW Document]. URL <https://www.juntadeandalucia.es/boja/2015/111/index.html> (accessed 5.25.19).
- Bretones, F., 2003. El Enarenado, in: Camacho, F. *Técnicas de Producción En Los Cultivos Protegidos*, Vol.1. Caja Rural de Almería. España. (In Spanish), pp. 109–118.
- Candido, V., Miccolis, V., Rivelli, A.R., 2009. Yield Traits and Water and Nitrogen Use Efficiencies of Bell Pepper Grown in Plastic-Greenhouse. 91–100.
- Caviglia, O.P., Melchiori, R.J.M., Sadras, V.O., 2014. Nitrogen utilization efficiency in maize as affected by hybrid and N rate in late-sown crops. *F. Crop. Res.* 168, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.08.005>
- Domínguez, P., 2014. Estado Actual de los Acuíferos del Sur de la Sierra de Gádor-Campo de Dalías. Instituto Geológico y Minero de España. Ministerio de Economía y Competitividad. [WWW Document]. URL <http://info.igme.es/ConsultaSID/presentacion.asp?Id=166757> (accessed 5.21.19).
- Feller, C., Fink, M., 2002. NMIN Target Values for Field Vegetables. *Acta Hort.* 571, 195–201. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.571.23>
- Fernández, E.J., Camacho, F., 2008. *Manual Práctico de Fertirrigación en riego por goteo*. Ediciones Agrotécnicas SL. Madrid, España. (In Spanish).
- Fernández, M.D., Bonachela, S., Orgaz, F., Thompson, R., López, J.C., Granados, M.R., Gallardo, M., Fereres, E., 2010. Measurement and estimation of plastic greenhouse reference evapotranspiration in a Mediterranean climate. *Irrig. Sci.* 28, 497–509. <https://doi.org/10.1007/s00271-010-0210-z>
- Fernández, M.D., Bonachela, S., Orgaz, F., Thompson, R.B., López, J.C., Granados, M.R., Gallardo, M., Fereres, E., 2011. Erratum to: Measurement and estimation of plastic greenhouse reference evapotranspiration in a Mediterranean climate. *Irrig. Sci.* 29, 91–92. <https://doi.org/10.1007/s00271-010-0233-5>
- Gallardo, M., Thompson, R.B., López-Toral, J.R., Fernández, M.D., Granados, R., 2006. Effect of Applied N Concentration in a Fertigated Vegetable Crop on Soil Solution Nitrate and Nitrate Leaching Loss. *Acta Hort.* 700, 221–224. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.700.37>
- Gallardo, M., Thompson, R.B., Giménez, C., Padilla, F.M., Stöckle, C.O., 2014. Prototype decision support system based on the VegSyst simulation model to calculate crop N
-

- and water requirements for tomato under plastic cover. *Irrig. Sci.* 32, 237–253. <https://doi.org/10.1007/s00271-014-0427-3>
- Gallardo, M., Fernández, M.D., Giménez, C., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2016. Revised VegSyst model to calculate dry matter production, critical N uptake and ET<sub>c</sub> of several vegetable species grown in Mediterranean greenhouses. *Agric. Syst.* 146, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2016.03.014>
- García-Serrano, P., Lucena, J.J., Ruano, S., Nogales, M., López, L., Betrán, J., Ramos, A., López, H., López, P., Bermejo, J.L., Urbano, P., Piñeiro, J., Castro, J., Blázquez, R., Ramos, C., Pomares, F., Quiñones, A., Martínez, B., Primo-Millo, E., Legaz, F., Espada, J.L., García-Escudero, E., García, C., Pérez, J., 2010. Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Parte I, Parte II. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, España. (In Spanish).
- García, M.C., Céspedes, A.J., Pérez, J.J., Lorenzo, P., 2016. El sistema de la producción hortícola protegido de la provincia de Almería. IFAPA, Almería, España. (In Spanish).
- Gastal, F., Lemaire, G., Durand, J., Louarn, G., 2015. Quantifying crop responses to nitrogen and avenues to improve nitrogen-use efficiency, in: Sadras, V.O., Calderini, D.F. (eds), *Crop Physiology: Applications for Genetic Improvement and Agronomy*, Ed2. Elsevier, United States of America, pp. 161–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417104-6.00008-X>
- Gázquez, J.C., Pérez, C., Meca, D.E., Segura, M.D., Domene, M.A., De La Cruz, E., López, J.C., Buendía, D., 2017. Comparative study of tomato production strategies for long-cycle crop in enarenado and for inter-planting in different substrates systems in the Mediterranean area. *Acta Hort.* 1170, 773–776. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.98>
- Gianquinto, G., Orsini, F., Sambo, P., Paino D'Urzo, M., 2011. The Use of Diagnostic Optical Tools to Assess Nitrogen Status and to Guide Fertilization of Vegetables. *Horttechnology* 21, 287–292.
- Giletto, C.M., Echeverría, H.E., 2015. Critical Nitrogen Dilution Curve in Processing Potato Cultivars. *Am. J. Plant Sci.* 6, 3144–3156. <https://doi.org/10.1007/s12230-011-9226-z>
- Giménez, C., Thompson, R.B., Prieto, M.H., Suárez-Rey, E., Padilla, F.M., Gallardo, M., 2019. Adaptation of the VegSyst model to outdoor conditions for leafy vegetables and processing tomato. *Agric. Syst.* 171, 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2019.01.003>
- Granados, M.R., Thompson, R.B., Fernández, M.D., Gázquez, J.C., Gallardo, M.L., Martínez-Gaitán, C., 2007. Reducción de la lixiviación de nitratos y manejo mejorado de nitrógeno con sondas de succión en cultivos hortícolas. Fundación Cajamar. Almería, España. (In Spanish).
- Granados, M.R., Thompson, R.B., Fernández, M.D., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., 2013. Prescriptive-corrective nitrogen and irrigation management of fertigated and drip-irrigated vegetable crops using modeling and monitoring approaches. *Agric. Water*

- 
- Manag. 119, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.12.014>
- Greenwood, D.J., Lemaire, G., Gosse, G., Cruz, P., Draycott, A., Neeteson, J.J., 1990. Decline in Percentage N of C3 and C4 Crops with Increasing Plant Mass. *Ann. Bot.* 66, 425–436. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088044>
- Huang, S., Miao, Y., Cao, Q., Yao, Y., Zhao, G., Yu, W., Shen, J., Yu, K., Bareth, G., 2018. A New Critical Nitrogen Dilution Curve for Rice Nitrogen Status Diagnosis in Northeast China. *Pedosphere* 28, 814–822. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60392-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60392-8)
- Huggins, D.R., Pan, W.L., 1993. Nitrogen Efficiency Component Analysis: An Evaluation of Cropping System Differences in Productivity. *Agron. J.* 85, 898–905.
- Jadoski, S., Thompson, R.B., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., 2013. Regional N balance for an intensive vegetable production system in South-Eastern Spain, in: Fontana, E., Grignani, C., Nicola, S. (Ed.), *Book of Abstracts, International Workshop on Nitrogen, Environment and Vegetables. NEV 2013, Turín, Italy, 15-17 April.* pp. 50–51.
- Justes, E., Mary, B., Meynard, J.M., Machet, J.M., Thelier-Huches, L., 1994. Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Winter Wheat Crops. *Ann. Bot.* 74, 397–407. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0557>
- Lemaire, G., Gastal, F., 1997. N uptake and distribution in plant canopies., in: Lemaire, G. (Ed) (Ed.), *Diagnosis of Nitrogen Status in Crops.* Springer, Berlin, Germany, pp. 3–41. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-60684-7>
- Lemaire, G., Oosterom, E. van, Sheehy, J., Jeuffroy, M.H., Massignam, A., Rossato, L., 2007. Is crop N demand more closely related to dry matter accumulation or leaf area expansion during vegetative growth? *F. Crop. Res.* 100, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.05.009>
- Lemaire, G., Jeuffroy, M.H., Gastal, F., 2008. Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. Theory and practices for crop N management. *Eur. J. Agron.* 28, 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.01.005>
- Li, Y., Chen, Y., Wu, C.Y., Tang, X., Ji, X.J., 2015. Determination of optimum nitrogen application rates in Zhejiang Province, China, based on rice yields and ecological security. *J. Integr. Agric.* 14, 2426–2433. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61168-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61168-6)
- Magán, J.J., Gallardo, M., Fernández, M.D., García, M.L., Granados, M.R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2019. Showcasing a fertigation management strategy for increasing water and nitrogen use efficiency in soil-grown vegetable crops in the FERTINNOWA project. *Acta Hortic.* 1253, 17–24. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1253.3>
- MAPAMA, 2019. Anuario de Estadística. Avance de superficies y producciones de cultivo 2018. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. (In Spanish) [WWW Document]. URL <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx>. (accessed 5.13.19).
- Milroy, S.P., Wang, P., Sadras, V.O., 2019. Defining upper limits of nitrogen uptake and
-

- nitrogen use efficiency of potato in response to crop N supply. *F. Crop. Res.* 239, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.05.011>
- Moll, R.H., Kamprath, E.J., Jackson, W.A., 1982. Analysis and Interpretation of Factors Which Contribute to Efficiency of Nitrogen Utilization. *Agron. J.* 74, 562–564. <https://doi.org/10.2134/agronj1982.00021962007400030037x>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2014. Evaluation of optical sensor measurements of canopy reflectance and of leaf flavonols and chlorophyll contents to assess crop nitrogen status of muskmelon. *Eur. J. Agron.* 58, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.04.006>
- Padilla, F.M., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2015. Threshold values of canopy reflectance indices and chlorophyll meter readings for optimal nitrogen nutrition of tomato. *Ann. Appl. Biol.* 166, 271–285. <https://doi.org/10.1111/aab.12181>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2016. Proximal optical sensing of cucumber crop N status using chlorophyll fluorescence indices. *Eur. J. Agron.* 73, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.11.001>
- Pardossi, A., Tognoni, F., Incrocci, L., 2004. Mediterranean Greenhouse Technology. *Chron. Horticult.* 44, 28–34.
- Peña-Fleitas, M.T., Thompson, R., Gallardo, M., Fernández-Fernández, M.D., 2013. Regional model of nitrate leaching for an intensive vegetable production system, in: *Nitrogen, Environment and Vegetables, Proceedings of the NEV 2013, Turín, Italy, 15–17 April 2013*; Fontana, E., Grignani, C., Nicola, S., Eds.; Università Degli Studi Di Torino, 10095 Grugliasco (Turin), Italy; pp. 73–74.
- Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., Farneselli, M., Padilla, F.M., 2015. Assessing crop N status of fertigated vegetable crops using plant and soil monitoring techniques. *Ann. Appl. Biol.* 167, 387–405. <https://doi.org/10.1111/aab.12235>
- Pulido-Bosch, A., 2005. Recarga en la Sierra de Gádor e hidrogeoquímica de los acuíferos del Campo de Dalías. Escobar Impresores S.L., El Ejido, Almería, España. (In Spanish).
- Quemada, M., Baranski, M., Nobel-de Lange, M.N.J., Vallejo, A., Cooper, J.M., 2013. Meta-analysis of strategies to control nitrate leaching in irrigated agricultural systems and their effects on crop yield. *Agric. Ecosyst. Environ.* 174, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.04.018>
- Sadras, V.O., Lemaire, G., 2014. Quantifying crop nitrogen status for comparisons of agronomic practices and genotypes. *F. Crop. Res.* 164, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.05.006>
- Seginer, I., 2004. Plant spacing effect on the nitrogen concentration of a crop. *Eur. J. Agron.* 21, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2003.10.007>
- Soto, F., Gallardo, M., Thompson, R.B., Peña-Fleitas, M.T., Padilla, F.M., 2015. Consideration of total available N supply reduces N fertilizer requirement and potential for nitrate leaching loss in tomato production. *Agric. Ecosyst. Environ.* 200, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.10.022>



- 
- Tei, F., Benincasa, P., Guiducci, M., 2002. Critical nitrogen concentration in processing tomato. *Eur. J. Agron.* 18, 45–55. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(02\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(02)00096-5)
- Thompson, R.B., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., Giménez, C., Fernández, M.D., 2007. Identification of irrigation and N management practices that contribute to nitrate leaching loss from an intensive vegetable production system by use of a comprehensive survey. *Agric. Water Manag.* 89, 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2007.01.013>
- Thompson, R.B., Gallardo, M., Fernández-Fernández, M.D., 2013. Measurement of Nitrate Leaching in Commercial Vegetable Production in SE Spain, in: *Nitrogen, Environment and Vegetables, Proceedings of the NEV 2013, Turín, Italy, 15–17 April 2013*; Fontana, E., Grignani, C., Nicola, S., Eds.; Università Degli Studi Di Torino, 10095 Grugliasco (Turin), Italy; Pp. 67–69.
- Thompson, R.B., Tremblay, N., Fink, M., Gallardo, M., Padilla, F.M., 2017a. Tools and Strategies for Sustainable Nitrogen Fertilisation of Vegetable Crops, in: Tei, F., Nicola, S., Benincasa, P. (Ed.), *Advances in Research on Fertilization Management of Vegetable Crops*. Springer, Cham, Switzerland, pp. 11–63. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2_2)
- Thompson, R.B., Incrocci, L., Voogt, W., Pardossi, A., Magán, J.J., 2017b. Sustainable irrigation and nitrogen management of fertigated vegetable crops. *Acta Hort.* 363–378. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1150.52>
- Tremblay, N., Fallon, E., Ziadi, N., 2011. Sensing of Crop Nitrogen Status: Opportunities, Tools, Limitations, and Supporting Information Requirements. *Horttechnology* 21, 274–281.
- Valera, L.D., Belmonte, L.J., Molina, F.D., López, A., 2016. Greenhouse agriculture in Almeria. A comprehensive techno-economic analysis. *Cajamar Caja Rural, Almeria. Spain*.
- Van Eerd, L.L., 2007. Evaluation of different nitrogen use efficiency indices using field-grown green bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Can. J. Plant Sci.* 87, 565–569.
- Yasuor, H., Ben-gal, A., Yermiyahu, U., Beit-yannai, E., Cohen-Shabtai, 2013. Nitrogen Management of Greenhouse Pepper Production: Agronomic, Nutritional, and Environmental Implications. *HortScience* 48, 1241–1249.
- Yue, S.C., Sun, F.L., Meng, Q.F., Zhao, R.F., Li, F., Chen, X.P., Zhang, F.S., Cui, Z.L., 2014. Validation of a Critical Nitrogen Curve for Summer Maize in the North China Plain. *Pedosphere* 24, 76–83. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(13\)60082-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(13)60082-X)
- Ziadi, N., Bélanger, G., Claessens, A., Lefebvre, L., Cambouris, A.N., Tremblay, N., Nolin, M.C., Parent, L.-É., 2010. Determination of a Critical Nitrogen Dilution Curve for Spring Wheat. *Agron. J.* 102, 241–250. <https://doi.org/10.2134/agronj2009.0266>



## **5. CHAPTER TWO: Soil monitoring methods to assess immediately available soil N for fertigated sweet pepper**

---

Rodríguez, A., Peña-fleitas, M.T., Padilla, F.M., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2020. Soil monitoring methods to assess immediately available soil N for fertigated sweet pepper. *Agronomy*. 10, 2000. <https://doi.org/10.3390/agronomy10122000>



### 5.1. Abstract

Excessive N application occurs in greenhouse vegetable production. Monitoring methods of immediately available soil N are required.  $[\text{NO}_3^-]$  in soil solution, sampled with ceramic cup samplers, and  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 soil to water (v/v) extract were evaluated. Five increasing [N], from very N deficient (N1) to very N excessive (N5) were applied throughout three fertigated pepper crops by combined fertigation/drip irrigation. The crops were grown in soil in a greenhouse. Soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  was measured every 1–2 weeks, and extract  $[\text{NO}_3^-]$  every 4 weeks. Generally, for treatments N1 and N2, both soil solution and extract  $[\text{NO}_3^-]$  were continually close to zero, and increased with applied [N] for treatments N3–5. The relationships of both methods to the nitrogen nutrition index (NNI), an indicator of crop N status, were assessed. Segmented linear analysis gave  $R^2$  values of 0.68–0.70 for combined data from entire crops, for both methods. NNI was strongly related to increasing  $[\text{NO}_3^-]$  up to 3.1 and 0.9  $\text{mmol L}^{-1}$  in soil solution and extracts, respectively. Thereafter, NNI was constant at 1.04–1.05, with increasing  $[\text{NO}_3^-]$ . Suggested sufficiency ranges were derived. Soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  is effective to monitor immediately available soil N for sweet pepper crops in SE Spain. The extract method is promising.

**Keywords:** *Capsicum annuum* L.; ceramic suction cups; greenhouse; nitrate leaching; NNI; soil solution; soil testing; soil-water extracts; sufficiency values; vegetable crops

### 5.2. Introduction

Approximately 170,000 ha of greenhouses and plastic tunnels (Pardossi et al., 2004) are used for intensive production of vegetables in the Mediterranean Basin. These greenhouse production systems are commonly associated with N applications that appreciably exceed what is required to ensure high yields (Tei et al., 2020; Thompson et al., 2007). Additionally, irrigation is often excessive to crop water requirements (Fernández et al., 2007; Peña-Fleitas et al., 2013; Thompson et al., 2007). Consequently, large nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) leaching losses (Peña-Fleitas et al., 2013; Thompson et al., 2020b, 2013), and associated aquifer  $\text{NO}_3^-$  contamination occur (Pulido-Bosch et al., 2018).

In southeast (SE) Spain, there are 42,000 ha of highly concentrated plastic greenhouses (Valera et al., 2016), of which 32,000 ha are located in the province of Almeria (Junta de Andalucía, 2019). In approximately 90% of these greenhouses, crops are grown in soil (García et al., 2016). Nearly all of the greenhouse production areas in Almeria have been declared nitrate vulnerable zones (NVZ) (BOJA, 2009) in accordance with the EU Nitrates Directive (Anonymous, 1991). Nitrate concentrations as high as 400  $\text{mg NO}_3^- \text{L}^{-1}$  have been reported (Domínguez, 2014), and there is a general tendency to increase (Domínguez, 2014; Pulido-Bosch et al., 2018).

Given that most greenhouses in Almeria are within NVZs, there is an obligation to adopt management practices that reduce aquifer  $\text{NO}_3^-$  contamination (BOJA, 2015; Thompson et al., 2020a). These improved practices must ensure optimal, or at least considerably improved, crop N management. All growers have combined drip irrigation and fertigation systems that frequently apply small amounts of N (García et al., 2016; Thompson et al., 2020b, 2017a). Tools/systems that monitor crop N status or the immediate supply of crop available N will enable frequent N applications to be adjusted to ensure optimal crop N status (Padilla et al., 2020; Thompson et al., 2017b). The assessment of crop N status of greenhouse-grown vegetable crops has suggested that generally crop/plant monitoring approaches (proximal optical sensors, petiole sap analysis) are sensitive to crop N deficiency, but less sensitive to excessive N supply (Padilla et al., 2020; Thompson et al., 2017b).

Previous studies in Almeria greenhouses have suggested that monitoring the immediately available soil N supply, as the  $\text{NO}_3^-$  concentration ( $[\text{NO}_3^-]$ ) of a root-zone soil solution can indicate an excessive N supply (Granados et al., 2013; Peña-Fleitas et al., 2015). In these studies, ceramic cup soil solution suction samplers were used. However, until now, suggested quantitative lower and upper limits have been tentative, being based on observation rather than on objective criteria (Granados et al., 2013; Thompson et al., 2020b). A number of studies have examined various practical aspects of determining the  $[\text{NO}_3^-]$  of soil solution, such as minimizing spatial variability (Granados et al., 2013; Padilla et al., 2020), their use with rapid analysis systems (Thompson et al., 2009), and providing general recommendations on their use (Padilla et al., 2020; Thompson et al., 2017b). However, only one study has quantitatively assessed sensitivity in relation to crop N status (Peña-Fleitas et al., 2015). In that study, simple linear regression analysis was used. No studies have assessed sensitivity in relation to crop N status using the more comprehensive approach of segmented line analysis. No studies have quantitatively determined lower and upper sufficiency limits.

Another soil-based approach to assess the immediately available soil N supply is the 1:2 soil to water (v/v) extract method, which is routinely used in commercial greenhouse production in The Netherlands (Sonneveld et al., 1990; Sonneveld and Voogt, 2009; Thompson et al., 2017b). This method involves taking a composite soil sample and extracting one volume of fresh soil with two volumes of water. The  $[\text{NO}_3^-]$  is determined in the decanted solution from the suspension (Sonneveld et al., 1990; Sonneveld and Van den Ende, 1971). Good agreement between N determined with the 1:2 soil to water (v/v) extract method and N extracted from mineral soils has been reported (Gysi, 1981).

Lower and upper and sufficiency values are available for the 1:2 soil to water (v/v) extract method for vegetable and ornamental crops grown in soil in Dutch greenhouses (Incrocci et al., 2017; Sonneveld and Voogt, 2009; Thompson et al., 2017b). Some work with this method has been conducted in Greek and Italian greenhouses (De Kreij et al., 2007; Incrocci et al., 2017). However, sufficiency values for those conditions have not been published, although suggested unpublished sufficiency values are lower than those used in The Netherlands (Incrocci, 2020). The 1:2 soil to water (v/v) extract method has not been evaluated in greenhouses in SE Spain. There is no available information as to its effectiveness or of sufficiency values for these conditions.

Quantitative evaluation of the sensitivity and quantitative determination of sufficiency values, for the  $[\text{NO}_3^-]$  in soil solution and in the extract from the 1:2 soil to water (v/v) extract method, can be done by relating these  $[\text{NO}_3^-]$  to an indicator of crop N status. The nitrogen nutrition index (NNI) is a reliable and established indicator of crop N status (Lemaire et al., 2008; Lemaire and Gastal, 1997). The NNI is the ratio between the actual crop N content and the critical N content of the crop (Greenwood et al., 1990). An NNI value of 1.0 indicates N sufficiency for maximum dry matter production (DMP) (i.e., maximum growth), values of <1.0 indicate N deficiency, and values of >1.0 indicate N excess (Lemaire et al., 2008). The relationship of soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  to NNI of fertigated tomato and melon was examined in one study (Peña-Fleitas et al., 2015). These authors observed a tendency for increasing NNI with increasing soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  in melon, but little relationship in tomato. No studies have reported quantitative assessment of the 1:2 soil to water (v/v) extract method using NNI.

In Almeria greenhouses, sweet pepper is one of the main crops, being grown annually on approximately 10,000 ha (Junta de Andalucía, 2019). While various crop monitoring tools have been thoroughly evaluated to determine N deficiency of sweet pepper (e.g., de Souza et al., 2019; Padilla et al., 2018, 2017), complementary soil monitoring tools are required that can also inform of excessive N supply.

The objectives of this study were, in the context of greenhouse-grown sweet pepper crops in SE Spain, to: (i) determine the response of  $[\text{NO}_3^-]$  in soil solution and the 1:2 soil to water (v/v) extract to increasing N supply, (ii) evaluate the sensitivity of  $[\text{NO}_3^-]$  in soil solution and the 1:2 soil to water (v/v) extract to assess crop N status, (iii) derive lower sufficiency values for maximum growth, and (iv) derive upper sufficiency values to identify excessive N supply. Objectives (ii) to (iv) used NNI. Additional objectives were to determine: (a) the relationships of  $[\text{NO}_3^-]$  in soil solution and in the 1:2 soil to water (v/v) extract to the

applied N concentration, and (b) the relationship between  $[\text{NO}_3^-]$  in soil solution and  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 soil to water (v/v) extract.

### 5.3. Materials and Methods

#### 5.3.1. Experimental site and crops

Three sweet pepper (*Capsicum annuum* L. “Melchor”) crops were grown, in soil, in a plastic greenhouse at the Experimental Farm of the University of Almeria, in Retamar, Almeria (36°51' N, 2°16' W, 92 m elevation) in SE Spain. The crops were grown with autumn-winter growing periods in 2014–2015 (2014 crop), 2016–2017 (2016 crop), and 2017–2018 (2017 crop) (Table 1). Cropping conditions were very similar to those of local commercial production (Valera et al., 2016).

The greenhouse had a multi-tunnel structure with a galvanized steel frame. The roof consisted of low-density polyethylene (LDPE) tri-laminated film, and walls of polycarbonate. It was ventilated passively through flap roof windows and lateral side panels. Total cropped area within the greenhouse was 1327 m<sup>2</sup>. The soil was an artificial layered “enarenado” soil that is commonly used in this region (Gázquez et al., 2017; Thompson et al., 2007). It consisted of a 30-cm layer of imported silty loam textured soil placed on the original loam soil; a 10-cm layer of fine gravel was placed on the imported soil as a mulch. Details of the soil are available in (Padilla et al., 2014).

Irrigation was applied through above-ground drip tape. The drip tape was organized in paired lines, with 0.8 m separation between the lines of each pair, 1.2 m separation between adjacent pairs of lines, and 0.5 m spacing between drip emitters in the drip tape. The density of emitters was 2 emitters m<sup>-2</sup>. The discharge rate was 3 L h<sup>-1</sup>. The drip system had a coefficient of uniformity of >95%. Complete nutrient solutions were applied through the drip irrigation system in each irrigation, consistent with local fertigation practice (Thompson et al., 2017a, 2007; Valera et al., 2016).

The cropped area was divided into 24 experimental plots measuring 6 m by 6 m. In this study, 20 of the plots were used. In each plot, there were three paired lines of drip tape with 12 emitters in each line. The plots were hydraulically separated from one another, by 30 cm deep vertical barriers of polyethylene sheet (250 μm thickness). Individual plants were positioned 6 cm from and adjacent to each emitter. The plant density was two plants m<sup>-2</sup>; there were 72 plants per plot. Plants were transplanted as five-week-old seedlings. Additional information of the layout is provided in (Rodríguez et al., 2020a).



### 5.3.2. Experimental design and treatments

The 20 experimental plots were allocated to five different irrigation/fertigation sectors using a randomized block design. Each sector received a different N treatment. Prior to each crop, the soil was leached, with large irrigation volumes, to homogenize the plots with respect to residual soil  $\text{NO}_3^-$  and salinity.

Throughout each crop, five different N treatments, of increasing N concentration, were applied in each irrigation. The five N treatments were: very N deficient (N1), N deficient (N2), conventional N management (N3), excessive N (N4), and very excessive N (N5), applied in the nutrient solution. The concentrations and amounts of N applied to each treatment in each crop are provided in Table 1. More than 90% of the mineral N was applied as  $\text{NO}_3^-$ , the rest as ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ). Other macronutrients and micronutrients were applied to the nutrient solution in concentrations that were sufficient to ensure they were not deficient. For several days after transplanting (DAT), the transplanted seedlings received only water ( $<0.04 \text{ mmol N L}^{-1}$ ). The different N treatments commenced at 1 DAT, 9 DAT, and 10 DAT in the 2014, 2016, and 2017 crops, respectively.

Irrigation/fertigation was conducted every 1–4 days to maintain the soil matric potential between  $-10$  to  $-30 \text{ kPa}$ . One tensiometer (Irrometer, Co., Riverside, CA, USA) was installed per plot at 12 cm depth where roots were most concentrated. Total irrigation volumes are presented in Table 1. During the crops, additional irrigation as nutrient solution or water was applied, to certain treatments, to reduce the build-up of soil salinity. In the 2014 crop, additional nutrient solution was applied to the N3, N4, and N5 treatments during 80–103 DAT; the total additional volumes were 23 mm, 44 mm, and 45 mm, respectively. In the 2016 crop, additional nutrient solution was applied for 66–71 DAT, 104–111 DAT, and 178–180 DAT for treatments N1 to N5 with total volumes of 62 mm, 79 mm, 84 mm, 115 mm, and 107 mm, respectively. In the 2017 crop, additional irrigation was applied as water to the N3 to N5 treatments (72–110 DAT, 129–143 DAT, and 185–208 DAT); the total extra volumes applied were 31 mm, 39 mm, and 39 mm, respectively.

Crop management followed local commercial practice. The crops were physically supported with nylon cords placed horizontally along the side of the crop, using a local system known as “enfajado”. Excessive greenhouse temperature was prevented by applications of  $\text{CaCO}_3$  suspension to the greenhouse roof. Details of the timing and applied concentrations of  $\text{CaCO}_3$  suspension, and of the resultant transmissivity of photosynthetically active radiation (PAR) are reported in (Rodríguez et al., 2020a).

**Table 1.** Information of the three pepper crops and N treatments. Duration of the crops, total mineral N applied, irrigation amount, the average applied N concentration by nutrient solution, total dry matter production (DMP), and total yield (TY).

Crop year	Date of transplanting	Date end of the crop (Duration)	N treatment <sup>a</sup>	Mineral N applied (kg N ha <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Irrigation amount (mm) <sup>c</sup>	[N] in Nutrient solution (mmol L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	DMP (t ha <sup>-1</sup> )	TY (t ha <sup>-1</sup> )
2014	12 August 2014	29 January 2015 (170 days)	N1	64	190	2.4	5.7	38.7
			N2	189	216	6.2	7.9	52.2
			N3	516	294	12.6	8.6	52.9
			N4	804	357	16.1	9.7	51.1
			N5	990	354	20.0	9.3	46.4
2016	19 July 2016	24 March 2017 (248 days)	N1	88	319	2.0	8.8	67.2
			N2	302	404	5.3	12.6	86.4
			N3	561	414	9.7	15.2	91.5
			N4	1052	557	13.5	14.4	94.2
			N5	1320	532	17.7	13.6	89.7
2017	21 July 2017	20 February 2018 (214 days)	N1	86	304	2.0	5.1	33.3
			N2	304	383	5.7	9.3	54.4
			N3	519	383	9.7	10.5	61.0
			N4	870	475	13.1	12.6	65.1
			N5	1198	513	16.7	12.6	68.9

<sup>a</sup> N1: very N deficient; N2: N deficient; N3: conventional N; N4: excessive N; N5: very excessive N.

<sup>b</sup> For the period of N treatments, which commenced 1, 9 and 10 DAT in the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively.

<sup>c</sup> For the complete cropping cycle.

### 5.3.3. Obtaining and analysis of samples of soil solution and 1:2 soil to water (v/v) extract

#### 5.3.3.1. Soil solution

Soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  was determined in samples collected every 1–2 weeks using ceramic cup suction samplers that were 3.1 cm in diameter and 35 cm long (Model SPS200 3, SDEC, Reignac Sur Indre, France). Sampling was weekly in the 2014 crop and every 2 weeks in the 2016 and 2017 crops. The suction samplers were placed within the drip irrigation bulb where most roots are located, 8 cm to the side of a plant, and 5 cm from the drip line, at 12 cm depth from the surface of the imported soil. One sampler was installed in each plot of each treatment. The locations of the suction samplers were carefully chosen to reduce spatial variability, by avoiding non-representative plants, the edges of plots, localized zones of rainwater infiltration, and shading.

Soil solution was collected after applying vacuum of  $-70$  kPa for 24 h. No irrigation/fertigation was applied during the 24 h period of sample collection, nor during the 24 h before application of vacuum. The  $[\text{NO}_3^-]$  were analyzed using an automatic continuous segmented flow analyzer (model SAN++, Skalar Analytical B.V., Breda, The Netherlands). In the 2014, 2016, and 2017 pepper crops, sampling commenced at 14 DAT, 9 DAT, and 19 DAT, respectively. In these crops, there were nineteen, twenty-six, and sixteen samplings, respectively.

#### 5.3.3.2. The 1:2 soil to water (v/v) extract method

The 1:2 soil to water (v/v) extract (Sonneveld and Van den Ende, 1971; Sonneveld and Voogt, 2009; Thompson et al., 2017b) was obtained from composite soil samples taken every four weeks, in the 2016 and 2017 crops. The composite samples were from the 0–20 cm soil depth of the imported soil. In each replicate plot of each treatment, the composite soil sample was obtained by mixing four 0–20 cm depth soil samples of equal volume; two samples were taken at both 8 cm and 20 cm adjacent to the plant. As with the location of suction samplers, care was taken to choose locations for soil sampling that minimized spatial variability. Immediately after sampling, the soil samples were mixed, and a 100 mL sub-sample of the composite soil sample was placed in a sealed plastic bag and refrigerated at  $5^\circ\text{C}$ .

Within 24 h of sampling, the refrigerated sub-samples were extracted, following the method of (Sonneveld et al., 1990). Forty mL of soil was placed in a transparent container filled with 80 mL of demineralized water; field-moist soil was added until the total volume increased to 120 mL to obtain the 1:2 (v/v) soil to water combination. The mixture of soil and water was gently mixed in an agitator for 20 min at 48 rpm. The suspension obtained

was allowed to sediment for 24 h while refrigerated at 5°C, after which the supernatant was filtered. The [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] of the filtered supernatant was analyzed using the automatic continuous segmented flow analyzer described in section 5.3.3.1.

In the 2016 and 2017 pepper crops, the sampling commenced at 21 DAT in both crops. There were eight and seven samplings in the 2016 and 2017 crops, respectively.

#### 5.3.4. Determination of crop Nitrogen Nutrition Index (NNI)

Crop N status was determined as:

$$NNI = \frac{N_{act}}{N_c}, \quad (1)$$

where  $N_{act}$  is the measured N content of all shoot dry matter (Lemaire and Gastal, 1997).  $N_{act}$  values for the dates of soil solution and soil sampling were obtained by interpolating from measured crop N content values that were determined in biomass samplings conducted approximately every 21 days, for each N treatment in each crop (Rodríguez et al., 2020a).  $N_c$  is the critical N content, for each sampling date, calculated using the critical N curve (CNC):  $\%N_c = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  ( $DMP$  is dry matter production) for greenhouse-grown sweet pepper determined by (Rodríguez et al., 2020a). The  $DMP$  values for each sampling date, that were required to calculate the corresponding  $\%N_c$  values, were interpolated from measured  $DMP$  from the regular biomass samplings.

To determine the amount of dry matter at transplanting, 100 seedlings were sampled. Subsequent biomass sampling, conducted approximately every 21 days, involved sampling one representative plant of each replicate plot, and dividing the plant into leaf, stem, and fruit. The dry matter content, of each component, was determined by oven-drying all material at 65°C until constant dry weight. In each crop, eight plants were marked in each replicate plot; these were used to determine fruit production and the amount of pruned material. Total  $DMP$ , at each biomass sampling, was calculated as the sum of dry matter of leaf, stem, and fruit on that sampling date, plus that of all previously sampled pruned material and harvested fruit.

To determine the total crop N content ( $N_{act}$  as %N), representative sub-samples of leaves, stems, fruit, pruned material, and harvested fruit from each replicate plot were sequentially ground using knife and ball mills. The N content of each component was determined using a Dumas-type elemental analyzer system (Model Rapid N, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). Total crop N content was calculated, for each replicate plot, as total crop N uptake divided by total  $DMP$ . Total crop N uptake (kg N ha<sup>-1</sup>) in each replicate plot, at each biomass sampling, was the sum of N in all relevant components

(leaf, stem, and fruit), including previously pruned material and harvested fruit, as was done for the calculation of total DMP.

### 5.3.5. Data analysis

The relationships between soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  and NNI were analyzed using data from individual entire crops, pooled entire crop data from the three crops, and pooled data for each phenological stage of the three crops. The relationships between  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 soil to water (v/v) extract and NNI were analyzed using data from individual entire crops, pooled entire crop data from the 2016 and 2017 crops, and pooled data for each phenological stage of the two crops. Three different phenological stages were considered, being (i) vegetative; (ii) flowering and early fruit growth; and (iii) harvest. For the three pepper crops, the vegetative stage was from 0 to 41 DAT. The flowering and early fruit growth stage included fruit set and development, from 42 to 97 DAT, 100 DAT, and 109 DAT in 2014, 2016, and 2017 crops, respectively. The harvest stage was from 98 to 170 DAT in 2014, from 101 to 248 DAT in 2016, and from 110 to 214 DAT in 2017.

Segmented linear regression analysis was used to analyze the relationships between NNI and soil solution or extract  $[\text{NO}_3^-]$ . The segmented linear regressions consisted of an inclined and a horizontal segment. The inclined segment was described by  $y = ax + b$  (if  $x < x_0$ ) and the horizontal segment by  $y = c$  (if  $x \geq x_0$ ), where  $y$  is NNI value,  $x$  is the  $[\text{NO}_3^-]$  in the soil solution or 1:2 soil to water (v/v) extract,  $a$  is the slope,  $b$  is the intercept of the inclined segment, and  $x_0$  is the  $[\text{NO}_3^-]$  where the two segments intersect. The  $x_0$  value is the  $[\text{NO}_3^-]$  in the soil solution or 1:2 soil to water (v/v) extract value that provides  $c$ , the maximum NNI value. Once the maximum NNI value is obtained, the response is constant. The segmented linear regression analysis was conducted using RStudio2 software (RStudio Inc., Boston, MA, USA).

To assess the spatial variability of the  $[\text{NO}_3^-]$  determined in soil solution and the 1:2 soil to water (v/v) extract, the coefficient of variation (CV) of these measurements was calculated. The CV was determined as:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100, \quad (2)$$

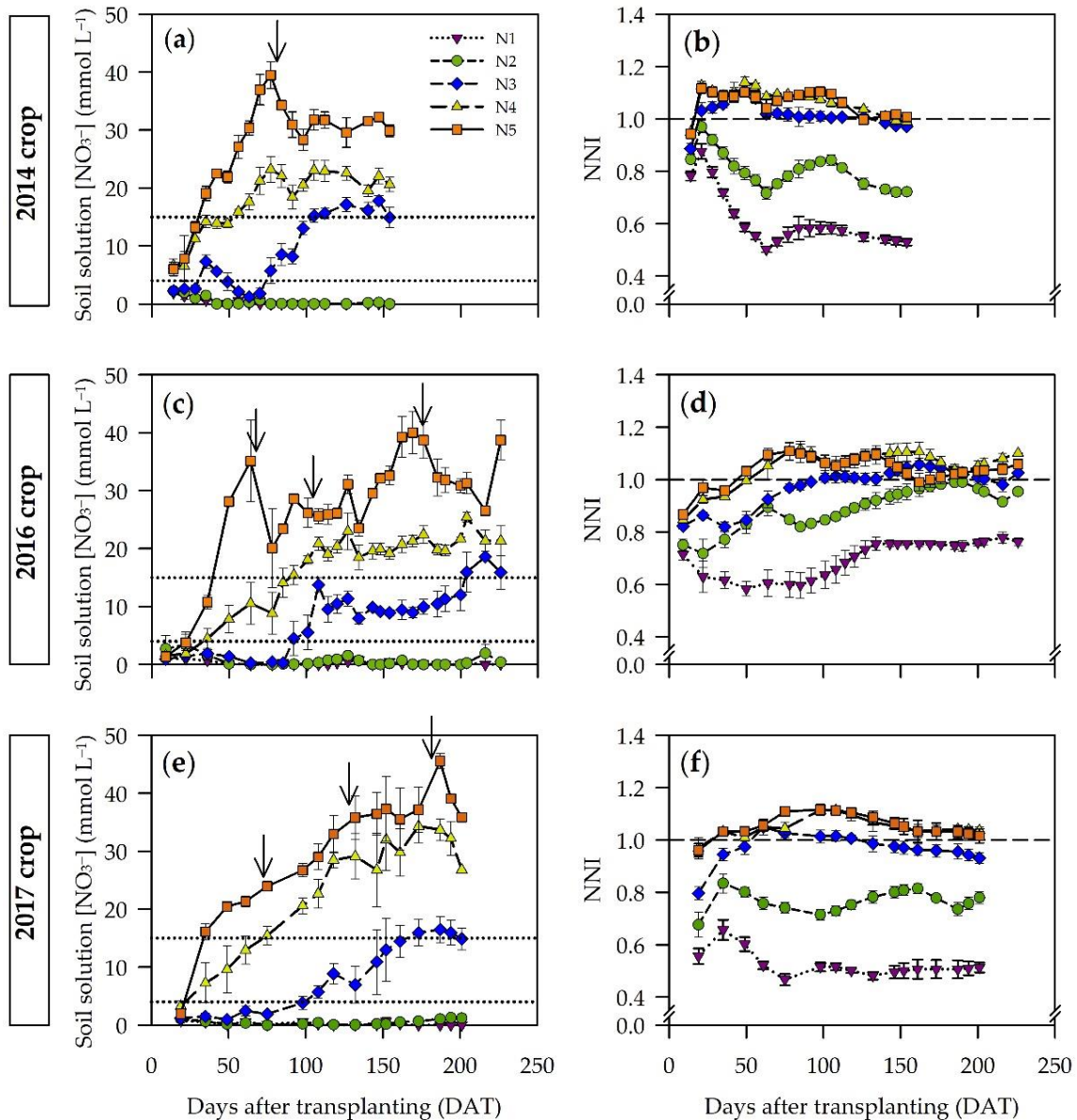
where  $\sigma$  is the standard deviation and  $\bar{x}$  is the average from the replicates ( $n=4$ ) of each treatment calculated for each sampling date. Average CV values were calculated for each crop for each soil  $\text{NO}_3^-$  monitoring method.

## **5.4. Results**

### *5.4.1. Soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]*

#### 5.4.1.1. Responses of soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] to N treatments

The response of soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] to the different N treatments was similar in each of the three pepper crops (Figure 1 a, c, e). Immediately after transplanting, soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] was similarly low (<5 mmol L<sup>-1</sup>) in all of the different N treatments (Figure 1 a, c, e). After 30 DAT, when the crops had received the N treatments for approximately 20 days, soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] in the N1 and N2 treatments remained low with values of 0.0–2.2 mmol L<sup>-1</sup> until the end of the crops. In contrast, after 30 DAT, soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] progressively increased in treatments N3, N4, and N5, with the degree of increase being related to the applied [N].



**Figure 1.** Evolution of the soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  and nitrogen nutrition index (NNI) values as a function of time (days after transplanting (DAT)) during the 2014 (a, b), 2016 (c, d), and 2017 (e, f) pepper crops, each with five N treatments. Values are means ( $n=4$ )  $\pm$  standard error (SE). The horizontal dotted lines (Figure a, c, e) represent the sufficiency values of 5.0 mmol  $\text{L}^{-1}$  and 15.0 mmol  $\text{L}^{-1}$  determined in this work. Arrows (Figure a, c, e) indicate the date of the commencement of the additional irrigation or fertigation during 80–103 DAT (N3, N4, and N5) in the 2014 crop, during 66–71 DAT, 104–111 DAT, and 178–180 DAT (N1 to N5) in the 2016 crop, and during 72–110 DAT, 129–143 DAT, and 185–208 DAT (N3 to N5) in the 2017 crop. The horizontal long dashed lines (Figure b, d, f) represent NNI=1.0. The NNI figures (b, d, f) were modified from (de Souza et al., 2019). The use of chlorophyll meters to assess crop N status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. Sensors 19: 2949, published by MDPI and distributed as open access under the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

In treatment N3, soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  increased slowly and progressively, generally reaching approximately 15 mmol  $\text{L}^{-1}$  by the end of the crops (Figure 1 a, c, e). In treatments

N4 and N5, soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  increased rapidly, with some fluctuations during crop growth (Figure 1 a, c, e), reaching maximum values of 34–46  $\text{mmol L}^{-1}$  (Figure 1 a, c, e). The relative differences in soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  between treatments N3–5, of  $\text{N3} < \text{N4} < \text{N5}$ , were consistently maintained throughout the three crops.

#### 5.4.1.2. Response of NNI to N treatments

The response of NNI to the different N treatments was similar during each of the three pepper crops (Figure 1 b, d, f). There were consistent and clear differences between N1, N2, and N3 treatments, with  $\text{N1} < \text{N2} < \text{N3}$  (Figure 1 b, d, f). The ranges of NNI values for these treatments were 0.47–0.88, 0.68–0.99, and 0.80–1.11 for the N1, N2, and N3 treatments, respectively. The N3 treatment had NNI values that were consistently close to 1.0 during the three crops (Figure 1 b, d, f). The N4 and N5 treatments had very similar values to each other throughout the crop with NNI values of 0.85–1.14, which were consistently slightly higher than the NNI values of the N3 treatment (Figure 1 b, d, f). Generally, the NNI values from treatments N4 and N5 were slightly and consistently higher than 1.0.

The evolution of the NNI values during the crops indicated that the crops grown in the N1 and N2 treatment were, respectively, consistently very N deficient and slightly N deficient, given their consistent relative differences in relation to NNI of 1.0 (Figure 1 b, d, f). The N3 treatment was generally N sufficient, with NNI values that were consistently very close to 1.0. The N4 and N5 treatments were very similar in that for both treatments there was continuously slight luxury N uptake, indicated by NNI values that were consistently slightly  $>1.0$ .

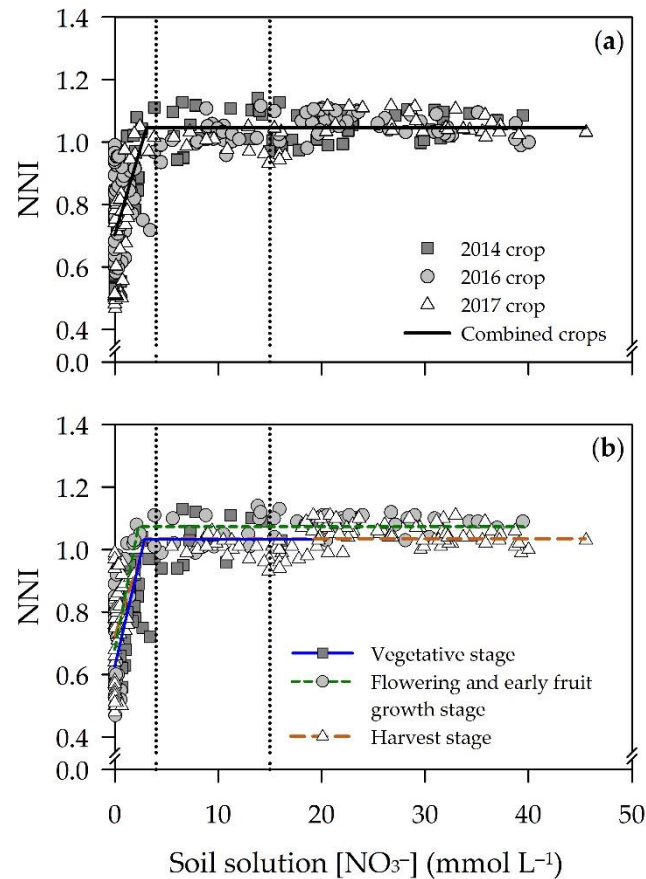
#### 5.4.1.3. Relationship between NNI and soil solution $[\text{NO}_3^-]$

The relationships between NNI and soil solution  $[\text{NO}_3^-]$ , for the entire crop were described by segmented linear regression analysis, using data for the combined set of data from the three crops (Figure 2 a; Table 2). There were similar strong relationships using segmented linear regression analysis for each phenological stage (Figure 2 b; Table 2). In all of these segmented linear regression analyses, NNI increased rapidly to values of approximately 1.05 as soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  increased from 0.0 to 3.1  $\text{mmol L}^{-1}$  (Figure 2 a, b). Thereafter, as soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  further increased to values as high as 45.6  $\text{mmol L}^{-1}$ , NNI remained constant at  $\text{NNI}=1.05$  (Figure 2 a).

The relationship for the combined entire crop data of the three crops was described by  $y = 0.1116x + 0.7029$  (if  $x < x_0$ ) and  $y = 1.05$  (if  $x \geq x_0$ ), with an  $R^2$  of 0.70 (Figure 2 a; Table 2). The segmented linear regression analyses for the 2014, 2016, and 2017 crops had  $R^2$  values of 0.81, 0.66, and 0.81, respectively (Table 2). The  $R^2$  values for the vegetative,



flowering and early fruit growth, and harvest stages, for the three crops considered together, were 0.72, 0.76, and 0.68, respectively (Table 2). These results showed that the strong relationship between NNI and soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  was consistent for each of the three crops, and was maintained throughout the three crops.



**Figure 2.** Relationships of NNI values with soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  for (a) the entire 2014, 2016, and 2017 pepper crops considered together, and (b) the vegetative, flowering and early fruit growth, and harvest phenological stages using combined data from the three pepper crops. The vertical dotted lines represent the sufficiency values of 5.0  $\text{mmol L}^{-1}$  and 15.0  $\text{mmol L}^{-1}$  determined in this work. The segmented linear regression was represented by an inclined segment defined by  $y = ax + b$  (if  $x < x_0$ ) and the horizontal segment by  $y = c$  (if  $x \geq x_0$ ), where  $y$  is NNI value,  $x$  is soil solution  $[\text{NO}_3^-]$ ,  $a$  is the slope,  $b$  is the intercept of the inclined segment and  $x_0$  is the intersection of the two segments. The  $x_0$  is the soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  required to reach the maximum NNI value. After reaching the maximum NNI value, the response is constant. The equations of the segmented regression are presented in Table 2.

**Table 2.** Inclined linear equation of segmented linear regression relating NNI values to soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (mmol L<sup>-1</sup>) for each and combined dataset of the three pepper crops and for combined dataset of the three pepper crops for each phenological stage. Equation, x<sub>0</sub> value, maximum NNI value reached, coefficients of determination (R<sup>2</sup>), standard error (±SE) and the number of data points (n) are shown.

Data	Segmented equation	x <sub>0</sub> value [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (mmol L <sup>-1</sup> )	Maximum NNI value	R <sup>2</sup>	SE	n
<i>Pepper crop</i>						
2014	$y = 0.1408x + 0.6602$	2.8	1.05	0.81	0.09	93
2016	$y = 0.0302x + 0.7999$	8.4	1.05	0.66	0.10	130
2017	$y = 0.1915x + 0.5868$	2.3	1.03	0.81	0.09	80
Combined crops	$y = 0.1116x + 0.7029$	3.1	1.05	0.70	0.10	303
<i>Phenological stage</i>						
Vegetative	$y = 0.1412x + 0.6264$	2.9	1.04	0.72	0.10	45
Flowering and early fruit growth	$y = 0.1723x + 0.6804$	2.3	1.08	0.76	0.09	95
Harvest	$y = 0.1034x + 0.7229$	3.0	1.03	0.68	0.09	163

#### 5.4.1.4. Sufficiency values of soil solution $[\text{NO}_3^-]$ for optimal N nutrition

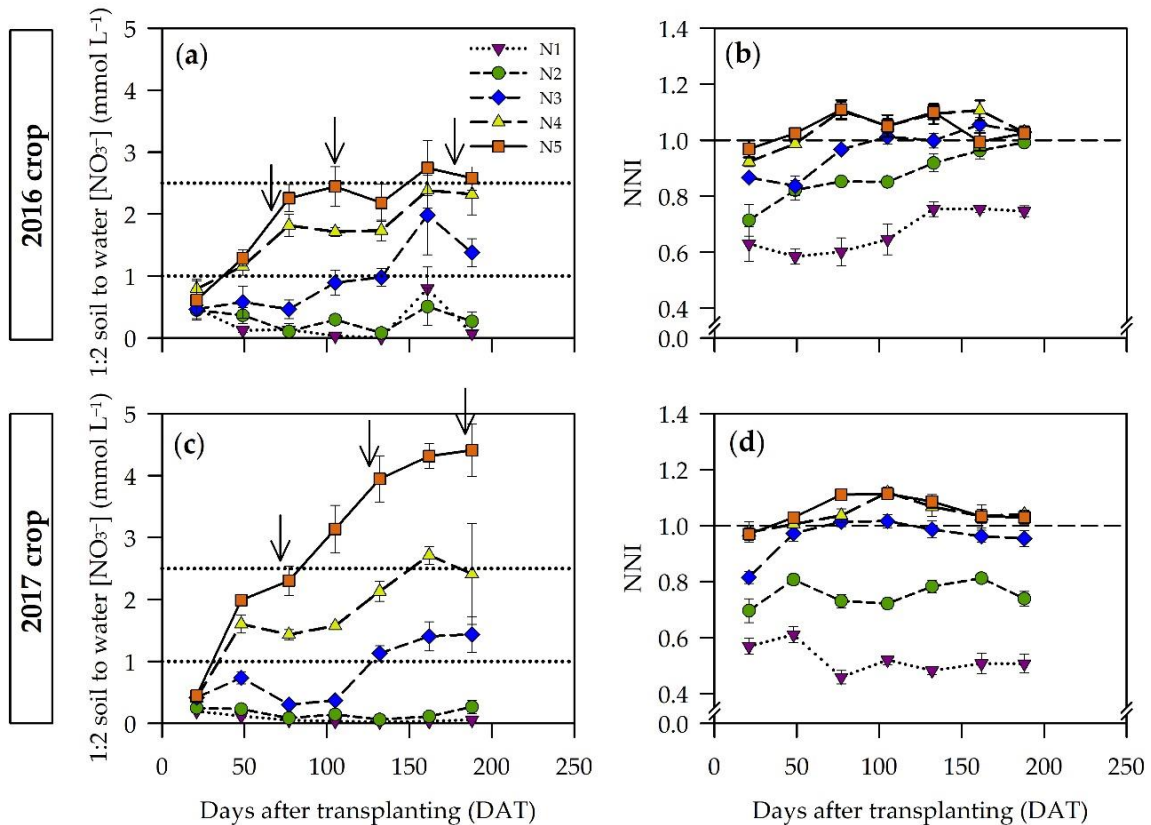
The  $x_0$  values represented the minimum soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  to obtain NNI values very close to 1.0 (Table 2), which corresponded to the minimum supply of N that ensured maximum crop DMP. For the combined entire crop data set, for two of the three entire individual crops, and for each of the three phenological stages,  $x_0$  was  $\leq 3.1 \text{ mmol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  (Table 2). Above this soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  value, NNI remained constant indicating that crop N status did not change with increasing soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  (Figure 2 a, b). These data suggest that soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  values somewhat larger than  $3.1 \text{ mmol L}^{-1}$  will ensure maximum DMP, i.e., a minimum sufficiency value, and that an appreciably larger soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  value can be used as a maximum sufficiency value.

It is proposed that  $5.0 \text{ mmol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  be a minimum recommended value for soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  for greenhouse-grown sweet pepper in SE Spain. This value will ensure both DMP production and a margin of comfort to avoid N deficiency. The data of the N3 treatments in the three crops provide a framework for determining a maximum recommended value. Throughout much of the crops, the NNI values of N3 treatments were very close to 1.0 (Figure 1 b, d, f), when soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  was  $< 15.0 \text{ mmol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  (Figure 1 a, c, e). Therefore, a maximum recommended value of  $15.0 \text{ mmol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  is proposed. The proposed sufficiency range of  $5.0\text{--}15.0 \text{ mmol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$  provides a range of soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  that ensures growth is not limiting (Figure 2 a, b; Table 2). Additionally, this range can be maintained in farming practice. Above this range (i.e.,  $> 15.0 \text{ mmol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ ), the immediately available soil N supply is excessive and wasteful.

#### *5.4.2. $[\text{NO}_3^-]$ in the 1:2 soil to water (v/v) extract*

##### 5.4.2.1. Response of $[\text{NO}_3^-]$ in the 1:2 soil to water (v/v) extract to N treatments

The  $[\text{NO}_3^-]$  values in the 1:2 soil to water (v/v) extract were generally similar in each of the 2016 and 2017 pepper crops for the different N treatments (Figure 3 a, c). At approximately 20 DAT, all N treatments had similar values of  $< 1.0 \text{ mmol NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ . Thereafter, there were clear differences between the N2, N3, N4, and N5 treatments in both crops (Figure 3 a, c). In the N1 and N2 treatments, in both crops, the extract  $[\text{NO}_3^-]$  was constantly  $0.0\text{--}0.8 \text{ mmol L}^{-1}$ . Extract  $[\text{NO}_3^-]$  for the N3 treatment increased slowly and consistently during the crops, reaching values of  $0.3\text{--}2.0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Extract  $[\text{NO}_3^-]$  in the N4 and N5 treatments increased more rapidly over time, reaching maximum values of  $2.7\text{--}4.4 \text{ mmol L}^{-1}$ . The relative differences in extract  $[\text{NO}_3^-]$  of  $\text{N3} < \text{N4} < \text{N5}$  were maintained consistently throughout the two crops (Figure 3 a, c).



**Figure 3.** Evolution of the  $[NO_3^-]$  in the 1:2 soil to water (v/v) extract and NNI values as a function of time (days after transplanting (DAT)) during 2016 (a, b) and 2017 (c, d) pepper crops, each with five N treatments. Values are means ( $n=4$ )  $\pm$  standard error (SE). The horizontal dotted lines (Figure a, c) represent the sufficiency values of 1.0 mmol L<sup>-1</sup> and 2.5 mmol L<sup>-1</sup> determined in this work. Arrows (Figure a, c) indicate the date of the commencement of the additional irrigation or fertigation during 66–71 DAT, 104–111 DAT, and 178–180 DAT (N1 to N5) in the 2016 crop, and during 72–110 DAT, 129–143 DAT, and 185–208 DAT (N3 to N5) in the 2017 crop. The horizontal long dashed lines (Figure b, d) represent NNI=1.0. The NNI figures (b, d) were modified from (de Souza et al., 2019). The use of chlorophyll meters to assess crop N status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. Sensors 19: 2949, published by MDPI and distributed as open access under the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

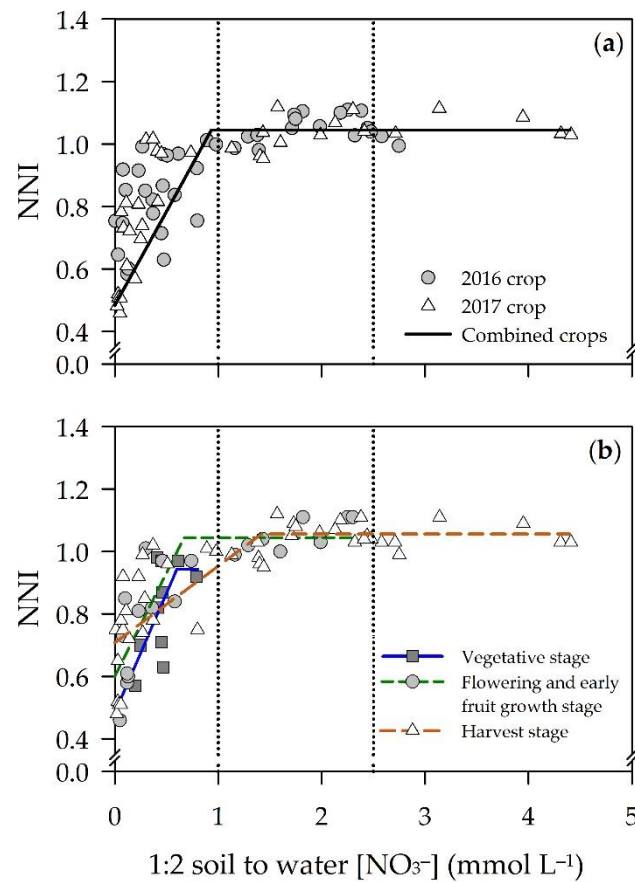
#### 5.4.2.2. Response of NNI to N treatments

The responses of NNI to the N treatments for the 2016 and 2017 crops are described in section 5.4.1.2.

#### 5.4.2.3. Relationship between NNI and $[NO_3^-]$ of the 1:2 soil to water (v/v) extract

There were strong relationship between NNI and  $[NO_3^-]$  of the 1:2 soil to water (v/v) extract, described by segmented linear regression equations for the two crops, considered together and separately, and for each phenological stage (Figure 4 a, b; Table 3). The segmented linear regression, for the combined entire crop data set, was described by  $y = 0.4132x + 0.6588$  (if  $x < x_0$ ) and  $y = 1.04$  (if  $x \geq x_0$ ), with a value of  $R^2$  of 0.68 (Figure 4 a; Table 3). For the 2016 and 2017 crops considered separately, the corresponding  $R^2$  values

were 0.64 and 0.83, respectively (Table 3). NNI values increased rapidly to 1.04 as  $[\text{NO}_3^-]$  of the 1:2 soil to water ( $v/v$ ) extract increased from 0 to 0.93  $\text{mmol L}^{-1}$  (Figure 4 a; Table 3). With increasing extract  $[\text{NO}_3^-]$  from 0.93  $\text{mmol L}^{-1}$  to 4.4  $\text{mmol L}^{-1}$ , NNI remained constant at 1.04 (Figure 4 a). The results for the segmented linear regression for the combined vegetative, flowering, and early fruit growth, and harvest phenological stages were generally very similar in terms of  $x_0$ ,  $c$  and  $R^2$  values (Figure 4 b; Table 3).



**Figure 4.** Relationships of NNI values with the  $[\text{NO}_3^-]$  of the 1:2 soil to water ( $v/v$ ) extract for (a) the entire 2016 and 2017 pepper crops considered together, and (b) the vegetative, flowering and early fruit growth and harvest stage using combined data from the two pepper crops. The vertical dotted lines represent the sufficiency values of 1.0  $\text{mmol L}^{-1}$  and 2.5  $\text{mmol L}^{-1}$  determined in this work. The segmented linear regression was represented by an inclined segment defined by  $y = ax + b$  (if  $x < x_0$ ) and the horizontal segment by  $y = c$  (if  $x \geq x_0$ ), where  $y$  is NNI value,  $x$  is the  $[\text{NO}_3^-]$  of the 1:2 soil to water ( $v/v$ ) extract,  $a$  is the slope,  $b$  is the intercept of the inclined segment and  $x_0$  is the intersection of the two segments. The  $x_0$  is the  $[\text{NO}_3^-]$  of the 1:2 soil to water ( $v/v$ ) extract required to reach  $c$ , the maximum NNI value. After reaching the maximum NNI value, the response is constant. The equations of the segmented regression are presented in Table 3.

**Table 3.** Inclined linear equation of segmented linear regression relating NNI values to 1:2 soil to water (v/v) [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (mmol L<sup>-1</sup>) extract method for each and combined dataset of the two pepper crops and for combined dataset of the two pepper crops for each phenological stage. Equation,  $x_0$  value, maximum NNI value reached, coefficients of determination (R<sup>2</sup>), standard error (±SE), and the number of data points ( $n$ ) are shown.

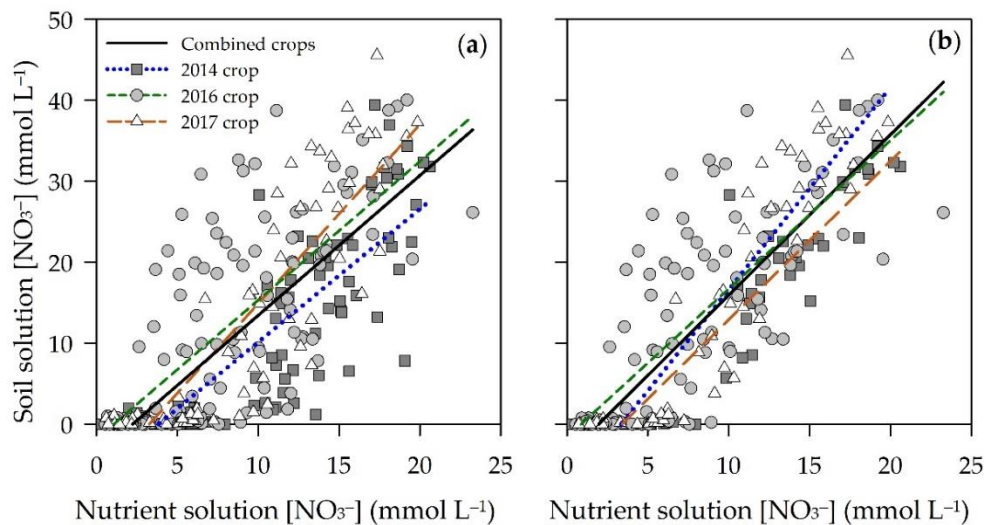
Data	Segmented equation	$x_0$ value [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (mmol L <sup>-1</sup> )	Maximum NNI value	R <sup>2</sup>	SE	$n$
<i>Pepper crop</i>						
2016	$y = 0.2056x + 0.7471$	1.55	1.07	0.64	0.09	40
2017	$y = 1.0310x + 0.5278$	0.49	1.03	0.83	0.09	35
Combined crops	$y = 0.4132x + 0.6588$	0.93	1.04	0.68	0.10	75
<i>Phenological stage</i>						
Vegetative	$y = 0.7659x + 0.4835$	0.60	0.94	0.42	0.12	10
Flowering and early fruit growth	$y = 0.6619x + 0.6005$	0.67	1.04	0.74	0.10	20
Harvest	$y = 0.2452x + 0.7079$	1.42	1.06	0.68	0.10	45

#### 5.4.2.4. Sufficiency values of $[\text{NO}_3^-]$ of the 1:2 soil to water (v/v) extract for optimal N nutrition

Using the same approach, as used in section 5.4.1.4, the proposed sufficiency range for  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 soil to water (v/v) extract, for greenhouse-grown pepper is 1.0–2.5  $\text{mmol L}^{-1}$ .

#### 5.4.3. Relationship between soil solution $[\text{NO}_3^-]$ and applied nutrient solution $[\text{NO}_3^-]$

Soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  was linearly related to the applied nutrient solution  $[\text{NO}_3^-]$  (Figure 5 a, b). These relationships were determined for combined data sets of the three crops and for the three crops considered individually, for (1) the entire crop, from transplanting to final harvest (Figure 5 a), and (2) from 70 DAT (Figure 5 b) onwards when the effects were more stable (Figure 1 a, c, e). For the combined data set of the three entire crops, the relationship was described by  $y = 1.7146x - 3.6156$  with an  $R^2$  value of 0.62. For the 2014, 2016, and 2017 entire crops, the  $R^2$  values were 0.71, 0.56, and 0.77, respectively (Table 4). For the three entire crops considered together or individually, the slope, intercept and  $R^2$  values were generally similar (Figure 5 a; Table 4).



**Figure 5.** Linear relationship between soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  and the applied nutrient solution  $[\text{NO}_3^-]$  during (a) the entire crop, considering the entire crops and the (b) crops after 70 days after transplanting (DAT). The linear regression of all dataset combining the three pepper crops of the soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  is presented as a black solid line, the linear regression for 2014 (dotted line), 2016 (short dash) and 2017 (long dash) crops is shown. The equations of the linear regressions are presented in Table 4.

**Table 4.** Linear relationship relating soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] and to the applied nutrient solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] for sweet pepper crops, considering the entire crops and crops after 70 days after transplanting (DAT). The equation, coefficients of determination (R<sup>2</sup>), standard error (±SE), and the number of data points (*n*) are presented.

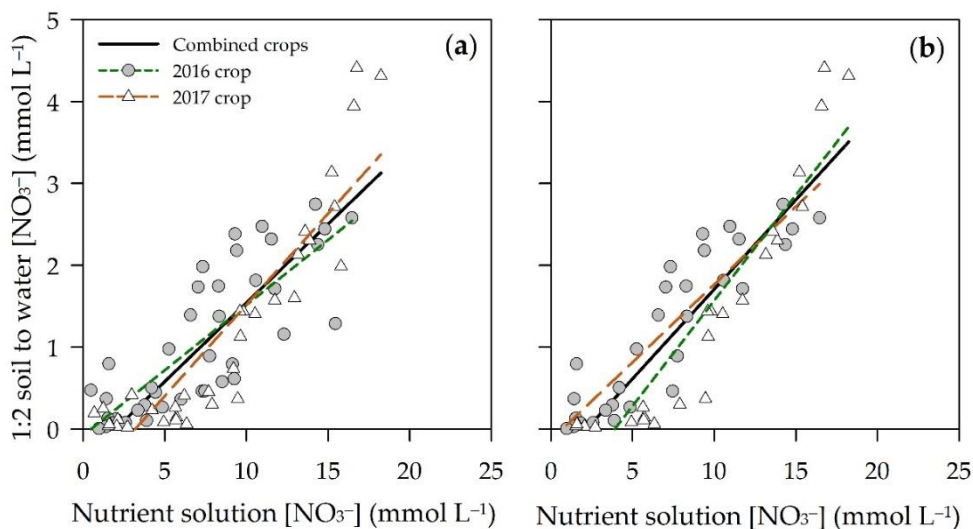
Crop year	Entire crop	R <sup>2</sup>	±SE	<i>n</i>	Crop after 70 DAT	R <sup>2</sup>	±SE	<i>n</i>
2014	$y = 1.6565x - 6.3849$	0.71	6.2	93	$y = 1.9555x - 6.6405$	0.86	4.8	48
2016	$y = 1.6959x - 1.5405$	0.56	8.0	130	$y = 1.8308x - 1.5868$	0.61	7.6	110
2017	$y = 2.2113x - 7.2355$	0.77	6.8	80	$y = 2.4963x - 8.3451$	0.85	5.7	60
Combined crops	$y = 1.7146x - 3.6156$	0.62	7.6	303	$y = 1.9800x - 3.8567$	0.72	6.9	218



For the first 70 DAT, it appeared that the leaching of residual mineral N prior to each crop influenced the relationship between applied  $[\text{NO}_3^-]$  and soil solution  $[\text{NO}_3^-]$ . Compared to the entire crop relationships (Figure 5 a; Table 4), for the equivalent data after 70 DAT ( $n=218$ ) there was an appreciable difference in the slope of the linear relationship between soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  and nutrient solution  $[\text{NO}_3^-]$  and in the  $R^2$  values (Figure 4 b; Table 4). For the period after 70 DAT, the slope values increased by approximately 0.3 and the  $R^2$  values by 0.05–0.15 (Table 4). After 70 DAT, the soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  was approximately twice that applied in the nutrient solution.

#### 5.4.4. Relationship between $[\text{NO}_3^-]$ of the 1:2 soil to water (v/v) extract and the applied nutrient solution $[\text{NO}_3^-]$

The  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 soil to water (v/v) extract was linearly related to the applied nutrient solution  $[\text{NO}_3^-]$  (Figure 6 a, b). The relationship was determined for data sets of the 2016 and 2017 crops, together and separately, for the entire crop (Figure 6 a) and for the crop after 70 DAT (Figure 6 b), as was done in section 5.4.3.



**Figure 6.** Linear relationship between 1:2 soil to water (v/v) extract method  $[\text{NO}_3^-]$  and the applied nutrient solution  $[\text{NO}_3^-]$  during (a) the entire crop, considering the entire crops and the (b) crops after 70 days after transplanting (DAT). The linear regression of all dataset combining the two pepper crops of the 1:2 soil to water (v/v) extract method  $[\text{NO}_3^-]$  is presented as a black solid line, the linear regression for 2016 (short dash) and 2017 (long dash) crops is shown. The equations of the linear regressions are presented in Table 5.

Using the combined data from the two entire pepper crops, the relationship was  $y = 0.1923x - 0.3819$ , with an  $R^2$  value of 0.74 (Figure 6 a; Table 5). For each of the entire 2016 and 2017 crops, the linear relationship had  $R^2$  values of 0.66 and 0.82, respectively (Figure 6 a; Table 5). For the two entire crops considered individually, the slope and intercept values were generally similar.

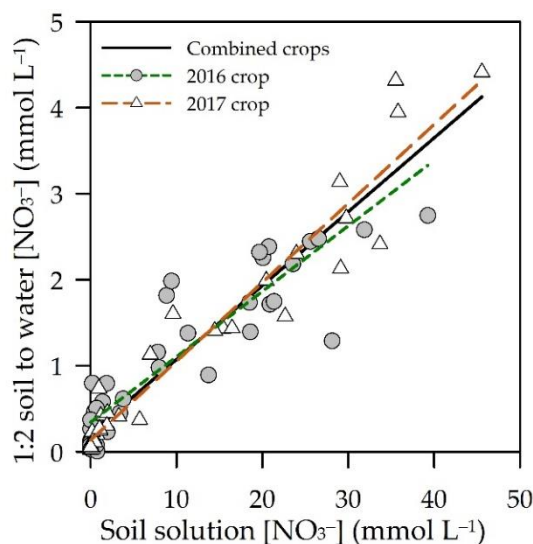
After 70 DAT, the relationship between extract  $[\text{NO}_3^-]$  and applied  $[\text{NO}_3^-]$  was described by  $y = 0.2185x - 0.4792$ , with an improved  $R^2$  value of 0.82. Compared to linear regressions for the entire crop, the slope values increased by approximately  $0.03 \text{ mmol L}^{-1}$  and the  $R^2$  values by 0.05–0.16 (Table 5). After 70 DAT, the  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 extract was approximately 0.22 of that applied in the nutrient solution.

**Table 5.** Linear relationship relating 1:2 soil to water (v/v) extract method [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] to the applied nutrient solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] for sweet pepper crops, considering the entire crops and crops after 70 days after transplanting (DAT). The equation, coefficients of determination (R<sup>2</sup>), standard error (±SE), and the number of data points (*n*) are presented.

Crop year	Entire crop	R <sup>2</sup>	±SE	<i>n</i>	Crop after 70 DAT	R <sup>2</sup>	±SE	<i>n</i>
2016	$y = 0.1591x - 0.0773$	0.66	0.5	40	$y = 0.1899x - 0.1338$	0.82	0.4	30
2017	$y = 0.2226x - 0.7094$	0.82	0.6	35	$y = 0.2576x - 1.0090$	0.87	0.5	25
Combined crops	$y = 0.1923x - 0.3819$	0.74	0.6	75	$y = 0.2185x - 0.4792$	0.82	0.5	55

5.4.5. Relationship between soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  and  $[\text{NO}_3^-]$  of the 1:2 soil to water (v/v) extract

Combining data from the entire 2016 and 2017 crops, a single linear relationship  $y = 0.0824x + 0.2408$  was derived relating the soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  and the  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 soil to water (v/v) extract, with an  $R^2$  value of 0.89 (Figure 7; Table 6).



**Figure 7.** Linear relationship between 1:2 soil to water (v/v) extract method  $[\text{NO}_3^-]$  and soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  during the cropping cycle. The linear regression for combining the 2016 and 2017 pepper crops is presented as a black solid line, the linear regression for 2016 (short dash) and 2017 (long dash) crops is shown. The equations of the linear regressions are presented in Table 6.

**Table 6.** Linear regressions analysis relating 1:2 soil to water (v/v) extract method  $[\text{NO}_3^-]$  and soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  for 2016 and 2017 pepper crops and combined all dataset of the two pepper crops. The equation, coefficients of determination ( $R^2$ ), standard error ( $\pm\text{SE}$ ), and the number of data points ( $n$ ) are presented.

Crop year	Entire crop	$R^2$	$\pm\text{SE}$	$n$
2016	$y = 0.0705x + 0.3621$	0.84	0.4	40
2017	$y = 0.0917x + 0.1337$	0.93	0.3	35
Combined crops	$y = 0.0824x + 0.2408$	0.89	0.4	75

The linear relationship between the soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  and the  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 soil to water (v/v) extract derived for each of the 2016 and 2017 crops was similar in terms of slope and intercept (Table 6). In the 2016 and 2017 crops, the  $R^2$  values were 0.84 and 0.93, respectively, indicating strong relationships. These data suggest that the  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 soil to water (v/v) extract was approximately 0.08 that in the soil solution.

#### 5.4.6. Variability of the measurements of the soil solution $[NO_3^-]$ and $[NO_3^-]$ of the 1:2 soil to water (v/v) extract

The average coefficient of variation (CV) values determined for both  $[NO_3^-]$  extraction methods, for the individual crops were similar (Table 7). The average CV values calculated for soil solution  $[NO_3^-]$  were 11.4, 13.7, and 18.0% for 2014, 2016, and 2017 crops, respectively. For the  $[NO_3^-]$  of the 1:2 soil to water (v/v) extract, the average CVs were 17.0 and 11.0% for 2016 and 2017 crops, respectively. For both extraction methods, it is considered that the calculated CVs were relatively low.

**Table 7.** Coefficient of variation (CV) of the measurements of  $[NO_3^-]$  extract method of soil solution and 1:2 soil to water (v/v) for each pepper crop.

[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] Extract method	Coefficient of variation (CV)	
	Average (%)	Range (%)
<i>Soil solution</i>		
2014 crop	11.4	1.6–49.3
2016 crop	13.7	0.2–65.2
2017 crop	18.0	0.1–51.4
<i>1:2 soil to water (v/v)</i>		
2016 crop	17.0	2.7–49.1
2017 crop	11.0	2.1–33.7

## 5.5. Discussion

### 5.5.1. Relationships of $[NO_3^-]$ in soil solution and 1:2 soil to water (v/v) extract, to N supply and NNI

When assessing the response of the  $[NO_3^-]$  of the two soil N monitoring approaches in the present study, the leaching of soil  $NO_3^-$  prior to each crop must be considered, because all values for all N treatments were initially close to zero. Thereafter, the general responses of the two approaches, to different [N] applied throughout the crop, were similar. With both approaches,  $[NO_3^-]$  of the deficient treatments (N1 and N2) remained close to zero throughout the crops. With the conventional treatment (N3) and the two increasingly excessive treatments (N4 and N5), there were consistent tendencies, with both approaches, to increase during the crops; the degree of increase was positively related to the applied [N]. For the excessive treatments (N4 and N5), the increases occurred immediately. For the conventional treatments (N3), the increase was delayed until approximately 70–100 DAT. There were some fluctuations in the increasing tendencies of soil solution and extract  $[NO_3^-]$  in treatments N3–5 during the crop, because of the additional irrigations applied to reduce salinity during the crop.

In treatments N1 and N2, the very low soil solution and extract  $[\text{NO}_3^-]$  indicated that the crops absorbed all N applied throughout the crops, which was consistent with the deficient crop N status indicated by the corresponding NNI values. In treatment N3, the initial lack of soil  $\text{NO}_3^-$  accumulation until approximately 70–100 DAT, and subsequent on-going increase, were consistent with the NNI data. The NNI data of treatment 3 indicated a N deficiency until 30–90 DAT; subsequent NNI values were close to 1.0, indicating adequate crop N status. Treatments N4 and N5 accumulated soil  $\text{NO}_3^-$  throughout, which was consistent with the corresponding NNI data that indicated consistent slight luxury N uptake.

The general tendencies in soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  observed throughout the crops, in the present study, of no increase with deficient N supply, a slight increase with a sufficient N supply, and a rapid increase with excess N supply, are consistent with other studies in this system (Gallardo et al., 2006; Granados et al., 2013; Peña-Fleitas et al., 2015). In these studies, as in the current study, irrigation was well-managed using decision support systems and/or tensiometers, and there was generally little drainage.

Segmented linear analysis effectively described the nature of the relationship between  $[\text{NO}_3^-]$  and NNI, for both soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  and extract  $[\text{NO}_3^-]$ . Using combined data from the three entire pepper crops, soil solution  $[\text{NO}_3^-]$ , and NNI were positively related until 3.1  $\text{mmol L}^{-1}$  at  $\text{NNI}=1.0$ ; thereafter, NNI was close to 1.0 (average value of 1.05  $\text{mmol L}^{-1}$ ) despite the soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  increasing to values of 45.6  $\text{mmol L}^{-1}$ . Similarly, for the 1:2 soil to water (v/v) extract  $[\text{NO}_3^-]$ , there was a positive relationship until 0.93  $\text{mmol L}^{-1}$  at  $\text{NNI}=1.0$ ; thereafter, NNI was close to 1.0 (average value of 1.05  $\text{mmol L}^{-1}$ ), despite extract  $[\text{NO}_3^-]$  increasing to 4.4  $\text{mmol L}^{-1}$ .

The authors of Peña-Fleitas et al. (2015) were unable to strongly relate soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  to NNI for greenhouse-grown melon and tomato. However, they only used simple regression analysis and not segmented linear analysis, as in the current study, and they had relatively small data sets from only one crop per species.

### *5.5.2. Sufficiency values*

A sufficiency range of 5.0–15.0  $\text{mmol L}^{-1}$  for soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  was proposed for greenhouse pepper crops in SE Spain. This lower value is consistent with the minimum soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  values suggested by other authors. For vegetable crops in California, sufficiency values of 4.0–5.0  $\text{mmol L}^{-1}$  were proposed by Hartz and Hochmuth. (1991). Reference Burt et al (1995) proposed 5.0  $\text{mmol L}^{-1}$  as a general minimum value, but suggested with frequent N application using combined drip irrigation/fertigation systems that values  $<5.0 \text{ mmol L}^{-1}$  may be sufficient. Similarly, minimum values of  $<5.0 \text{ mmol L}^{-1}$

have been reported that could be used with well-managed, combined drip irrigation/fertigation systems (Magán et al., 2019). The minimum value of 5.0 mmol L<sup>-1</sup>, proposed here is a conservative value. A value of 4.0 mmol L<sup>-1</sup> probably could be used. However, to avoid risk, 5.0 mmol L<sup>-1</sup> is the proposed minimum sufficiency value, until further studies support a lower recommended minimum value. The suggested maximum sufficiency value of 15.0 mmol L<sup>-1</sup> is consistent with values of 12.0–15.0 mmol L<sup>-1</sup> suggested by Granados et al. (2013) and Magán et al. (2019) for greenhouse pepper crops in Almeria.

The present study proposed a sufficiency range of 1.0–2.5 mmol L<sup>-1</sup> for the [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] in the 1:2 extract for greenhouse pepper crops in SE Spain. These values are considerably less than the minimum value 4.5 mmol L<sup>-1</sup> used in The Netherlands (Incrocci et al., 2017; Sonneveld and Voogt, 2009). In the Mediterranean Basin, this method has been investigated in Italy (Sonneveld and Voogt, 2009) and Greece (De Kreij et al., 2007). Minimum sufficiency values for Italy were less than those in The Netherlands (Incrocci, 2020), but not as low as in the present study. Additional work is required to validate the proposed sufficiency values for this method, obtained in the present study.

Appreciable spatial variability of soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] has been reported (Hartz, 2003), and could be a limitation for its use in practical management. Through careful placement and management, and replication, ref. Granados et al. (2013) were able to reduce the coefficient of variation (CV) of soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] measurement to 16%. The CVs in the current work of 11.4–18.0% were consistent with those reported by Granados et al. (2013). These CV values suggest that with careful placement and management that the spatial variability of soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] is sufficiently low so as not to limit its use for N management.

The 1:2 soil to water (v/v) extract method should reduce spatial variability, because of the use of composite soil samples (Thompson et al., 2017b). In the current work, the CVs for this method of 11.0–17.0% were similar to those for soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>].

### *5.5.3. General considerations of the use of the soil solution and 1:2 soil to water (v/v) extract methods*

Greenhouse vegetable production is a suitable cropping system for the use of ceramic soil solution suction samplers. Frequent irrigation and N addition ensure constantly moist soil and reduce fluctuations in root zone NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content. Soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] is an option for monitoring the readily available soil N supply in these systems. However, in other cropping systems, particularly outdoor systems with more infrequent irrigation and N application, it is probably less well suited. For this method to be most effective, considerable care should

be taken to ensure that samples are as representative as possible and to minimize spatial variation. Relevant procedures are described in detail by Padilla et al. (2020), Peña-Fleitas et al. (2015) and Granados et al. (2013). Analysis of  $[\text{NO}_3^-]$  can be conducted on the farm using rapid analysis systems (Padilla et al., 2020; Thompson et al., 2009).

The variable water content in the soil samples for the extraction of  $[\text{NO}_3^-]$  in the 1:2 extract is not a limitation for the interpretation of the results. The variation in the water content of the soil did not affect the interpretation of results, for the ranges of soil water content commonly encountered in intensive vegetable production (De Kreij et al., 2007). Practical advantages of the extract method are that it only requires a single visit to the greenhouse for each measurement, and that taking soil samples can be done rapidly.

#### *5.5.4. General application of results*

The soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  effectively monitored the readily available soil N supply for greenhouse pepper crops in SE Spain. This method will likely be suitable for other species in this vegetable production system and in greenhouses throughout the Mediterranean Basin. Although, ideally, sufficiency values should be determined for each species and location, it is likely that the sufficiency values obtained in the present work will be applicable to other species in this and similar systems. The 1:2 soil to water (v/v) extract method is a promising and versatile method; however, more work is required before it can be recommended for use in vegetable production in SE Spanish greenhouses.

## **5.6. Conclusions**

$[\text{NO}_3^-]$  in soil solution and in the extract from the 1:2 soil to water (v/v) method were both sensitive to excess N application, in greenhouse pepper crops. Excess N application was indicated by increasing tendencies and clear differences between adequate, excessive, and very excessive N supply. Both methods were sensitive to deficient N application, which was apparent as values very close to zero. For both methods, segmented linear regression analysis described the relationship with NNI which was used as a measure of crop N status. The results of the segmented linear regression analysis were generally consistent between phenological stages and between crops. A range of sufficiency values, for the entire crop, were determined for each method.

Soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  effectively monitored the supply of readily available soil N for pepper grown in SE Spanish greenhouses. This method and the associated sufficiency range values are likely to be applicable to other vegetable species grown in this system. The 1:2 soil to water (v/v) extract is a promising method, but requires further assessment in this system.



---

## 5.7. References

- Anonymous., 1991. Council directive 91/676/EEC concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. Off. J. Eur. Commun. L375, 1–8.
- BOJA., 2009. Orden de 7 de julio de 2009, por el que se designan las zonas vulnerables y se establecen medidas contra la contaminación por nitratos de origen agrario. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. N°157, 48-51. (In Spanish) [WWW Document]. URL [http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/cocow/archivos/orden\\_7\\_julio\\_2009\\_modificacion\\_decreto\\_36\\_2008.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/cocow/archivos/orden_7_julio_2009_modificacion_decreto_36_2008.pdf) (accessed 10.22.20).
- BOJA., 2015. Orden de 1 de junio de 2015, por la que se aprueba el programa de actuación aplicable en las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos de fuentes agrarias designadas en Andalucía. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. N°111. (In Spanish) [WWW Document]. URL <https://www.juntadeandalucia.es/boja/2015/111/index.html> (accessed 10.22.20).
- Burt, C., O'Connor, K., Ruehr, T., 1995. Fertigation. San Luis Obispo, CA: Irrigation Training and Research Center, California Polytechnic State University.
- De Kreij, C., Kavvadias, V., Assimakopoulou, A., Paraskevopoulos, A., 2007. Development of Fertigation for Trickle Irrigated Vegetables under Mediterranean Conditions. Int. J. Veg. Sci. 13, 81–99. [https://doi.org/10.1300/J512v13n02\\_08](https://doi.org/10.1300/J512v13n02_08)
- de Souza, R., Peña-Fleitas, M.T., Thompson, R.B., Gallardo, M., Grasso, R., Padilla, F.M., 2019. The Use of Chlorophyll Meters to Assess Crop N Status and Derivation of Sufficiency Values for Sweet Pepper. Sensors. 19, 2949. <https://doi.org/10.3390/s19132949>
- Domínguez, P., 2014. Estado Actual de los Acuíferos del Sur de la Sierra de Gádor-Campo de Dalías. Instituto Geológico y Minero de España. Ministerio de Economía y Competitividad. [WWW Document]. URL <http://info.igme.es/ConsultaSID/presentacion.asp?Id=166757> (accessed 5.21.19).
- Fernández, M.D., González, A.M., Carreño, J., Pérez, C., Bonachela, S., 2007. Analysis of on-farm irrigation performance in Mediterranean greenhouses. Agric. Water Manag. 89, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2007.02.001>
- Gallardo, M., Thompson, R.B., López-Toral, J.R., Fernández, M.D., Granados, R., 2006. Effect of Applied N Concentration in a Fertigated Vegetable Crop on Soil Solution Nitrate and Nitrate Leaching Loss. Acta Hortic. 700, 221–224. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.700.37>
- García, M.C., Céspedes, A.J., Pérez, J.J., Lorenzo, P., 2016. El sistema de la producción hortícola protegido de la provincia de Almería. IFAPA, Almería, España. (In Spanish).
- Gázquez, J.C., Pérez, C., Meca, D.E., Segura, M.D., Domene, M.A., De La Cruz, E., López, J.C., Buendía, D., 2017. Comparative study of tomato production strategies for long-cycle crop in enarenado and for inter-planting in different substrates systems in the Mediterranean area. Acta Hortic. 1170, 773–776. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.98>
- Granados, M.R., Thompson, R.B., Fernández, M.D., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., 2013.
-

- Prescriptive-corrective nitrogen and irrigation management of fertigated and drip-irrigated vegetable crops using modeling and monitoring approaches. *Agric. Water Manag.* 119, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.12.014>
- Greenwood, D.J., Lemaire, G., Gosse, G., Cruz, P., Draycott, A., Neeteson, J.J., 1990. Decline in Percentage N of C3 and C4 Crops with Increasing Plant Mass. *Ann. Bot.* 66, 425–436. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088044>
- Gysi, C., 1981. A simple procedure to express results of soil analysis (1:2 volume extract) on a volume basis. *Plant and Soil.* 63, 523–526. <https://doi.org/10.1007/BF02370055>
- Hartz, T.K., Hochmuth, G.J., 1991. *Fertility Management of Drip-Irrigated Vegetables*. UC Davis, Vegetable Research and Information Center.
- Hartz, T.K., 2003. The assessment of soil and crop nutrient status in the development of efficient fertilizer recommendations. *Acta Hortic.* 627, 231–240. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.627.30>
- Incrocci, L., 2020. Personal communication. University of Pisa, Pisa, Italy.
- Incrocci, L., Massa, D., Pardossi, A., 2017. New trends in the fertigation management of irrigated vegetable crops. *Horticulturae.* 3, 37. <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020037>
- Junta de Andalucía., 2019. Cartografía de invernaderos en Almería, Granada y Málaga. (In Spanish). [WWW Document]. URL [https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Cartografia\\_inv\\_AL\\_GR\\_MA\\_180725.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Cartografia_inv_AL_GR_MA_180725.pdf) (accessed 5.13.20).
- Lemaire, G., Gastal, F., 1997. N uptake and distribution in plant canopies., in: Lemaire, G. (Ed) (Ed.), *Diagnosis of Nitrogen Status in Crops*. Springer, Berlin, Germany, pp. 3–41. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-60684-7>
- Lemaire, G., Jeuffroy, M.H., Gastal, F., 2008. Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. Theory and practices for crop N management. *Eur. J. Agron.* 28, 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.01.005>
- Magán, J.J., Gallardo, M., Fernández, M.D., García, M.L., Granados, M.R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2019. Showcasing a fertigation management strategy for increasing water and nitrogen use efficiency in soil-grown vegetable crops in the FERTINNOWA project. *Acta Hortic.* 1253, 17–24. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1253.3>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2014. Evaluation of optical sensor measurements of canopy reflectance and of leaf flavonols and chlorophyll contents to assess crop nitrogen status of muskmelon. *Eur. J. Agron.* 58, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.04.006>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2017. Determination of sufficiency values of canopy reflectance vegetation indices for maximum growth and yield of cucumber. *Eur. J. Agron.* 84, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.12.007>
- Padilla, F.M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Giménez, C., Thompson, R.B., 2018. Different responses of various chlorophyll meters to increasing nitrogen supply in

- sweet pepper. *Front. Plant Sci.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01752>
- Padilla, F.M., Farneselli, M., Gianquinto, G., Tei, F., Thompson, R.B., 2020. Monitoring nitrogen status of vegetable crops and soils for optimal nitrogen management. *Agric. Water Manag.* 241, 106356. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106356>
- Pardossi, A., Tognoni, F., Incrocci, L., 2004. Mediterranean Greenhouse Technology. *Chron. Horticult.* 44, 28–34.
- Peña-Fleitas, M.T., Thompson, R., Gallardo, M., Fernández-Fernández, M.D., 2013. Regional model of nitrate leaching for an intensive vegetable production system, in: *Nitrogen, Environment and Vegetables, Proceedings of the NEV 2013, Turín, Italy, 15–17 April 2013*; Fontana, E., Grignani, C., Nicola, S., Eds.; Università Degli Studi Di Torino, 10095 Grugliasco (Turin), Italy; Pp. 73–74.
- Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., Farneselli, M., Padilla, F.M., 2015. Assessing crop N status of fertigated vegetable crops using plant and soil monitoring techniques. *Ann. Appl. Biol.* 167, 387–405. <https://doi.org/10.1111/aab.12235>
- Pulido-Bosch, A., Rigol-Sanchez, J.P., Vallejos, A., Andreu, J.M., Ceron, J.C., Molina-Sanchez, L., Sola, F., 2018. Impacts of agricultural irrigation on groundwater salinity. *Environ. Earth Sci.* 77, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7386-6>
- Rodríguez, A., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., de Souza, R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2020. Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss. *Eur. J. Agron.* 117, 126046. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126046>
- Sonneveld, C., Van den Ende, J., 1971. Soil Analysis by Means of a 1:2 Volume Extract. *Plant and Soil.* 505–516. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF01372683>
- Sonneveld, C., Van den Ende, J., De Bes, S.S., 1990. Estimating the chemical compositions of soil solutions by obtaining saturation extracts or specific 1:2 by volume extracts. *Plant and Soil.* 122, 169–175. <https://doi.org/10.1007/BF02851971>
- Sonneveld, C., Voogt, W., 2009. *Plant Nutrition of Greenhouse Crops*, Springer. ed. The Netherlands.
- Tei, F., De Neve, S., de Haan, J., Kristensen, H.L., 2020. Nitrogen management of vegetable crops. *Agric. Water Manag.* 240, 106316. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106316>
- Thompson, R.B., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., Giménez, C., Fernández, M.D., 2007. Identification of irrigation and N management practices that contribute to nitrate leaching loss from an intensive vegetable production system by use of a comprehensive survey. *Agric. Water Manag.* 89, 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2007.01.013>
- Thompson, R.B., Gallardo, M., Joya, M., Segovia, C., Martínez-Gaitán, C., Granados, M.R., 2009. Evaluation of rapid analysis systems for on-farm nitrate analysis in vegetable cropping. *Spanish J. Agric. Res.* 7, 200–211. <https://doi.org/10.5424/sjar/2009071-412>
- Thompson, R.B., Gallardo, M., Fernández-Fernández, M.D., 2013. Measurement of Nitrate

- Leaching in Commercial Vegetable Production in SE Spain, in: Nitrogen, Environment and Vegetables, Proceedings of the NEV 2013, Turín, Italy, 15–17 April 2013; Fontana, E., Grignani, C., Nicola, S., Eds.; Università Degli Studi Di Torino, 10095 Grugliasco (Turin), Italy; Pp. 67–69.
- Thompson, R.B., Incrocci, L., Voogt, W., Pardossi, A., Magán, J.J., 2017a. Sustainable irrigation and nitrogen management of fertigated vegetable crops. *Acta Hortic.* 363–378. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1150.52>
- Thompson, R.B., Tremblay, N., Fink, M., Gallardo, M., Padilla, F.M., 2017b. Tools and Strategies for Sustainable Nitrogen Fertilisation of Vegetable Crops, in: Tei, F., Nicola, S., Benincasa, P. (Ed.), *Advances in Research on Fertilization Management of Vegetable Crops*. Springer, Cham, Switzerland, pp. 11–63. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2_2)
- Thompson, R.B., Incrocci, L., van Ruijven, J., Massa, D., 2020a. Reducing contamination of water bodies from European vegetable production systems. *Agric. Water Manag.* 240, 106258. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106258>
- Thompson, R.B., Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., 2020b. Reducing nitrate leaching losses from vegetable production in Mediterranean greenhouses. *Acta Hortic.* 1268, 105–117. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1268.14>
- Valera, L.D., Belmonte, L.J., Molina, F.D., López, A., 2016. Greenhouse agriculture in Almeria. A comprehensive techno-economic analysis. Cajamar Caja Rural, Almeria. Spain.

## **6. CHAPTER THREE: Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper**

---

Rodríguez, A., Peña-Fleitas, M.T., Padilla, F.M., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2021. Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper. *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 285, 110157. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110157>



## 6.1. Abstract

Vegetable production requires improved nitrogen (N) management practices. Monitoring petiole sap nitrate concentration ( $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ ) is a simple and cheap method to evaluate crop N status. The sensitivity of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  to assess crop N status of sweet pepper was evaluated. Three sweet pepper crops were grown in different cropping seasons, each with an autumn-winter growing period. The crops commenced in 2014, 2016, and 2017. Combined fertigation and drip irrigation frequently applied (every 1–4 days) complete nutrient solution throughout each crop. The crops were grown in a greenhouse in soil. Five N treatments as N concentrations were applied throughout each crop: N1 (2.0–2.4 mmol L<sup>-1</sup>); N2 (5.3–6.2 mmol L<sup>-1</sup>); N3 (9.7–12.6 mmol L<sup>-1</sup>); N4 (13.1–16.1 mmol L<sup>-1</sup>); N5 (16.7–20.0 mmol L<sup>-1</sup>). These corresponded to very deficient, deficient, conventional, excessive and very excessive N supply. Petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  was determined every 1–2 weeks and related to Nitrogen Nutrition Index (NNI), which was used as an indicator of crop N status. For each of the N treatments in each crop, petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  was relatively constant throughout the crop. The relationship between petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  and NNI, for pooled data from the three pepper crops, was described by (a) the polynomial equation  $\text{NNI} = -1.10\text{E} - 07 \times \text{Sap}^2 + 0.000473 \times \text{Sap} + 0.5514$  with an  $R^2$  of 0.84, and (b) the segmented linear equations  $\text{NNI} = 0.00034 \times \text{Sap} + 0.572$  and  $\text{NNI}=1.04$ , with an  $R^2$  of 0.83. Sufficiency values for maximum growth of sweet pepper were obtained by (a) solving the polynomial equation for  $\text{NNI}=1.0$ , and (b) using the intercept value of the horizontal line of the segmented linear regression. The corresponding sufficiency values for the duration of a complete crop cycle were 1441 and 1367 mg  $\text{NO}_3^--\text{N}$  L<sup>-1</sup>, respectively. A sufficiency value of 1400 mg  $\text{NO}_3^--\text{N}$  L<sup>-1</sup> was rounded-off and suggested for the duration of a complete crop cycle of greenhouse-grown sweet pepper in SE Spain. The relationships between petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  and NNI, and the derived sufficiency values for the flowering and early fruit growth, and harvest phenological stages were similar to those determined for the entire crop. Petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  is a sensitive and effective method to monitor crop N status of sweet pepper.

**Keywords:** *Capsicum annuum* L.; crop N status; N fertilizer management; NNI; petiole sap analysis; sufficiency values; vegetable crop

## 6.2. Introduction

Intensive vegetable production in plastic greenhouses and large plastic tunnels is an important industry throughout the Mediterranean Basin (Pardossi et al., 2004). On the southeast (SE) coast of Spain, vegetable production takes place in 42,000 ha of plastic

greenhouses (Valera et al., 2016), of which 32,000 ha are in Almeria province (Junta de Andalucía, 2019a). In the greenhouses of Almeria, 90% of cropping is in soil (García et al., 2016). The crops grown in soil are produced with combined fertigation and drip irrigation, with which N is frequently applied in nutrient solution throughout the crop (Thompson et al., 2007, 2017a, 2020a).

For intensive production of greenhouse vegetable crops, excessive amounts of mineral nitrogen (N) fertilizer are commonly applied (Soto et al., 2015; Thompson et al., 2007). Additionally, appreciable amounts of N are supplied by the soil as mineral N or through N mineralization from organic N in soil organic matter and/or applied manure (Granados et al., 2013; Jadoski et al., 2013; Thompson et al., 2007). The consequent excessive N supply (Jadoski et al., 2013) often results in appreciable nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) leaching loss (Gallardo et al., 2006; Granados et al., 2013; Thompson et al., 2013, 2020a). These N losses have resulted in  $\text{NO}_3^-$  contamination of associated groundwater and the eutrophication of adjoining natural surface water bodies (Thompson et al., 2020a, b). In Almeria, there is substantial  $\text{NO}_3^-$  contamination of aquifers from greenhouse vegetable production (Pulido-Bosch et al., 2018).

Given the extent of aquifer  $\text{NO}_3^-$  contamination, nearly all of the greenhouse growing areas of Almeria have been identified as being Nitrate Vulnerable Zones (NVZ) (BOJA, 2015) as required by the European Union (EU) Nitrate Directive (Anonymous, 1991). Being in NVZs, vegetable growers in Almeria greenhouses are required to adopt management practices that appreciably improve crop N management to considerably decrease aquifer  $\text{NO}_3^-$  contamination.

The management of N of soil-grown vegetable crops inside greenhouses in Almeria is complicated by the likely occurrence of appreciable quantities of N supplied by the soil as residual soil mineral N (Granados et al., 2013; Thompson et al., 2020a) and mineralized N from periodic manure applications (Thompson et al., 2007, 2020a). Generally, growers apply standard concentrations of N, throughout crops, without taking into account N supplied by the soil, which can be substantial (Jadoski et al., 2013; Thompson et al., 2007, 2020a).

Monitoring approaches that provide assessment of crop N status will greatly assist growers, in this and other systems, to make decisions and adjustments to optimize crop N management (Thompson et al., 2017b). Petiole sap nitrate concentration ( $[\text{NO}_3^-\text{-N}]$ ) is a sensitive indicator of crop N status of various vegetable species (Farneselli et al., 2014; Goffart et al., 2008; Hochmuth, 1994). It is substantially more responsive to crop N nutrition



than leaf total N analysis (Majić et al., 2008; Olsen and Lyons, 1994). Petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  is particularly sensitive to changes in crop N status (Goffart et al., 2008; Olf et al., 2005; Villeneuve et al., 2002). This makes it an interesting option for vegetable production in greenhouses in Almeria where frequent N application would enable rapid correction of detected deficient crop N status.

A recent study with drip irrigated/fertigated tomato, receiving frequent N application, suggested that there was a strong and consistent linear relationship, throughout the crop, between petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  and crop N status, measured as Nitrogen Nutrition Index (NNI) (Peña-Fleitas et al., 2015). The NNI is an established quantitative indicator of crop N status (Lemaire et al., 2008; Ziadi et al., 2010); it is the ratio between the actual crop N concentration and the critical N concentration of the crop (i.e. the minimum crop N concentration required for maximum growth; Greenwood et al., 1990). An NNI value of one indicates N sufficiency for growth (dry matter production, values  $<1$  indicate N deficiency, and values  $>1$  indicate N excess; Lemaire et al., 2008).

Sweet pepper is an important crop in Almeria greenhouses (Valera et al., 2016). Approximately, 10,000 ha of the greenhouse surface area is cropped annually with sweet pepper (Junta de Andalucía, 2019b). Given the considerable importance of pepper in this system, and the severity of the N problem of this system, it is necessary to develop tools that will improve the management of N of sweet pepper crops.

Petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  is an approach that could be used to assess sweet pepper N status within this vegetable production system. The general sensitivity of sweet pepper petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  to N supply was demonstrated by Olsen and Lyons, (1994). The critical N curve developed by Rodríguez et al., (2020a) enables the calculation of NNI values that facilitate quantitative evaluation of the capacity of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  to indicate crop N status and for the derivation of sufficiency values for crop growth.

The objectives of the present work were for sweet pepper, grown in soil in a greenhouse, to: (i) evaluate the response of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  to different nutrient solution N concentrations applied by fertigation, (ii) assess the use of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  to evaluate crop N status, and (iii) derive sufficiency values of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  for maximum crop growth for the duration of the crop, and also for three different phenological stages.

### **6.3. Materials and Methods**

#### *6.3.1. Experimental site*

Three sweet pepper (*Capsicum annuum* L. cv. “Melchor”) crops, each in a different autumn-winter growing season, were grown in a greenhouse at the research farm of the University of Almeria, Retamar, Almeria, SE Spain (36°51' N, 2°16' W). Cropping conditions were equivalent to local commercial production. The crops were grown in an artificial soil, known locally as “enarenado” that is characteristic in the region (Thompson et al., 2007; Gázquez et al., 2017).

The soil consisted of sandy loamy soil of natural origin covered with a 30 cm layer of imported loam textured soil, with 10 cm layer of a fine gravel (mostly 2–5 mm diameter) placed on the imported soil as a mulch (Padilla et al., 2014). Some relevant physical and chemical characteristics (0–10 cm), from a 2011 analysis, are soil pH (1:2.5, soil:water) of 8.2, bulk density ( $\text{Mg m}^{-3}$ ) of 1.2, total N of 0.2%, and organic C of 2.8%. More details of the soil are available in Padilla et al., (2014) and Soto et al., (2014).

The greenhouse had a multi-tunnel type structure (Valera et al., 2016) with walls of polycarbonate. The roof was low-density polyethylene (LDPE), tri-laminated film (200- $\mu\text{m}$  thick) that had approximately 60% transmittance of Photosynthetically Active Radiation (PAR) (Padilla et al., 2014). The greenhouse was passively ventilated through flap roof windows and lateral side panels. The orientation of the greenhouse was east-west, and that of the crop rows was north-south. The area that was cropped was 1327  $\text{m}^2$ .

The irrigation system was above-ground drip tape. The tape was organized in pairs of lines with a separation 0.8 m between lines in each pair, and a 1.2 m separation between pairs of lines. There was a 0.5 m separation between emitters in each drip line. The discharge rate of the drip emitters was 3  $\text{L h}^{-1}$ , and the coefficient of uniformity of the irrigation system was >95%. Fertigation was used to apply mineral fertilizer.

The greenhouse was arranged as 24 experimental plots of 6 × 6 m; twenty plots were used. In every plot there were three paired lines of drip tape, with 12 emitters in each line. Individual plots were hydraulically separated from one another by vertically positioning polyethylene film (250  $\mu\text{m}$  thick) to 30 cm soil depth. The plants were located 6 cm to the side of an emitter. Plant density was 2 plants  $\text{m}^{-2}$ , for a total of 72 plants in each plot.

#### *6.3.2. Pepper crops and N treatments*

The three sweet pepper crops were grown in different autumn-winter growing seasons, in 2014–2015 (2014 crop), 2016–2017 (2016 crop) and 2017–2018 (2017 crop).

The 2014 crop was from 12 August 2014 to 29 January 2015 (170 days), the 2016 crop from 19 July 2016 to 24 March 2017 (248 days), and the 2017 crop from 21 July 2017 to 20 February 2018 (214 days) (Table 1). Plants were transplanted as five-week-old seedlings. Following transplanting, seedlings were irrigated with water ( $<0.04 \text{ mmol N L}^{-1}$ ) from the first day after transplanting (DAT) until the N treatments started. The same three pepper crops were used in the studies of Rodríguez et al., (2020a, b).

**Table 1.** General information of the three pepper crops, and of each N treatment. Provided are the dates of the crops, and of the N treatments expressed as the average nutrient solution N concentration, and total quantity of N applied. Total dry matter production (DMP) and total yield (TY; fresh weight) data are presented.

Crop year	Date of transplanting	Date end of the crop (duration)	N treatment <sup>a</sup>	[N] in nutrient solution (mmol L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Total N applied (kg N ha <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	DMP (t ha <sup>-1</sup> )	TY (t ha <sup>-1</sup> )
2014	12/08/2014	29/01/2015 (170 days)	N1	2.4	64	5.7	38.7
			N2	6.2	189	7.9	52.2
			N3	12.6	516	8.6	52.9
			N4	16.1	804	9.7	51.1
			N5	20.0	990	9.3	46.4
2016	19/07/2016	24/03/2017 (248 days)	N1	2.0	88	8.8	67.2
			N2	5.3	302	12.6	86.4
			N3	9.7	561	15.2	91.5
			N4	13.5	1052	14.4	94.2
			N5	17.7	1320	13.6	89.7
2017	21/07/2017	20/02/2018 (214 days)	N1	2.0	86	5.1	33.3
			N2	5.7	304	9.3	54.4
			N3	9.7	519	10.5	61.0
			N4	13.1	870	12.6	65.1
			N5	16.7	1198	12.6	68.9

<sup>a</sup> N1: very N deficient; N2: N deficient; N3: conventional N; N4: excessive N; N5: very excessive N.

<sup>b</sup> For the period in which the N treatments were applied.

<sup>c</sup> For the complete cropping cycle.

Five treatments of different N concentration were applied to each crop. They were applied in each irrigation event, throughout the crops, from 1, 9 and 10 DAT in the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively. The different N treatments were: very N deficient (N1), N deficient (N2), conventional N management (N3), excessive N (N4) and very excessive N (N5). There were minor differences between the N concentrations applied as equivalent treatments in the three pepper crops (Table 1). The total quantities of mineral N applied are provided in Table 1. More than 90% of applied mineral N was in the form of  $\text{NO}_3^-$ , the rest as ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ).

Other than the different N concentrations, the nutrient solution supplied all other macro and micronutrients to ensure that they were not limiting. The composition of the nutrient solution applied to the N3 treatments in the three pepper crops are presented in Supplementary Table 1.

Irrigation was conducted to maintain the soil matric potential of the root zone in the range  $-10$  to  $-30$  kPa. Soil matric potential was measured with one tensiometer (Irrometer, Co., Riverside, CA, USA) per plot, at 0.15 m depth. Irrigation frequency was one irrigation every 1–4 days, with irrigation being more frequent in warm conditions. To reduce the build-up of soil salinity, additional irrigation as nutrient solution or water was applied, to certain treatments during the crops, for short periods. These additional irrigations are described in Rodríguez et al., (2020b).

Local crop management practices were used; crop management practices in this system are described in detail by Valera et al. (2016). For the three pepper crops in the current study, nylon cords were placed horizontally along the crop rows to physically support the crops. This is a local system known as “enfajado”. To control high temperature in the greenhouse, the plastic cladding was white-washed with applications of  $\text{CaCO}_3$  suspension, prior to transplanting the seedlings. The whitewash was removed by hosing in early Autumn. Otherwise, climate control was based on the opening and closing of side panels and roof windows. Pest and pathogen control was mostly with biological control; when necessary, chemical agents were used. To prevent insect entry, all side panels and roof windows had fine mesh, and entry was through chambers with doors on each side. All crop management operations, apart from irrigation and fertilizer application, such as transplanting, pest treatments, pruning, harvesting, etc., were conducted manually.

### *6.3.3. Petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] measurements*

Petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] was determined every week in the 2014 crop, and every two weeks in the 2016 and 2017 crops. Sap measurements commenced at 21, 22 and 19 DAT for the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively, and continued throughout the crops.

For each sampling of petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N], the most recently fully expanded leaf was removed from sixteen different plants, in each replicate plot, between 07:00 and 09:00 h on each sampling date. Immediately after sampling, each sampled leaf was placed in a sealed plastic bag, from which air was pressed, and which was then placed in a chilled cooler box. At the completion of sampling, petioles were separated from leaf blades in a laboratory adjacent to the greenhouse. The petioles were then immediately placed in individual sealed plastic bags from which air was pressed out. The bags were then placed in a chilled cooler box in which they were promptly transported to a laboratory at the University of Almeria (UAL).

In the laboratory at UAL, they were stored at 5°C prior to being cut into 1 cm long sections that were immediately pressed with a domestic garlic press. The extracted liquid was diluted (1:10) and centrifuged at 1900 g (4500 rpm) for 15 minutes, at a temperature of 4°C. The [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] was measured with a SAN++ segmented flow analyzer (Skalar Analytical B.V., Breda, The Netherlands). Analysis was conducted within 6 h after sampling the petioles.

### *6.3.4. Determination of crop dry matter production, crop N concentration, crop N uptake, and yield*

Crop above-ground dry matter production (DMP) was measured at approximately three weekly intervals. In each replicate plot, one complete and representative plant was removed, which was separated into stem, leaf, and fruit material. For each biomass component (leaf, stem, fruit), dry matter content was assessed by oven-drying at 65°C until constant weight. The dry matter of the transplanted seedlings was determined in 100 seedlings. The amount of dry matter of pruned material was assessed at each pruning in each crop, from eight selected marked plants in each plot. At the end of the crop, the final biomass was determined by removing and measuring the fresh weight of the eight marked plants. The fractions of leaf, stem, and fruit were assessed in two representative plants. The dry matter contents of these components were determined by oven-drying at 65°C, until constant weight.

In all biomass samplings, the dry matter mass of each biomass component was calculated as the product of dry matter percentage and fresh weight. Total DMP at each

biomass sampling, was the sum of the mass of dry matter of leaf, stem and fruit, plus the dry matter mass of all previously-sampled harvested fruit and pruned material.

Sub-samples of leaf, stem and fruit from all biomass samplings, and of pruned material and of harvested fruit, from each plot, were ground in a knife mill. The total N concentration (%N) of all sub-samples was analyzed with a Rapid N elemental analyzer system (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). The mass of N in each plant component was the product of the dry matter mass and the N concentration.

For all biomass samplings, total crop N uptake ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ), in each plot, was the sum of N in all components (leaf, stem, immature fruit, previously pruned material and previously harvested fruit). Total crop N concentration (%N) for each plot was total crop N uptake divided by total DMP.

Fresh fruit were regularly harvested from the same eight marked plants, in each plot, used to collect pruned material. For harvested fruit from each plot, fresh and dry weights were assessed. Harvests took place every 7–14 days. They commenced at 98, 101 and 110 DAT for the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively. There were seven, sixteen and eleven harvests, respectively. Total yield, for each treatment in each crop, was the sum of all harvested fresh fruit.

#### 6.3.5. Determination of crop Nitrogen Nutrition Index (NNI)

To relate petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  values to NNI, NNI was estimated for each date of petiole sap sampling. NNI was calculated as:

$$NNI = \frac{N_{act}}{N_c}, \quad (1)$$

where  $N_{act}$  is the actual crop N concentration and  $N_c$  is the critical crop N concentration.  $N_{act}$  values were obtained by interpolating from measured crop N concentration values, which were determined approximately every 21 days, for each treatment, during each of the three individual pepper crops, as described in section 6.3.4. The  $N_c$  values, for each date of petiole sap sampling, were obtained using the critical N curve  $\%N_c = 4.71 \times \text{DMP}^{-0.22}$  for greenhouse-grown sweet pepper (Rodríguez et al., 2020a). This critical N curve was derived from the same three pepper crops that were used in the present work. The DMP values used to derive  $N_c$  values, for each treatment in each crop, were interpolated from measured DMP values from the periodic biomass samplings.

### 6.3.6. Data analysis

#### 6.3.6.1. Relationship between crop NNI and petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N]

NNI was used as an indicator of crop N status. For each date of sap sampling, the corresponding NNI values were interpolated, for each N treatment. The relationships between NNI and petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] were examined using regression analysis. Two different types of regression were used to compare the relationship, being: (i) polynomial regression, and (ii) segmented linear regression analysis.

The polynomial regression was defined by the equation  $NNI = a \times Sap^2 + b \times Sap + c$ ; where  $a$ ,  $b$  and  $c$  are the quadratic, linear and independent parameters determined by the equation, and  $Sap$  is the petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] (mg L<sup>-1</sup>). The regression equations were fitted, and the coefficient of determination (R<sup>2</sup>) and standard error (SE) values were obtained using CurveExpert Professional 2.2.0 software (D. Hyams, Madison, AL, USA).

Segmented linear regression analysis consisted of fitting two linear regression lines, a sloped line described by  $NNI = a \times Sap + b$  (if  $Sap < Sap_0$ ) and a horizontal line described by  $NNI = c$  (if  $Sap \geq Sap_0$ ), where  $a$  is the slope of the sloped segment,  $b$  and  $c$  are intercept values, and  $Sap_0$  is the petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] value where the two lines intersect. The sloped line implies a linear increase in NNI with increasing petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N]. The horizontal line implies that NNI remains constant at higher petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N]. The value  $Sap_0$  is the petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] that maximizes NNI, below which NNI is reduced, and above which NNI is constant. The segmented line analysis was conducted using RStudio2 software (RStudio Inc., Boston, MA, USA).

#### 6.3.6.2. Determination of integrated petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] and NNI values

For each pepper crop, integrated values of petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] ( $Sap_i$ ) and NNI values ( $NNI_i$ ) were calculated as single integrated values, for each treatment, to evaluate how different N treatments affected petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] for the complete crop and for each phenological stage. Integrated values, for each treatment, were calculated as:  $NNI_i = \sum (NNI_m \times d_m / D)$  and  $Sap_i = \sum (Sap_m \times d_m / D)$ , where  $NNI_m$  and  $Sap_m$  were the values at each date of sap measurement,  $d_m$  was the number of days since the previous measurement (from two consecutive measurements), and  $D$  was the total number of days from first to the last measurement. For the initial measurement, for which there was no previous measurement, a 7-day interval was used for the 2014 crop, and a 14-day interval for the 2016 and 2017 crops, which was consistent with the sampling frequency.

For the calculation of the integrated values, when the beginning of a phenological stage occurred between two sap sampling dates, the number of days to the first sap sampling, in



the stage, was considered. Similarly, when the end of the phenological stage occurred between two sampling dates, the number of days from the last sap sampling, in the stage, was considered.

Three different phenological stages were examined, being (i) vegetative, (ii) flowering and early fruit growth, and (iii) harvest. The vegetative stage started at transplanting and continued until the commencement of flowering, it corresponded to 0 to 41 DAT in the three cropping cycles. The flowering and early fruit growth stage started at the commencement of flowering (at 42 DAT in the three crops) and continued until the first fruit harvest at 97, 100 and 109 DAT in the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively. The harvest stage, which was the longest stage, commenced with the initial harvest of fruit and continued until the end of the crop, being 98–170, 101–248, and 110–214 DAT, in the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively.

Treatment effects on integrated NNI and integrated petiole sap  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  values were evaluated with analysis of variance (ANOVA) and least significant difference (LSD) tests. ANOVA was conducted following verification of assumptions of equal variance and normality. The LSD test compared multiple means when treatment effects were significant at  $P < 0.05$ . ANOVA results will be indicated as: no significant difference at  $P \geq 0.05$  (ns), significant at  $P < 0.05$  (\*), very significant at  $P < 0.01$  (\*\*), and highly significant at  $P < 0.001$  (\*\*\*). The Statistica 13 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) was used for these statistical analyses.

#### 6.3.6.3. Determination of petiole sap $[\text{NO}_3\text{-N}]$ sufficiency values for maximum growth

Sufficiency values were obtained from the relationships between petiole sap  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  and NNI. The calculation of sufficiency values for maximum growth (i.e. of DMP) was determined using two approaches: (1) by solving the polynomial equation that related NNI to petiole sap for  $\text{NNI}=1.0$ , and (2) by determining the intersection of the sloped and horizontal lines of the segmented line analysis, i.e. the  $Sap_0$  value defined in section 6.3.6.1.

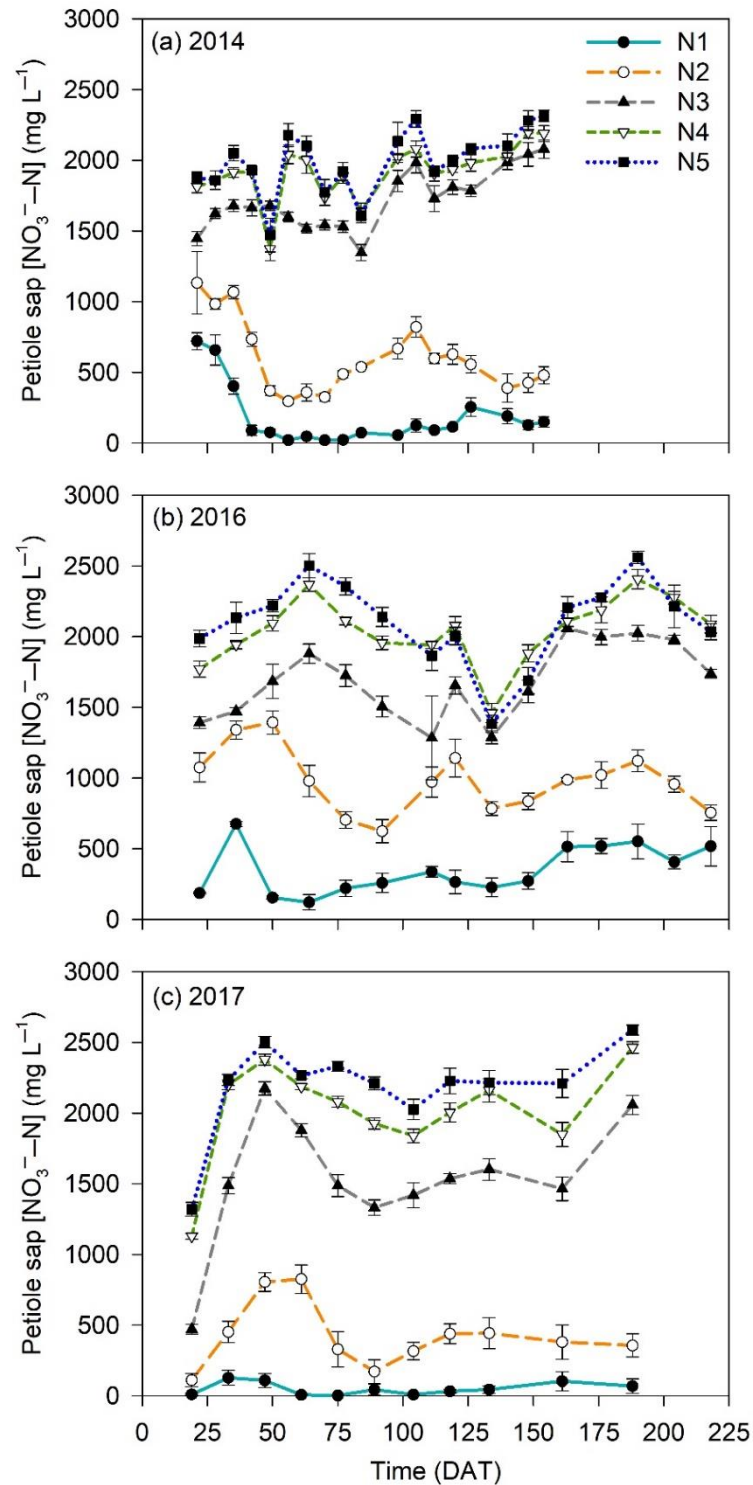
Using both approaches, sufficiency values were derived for the duration of each of the three pepper crops, and for each phenological stage of each crop. Also, using both approaches with pooled data from throughout the three crops, a single sufficiency value was determined for sweet pepper, and single sufficiency values were determined for each of three phenological stages, which were the vegetative stage, the combined flowering and early fruit growth stage, and the harvest stage.

## **6.4. Results**

### *6.4.1. Effect of N on petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] of sweet pepper crops*

#### 6.4.1.1. Petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] throughout the crops

Petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] was influenced by the N treatments, at all sampling dates, in each of the 2014, 2016 and 2017 pepper crops (Figure 1). With very few exceptions, there were consistent differences in petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] between N treatments, with the order N5 > N4 > N3 > N2 > N1 being maintained throughout each of the three pepper crops (Figure 1). Petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] for each treatment was relatively constant throughout each crop, particularly after the first 40–60 days when some fluctuation occurred in some treatments. There were consistent appreciable differences between the N1, N2 and N3 treatments in each of the three pepper crops. The average differences, between petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] of treatments N1 and N2 and between treatments N2 and N3, were 475 and 979 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>, respectively (Figure 1). The differences between the N4 and N3 treatments were generally consistently notable in each of the three pepper crops; the average difference being 348 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>. There were generally small, but consistent, differences between the N4 and N5 treatments; the average difference in the three pepper crops being 103 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>.



**Figure 1.** Effect of increasing N concentration in nutrient solution, on petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] values throughout the (a) 2014, (b) 2016 and (c) 2017 pepper crops. The data presented are means ( $n=4$ )  $\pm$  standard error (SE).

#### 6.4.1.2. Integrated petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] values

For the integrated petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] (Sapi) values, there were the following

significant differences ( $P < 0.05$ ) between N treatments for the duration of the crop and in each of the three phenological stages, for each of the 2014, 2016 and 2017 crops:  $N4 > N3 > N2 > N1$  (Table 2). The N5 treatment had significantly ( $P < 0.05$ ) higher integrated petiole sap  $[NO_3^- - N]$  values than the N4 treatment for the duration of the 2014 and 2017 crops, and in five of the nine phenological stages evaluated in the three pepper crops (Table 2).

**Table 2.** Integrated petiole sap  $[NO_3^- - N]$  (Sapi) ( $mg L^{-1}$ ) values for each treatment, the entire crop and phenological stage for the 2014, 2016 and 2017 crops. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments in each crop, using LSD. A summary of the significance of the N treatments in the ANOVA is presented, with highly significant differences indicated by  $P < 0.001$  (\*\*\*). Values are means ( $n=4$ )  $\pm$  standard error (SE).

Crop	Treatment	Sapi $[NO_3^- - N]$ ( $mg L^{-1}$ )			
		Entire crop	Phenological Stage		
			Vegetative	Flowering and early fruit growth	Harvest
2014	N1 (Very N deficient)	172 $\pm$ 23 a	481 $\pm$ 61 a	47 $\pm$ 4 a	149 $\pm$ 29 a
	N2 (N deficient)	595 $\pm$ 22 b	988 $\pm$ 72 b	465 $\pm$ 15 b	537 $\pm$ 49 b
	N3 (Conventional)	1736 $\pm$ 19 c	1600 $\pm$ 31 c	1611 $\pm$ 25 c	1922 $\pm$ 24 c
	N4 (Excessive N)	1918 $\pm$ 25 d	1873 $\pm$ 26 d	1837 $\pm$ 39 d	2042 $\pm$ 13 d
	N5 (Very excessive N)	2006 $\pm$ 25 e	1928 $\pm$ 28 d	1911 $\pm$ 57 d	2136 $\pm$ 31 e
	<i>Significance</i>	***	***	***	***
2016	N1 (Very N deficient)	350 $\pm$ 35 a	389 $\pm$ 10 a	211 $\pm$ 39 a	408 $\pm$ 61 a
	N2 (N deficient)	957 $\pm$ 23 b	1121 $\pm$ 117 b	892 $\pm$ 54 b	944 $\pm$ 16 b
	N3 (Conventional)	1687 $\pm$ 34 c	1470 $\pm$ 31 c	1644 $\pm$ 56 c	1752 $\pm$ 45 c
	N4 (Excessive N)	2044 $\pm$ 12 d	1892 $\pm$ 33 d	2110 $\pm$ 15 d	2049 $\pm$ 26 d
	N5 (Very excessive N)	2101 $\pm$ 34 d	2084 $\pm$ 68 e	2251 $\pm$ 36 e	2030 $\pm$ 48 d
	<i>Significance</i>	***	***	***	***
2017	N1 (Very N deficient)	56 $\pm$ 24 a	78 $\pm$ 26 a	25 $\pm$ 12 a	72 $\pm$ 41 a
	N2 (N deficient)	413 $\pm$ 49 b	398 $\pm$ 59 b	446 $\pm$ 81 b	391 $\pm$ 87 b
	N3 (Conventional)	1568 $\pm$ 31 c	1245 $\pm$ 32 c	1585 $\pm$ 49 c	1701 $\pm$ 59 c
	N4 (Excessive N)	2038 $\pm$ 32 d	1823 $\pm$ 23 d	2037 $\pm$ 16 d	2135 $\pm$ 58 d
	N5 (Very excessive N)	2222 $\pm$ 41 e	1938 $\pm$ 30 e	2233 $\pm$ 36 e	2341 $\pm$ 70 d
	<i>Significance</i>	***	***	***	***

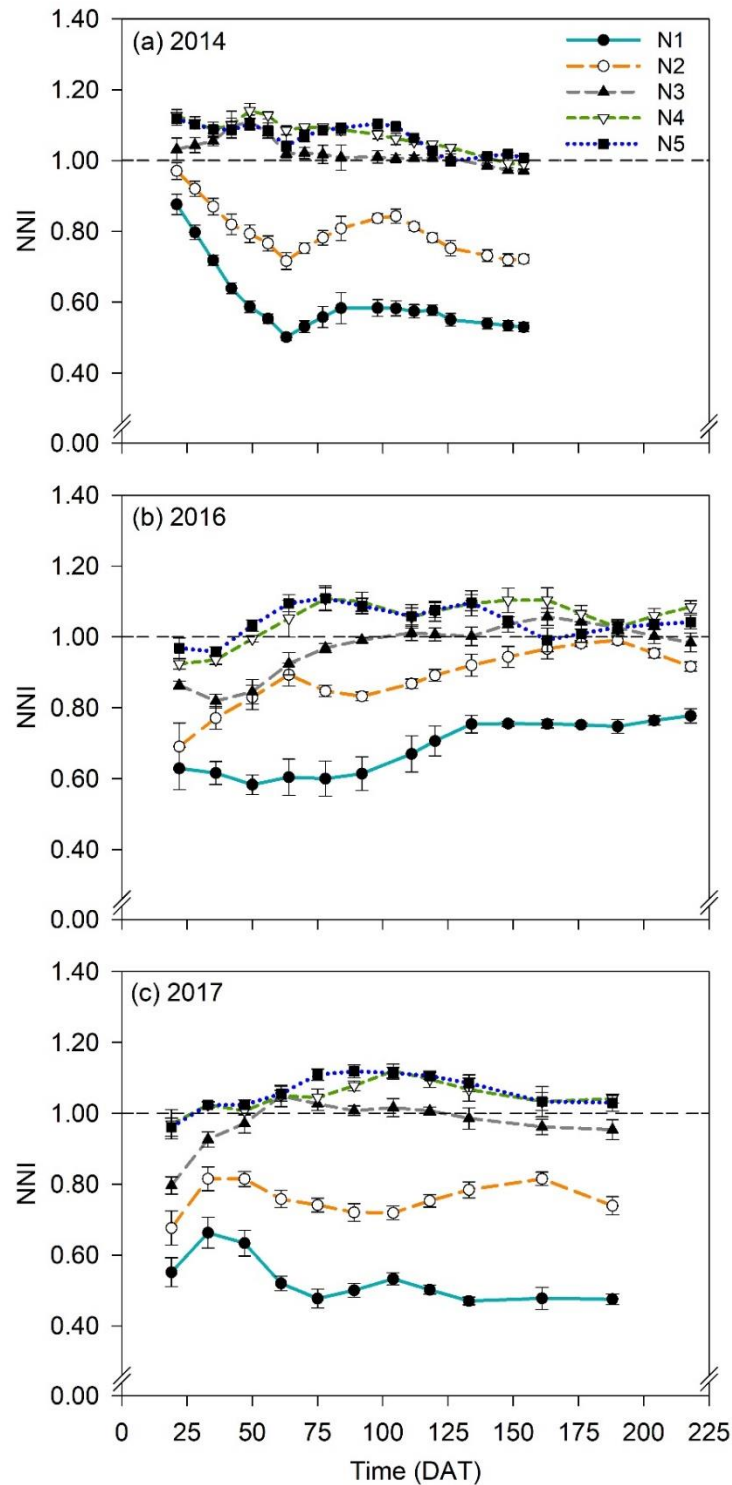
#### 6.4.2. Effect of N on NNI of sweet pepper crops

##### 6.4.2.1. NNI throughout the crops

NNI was influenced by the N treatments, at all sampling dates, in the 2014, 2016 and 2017 pepper crops (Figure 2). In general, there were consistent differences, in the order of  $N5 = N4 > N3 > N2 > N1$ , throughout the three pepper crops (Figure 2). Despite some fluctuations in a minority of treatments, the general tendency was of relatively constant NNI values for all treatments. There were generally consistent and clear differences in NNI

between the N1, N2 and N3 treatments in each of the three pepper crops. In general, there were relatively small and consistent differences in NNI between the N3 and N4 treatments. The NNI values of the N4 and N5 treatments were generally very similar.

NNI values of the N1 and N2 treatments were mostly in the ranges of 0.47–0.88, and 0.68–0.99, respectively (Figure 2). Those of the N3 treatment were consistently close to 1.0, and those of the N4 and N5 treatments were generally 0.92–1.14.



**Figure 2.** NNI values throughout the (a) 2014, (b) 2016, and (c) 2017 pepper crops. Presented values are means ( $n=4$ )  $\pm$  standard error (SE). The horizontal dotted line represents NNI=1.0. Modified from de Souza et al. (2019). The use of chlorophyll meters to assess crop N status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. Sensors 19, 2949, published by MDPI and distributed as open access under the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

#### 6.4.2.2. Effect of N on integrated NNI values

For the integrated NNI (NNI<sub>i</sub>) values, there were the following significant differences (P < 0.05) between treatments for the duration of the crop and in each phenological stage, for each of the 2014, 2016 and 2017 pepper crops: N5 = N4 > N3 > N2 > N1 (Table 3). There were no significant differences (P < 0.05) in NNI<sub>i</sub> values between the N5 and N4 treatments.

**Table 3.** Integrated Nitrogen Nutrition Index NNI<sub>i</sub> values for each treatment for the complete crop and for phenological stage for the 2014, 2106 and 2017 crops. Different letters indicate significant differences (P < 0.05) between means in each crop year according to LSD. A summary of the significance of the N treatments in the ANOVA is presented, with highly significant differences indicated by P < 0.001 (\*\*\*). Values are means (n=4) ± standard error (SE).

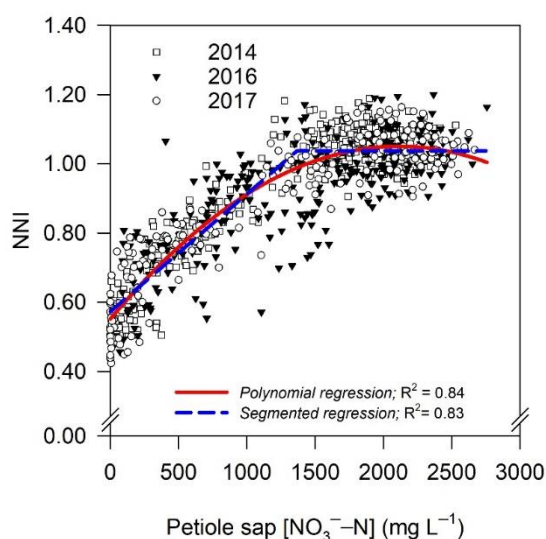
Crop	Treatment	Entire crop	Phenological Stage		
			Vegetative	Flowering and early fruit growth	Harvest
2014	N1 (Very N deficient)	0.60 ± 0.01 a	0.76 ± 0.02 a	0.56 ± 0.01 a	0.55 ± 0.02 a
	N2 (N deficient)	0.80 ± 0.01 b	0.90 ± 0.02 b	0.79 ± 0.01 b	0.76 ± 0.01 b
	N3 (Conventional)	1.02 ± 0.01 c	1.06 ± 0.02 c	1.04 ± 0.02 c	0.99 ± 0.00 c
	N4 (Excessive N)	1.07 ± 0.01 d	1.11 ± 0.02 d	1.10 ± 0.01 d	1.03 ± 0.01 d
	N5 (Very excessive N)	1.07 ± 0.00 d	1.10 ± 0.01 d	1.08 ± 0.01 d	1.03 ± 0.00 d
	<i>Significance</i>	***	***	***	***
2016	N1 (Very N deficient)	0.69 ± 0.02 a	0.62 ± 0.04 a	0.61 ± 0.04 a	0.75 ± 0.01 a
	N2 (N deficient)	0.89 ± 0.02 b	0.76 ± 0.04 b	0.85 ± 0.02 b	0.94 ± 0.01 b
	N3 (Conventional)	0.97 ± 0.02 c	0.84 ± 0.02 c	0.94 ± 0.02 c	1.02 ± 0.02 c
	N4 (Excessive N)	1.05 ± 0.02 d	0.94 ± 0.01 d	1.07 ± 0.03 d	1.07 ± 0.02 d
	N5 (Very excessive N)	1.04 ± 0.01 d	0.97 ± 0.02 d	1.08 ± 0.02 d	1.04 ± 0.01 cd
	<i>Significance</i>	***	***	***	***
2017	N1 (Very N deficient)	0.53 ± 0.01 a	0.60 ± 0.03 a	0.51 ± 0.01 a	0.50 ± 0.03 a
	N2 (N deficient)	0.76 ± 0.01 b	0.76 ± 0.03 b	0.74 ± 0.01 b	0.78 ± 0.01 b
	N3 (Conventional)	0.97 ± 0.01 c	0.89 ± 0.02 c	1.02 ± 0.01 c	0.97 ± 0.02 c
	N4 (Excessive N)	1.05 ± 0.01 d	1.00 ± 0.02 d	1.07 ± 0.01 d	1.05 ± 0.01 d
	N5 (Very excessive N)	1.06 ± 0.01 d	1.00 ± 0.01 d	1.09 ± 0.01 d	1.05 ± 0.02 d
	<i>Significance</i>	***	***	***	***

#### 6.4.3. Relationship between NNI and petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] for entire crop

Nitrogen nutrition index (NNI) was strongly related to petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] in the three pepper crops. Using pooled data from the duration of the three crops, the relationship between NNI and sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] was best described by (a) a polynomial regression of  $NNI = -1.10E - 07 \times Sap^2 + 0.000473 \times Sap + 0.5514$  with an R<sup>2</sup> of 0.84 (Figure 3; Table 4a), and (b) a segmented linear regression of  $NNI = 0.00034 \times Sap + 0.572$  (if  $Sap < Sap_0$ ) and  $NNI = 1.04$  (if  $Sap \geq Sap_0$ ) with an R<sup>2</sup> of 0.83 (Figure 3; Table 4b). In the segmented linear regression, the horizontal linear regression corresponds to the “maximum

NNI value”.

The sufficiency value for maximum DMP, derived from the polynomial equation that corresponded to an NNI value of 1.0, was 1441 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> (Figure 3; Table 4a). The sufficiency value for maximum DMP, determined as the intersection of the inclined linear and horizontal segments (*Sap*<sub>0</sub> in Figure 3), was 1367 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> (Figure 3; Table 4b). The sufficiency values for maximum DMP calculated using the two approaches were very similar, the difference being only 74 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>.



**Figure 3.** Relationship between N nutrition index (NNI) and petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] for pooled data from the three different pepper crops. The red line is the polynomial regression of  $NNI = -1.10E - 07 \times Sap^2 + 0.000473 \times Sap + 0.5514$  ( $R^2=0.84$ ) and the blue dotted lines are the linear segmented regression described by the sloped line of  $NNI = 0.00034 \times Sap + 0.572$  (if  $Sap < Sap_0$ ) and the horizontal line described by  $NNI = 1.04$  (if  $Sap \geq Sap_0$ ) ( $R^2=0.83$ ). The values are from five different N treatments with four replications from the 2014, 2016 and 2017 pepper crops ( $n=878$ );  $n$  is the number of data points.

For the duration of each of the three individual pepper crops, individual polynomial equations described the relationship between NNI and petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] with  $R^2$  values of 0.91, 0.66 and 0.89 for the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively (Table 4a). Using these three polynomial equations, sufficiency values for maximum DMP, estimated by solving for  $NNI=1.0$ , were 1256, 1706 and 1415 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> for the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively (Table 4a).

The segmented linear regression relationships derived between NNI and petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] had  $R^2$  values of 0.91, 0.64 and 0.88 for the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively (Table 4b). The sufficiency values for maximum DMP determined from the segmented linear regression analysis (*Sap*<sub>0</sub>), were 1278, 1875 and 1380 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> for



2014, 2016 and 2017, respectively. The maximum NNI values, corresponding to the horizontal line segment, were 1.05 for the 2014 crop, and 1.04 for the 2016 and 2017 crops (Table 4b).

The polynomial equations and the equations of the segmented linear regression analysis were similar for the duration of each of the three pepper crops, and for the pooled data set from the three pepper crops (Tables 4a and 4b). The DMP sufficiency values calculated, for each of the three pepper crop, using the polynomial equation and the segmented linear regression analysis were similar (Tables 4a and 4b). The differences between the sufficiency values determined using the two statistical approaches were 22, 169 and 35 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> for the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively.

There were very strong relationships between NNI and petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N], using either polynomial equations or segmented linear regression relationships (R<sup>2</sup> of 0.88–0.91; Tables 4a and 4b), in the 2014 and 2017 crops. For both types of relationship, the relationships were noticeably weaker in the 2016 crop (R<sup>2</sup> of 0.64–0.66; Tables 4a and 4b).

**Table 4 (a).** Polynomial regression analysis relating NNI to petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] for 2014 (*n*=359), 2016 (*n*=299) and 2017 (*n*=220) pepper crops, and using pooled data for the duration of the three crops (*n*=878); *n* is the number of data points. The fitted equations and coefficients of determination (R<sup>2</sup>) are shown. SE is standard error of the estimation. The values of petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] (mg L<sup>-1</sup>) that correspond to NNI values of 1.0 are presented.

Crop year	Polynomial equation	Petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] (mg L <sup>-1</sup> ) for NNI=1.0	R <sup>2</sup>	SE
2014	NNI = -1.50E-07 × <i>Sap</i> <sup>2</sup> + 0.000567 × <i>Sap</i> + 0.5248	1256	0.91	0.06
2016	NNI = -6.60E-08 × <i>Sap</i> <sup>2</sup> + 0.000340 × <i>Sap</i> + 0.6109	1706	0.66	0.09
2017	NNI = -1.10E-07 × <i>Sap</i> <sup>2</sup> + 0.000475 × <i>Sap</i> + 0.5469	1415	0.89	0.07
Combined crops	NNI = -1.10E-07 × <i>Sap</i> <sup>2</sup> + 0.000473 × <i>Sap</i> + 0.5514	1441	0.84	0.08

**Table 4 (b).** Segmented linear regression analysis relating NNI to petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] for 2014 (*n*=359), 2016 (*n*=299) and 2017 (*n*=220) pepper crops, and using pooled data for the duration of the three crops (*n*=878); *n* is the number of data points. The fitted equations and coefficients of determination (R<sup>2</sup>) are shown. SE is standard error of the estimation. The two linear equations of the segmented analysis are presented as (i) the sloped equation and (ii) the horizontal equation, which is presented as the maximum NNI value. The values of petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] (mg L<sup>-1</sup>) that correspond to *Sap*<sub>0</sub>, which is the petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] value associated with the maximum NNI value, are presented.

Crop year	Inclined linear equation of segmented linear regression	Maximum NNI value	<i>Sap</i> <sub>0</sub> value (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	SE
2014	NNI = 0.00039 × <i>Sap</i> + 0.551	1.05	1278	0.91	0.06
2016	NNI = 0.00020 × <i>Sap</i> + 0.660	1.04	1875	0.64	0.09
2017	NNI = 0.00035 × <i>Sap</i> + 0.561	1.04	1380	0.88	0.07
Combined crops	NNI = 0.00034 × <i>Sap</i> + 0.572	1.04	1367	0.83	0.08

---

#### 6.4.4. Relationships between NNI and petiole sap $[NO_3^- - N]$ , and derivation of sufficiency values, for each phenological stage

Polynomial equations and segmented linear regression equations were derived for each of the three phenological stages of vegetative, flowering and early fruit growth, and harvest, using pooled data, for each phenological stage, of the 2014, 2016 and 2017 crops (Tables 5a and 5b). For the polynomial equations for the vegetative, flowering and early fruit growth, and harvest stages, using pooled data from the three crops, the  $R^2$  values were 0.66, 0.89, 0.86, respectively (Table 5a). For the segmented regression analyses, the respective  $R^2$  values were 0.67, 0.88 and 0.86 (Table 5b).

Sufficiency values for maximum DMP were derived for the three phenological stages using the pooled data set from the three crops. Sufficiency values corresponding to NNI values of one, derived from the polynomial equations, were 1747, 1327 and 1403 mg  $NO_3^- - N L^{-1}$  for the vegetative, flowering and early fruit growth and harvest stages, respectively (Table 5a). Using the segmented linear regression analysis, the sufficiency values (i.e.  $Sap_0$  values) were 1817, 1335 and 1230 mg  $NO_3^- - N L^{-1}$  for the vegetative, flowering and early fruit growth, and harvest stages, respectively (Table 5b). The maximum NNI values were 1.03–1.05 (Table 5b).

The estimated sufficiency values for maximum DMP for each phenological stage, calculated with the two different approaches were very similar (Tables 5a and 5b). The differences between equivalent sufficiency values calculated with the two methods were 70, 8 and 173 mg  $NO_3^- - N L^{-1}$  for the vegetative, flowering and early fruit growth and harvest stages, respectively. Using both approaches, the sufficiency values for the vegetative stage were appreciably higher than the other two stages, which were very similar to one another (Tables 5a and 5b).

**Table 5 (a).** Polynomial regression analysis relating NNI to petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] for vegetative (*n*=139), flowering and early fruit growth (*n*=320) and harvest (*n*=419) stages using combined data from the 2014, 2016, and 2017 pepper crops; *n* is the number of data points. The fitted equations and coefficients of determination (R<sup>2</sup>) are shown. SE is the standard error of the estimation. The values of petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] (mg L<sup>-1</sup>) that correspond to NNI values of 1.0 are presented.

Phenological stage	Polynomial equation	Petiole sap [NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] (mg L <sup>-1</sup> ) for NNI=1.0	R <sup>2</sup>	SE
Vegetative	$NNI = -5.90E-08 \times Sap^2 + 0.000333 \times Sap + 0.5992$	1747	0.66	0.09
Flowering and early fruit growth	$NNI = -1.20E-07 \times Sap^2 + 0.000504 \times Sap + 0.5435$	1327	0.89	0.07
Harvest	$NNI = -1.24E-07 \times Sap^2 + 0.000498 \times Sap + 0.5452$	1403	0.86	0.07

**Table 5 (b).** Segmented linear regression analysis relating NNI to petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] for vegetative (*n*=139), flowering and early fruit growth (*n*=320) and harvest (*n*=419) stages using combined data from the 2014, 2016, and 2017 pepper crops; *n* is the number of data points. The fitted equations and coefficients of determination (R<sup>2</sup>) are shown. SE is the standard error of the estimation. The two linear equations of the segmented analysis are presented as (i) the sloped equation, and (ii) the horizontal equation, which is presented as the maximum NNI value. The values of petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] (mg L<sup>-1</sup>) that correspond to maximum NNI (i.e. *Sap*<sub>0</sub> value) are presented.

Phenological stage	Inclined linear equation of segmented linear regression	Maximum NNI value	<i>Sap</i> <sub>0</sub> value (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	SE
Vegetative	$NNI = 0.00022 \times Sap + 0.630$	1.03	1817	0.67	0.09
Flowering and early fruit growth	$NNI = 0.00037 \times Sap + 0.560$	1.05	1335	0.88	0.07
Harvest	$NNI = 0.00038 \times Sap + 0.559$	1.03	1230	0.86	0.07

---

## 6.5. Discussion

### 6.5.1. Petiole sap $[NO_3^- - N]$ during the crop

In general, in each of the three sweet pepper crops, petiole sap  $[NO_3^- - N]$  for a given treatment, remained relatively constant throughout the crop. In some cases, during the first 40–60 DAT there were fluctuations attributable to the establishment of the N treatments. Relative constancy of petiole sap  $[NO_3^- - N]$  throughout the duration of a crop has been observed with greenhouse-grown pepper (Magán et al., 2019), tomato (Peña-Fleitas et al., 2015), and muskmelon (Peña-Fleitas et al., 2015) crops, and in open field tomato (Farneselli et al., 2010), that all received frequent N addition (at least every week) through combined fertigation and drip irrigation.

Numerous studies have reported on-going reductions in petiole sap  $[NO_3^- - N]$  during vegetable crops e.g. in cabbage, onion, carrot (Westerveld et al., 2004) and during potato crops (Vitosh and Silva, 1996; Zhang et al., 1996). The recommended petiole sap  $[NO_3^- - N]$  values for numerous vegetable species declined with on-going phenological development (Hochmuth, 1994, 2012).

Generally, in studies where petiole sap  $[NO_3^- - N]$  declined during the crop, there were a small number (e.g. 2–3) of N fertilizer applications; commonly, a pre-plant application and 1–2 sidedress applications (Vitosh and Silva, 1996; Westerveld et al., 2004). In these studies, an appreciable portion of the fertilizer N was applied prior to planting. In the current study, for the conventional N treatments (N3) that supplied sufficient N, there were 72, 108, and 94 separate N fertilizer applications throughout the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively. The respective average amounts and ranges of N applied in each application were 7.1 (1.9–21.1), 5.2 (1.2–11.9), and 5.6 (0.6–18.1) kg N ha<sup>-1</sup>. In the 2014, 2016 and 2017 crops, 83, 99 and 94%, respectively, of the individual N applications each supplied <10 kg N ha<sup>-1</sup>. The larger N applications were generally because of larger nutrient solution applications to control soil salinity as described in section 6.3.2.

It appears that very frequent small applications of N (mostly <10 kg N ha<sup>-1</sup>, every 1–4 days) through combined fertigation and drip irrigation systems contribute to relatively constant petiole sap  $[NO_3^- - N]$  throughout the crop. The application of N throughout each crop was very strongly related to dry matter production. The relationship between cumulative N addition (kg N ha<sup>-1</sup>) and cumulative dry matter production (t ha<sup>-1</sup>), throughout the three crops, considered together, was described by the linear regression equation  $y = 39.6x + 37.2$  with  $R^2=0.93$ .

Hochmuth (1994) reported that petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  of greenhouse crops tended to decrease less when compared to crops grown in open field conditions. The indeterminate growth of many greenhouse-grown vegetable crops, with the constant growth of new shoot material may be a contributing factor to the relatively constant petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  values observed with greenhouse-grown vegetable crops.

#### *6.5.2. Relationship of petiole sap $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ to crop NNI*

The strong asymptotic relationships between petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  and NNI, for pooled data from throughout the three sweet pepper crops, and throughout each of the three crops considered separately, were described by either polynomial or segmented linear regression equations. A very small number of previous studies have established linear relationships between petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  and NNI (Bélanger et al., 2003; Peña-Fleitas et al., 2015). Peña-Fleitas et al., (2015) obtained  $R^2$  values of 0.77 for combined data of three tomato crops, and also for a muskmelon crop. Bélanger et al., (2003) obtained  $R^2$  values of 0.29–0.62 for three different periods of two potato cultivars. Other studies have reported that petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  was strongly related to apparent crop N status in various vegetable species such as broccoli (Villeneuve et al., 2002), potato (Poljak et al., 2008), cauliflower (Kubota et al., 1996), and processing tomato (Farneselli et al., 2010).

The steep linear relationships between petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  and NNI at NNI values of  $<1$  indicated that petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  is a sensitive measure of crop N deficiency in sweet pepper. The plateau response at NNI values close to 1.0 demonstrated that sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  continued to accumulate, with increasing N supply, even though there was very limited luxury uptake of N (Rodríguez et al., 2020a). This suggests that maximum values of a sufficiency range could be identified, above which petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  could be used to identify excessive N supply. It appears that the relationships between NNI and petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  are asymptotic in species with little luxury N uptake, and that relationships may be linear where luxury N uptake occurs (e.g. Peña-Fleitas et al., 2015). There appears to be variation between vegetable species in the occurrence and degree of luxury N uptake (Rahn et al., 2010; Thompson et al., 2017b).

For both the polynomial and segmented linear analyses, the equation coefficients and  $R^2$  values were very similar both for the flowering and early fruit growth stage, and for the harvest stage. The  $R^2$  values for both types of analysis in these two stages were very high, being 0.88–0.91. In contrast, for the earlier vegetative stage, the equation coefficients were notably different, and the  $R^2$  values were clearly lower. These differences, between the earlier vegetative stage and the two later phenological stages, are likely due to the relatively

large fluctuations in petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  during the earlier vegetative stage, when the N treatments were being established. The equation coefficients for the flowering and early fruit growth stage and for the harvest stage, for the three crops considered together, were very similar to the equivalent values for the duration of the 2014 and 2017 crops, for each type of equation. The similarity of the equation coefficients and the  $R^2$  values for these two phenological phases, and for the 2014 and 2017 crops, demonstrates the strength and consistency of these relationships throughout the crops and between different crops.

### 6.5.3. Petiole sap $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ sufficiency values

Using the polynomial relationship for the duration of the crop cycle of the three crops considered together, a sufficiency value of 1441 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  was derived for a  $\text{NNI}=1.0$ , that is the minimum petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  for maximum dry matter production. Using the segmented linear regression relationship, the sufficiency value was 1367 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ , which corresponded to the maximum  $\text{NNI}$  value of 1.04 for the duration of the crop cycle. Using both types of equations, the sufficiency values derived for the duration of the individual 2014 and 2017 crops were very similar. The complete crop cycle sufficiency values derived for the individual 2016 crop, using both approaches were notably higher being 1706 and 1875 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ . The appreciably lower  $R^2$  values for the 2016 crop, and the clear differences in equation coefficients, compared to both the 2014 and 2017 crops, suggest that the equations and whole crop sufficiency values of the 2016 crop were anomalous. Considering these observations, a rounded-off sufficiency value, for growth (i.e. maximum dry matter production), of 1400 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  is proposed for greenhouse-grown sweet pepper in SE Spain. This sufficiency value may be applicable for the greenhouse-grown sweet pepper throughout the Mediterranean Basin; however, validation is recommended for use outside of SE Spain.

This proposed whole crop sufficiency value is consistent with the sufficiency values reported by Hochmuth (1994, 2012) for outdoor pepper of 1400–1600 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  for the first two stages of first flower buds and first open flowers. However, as previously stated, the sufficiency values proposed by Hochmuth (1994, 2012) declined as the crop developed.

Using polynomial and segmented linear regression analysis, the sufficiency values derived for the combined flowering and early fruit growth stage were 1327 mg and 1335 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ , and for the harvest stage were 1403 and 1230 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ . These values are very similar to proposed whole crop sufficiency value of 1400 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ , confirming the constancy of the sufficiency value throughout the crop. As previously

explained, the vegetative stage was anomalous because of the establishment of the N treatments. The proposed sufficiency value derived in the current study is for dry matter production, i.e. growth. Further work is required to determine whether this value also applies to yield.

#### *6.5.4. General observations*

Possible effects of different cropping systems and of cultivar will need to be considered when using petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  as a management tool. Peña-Fleitas et al. (2015) described the relationship of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  to NNI, and the derived sufficiency value, being very similar for two different types of tomato grown in different conditions. Future work is required to examine how factors such as crop type and cultivar, production system and location affect the relationships and suggested sufficiency value reported here for sweet pepper.

### **6.6. Conclusions**

The strong relationship between petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  and NNI suggests that petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  can be used to improve N management of greenhouse-grown sweet pepper. In each N treatment of the three pepper crops, which received frequent N application, petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  was relatively constant throughout the crops. Using the pooled data from the three cropping cycles, a sufficiency value for maximum crop growth of  $1400 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  was derived for an entire crop. For two of the three different phenological stages (for the flowering and early fruit growth stage, and the harvest stage) the derived sufficiency values were similar to the derived sufficiency value for the duration of the crop. This sufficiency value can be a guide to vegetable growers and advisors to achieve optimal N fertilization. However, in each region and cropping system, verification is recommended. Petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  analysis is a practical and effective tool to assess crop N status of sweet pepper grown in greenhouses.

### **6.7. References**

- Anonymous., 1991. Council directive 91/676/EEC concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. Off. J. Eur. Commun. L375, 1–8.
- Bélangier, G., Walsh, J.R., Richards, J.E., Milburn, P.H., Ziadi, N., 2003. Critical Petiole Nitrate Concentration of Two Processing Potato Cultivars in Eastern Canada. *Am. J. Potato Res.* 80, 251–262. <https://doi.org/10.1007/BF02855361>
- BOJA., 2015. Orden de 1 de junio de 2015, por la que se aprueba el programa de actuación aplicable en las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos de fuentes agrarias designadas en Andalucía. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. N°111. (In Spanish)



- 
- | [WWW | Document]. | URL |
|------|------------|-----|
|------|------------|-----|
- <https://www.juntadeandalucia.es/boja/2015/111/index.html> (accessed 10.22.20).
- de Souza, R., Peña-Fleitas, M.T., Thompson, R.B., Gallardo, M., Grasso, R., Padilla, F.M., 2019. The Use of Chlorophyll Meters to Assess Crop N Status and Derivation of Sufficiency Values for Sweet Pepper. *Sensors*. 19, 2949. <https://doi.org/10.3390/s19132949>
- Farneselli, M., Benincasa, P., Tei, F., 2010. Validation of N Nutritional Status Tools for Processing Tomato. *Acta Hortic.* 852, 227–232. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.852.27>
- Farneselli, M., Tei, F., Simonne, E., 2014. Reliability of Petiole Sap Test for N Nutritional Status Assessing in Processing Tomato. *J. Plant Nutr.* 37, 270–278. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.859696>
- Gallardo, M., Thompson, R.B., López-Toral, J.R., Fernández, M.D., Granados, R., 2006. Effect of Applied N Concentration in a Fertigated Vegetable Crop on Soil Solution Nitrate and Nitrate Leaching Loss. *Acta Hortic.* 700, 221–224. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.700.37>
- García, M.C., Céspedes, A.J., Pérez, J.J., Lorenzo, P., 2016. El sistema de la producción hortícola protegido de la provincia de Almería. IFAPA, Almería, España. (In Spanish).
- Gázquez, J.C., Pérez, C., Meca, D.E., Segura, M.D., Domene, M.A., De La Cruz, E., López, J.C., Buendía, D., 2017. Comparative study of tomato production strategies for long-cycle crop in enarenado and for inter-planting in different substrates systems in the Mediterranean area. *Acta Hortic.* 1170, 773–776. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.98>
- Goffart, J.P., Olivier, M., Frankinet, M., 2008. Potato Crop Nitrogen Status Assessment to Improve N Fertilization Management and Efficiency: Past-Present-Future. *Potato Res.* 51, 355–383. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9118-x>
- Granados, M.R., Thompson, R.B., Fernández, M.D., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., 2013. Prescriptive-corrective nitrogen and irrigation management of fertigated and drip-irrigated vegetable crops using modeling and monitoring approaches. *Agric. Water Manag.* 119, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.12.014>
- Greenwood, D.J., Lemaire, G., Gosse, G., Cruz, P., Draycott, A., Neeteson, J.J., 1990. Decline in Percentage N of C3 and C4 Crops with Increasing Plant Mass. *Ann. Bot.* 66, 425–436. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088044>
- Hochmuth, G.J., 1994. Efficiency Ranges for Nitrate-nitrogen and Potassium for Vegetable Petiole Sap Quick Tests. *Horttechnology* 4, 218–222. <https://doi.org/10.21273/horttech.4.3.218>
- Hochmuth, G., 2012. Plant Petiole Sap-Testing For Vegetable Crops. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/CV/CV00400.pdf>.
-

- Jadoski, S., Thompson, R.B., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., 2013. Regional N balance for an intensive vegetable production system in South-Eastern Spain, in: Fontana, E., Grignani, C., Nicola, S. (Ed.), Book of Abstracts, International Workshop on Nitrogen, Environment and Vegetables. NEV 2013, Turín, Italy, 15-17 April. pp. 50–51.
- Junta de Andalucía., 2019a. Cartografía de invernaderos en Almería, Granada y Málaga. (In Spanish) [WWW Document]. URL [https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Cartografia\\_inv\\_AL\\_GR\\_MA\\_180725.pdf](https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/Cartografia_inv_AL_GR_MA_180725.pdf) (accessed 5.13.20).
- Junta de Andalucía, 2019b. Síntesis de la campaña de Hortícolas protegidos de Almería. Campaña 2018/19. Observatorio de precios y mercados. Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Almería, España. (In Spanish). [WWW Document]. URL <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?action=RecordContent&table=11030&element=2233136&ec=subsector&subsector=20&CODTIPOESTUDIO=1> (accessed 5.13.20).
- Kubota, A., Thompson, T.L., Doerge, T.A., Godin, R.E., 1996. A Petiole Sap Nitrate Test for Cauliflower. *HortScience* 31, 934–937. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.31.6.934>
- Lemaire, G., Jeuffroy, M.H., Gastal, F., 2008. Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. Theory and practices for crop N management. *Eur. J. Agron.* 28, 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.01.005>
- Magán, J.J., Gallardo, M., Fernández, M.D., García, M.L., Granados, M.R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2019. Showcasing a fertigation management strategy for increasing water and nitrogen use efficiency in soil-grown vegetable crops in the FERTINNOWA project. *Acta Hort.* 1253, 17–24. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1253.3>
- Majić, A., Poljak, M., Sabljo, A., Knezović, Z., Horvat, T., 2008. Efficiency of use of chlorophyll meter and cardy-ion meter in potato nitrogen nutrition supply. VII. *Alps-Adria Sci. Work.* 36, 1431–1434.
- Olfs, H.W., Blankenau, K., Brentrup, F., Jasper, J., Link, A., Lammel, J., 2005. Soil- and plant-based nitrogen-fertilizer recommendations in arable farming. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 414–431. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520526>
- Olsen, J.K., Lyons, D.J., 1994. Petiole sap nitrate is better than total nitrogen in dried leaf for indicating nitrogen status and yield responsiveness of capsicum in subtropical Australia. *Aust. J. Exp. Agric.* 34, 835–843. <https://doi.org/10.1071/EA9940835>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2014. Evaluation of optical sensor measurements of canopy reflectance and of leaf flavonols and chlorophyll contents to assess crop nitrogen status of muskmelon. *Eur. J. Agron.* 58, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.04.006>
- Pardossi, A., Tognoni, F., Incrocci, L., 2004. Mediterranean Greenhouse Technology. *Chron. Horticult.* 44, 28–34.

- 
- Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., Farneselli, M., Padilla, F.M., 2015. Assessing crop N status of fertigated vegetable crops using plant and soil monitoring techniques. *Ann. Appl. Biol.* 167, 387–405. <https://doi.org/10.1111/aab.12235>
- Poljak, M., Horvat, T., Majić, A., Pospišil, A., Ćosić, T., 2008. Nitrogen Management for potatoes by Using Rapid Test Methods. *Cereal Res. Commun. Suppl. Proc. VII. Alps-Adria Sci. Work.* 36, 1395–2094.
- Pulido-Bosch, A., Rigol-Sanchez, J.P., Vallejos, A., Andreu, J.M., Ceron, J.C., Molina-Sanchez, L., Sola, F., 2018. Impacts of agricultural irrigation on groundwater salinity. *Environ. Earth Sci.* 77, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12665-018-7386-6>
- Rahn, C.R., Zhang, K., Lillywhite, R., Ramos, C., Doltra, J., de Paz, J.M., Riley, H., Fink, M., Nendel, C., Thorup-Kristensen, K., Pedersen, A., Piro, F., Venezia, A., Firth, C., Schmutz, U., Rayns, F., Strohmeyer, K., 2010. Eu-Rotate\_N - a Decision Support System - to Predict Environmental and Economic Consequences of the Management of Nitrogen Fertiliser in Crop Rotations. *Eur. J. Hortic. Sci.* 75, 20–32.
- Rodríguez, A., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., de Souza, R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2020a. Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss. *Eur. J. Agron.* 117, 126046. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126046>
- Rodríguez, A., Peña-fleitas, M.T., Padilla, F.M., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2020b. Soil monitoring methods to assess immediately available soil N for fertigated sweet pepper. *Agronomy.* 10, 2000. <https://doi.org/10.3390/agronomy10122000>
- Soto, F., Gallardo, M., Giménez, C., Peña-Fleitas, T., Thompson, R.B., 2014. Simulation of tomato growth, water and N dynamics using the EU-Rotate\_N model in Mediterranean greenhouses with drip irrigation and fertigation. *Agric. Water Manag.* 132, 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.10.002>
- Soto, F., Gallardo, M., Thompson, R.B., Peña-Fleitas, M.T., Padilla, F.M., 2015. Consideration of total available N supply reduces N fertilizer requirement and potential for nitrate leaching loss in tomato production. *Agric. Ecosyst. Environ.* 200, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.10.022>
- Thompson, R.B., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., Giménez, C., Fernández, M.D., 2007. Identification of irrigation and N management practices that contribute to nitrate leaching loss from an intensive vegetable production system by use of a comprehensive survey. *Agric. Water Manag.* 89, 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2007.01.013>
- Thompson, R.B., Gallardo, M., Fernández-Fernández, M.D., 2013. Measurement of Nitrate Leaching in Commercial Vegetable Production in SE Spain, in: *Nitrogen, Environment and Vegetables, Proceedings of the NEV 2013, Turín, Italy, 15–17 April 2013*; Fontana, E., Grignani, C., Nicola, S., Eds.; Università Degli Studi Di Torino, 10095 Grugliasco (Turin), Italy; Pp. 67–69.
-

- Thompson, R.B., Incrocci, L., Voogt, W., Pardossi, A., Magán, J.J., 2017a. Sustainable irrigation and nitrogen management of fertigated vegetable crops. *Acta Hortic.* 363–378. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1150.52>
- Thompson, R.B., Tremblay, N., Fink, M., Gallardo, M., Padilla, F.M., 2017b. Tools and Strategies for Sustainable Nitrogen Fertilisation of Vegetable Crops, in: Tei, F., Nicola, S., Benincasa, P. (Ed.), *Advances in Research on Fertilization Management of Vegetable Crops*. Springer, Cham, Switzerland, pp. 11–63. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2_2)
- Thompson, R.B., Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., 2020a. Reducing nitrate leaching losses from vegetable production in Mediterranean greenhouses. *Acta Hortic.* 1268, 105–117. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1268.14>
- Thompson, R.B., Incrocci, L., van Ruijven, J., Massa, D., 2020b. Reducing contamination of water bodies from European vegetable production systems. *Agric. Water Manag.* 240, 106258. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106258>
- Valera, L.D., Belmonte, L.J., Molina, F.D., López, A., 2016. Greenhouse agriculture in Almeria. A comprehensive techno-economic analysis. *Cajamar Caja Rural, Almeria. Spain.*
- Villeneuve, S., Coulombe, J., Bélec, C., Tremblay, N., 2002. A Comparison of Sap Nitrate Test and Chlorophyll Meter for Nitrogen Status Diagnosis in Broccoli (*Brassica oleracea* L. spp. *italica*). *Acta Hortic.* 571, 171–177. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.571.20>
- Vitosh, M.L., Silva, G.H., 1996. Factors Affecting Potato Petiole Sap Nitrate Test. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27, 1137–1152. <https://doi.org/10.1080/00103629609369622>
- Westerveld, S.M., Mckeown, A.W., Scott-Dupree, C.D., McDonald, M.R., 2004. Assessment of chlorophyll and nitrate meters as field tissue nitrogen tests for cabbage, onions, and carrots. *Horttechnology* 14, 179–188. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.14.2.0179>
- Zhang, H., Smeal, D., Arnold, R.N., Gregory, E.J., 1996. Potato Nitrogen Management by Monitoring Petiole Nitrate Level. *J. Plant Nutr.* 19, 1405–1412. <https://doi.org/10.1080/01904169609365208>
- Ziadi, N., Bélanger, G., Claessens, A., Lefebvre, L., Tremblay, N., Cambouris, A.N., Nolin, M.C., Parent, L.-É., 2010. Plant-Based Diagnostic Tools for Evaluating Wheat Nitrogen Status. *Crop Sci.* 50, 2580–2590. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.01.0032>

## **7. CAPÍTULO CUATRO:**

---

**Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero**



## 7.1. Introducción

En la producción intensiva de hortalizas, es común aplicar cantidades de fertilizantes nitrogenados que exceden apreciablemente las necesidades de los cultivos (Ju et al., 2009; Min et al., 2011; Soto et al., 2015; Thompson et al., 2007). Las aplicaciones excesivas en la agricultura y horticultura del nitrógeno (N) mineral y las asociadas pérdidas al medio ambiente provocan varios problemas medio ambientales y a la salud humana (Di and Cameron, 2002; Grizzetti et al., 2011). Como se menciona en los capítulos anteriores, la pérdida de N más importante en sistemas de horticultura intensiva, por su impacto medio ambiental, es la lixiviación de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) que provocan la contaminación de los acuíferos y la eutrofización de las masas superficiales de aguas naturales (Thompson et al., 2020).

Como se menciona anteriormente, en los Capítulos 1 y 2 de esta tesis, aproximadamente 170,000 ha de invernaderos de plástico son usados para la producción hortícola intensiva en la Cuenca Mediterránea, donde el 90% de los cultivos se producen en suelo. De las cuales, 42,000 ha están concentradas en el sureste de España (Valera et al., 2016), estando 32,000 ha ubicadas en la provincia de Almería. Debido a la contaminación de  $\text{NO}_3^-$ , la mayoría de las áreas de Almería donde se concentran los invernaderos han sido declaradas por la Directiva de Nitratos (Anonymous., 1991) como “Zonas Vulnerables a Nitratos” (BOJA., 2015), lo que requiere la adopción de mejores prácticas de gestión del N para reducir la contaminación.

En el Capítulo 1 se menciona que las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  tienden a superar los 200 mg  $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$  en estas zonas, cuando el límite permitido es 50 mg  $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$  (Anonymous., 1991; BOJA., 2015). Dentro de los planes de actuación impuestos para minimizar las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  lixiviado, el manejo en el suministro de N y el riego deben cumplir las necesidades de los cultivos.

La implementación de herramientas que permitan optimizar las aplicaciones de N y evaluar el estado de N pueden ajustarse según el suministro de N y la demanda del cultivo. Dos métodos relativamente sencillos para monitorizar directamente las plantas de un cultivo son el análisis de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $[\text{NO}_3^-\text{-N}]$ ) en la savia del peciolo y la determinación de contenido de N en la hoja (%N) (Thompson et al., 2017). Con estos dos métodos el agricultor no requiere hacer una gran inversión, a diferencia de si se quisiera evaluar el estado del N de un cultivo con sensores ópticos (Thompson et al., 2017). Con el uso de equipos de medición rápida (Peña-Fleitas et al., 2021), se puede medir la  $[\text{NO}_3^-\text{-N}]$

en la savia del peciolo en la finca, inmediatamente después del muestreo. Para el análisis de N en hoja, es necesario enviar las muestras a un laboratorio analítico.

La medida del contenido de N en la hoja (%N) es un método tradicional de monitorización del análisis de la planta (Geraldson and Tyler, 1990; Hartz and Hochmuth, 1996). Es un método sensible que permite evaluar el estado del N en un cultivo (Peña-Fleitas et al., 2015), aunque es menos sensible a los cambios en la aplicación de N que las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia (Majić et al., 2008; Olsen and Lyons, 1994). Una ventaja que tiene el análisis de N en la hoja es que como es un método establecido hay muchos valores de referencia disponibles (Casas and Casas, 1999; Geraldson and Tyler, 1990; Hartz and Hochmuth, 1996).

El análisis de las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en el peciolo ha sido usado como un indicador sensible del estado de N en varias especies de cultivos vegetales (Farneselli et al., 2014; Hochmuth, 2012). El Capítulo 3 de este trabajo y Peña-Fleitas et al. (2015) sugieren que existe una consistente relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el Índice de Nutrición de N (Nitrogen Nutrition Index; NNI). El NNI es un efectivo y estable indicador del estado del N (Lemaire et al., 2008) que relaciona el contenido actual del N del cultivo con el contenido crítico de N (es decir, la concentración mínima de N que el cultivo requiere para un máximo crecimiento) (Greenwood et al., 1990).

Los valores de suficiencia de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia que están disponibles en la literatura científica y técnica son generales para diferentes especies de cultivos (Hochmuth, 2012, 1994). Estos valores de suficiencia absolutos fueron derivados para un cultivar específico de estas especies de cultivos. Pocos estudios han evaluado el efecto que pueden tener los diferentes cultivares sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo de una especie de cultivo. Algunos estudios en zanahoria (Westerveld et al., 2007) y patata (Goffart et al., 2008; Waterer, 1997) indicaron que las medidas en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia fueron afectadas por el cultivar (Bélanger et al., 2003). Además, los valores de suficiencia disponibles para el contenido de N en la hoja son específicos para un cultivo determinado (Geraldson and Tyler, 1990; Hartz and Hochmuth, 1996), sin considerar las posibles diferencias que pueden presentarse entre cultivares. Hay muy poca información sobre los efectos del cultivar sobre los valores de suficiencia.

En los invernaderos de Almería, cada año se siembran aproximadamente 5,000 ha, 2,000 ha y 12,000 ha de pepino, melón y pimiento respectivamente (Junta de Andalucía, 2020). En la producción comercial de cultivos hortícolas como el pepino (*Cucumis sativus* L.), melón (*Cucumis melo* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.), constantemente se están



introduciendo al mercado nuevos y mejorados cultivares. Por lo tanto, será útil saber si el cultivar influye en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y en el contenido de N en la hoja de estas especies de cultivos y si se requiere derivar valores de suficiencia específicas para cultivares individuales.

Los objetivos del presente trabajo para diferentes cultivares de pepino, melón y pimiento cultivados en suelo en invernadero fueron: (i) evaluar el efecto del cultivar en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo, (ii) evaluar el efecto del cultivar en el contenido de N en la hoja y (iii) determinar la relación de las medidas en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N).

## 7.2. Materiales y métodos

### 7.2.1. Sitio experimental

El trabajo experimental de los diferentes cultivares de pepino, melón y pimiento se realizaron en la Estación Experimental de la Universidad de Almería ubicada en Retamar al sureste de España (SE España, 36°51' N, 2°16' O, 92 msnm). Cada ciclo de cada cultivo se estableció en el mismo invernadero de plástico. Era un invernadero tipo multitúnel, con una estructura multicapa de acero galvanizado, con paredes de policarbonato y un techo trilaminado de polietileno de baja densidad de 200  $\mu\text{m}$  de espesor con una transmitancia a la radiación fotosintéticamente activa (Photosynthetically Active Radiation; PAR) del 60%. El invernadero tenía ventilación pasiva (dos paneles laterales y ventanas en el techo abatibles) y estaba orientado de este a oeste (Padilla et al., 2014).

Los cultivos crecieron en suelo, bajo condiciones muy similares a los de la producción comercial de hortalizas usada en la zona. El suelo del invernadero era un suelo "enarenado" típico de la región (Gázquez et al., 2017; Thompson et al., 2007), consta de una capa de 30 cm de suelo de textura franco limosa importada sobre un suelo franco original y una capa de 10 cm de grava fina (2 a 5 mm de diámetro) colocada como mantillo sobre el suelo importado. El invernadero fue construido en el año 2007, inmediatamente el suelo se preparó mezclando 5 cm de arena fina con 5 cm del suelo original franco limoso para mejorar la infiltración del suelo. Además, se incorporó 200  $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$  de estiércol de oveja mezclado en la capa superior del suelo franco importado, antes de colocar la capa de grava, todo esto según la práctica local establecida (Padilla et al., 2014; Soto et al., 2014). Algunas características físico-químicas más relevantes del suelo, a una profundidad de 0–10 cm fueron: pH de 8.2 (1:2.5, suelo:agua), densidad aparente de 1.2  $\text{Mg m}^{-3}$ , 0.2% de N total y 2.8% de C orgánico (Padilla et al., 2014; Soto et al., 2014). En todos los cultivos se usó riego por goteo que combinó el riego con la aplicación de los fertilizantes minerales (fertirriego).

En cada riego se aplicaron los nutrientes vía fertirriego cada 1–4 días según la demanda del cultivo, siendo más frecuente durante los periodos cálidos y menos durante los periodos más fríos.

La cinta de goteo se distribuyó en líneas pareadas, la separación entre líneas dentro de cada línea pareada fue de 0.8 m, y la distancia entre líneas pareadas adyacentes fue de 1.2 m, con 0.5 m entre los emisores de goteo, dando una densidad de 2 plantas m<sup>-2</sup>. Cada planta estaba inmediatamente adyacente a un emisor con una descarga de 3 L h<sup>-1</sup>. El coeficiente de uniformidad medido al inicio de cada cultivo fue >95%. En cada cultivo, el invernadero se dividió en 12 parcelas de 12 m (ancho) x 6 m (largo) cada una, con hileras del cultivo alineadas de norte a sur. Cada parcela tenía seis líneas pareadas, con 24 plantas por línea pareada y 144 plantas en total, asignando 48 plantas por cultivar. Entre las parcelas se enterraron láminas de film de polietileno (250 µm de espesor) a 30 cm de profundidad como barrera hidráulica (Padilla et al., 2016). El área del cultivo fue de 1327 m<sup>2</sup> incluyendo el área de los bordes.

#### *7.2.2. Cultivos y tratamientos experimentales*

Se llevaron a cabo tres experimentos en diferentes periodos. Cada experimento consistió en un cultivo, con tres cultivares y tres tratamientos, siendo pepino, melón y pimiento los tres cultivos. El cultivo de pepino se cultivó desde el 24 de abril hasta el 03 de julio del 2018, el cultivo de melón desde el 27 de febrero hasta el 11 de junio del 2020 y el cultivo de pimiento desde el 22 de julio del 2020 hasta el 28 de enero del 2021 (Tabla 1).

En cada cultivo, se dividió el área experimental en tres sectores de riego, cada uno con cuatro parcelas en un diseño de bloques al azar. Antes del trasplante, se aplicó abundantes volúmenes de riego para lixiviar las sales minerales residuales y homogenizar el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> residual y la conductividad eléctrica en el perfil del suelo entre los sectores.

Las plantas de pepino, melón y pimiento fueron trasplantadas a los 21, 37 y 35 días después de siembra, respectivamente. Las fechas de siembra y duración de los cultivos se presentan en la Tabla 1. Durante los primeros días después del trasplante (DDT), las plántulas de los tres cultivos fueron regadas con agua (<0.04 mmol N L<sup>-1</sup>) hasta que los diferentes tratamientos de N comenzaran a los 9, 0 y 6 DDT en el cultivo de pepino, melón y pimiento, respectivamente.

Los tres cultivares de pepino fueron tipo Holandés: ‘Strategos’ (Syngenta International AG, Basel, Switzerland), ‘Pradera’ (Rijk Zwaan Zaadteelt en Zaadhandel B.V., De Lier, The Netherlands) y ‘Mitre’ (Semillas Fitó, Barcelona, Spain). Los cultivares de melón fueron tipo

Cantaloupe: ‘Tezac’ (Séminis–Monsanto), ‘Magiar’ (Nunhems) y ‘Jacobo’ (Fitó). Dos cultivares de pimiento fueron tipo California: ‘Melchor’ (Zeraim) y ‘Machado’ (Hazera) y un cultivar de pimiento fue tipo Lamuyo: ‘CLX PLRJ731’ (De Ruitter). Durante este trabajo, Lamuyo ‘CLX PLRJ731’ será referido como un cultivar más.

Para cada uno de los cultivares de los diferentes cultivos, se aplicaron vía fertirriego tres tratamientos de diferentes concentraciones de N, que fueron aplicados durante el ciclo de los cultivos. Los tratamientos de N fueron: muy deficiente (N1), suficiente (N2) y excesivo (N3) (Tabla 1). Las cantidades totales de riego y N aplicadas se presentan en la tabla 1. El N mineral se aplicó principalmente como NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (el 92% de lo aplicado), el resto se aplicó como NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Los demás nutrientes se aplicaron en la solución nutritiva en concentraciones suficientes para garantizar que las plantas no estuvieran limitadas (Tabla Suplementaria 1).

**Tabla 1.** Información general de los cultivos de pepino, melón y pimiento y de los tratamientos de N. Se incluye la fecha de trasplante y duración del cultivo, la concentración de N aplicada en la solución nutritiva, la cantidad de N mineral aplicado y el riego total aplicado.

Cultivo	Fecha de trasplante	Fecha final (duración)	Tratamiento de N <sup>a</sup>	[N] en la solución nutritiva (mmol L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	N total aplicado (kg N ha <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Riego (mm) <sup>c</sup>
Pepino	24/04/2018	03/07/2018 (70 días)	N1	2.4	38	114
			N2	8.5	302	253
			N3	14.8	514	247
Melón	27/02/2020	11/06/2020 (105 días)	N1	2.7	65	173
			N2	8.3	309	265
			N3	14.0	542	276
Pimiento	22/07/2020	28/01/2021 (190 días)	N1	2.2	66	217
			N2	8.4	428	363
			N3	14.2	704	353

<sup>a</sup>N1: muy deficiente; N2: suficiente; N3 excesivo.

<sup>b</sup>Durante el periodo en el que se aplicaron los tratamientos de N.

<sup>c</sup>Durante todo el ciclo del cultivo.

Se programó el riego para mantener el potencial matricial del suelo en la zona radical, a 15 cm de profundidad, entre -10 y -30 kPa; se utilizó un tensiómetro (Irrometer, Co., Riverside, CA, EE. UU.) en cada parcela experimental. Las altas temperaturas dentro del invernadero se controlaron con el blanqueo de la cubierta plástica, aplicando suspensiones de CaCO<sub>3</sub>, reduciéndose la PAR a un 15–50%. En el pepino, el blanqueo se aplicó 4 días antes del trasplante, manteniéndolo durante todo el ciclo del cultivo, en el melón se aplicó a los

95 DDT y en el pimiento se aplicó 13 días antes del trasplante, retirándolo de la cubierta a los 54 DDT.

Los diferentes cultivos se manejaron siguiendo las prácticas locales. Las plantas de pepino fueron entutoradas apoyándolas en guías verticales con cuerda de nailon y siendo podadas periódicamente, iniciando las podas a los 24 DDT, con un total de 6 podas durante todo el ciclo, se despuntó el tallo principal de las plantas de pepino eliminando el brote apical a los 46 DDT. Las plantas de melón fueron entutoradas de igual forma que en el pepino, las podas iniciaron a los 17 DDT, con un total de 7 podas durante todo el ciclo y el despunte fue a los 54 DDT. En el pimiento, se usó un sistema de entutorado local conocido como “enfajado”, que consiste en colocar las cuerdas de nailon horizontalmente al costado del cultivo, a los 17 DDT se eliminaron las flores y frutos recién cuajados (aclareo) hasta la primera cruz del tallo, a los 104 DDT se realizó un deshojado hasta la altura de la primera cruz del tallo, favoreciendo la ventilación y reduciendo el ataque de enfermedades.

### *7.2.3. Medidas*

#### 7.2.3.1. Savia del peciolo

La concentración de nitrato ( $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ ) en la savia del peciolo se determinó cada semana en el cultivo de pepino y melón, y cada dos semanas en el cultivo de pimiento. Las medidas de savia comenzaron a los 22 DDT en el pepino, y a los 20 DDT en el melón y pimiento, continuando a lo largo del ciclo de los cultivos. Se realizaron 7, 9 y 10 muestreos en el pepino, melón y pimiento respectivamente. En cada muestreo se extrajo la última hoja completamente expandida de 8 plantas de cada parcela replicada en el pepino y melón, y de 12 plantas en el pimiento, entre las 08:00 y 09:00 h en cada fecha de muestreo.

Inmediatamente después del muestreo, los peciolos y las láminas foliares fueron separadas. Los peciolos fueron colocados en bolsas de plástico tipo zip, extrayendo el aire y colocándolos en una nevera refrigerada donde fueron transportadas al laboratorio de la Universidad de Almería (UAL) durante aproximadamente 20 min. En el laboratorio de la UAL, las muestras fueron almacenadas a 5°C. Los peciolos se cortaron en trozos de 1 cm de largo y fueron prensados inmediatamente con una prensa manual de ajos. Una parte del líquido extraído fue diluido, a un factor de dilución de 1:5 en el pepino y a 1:10 en el melón y pimiento. Las muestras diluidas fueron centrifugadas a 1900 g (4500 rpm) durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  fue medida con un analizador de flujo segmentado SAN++ (Skalar Analytical B.V., Breda, The Netherlands). El análisis se realizó dentro de las 6 h posteriores al muestreo de los peciolos.

### 7.2.3.2. Contenido de N en la hoja (%N)

En cada fecha de medición, la lámina foliar separada del peciolo de la sección anterior fue usada para determinar el contenido de N (%N). Se colocaron en bolsas de papel y fueron secadas en una estufa a 65°C hasta alcanzar el peso constante. El material seco se trituró secuencialmente con un molino de cuchillas y posteriormente con un molino de bolas (modelo MM-200, Retsch GmbH, Haan, Alemania). El contenido de N (%N) de cada muestra se determinó utilizando un sistema de analizador elemental (modelo Rapid N, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Alemania).

### 7.2.3.3. Producción de materia seca y producción total

En cada uno de los cultivos y para cada cultivar se determinó la producción de materia seca (Dry Matter Production; DMP) y la producción total de frutos. Estas medidas fueron determinadas para cada cultivar en cada parcela replicada de cada cultivo.

Para cada cultivar se recolectó todo el material retirado en cada poda durante el ciclo del cultivo de ocho plantas marcadas dentro de cada parcela replicada, se determinó el contenido de materia seca del material secando en una estufa a 65°C hasta alcanzar el peso constante. De las mismas ocho plantas marcadas utilizadas para recolectar el material podado, se cosecharon periódicamente los frutos. En el cultivo de pepino, las cosechas se realizaron cada 3–4 días, comenzando a los 45 DDT y se realizaron 8 cosechas. En el cultivo de melón se realizaron 2 cosechas, a los 96 y 104 DDT. En el cultivo de pimiento, las cosechas se realizaron cada 8–29 días, comenzando a los 98 DDT y se realizaron 6 cosechas en total. La producción total al final de cada cultivo para cada cultivar se calculó como la producción acumulada de todos los frutos recolectados de todas las cosechas, incluyendo los frutos que no se consideraron como comerciales debido a su tamaño o imperfecciones (Tabla 2).

Al final del cultivo, se midió la DMP removiendo dos plantas completas por parcela replicada y cultivar de las ocho plantas marcadas, separándolas en cada componente (es decir, hojas, tallos y frutos). Este contenido de materia seca se midió secando en la estufa a 65°C las muestras representativas de las hojas y tallos y una submuestra de aproximadamente el 20% del peso fresco de los frutos, todo, hasta peso constante. La DMP de cada cultivar al final de cada cultivo se determinó como la suma de la materia seca de las hojas, tallos y frutos, más todo el material podado previamente muestreado y de la fruta cosechada (Tabla 2).

**Tabla 2.** Producción total de materia seca (DMP) y producción total de frutos (PT; peso fresco) para cada cultivar de los diferentes cultivos de pepino, melón y pimiento.

Cultivo de pepino			Cultivo de melón			Cultivo de pimiento		
Cultivar	(t ha <sup>-1</sup> )		Cultivar	(t ha <sup>-1</sup> )		Cultivar	(t ha <sup>-1</sup> )	
	DMP	PT		DMP	PT		DMP	PT
'Strategos'			'Tezac'			'Melchor'		
N1	2.4	20	N1	6.6	54	N1	2.8	35
N2	5.6	79	N2	9.5	79	N2	6.4	74
N3	5.3	77	N3	11.3	83	N3	7.1	82
'Pradera'			'Magiar'			'Machado'		
N1	2.1	19	N1	5.3	39	N1	2.6	39
N2	5.3	79	N2	9.8	67	N2	6.1	83
N3	5.9	82	N3	11.6	77	N3	6.9	81
'Mitre'			'Jacobo'			Lamuyo		
N1	2.1	18	N1	6.6	36	N1	3.4	30
N2	5.7	86	N2	9.6	60	N2	6.3	92
N3	5.7	75	N3	10.6	62	N3	6.4	82

#### 7.2.3.4. Índice de nutrición de N (Nitrogen Nutrition Index; NNI)

La metodología usada para calcular el NNI y el resultado de la relación entre la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el NNI para los tres cultivares de pepino, melón y pimiento se presentan en el Anexo 1 (Sección 13).

#### 7.2.4. Análisis estadístico de datos

Como las medidas de savia y las medidas del contenido de N en la hoja se tomaron varias veces durante el ciclo del cultivo, se realizaron análisis de varianza de medidas repetidas en el tiempo (RM-ANOVA) para probar los efectos de los tratamientos de N, cultivares y el tiempo en las variables medidas. El RM-ANOVA se realizó tras la verificación de los supuestos de igualdad de varianza y normalidad. La prueba de LSD comparó múltiples medias cuando los efectos del tratamiento fueron significativos a  $P < 0.05$ . Las regresiones lineales entre el contenido de N en la hoja (%N) (variable dependiente) y las medidas de la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia (variable independiente) se evaluaron para cada cultivar y fecha de medida por separado.

Los resultados se indicaron como: ninguna diferencia significativa en  $P \geq 0.05$  (ns), significativa en  $P < 0.05$  (\*), muy significativa en  $P < 0.01$  (\*\*) y altamente significativa en  $P < 0.001$  (\*\*\*). Para el análisis estadístico del RM-ANOVA y para el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), la probabilidad ( $P$ -valor), la pendiente y la intersección de las

regresiones lineales se utilizó el software Statistica 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, EE. UU.).

### 7.3. Resultados

#### 7.3.1. Efecto de la concentración de N aplicado sobre la $[NO_3^- - N]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pepino

##### 7.3.1.1. Diferencias en la medida de la $[NO_3^- - N]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) entre cultivares de pepino

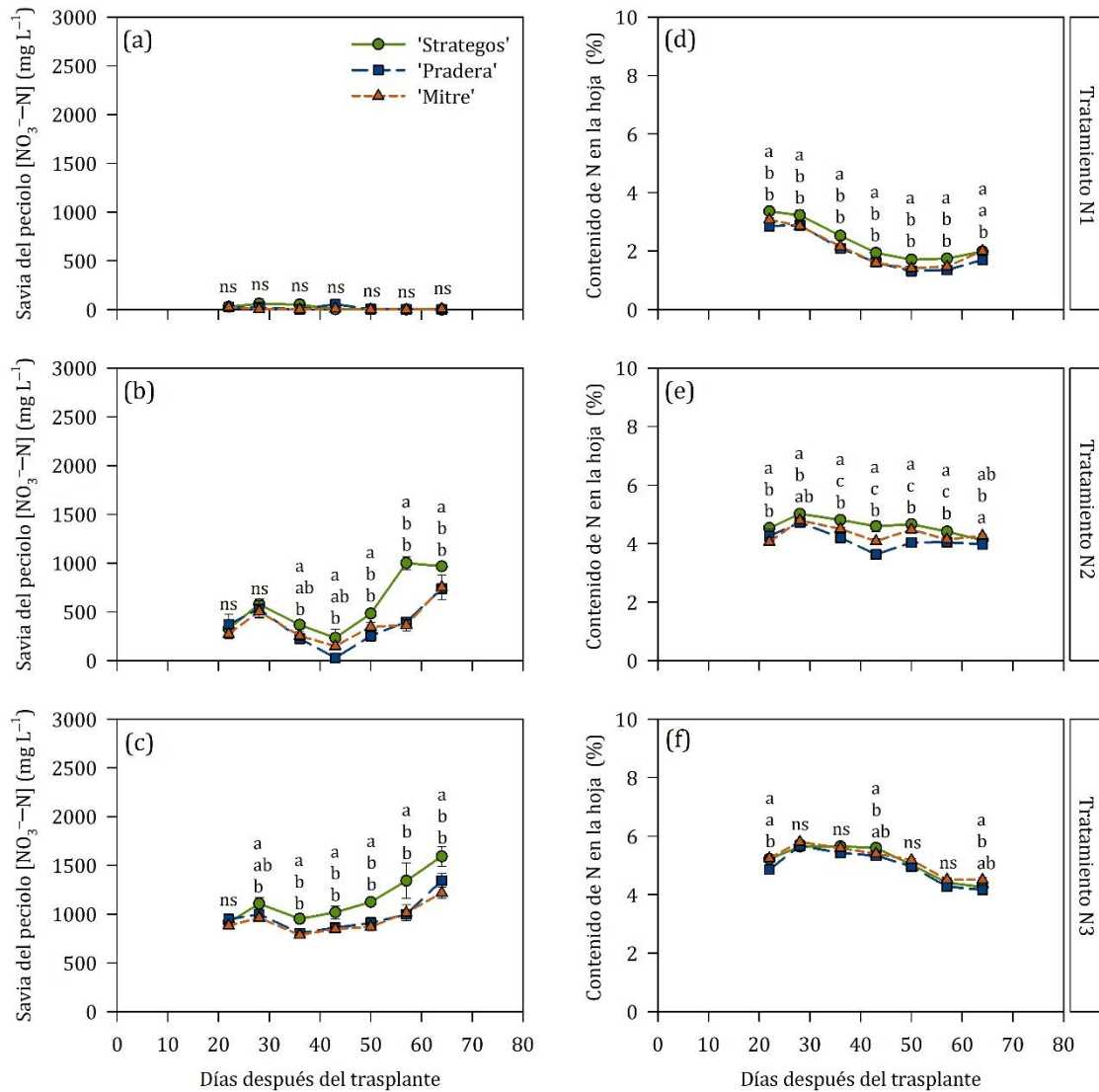
Durante el cultivo de pepino se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los cultivares ‘Strategos’, ‘Pradera’ y ‘Mitre’ en las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y en el contenido de N en la hoja (%) dependiendo del tratamiento de N y del tiempo (RM-ANOVA;  $T \times C \times N$ ,  $P < 0.05$ ) (Tabla 3; Figura 1).

**Tabla 3.** Resultados del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) que prueba el efecto del cultivar, los tratamientos con N y el tiempo en las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pepino. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad (P).

Efecto	g. l	$[NO_3^- - N]$ en la savia		Contenido de N en la hoja (%N)	
		F	P	F	P
Bloque	3	1.38	0.273	3.46	0.032
Cultivar (C)	2	24.15	<0.001	29.40	<0.001
Nitrógeno (N)	2	1068.06	<0.001	2441.02	<0.001
C × N	4	5.36	0.003	3.73	0.02
Error	24				
Tiempo (T)	6	85.26	<0.001	257.75	<0.001
T × C	12	5.62	<0.001	3.71	<0.001
T × N	12	26.89	<0.001	73.01	<0.001
T × C × N	24	2.70	<0.001	1.88	0.01
Error	144			3.46	

##### 7.3.1.2. La $[NO_3^- - N]$ en la savia del peciolo en pepino

La  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo fue afectada por los tratamientos de N en el cultivo de pepino en los cultivares ‘Strategos’, ‘Pradera’ y ‘Mitre’ (Figura 1 a, b, c; Tabla 4). Se presentaron consistentes diferencias entre los tratamientos N1, N2 y N3. La  $[NO_3^- - N]$  en la savia se mantuvo relativamente constante hasta los 50 DDT aproximadamente, principalmente en el tratamiento N3 (N excesivo) (Figura 1 c). El tratamiento N2 presentó algunas fluctuaciones en los valores a lo largo del ciclo, los tratamientos N2 y N3 presentaron una tendencia a incrementar hasta finalizar el ciclo (Figura 1 b, c).



**Figura 1.** Evolución de las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo (a, b, c) y del contenido de N en la hoja (%N) (d, e, f) de tres cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. Las figuras del contenido de N en la hoja (%N) (d, e, f) fueron modificadas de de Souza et al. (2020). Effect of cultivar on chlorophyll meter and canopy reflectance measurements in cucumber. Sensors 20: 509, publicado por MDPI y distribuido como acceso abierto (open access) bajo la licencia Creative Commons Attribution (CC BY).

En el tratamiento N1 las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia durante todo el ciclo del cultivo fueron cero o muy cercanas a cero, el máximo valor promedio de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia durante todo el ciclo del cultivo de los cultivares fue de  $21 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (Figura 1 a).

En el tratamiento N2, hasta los 28 DDT aproximadamente, los cultivares no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Después de esta fecha, a partir de 50 DDT el cultivar 'Strategos' tuvo significativamente más  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia que el cultivar 'Pradera' y 'Mitre' (Figura 1 b; Tabla 4). Los valores de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia



medidos en 'Pradera' y 'Mitre' fueron constantemente muy similares (Figura 1 b; Tabla 4). Los valores promedios en el tratamiento N2 durante el cultivo para los cultivares 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' fueron 565, 363 y 377 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 1 b). En el tratamiento N2, el valor promedio de 'Strategos' fue aproximadamente 36% y 33% más alto que 'Pradera' y 'Mitre' respectivamente.

En el tratamiento N3, el cultivar 'Strategos' tuvo significativamente más [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia que 'Mitre' desde los 28 DDT y que 'Pradera' y 'Mitre' desde los 36 DDT (Figura 1 c; Tabla 4). Los cultivares 'Pradera' y 'Mitre' no presentaron diferencias estadísticamente significativas durante todo el ciclo. Para todo el cultivo, los valores promedios de 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' (Figura 1 c) fueron 1150, 981 y 940 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>, respectivamente. En el tratamiento N3, el valor promedio de 'Strategos' fue aproximadamente 15% y 18% más alto que 'Pradera' y 'Mitre' respectivamente.

#### 7.3.1.3. El contenido de N en la hoja (%N) en pepino

El contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pepino en los cultivares 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' fue afectado por las diferentes concentraciones de N aplicadas (Figura 1 d, e, f; Tabla 4) en los tratamientos N1, N2 y N3. Se presentaron consistentes diferencias entre los cultivares en los días de medición realizados durante todo ciclo del cultivo. El contenido de N en la hoja disminuyó durante el ciclo del cultivo en el tratamiento N1 (Figura 1 d). En el tratamiento N2 y N3 el contenido de N en la hoja se mantuvo relativamente constante hasta los 50 DDT aproximadamente. Posteriormente, el contenido de N en la hoja mostró una ligera tendencia a disminuir hasta el final del cultivo (Figura 1 e, f).

En el tratamiento N1, el contenido de N en la hoja del cultivar 'Strategos' fue estadísticamente más alto que 'Pradera' y 'Mitre' durante todo el ciclo del cultivo (Figura 1 a; Tabla 4). Los valores de 'Pradera' y 'Mitre' fueron constantemente muy similares. En promedio, durante todo el ciclo del cultivo el contenido de N en la hoja de 'Strategos' fue 2.4%, superando a 'Pradera' y 'Mitre' en un 0.3% (Figura 1 d).

En el tratamiento N2, el contenido de N en la hoja de 'Strategos' fue significativamente más alto que 'Pradera' durante todo el ciclo del cultivo, 'Strategos' fue significativamente más alto que 'Mitre' en cuatro de los siete muestreos (Figura 1e, Tabla 4). 'Mitre' fue significativamente más alto que 'Pradera' en cuatro de los siete muestreos (Figura 1e, Tabla 4). Los valores promedios durante el ciclo del cultivo de 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' fueron 4.6, 4.1 y 4.3%, respectivamente (Figura 1e).

En el tratamiento N3, generalmente durante la mayoría del ciclo del cultivo, los cultivares no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de N en la hoja (Figura 1 f; Tabla 4).

**Tabla 4.** Resumen de la prueba LSD del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) evaluando las diferencias entre los cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') en las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Las celdas de color gris oscuro indican una diferencia estadísticamente significativa con los otros dos cultivares en esta fecha. Las celdas de color gris claro indican una diferencia estadísticamente significativa con uno de los otros dos cultivares en esta fecha.

Tratamiento y cultivares	$[NO_3^- - N]$ en la savia							Contenido de N en la hoja (%N)						
	<sup>1</sup> Días después de trasplante (DDT)													
	22	28	36	43	50	57	64	22	28	36	43	50	57	64
<b>N1</b>														
'Strategos'	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
'Pradera'	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b
'Mitre'	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b	b	b	a
<b>N2</b>														
'Strategos'	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ab
'Pradera'	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
'Mitre'	a	a	ab	ab	b	b	b	b	ab	c	c	a	b	a
<b>N3</b>														
'Strategos'	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ab
'Pradera'	a	ab	b	b	b	b	b	b	a	a	b	a	a	b
'Mitre'	a	b	b	b	b	b	b	a	a	a	ab	a	a	a

<sup>1</sup>Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre cultivares en cada tratamiento.

7.3.1.4. Relación entre la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y contenido de N en la hoja (%N) durante el ciclo del cultivo de pepino

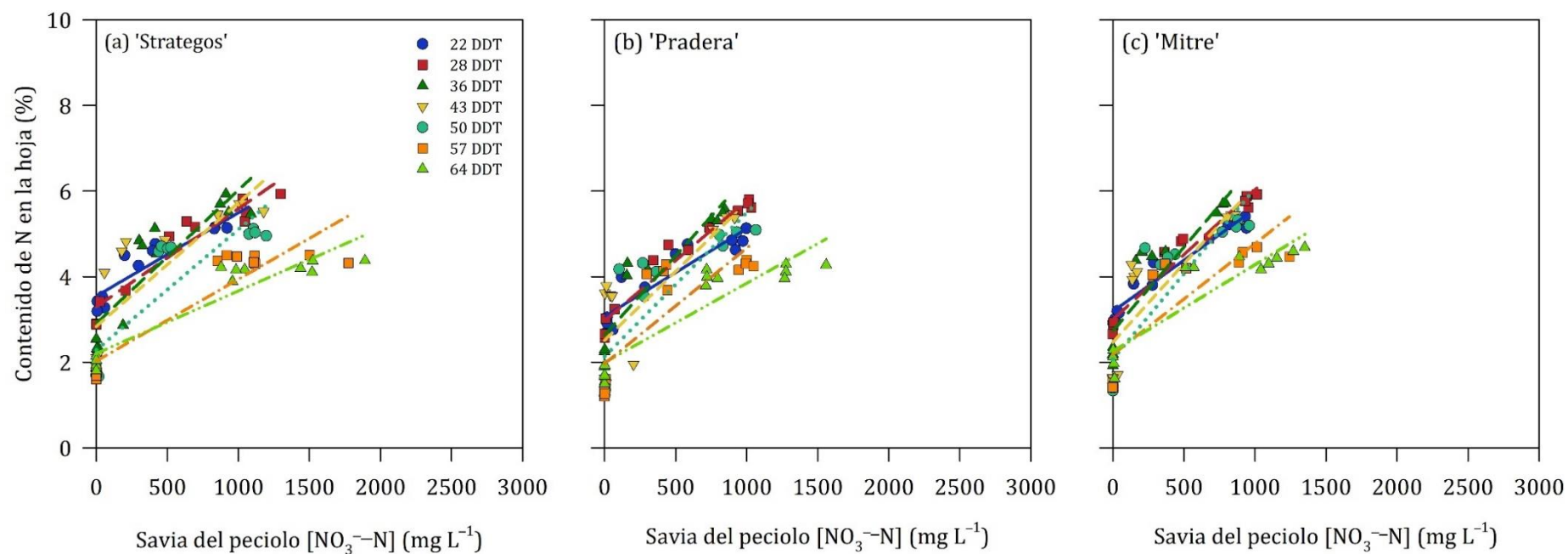
En los tres cultivares de pepino 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' se obtuvieron relaciones lineales entre la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja. Las relaciones lineales fueron altamente significativas ( $P < 0.001$ ) para cada día de medición en los tres cultivares, aunque 'Mitre' presentó diferencias estadísticamente muy significativas ( $P < 0.01$ ) en dos días de medición (Figura 2; Tabla 5).

El cultivar 'Strategos' tuvo una fuerte relación lineal en cada día de medición, presentando valores de  $R^2$  de 0.83–0.95 ( $P < 0.001$ ), excepto a los 36 DDT ( $R^2=0.78$ ;  $P < 0.001$ ) y a los 50 DDT ( $R^2=0.76$ ;  $P < 0.001$ ) (Figura 2 a; Tabla 5). El cultivar 'Pradera' presentó una fuerte relación lineal, con valores de  $R^2$  de 0.83–0.93 ( $P < 0.001$ ) en cada día de medición, excepto a los 43 DDT ( $R^2=0.68$ ;  $P < 0.001$ ), a los 50 DDT ( $R^2=0.71$ ;  $P < 0.001$ ) y

a los 57 DDT ( $R^2=0.69$ ;  $P < 0.001$ ) (Figura 2 b; Tabla 5). Por otro lado, en el cultivar 'Mitre', la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja tuvieron una fuerte relación lineal en cada día de medición, con valores de  $R^2$  de 0.77–0.96 ( $P < 0.001$ ), excepto a los 43 DDT ( $R^2=0.52$ ;  $P < 0.01$ ) y a los 57 DDT ( $R^2=0.67$ ;  $P < 0.01$ ) (Figura 2 c; Tabla 5).

Las pendientes de las relaciones lineales entre la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja de los cultivares 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' determinadas para cada día de medición mantienen una misma tendencia. Al principio del ciclo, hasta los 28 DDT la pendiente parece subir levemente con el tiempo entre 0.0019–0.0030 (Figura 2; Tabla 5). Cuando el cultivo tuvo un crecimiento foliar activo de tejido vegetal joven, entre los 36–50 DDT, las pendientes se mantuvieron relativamente constantes (0.0028–0.0040). Al finalizar el ciclo, después del despunte, las medidas se pudieron ver afectadas con una tendencia a disminuir ligeramente entre 0.0027–0.0015.

Los valores de la intersección para la relación entre la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja para los cultivares de pepino determinadas para cada día de medición tienden a disminuir de la misma forma en 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' desde 3.5% hasta 2.0% (Figura 2; Tabla 5).



**Figura 2.** Relaciones lineales entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) para cada fecha de muestreo en (a) 'Strategos', (b) 'Pradera' y (c) 'Mitre' con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y significancias son presentados en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo (variable  $x$ ) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable  $y$ ) para los cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') cultivados en invernadero para cada día de medición ( $n=12$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y significancias son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*) y muy significativo en  $P < 0.01$  (\*\*).

DDT	Cultivar					
	'Strategos'	$R^2$	'Pradera'	$R^2$	'Mitre'	$R^2$
22	$y = 0.0019x + 3.5$	0.87***	$y = 0.0021x + 3.1$	0.84***	$y = 0.0024x + 3.2$	0.94***
28	$y = 0.0023x + 3.3$	0.90***	$y = 0.0028x + 3.0$	0.95***	$y = 0.0030x + 3.0$	0.96***
36	$y = 0.0031x + 2.9$	0.78***	$y = 0.0037x + 2.6$	0.83***	$y = 0.0039x + 2.7$	0.82***
43	$y = 0.0029x + 2.8$	0.95***	$y = 0.0032x + 2.5$	0.68***	$y = 0.0034x + 2.8$	0.52**
50	$y = 0.0028x + 2.3$	0.76***	$y = 0.0034x + 2.1$	0.71***	$y = 0.0040x + 2.1$	0.77***
57	$y = 0.0019x + 2.0$	0.83***	$y = 0.0027x + 2.0$	0.69***	$y = 0.0026x + 2.2$	0.67**
64	$y = 0.0015x + 2.2$	0.86***	$y = 0.0018x + 2.0$	0.83***	$y = 0.0020x + 2.3$	0.84***

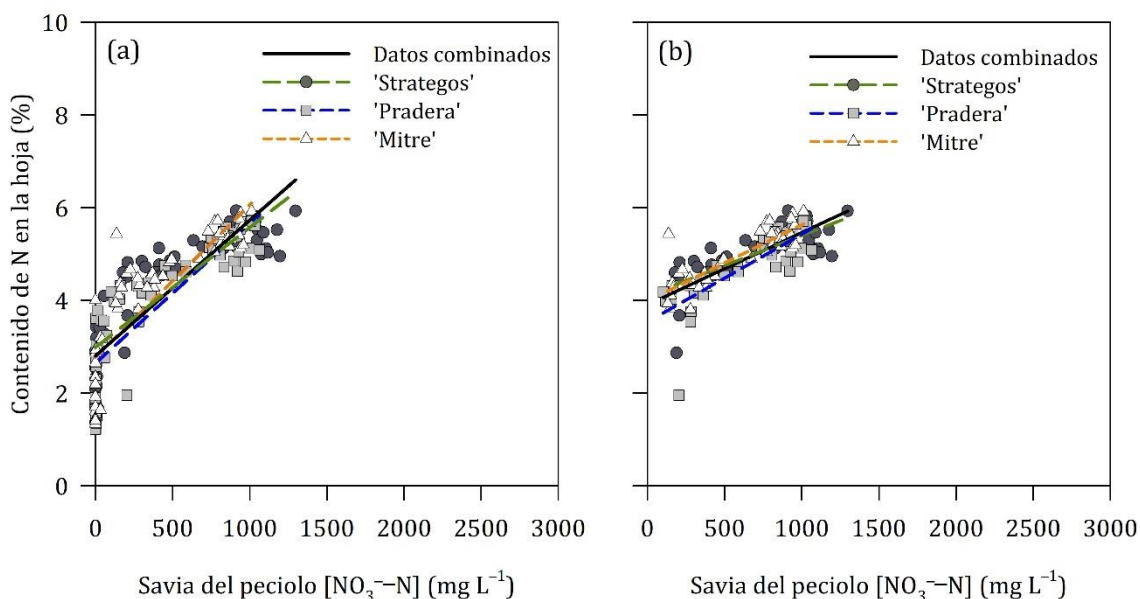
Para todo el ciclo de cada uno de los tres cultivares de pepino 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' se obtuvieron relaciones lineales altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (Tabla 6). Las relaciones lineales se determinaron para todo el conjunto de datos medidos durante todo el cultivo en cada uno de los tres cultivares de pepino, desde 22 DDT hasta 50 DDT (Figura 3 a; Tabla 6).

Las relaciones lineales presentadas para cada uno los tres cultivares a los 57 y 64 DDT fueron visiblemente diferentes a las fechas anteriores por las diferencias en la pendiente e intersección (Figura 2). Los datos de estos días de medición podrían no ser representativos por los cambios fisiológicos que podrían haber sufrido las plantas después del despunte y por la madurez del cultivo (Figura 2; Tabla 5), por tal motivo, han sido excluidos de los análisis adicionales de estas relaciones.

Por lo tanto, los cultivares 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' tuvieron una fuerte relación lineal entre la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja desde 22 DDT hasta 50 DDT, con valores de  $R^2$  de 0.71–0.74 ( $P < 0.001$ ) (Tabla 6). Durante este periodo, los valores de las pendientes (0.0026–0.0033) y de las intersecciones (2.6–3.0%) de las relaciones lineales en los cultivares 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' fueron muy similares (Figura 3 a; Tabla 6). Combinando todos los datos de los tres cultivares, se obtuvo una única relación lineal general para pepino con una pendiente de 0.0029 y una intersección de 2.8% ( $R^2=0.72$ ;  $P < 0.001$ ) para el ciclo del cultivo desde 22 DDT hasta 50 DDT (Tabla 6).

Como se menciona en la sección 7.3.1.2, el tratamiento N1 presentó valores de la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia de cero o muy cercanos a cero (Figura 1 a). Para mostrar una relación que considere medidas de la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo más representativas, se relacionó la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja considerando únicamente valores que fueran  $>100 \text{ mg NO}_3^- - \text{N L}^{-1}$  (Figura 3 b). Este análisis presentó relaciones lineales entre la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja con valores de  $R^2$  de 0.57–0.72 (Tabla 6), para el ciclo del cultivo desde 22 DDT hasta 50 DDT (Tabla 6). Durante este periodo, las pendientes de los cultivares 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' fueron 0.0013–0.0019 (Figura 3 b; Tabla 6) y los valores de las intersecciones fueron 4.1, 3.5 y 4.0% para 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre' respectivamente (Tabla 6). Combinando los tres cultivares de pepino y considerando solamente los valores  $>100 \text{ mg NO}_3^- - \text{N L}^{-1}$ , se obtuvo una ecuación lineal general con una pendiente de 0.0016 y una intersección de 3.9% ( $R^2=0.60$ ;  $P < 0.001$ ) para el ciclo del cultivo desde 22 DDT hasta 50 DDT (Tabla 6).

En general, las relaciones lineales entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja entre 22 y 50 DDT de cada una de los cultivares de pepino presentaron el mismo comportamiento. El incremento en el contenido de N en la hoja debido al incremento en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia del peciolo fue muy similar en cada cultivar. Sin embargo, se presentaron diferencias en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo entre los cultivares y diferencias en el contenido de N en la hoja medido entre los cultivares (Figura 3).



**Figura 3.** Relaciones lineales entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) usando (a) todas las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y (b) las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  con valores  $>100 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  durante el ciclo del cultivo desde 22 DDT hasta 50 DDT para los cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. La regresión lineal de todo el conjunto de datos de las medidas que combina los tres cultivares de pepino se muestra como una línea negra sólida, también se muestran las relaciones lineales para 'Strategos' (guion largo verde), 'Pradera' (guion mediano azul) y 'Mitre' (guion corto anaranjado). Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y el número del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo (variable  $x$ ) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable  $y$ ) para los cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') cultivados en invernadero considerando todos los datos de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  con valores  $>100 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  durante el ciclo del cultivo desde 22 DDT hasta 50 DDT. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y los números totales del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Cultivar	Todos los datos	$R^2$	$n$	$>100 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$	$R^2$	$n$
'Strategos'	$y = 0.0026x + 3.0$	0.71***	60	$y = 0.0013x + 4.1$	0.57***	41
'Pradera'	$y = 0.0030x + 2.6$	0.74***	60	$y = 0.0019x + 3.5$	0.64***	37
'Mitre'	$y = 0.0033x + 2.8$	0.73***	60	$y = 0.0016x + 4.0$	0.72***	39
Datos combinados	$y = 0.0029x + 2.8$	0.72***	180	$y = 0.0016x + 3.9$	0.60***	117



### 7.3.2. Efecto de la concentración de N aplicado sobre la $[NO_3^- - N]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de melón

#### 7.3.2.1. Diferencias en la medida de la $[NO_3^- - N]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) entre cultivares de melón

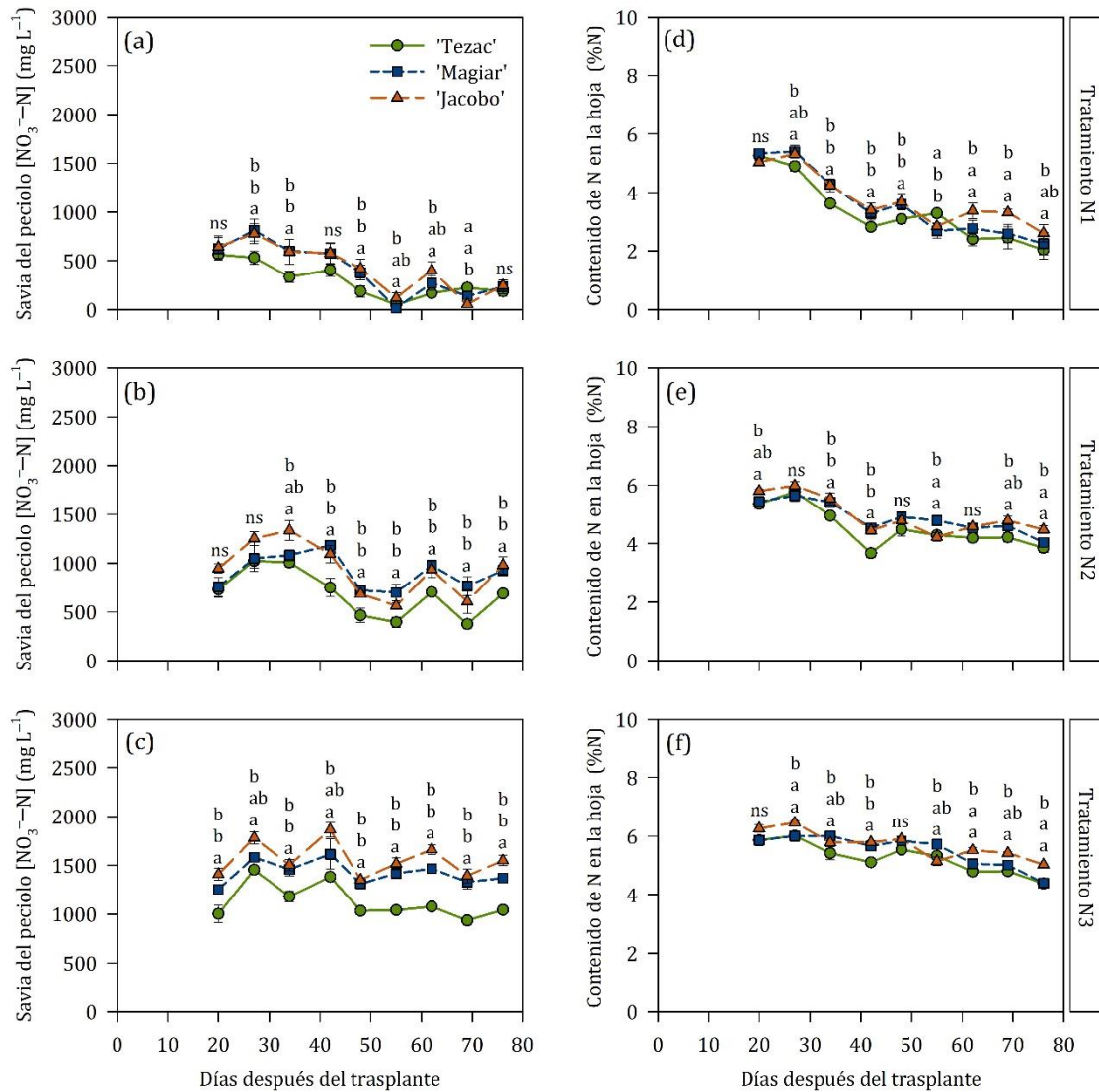
Durante el cultivo de melón se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los cultivares 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' en las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y en el contenido de N en la hoja (%) dependiendo del tratamiento de N y del tiempo (RM-ANOVA;  $T \times C \times N$ ,  $P < 0.05$ ) (Tabla 7; Figura 4).

**Tabla 7.** Resultados del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) que prueba el efecto del cultivar, los tratamientos con N y el tiempo en las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de melón. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad (P).

Efecto	g. l	$[NO_3^- - N]$ en la savia		Contenido de N en la hoja (%N)	
		F	P	F	P
Bloque	3	2.21	0.112	2.21	0.112
Cultivar (C)	2	21.91	<0.001	15.62	<0.001
Nitrógeno (N)	2	353.29	<0.001	302.54	<0.001
C × N	4	0.87	0.491	0.12	0.974
Error	24				
Tiempo (T)	8	101.93	<0.001	269.93	<0.001
T × C	16	2.06	0.01	6.27	<0.001
T × N	16	23.37	<0.001	24.02	<0.001
T × C × N	32	3.25	<0.001	1.98	0.003
Error	192				

#### 7.3.2.2. La $[NO_3^- - N]$ en la savia del peciolo en melón

La  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo fue afectada por los tratamientos de N en el cultivo de melón en los cultivares 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' (Figura 4 a, b, c; Tabla 8). Se presentaron consistentes diferencias entre los tratamientos N1, N2 y N3. En el tratamiento N1, la  $[NO_3^- - N]$  en la savia presentó una tendencia a disminuir hasta los 48 DDT, manteniéndose constante hasta finalizar el ciclo (Figura 4 a). La  $[NO_3^- - N]$  en la savia en los tratamientos N2 y N3 se mantuvo relativamente constante, presentando algunas fluctuaciones en ciertos momentos del ciclo (Figura 4 b, c).



**Figura 4.** Evolución de las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo (a, b, c) y del contenido de N en la hoja (%N) (d, e, f) de tres cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

En el tratamiento N1, las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia en los cultivares de melón 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' presentaron diferencias estadísticamente significativas en seis de los ocho muestreos a partir de los 27 DDT (Figura 4 a; Tabla 8). Generalmente, el cultivar 'Tezac' tuvo valores más bajos que 'Magiar' y 'Jacobo' hasta los 55 DDT. Los cultivares 'Magiar' y 'Jacobo' fueron generalmente similares durante el ciclo del cultivo. Los valores promedios durante todo el ciclo para los cultivares 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' fueron 295, 405 y 426 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> (Figura 4 a). El valor de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del cultivar 'Tezac' fue en promedio 26% y 31% menos que 'Magiar' y 'Jacobo' respectivamente (Figura 4 a).

En el tratamiento N2, después de la fase de establecimiento hasta los 27 DDT, se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre 'Tezac' y 'Jacobo' a los 34 DDT,

y entre 'Tezac' y los otros dos cultivares hasta finalizar el cultivo (Figura 4 b, Tabla 8). Los valores promedios durante el ciclo del cultivo para 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' fueron 681, 905 y 932 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4 b; Tabla 8). El valor de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del cultivar 'Tezac' fue en promedio 24% y 27% menos que 'Magiar' y 'Jacobo', respectivamente (Figura 4 b).

En el tratamiento N3, el cultivar 'Tezac' fue significativamente inferior que 'Magiar' y 'Jacobo' en siete de las nueve fechas de muestreo. En promedio, las [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo fueron 1127, 1422 y 1559 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> en 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo', respectivamente, durante el cultivo (Figura 4 c; Tabla 8). El valor de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del cultivar 'Tezac' fue en promedio 19% y 28% menos que 'Magiar' y 'Jacobo', respectivamente (Figura 4 c).

#### 7.3.2.3. El contenido de N en la hoja (%N) en melón

El contenido de N en la hoja (%) en el cultivo de melón en los cultivares 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' fue afectado por las diferentes concentraciones de N aplicadas (Figura 4 d, e, f; Tabla 8) en los tratamientos N1, N2 y N3. Se presentaron diferencias entre los cultivares de melón en los días de medición realizados durante todo el ciclo del cultivo. El contenido de N en la hoja mantuvo una tendencia similar en los diferentes cultivares, disminuyendo durante el ciclo del cultivo en los tratamientos N1, N2 y N3 (Figura 4 d, e, f).

En el tratamiento N1, el contenido de N en la hoja del cultivar 'Tezac' fue significativamente menor que 'Magiar' y 'Jacobo' en tres fechas y mayor que 'Magiar' y 'Jacobo' en una fecha, las demás fechas 'Jacobo' fue significativamente mayor que el cultivar 'Tezac' (Figura 4 d, Tabla 8). En general, en el tratamiento N1 los promedios de 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' para todo el ciclo del cultivo fueron 3.3, 3.6 y 3.8% respectivamente (Figura 4 d). Entre 27 y 55 DDT (Figura 4 d), el contenido de N en la hoja de 'Tezac' se mantuvo constante, aproximadamente 0.3–0.4% por debajo de 'Magiar' y 'Jacobo' respectivamente (Figura 4 d).

En el tratamiento N2 y N3, durante todo el ciclo del cultivo, los cultivares no presentaron claras diferencias entre el contenido de N en la hoja entre 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' (Figura 4 e, f; Tabla 8). En dos fechas de cada uno de estos tratamientos, el cultivar 'Tezac' presentó valores significativamente inferiores. En una fecha de muestreo en el tratamiento N2 y tres fechas en el tratamiento N3, el cultivar 'Jacobo' tuvo valores significativamente más altos que los otros dos cultivares (Tabla 8). En el tratamiento N2, los valores promedios para 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' fueron 4.5, 4.9 y 5.0% y en el tratamiento N3 fueron 5.2, 5.5 y 5.7%, respectivamente (Figura 5 e, f).

En general, tanto en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja, el cultivar 'Tezac' presentó durante todo el ciclo del cultivo los valores inferiores. Por otro lado, los cultivares 'Magiar' y 'Jacobo' fueron muy similares, sin embargo, 'Jacobo' pareció estar por encima de 'Magiar'.

**Tabla 8.** Resumen de la prueba LSD del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) evaluando las diferencias entre los cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') en las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Las celdas de color gris oscuro indican una diferencia estadísticamente significativa con los otros dos cultivares en esta fecha. Las celdas con el color gris claro indican una diferencia estadísticamente significativa con uno de los otros dos cultivares en esta fecha.

Tratamiento y cultivares	$[NO_3^- - N]$ en la savia									Contenido de N en la hoja (%N)								
	<sup>1</sup> Días después de trasplante (DDT)																	
	20	27	34	42	48	55	62	69	76	20	27	34	42	48	55	62	69	76
N1																		
'Tezac'	a	a	a	a	a	ab	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
'Magiar'	a	b	b	a	b	a	ab	a	a	a	b	b	b	b	b	a	a	ab
'Jacobo'	a	b	b	a	b	b	b	b	a	a	ab	b	b	b	b	b	b	b
N2																		
'Tezac'	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
'Magiar'	a	a	ab	b	b	b	b	b	b	ab	a	b	b	a	b	a	ab	a
'Jacobo'	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	a	b	b	a	a	a	b	b
N3																		
'Tezac'	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ab	ab	a	a	a
'Magiar'	b	a	b	ab	b	b	b	b	b	a	a	b	b	a	a	a	ab	a
'Jacobo'	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	b	b	b	b	b	b	b	b

<sup>1</sup>Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre cultivares en cada tratamiento.

7.3.2.4. Relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y contenido de N en la hoja (%N) durante el ciclo del cultivo de melón

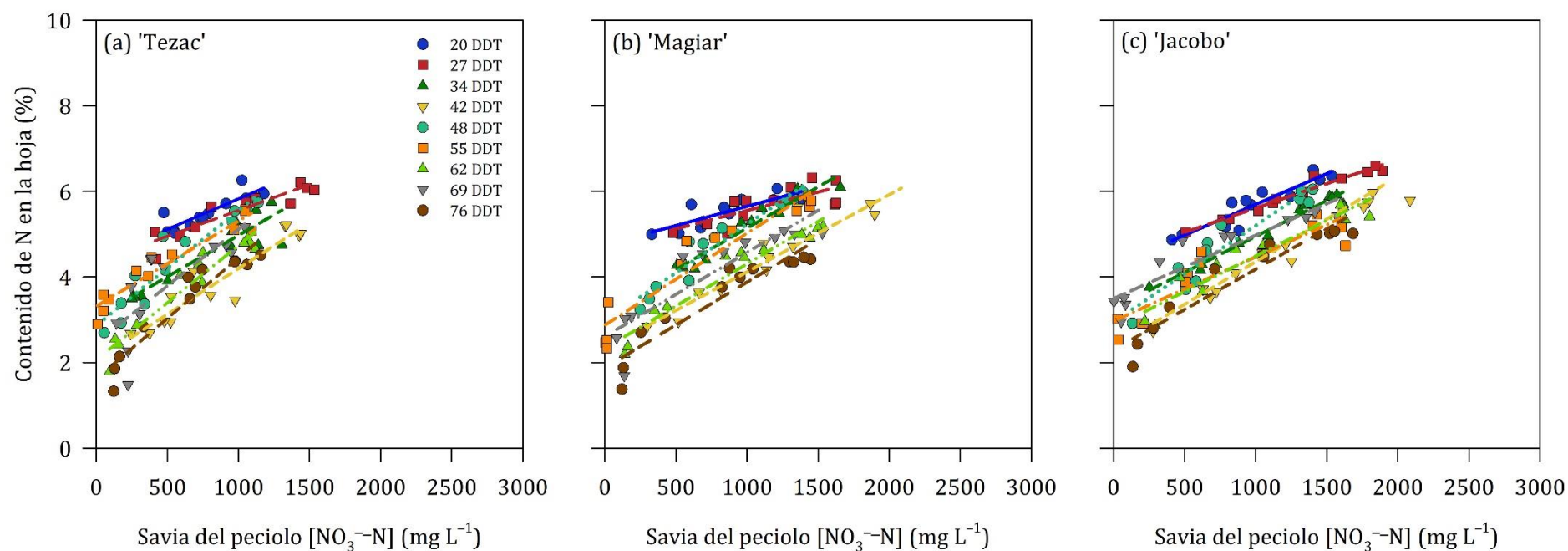
En los tres cultivares de melón 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' se obtuvieron relaciones lineales entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja para cada día de medición y para todo el ciclo del cultivo.

Para cada día de medición en los tres cultivares, las relaciones lineales fueron estadísticamente muy significativas ( $P < 0.01$ ) en dos fechas de medición y altamente significativas ( $P < 0.001$ ) en las demás fechas (Figura 5; Tabla 9).

El cultivar 'Tezac' tuvo una fuerte relación lineal en cada día de medición, presentando valores de  $R^2$  de 0.73–0.92 ( $P < 0.001$ ), excepto a los 69 DDT ( $R^2=0.59$ ;  $P < 0.01$ ) (Figura 5 a; Tabla 9). El cultivar 'Magiar' presentó una fuerte relación lineal, con valores de  $R^2$  de 0.79–0.95 ( $P < 0.001$ ), excepto al inicio del cultivo a los 20 y 27 DDT ( $R^2=0.70$ ;  $P < 0.001$ , 0.58;  $P < 0.01$ ) (Figura 5 b; Tabla 9). En el cultivar 'Jacobo', en cada día de medición, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja tuvieron una fuerte relación lineal con valores de  $R^2$  de 0.83–0.97 ( $P < 0.001$ ) (Figura 5 c; Tabla 9).

Las pendientes de las relaciones lineales determinadas para cada día de medición entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja de los cultivares 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' mantuvieron tendencias similares. Al inicio del ciclo del cultivo muestran un incremento hasta los 48 DDT (0.0009–0.0027), y hacia el final del ciclo se mantienen generalmente constantes (Figura 5; Tabla 9).

Los valores de la intersección para la relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja para los cultivares de melón tienden a disminuir de igual forma en 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo' desde 4.8 hasta 1.6% (Figura 5; Tabla 9).



**Figura 5.** Relaciones lineales entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) para cada fecha de muestreo en (a) 'Tezac', (b) 'Magiar' y (c) 'Jacobo' con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=12$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y significancias son presentados en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo (variable  $x$ ) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable  $y$ ) para los cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') cultivados en invernadero para cada día de medición ( $n=12$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y significancias son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*) y muy significativo en  $P < 0.01$  (\*\*).

DDT	Cultivar					
	'Tezac'	$R^2$	'Magiar'	$R^2$	'Jacobo'	$R^2$
20	$y = 0.0014x + 4.4$	0.73***	$y = 0.0009x + 4.8$	0.70***	$y = 0.0014x + 4.3$	0.86***
27	$y = 0.0012x + 4.3$	0.83***	$y = 0.0009x + 4.7$	0.58**	$y = 0.0011x + 4.5$	0.96***
34	$y = 0.0019x + 3.0$	0.79***	$y = 0.0019x + 3.2$	0.93***	$y = 0.0017x + 3.3$	0.97***
42	$y = 0.0021x + 2.1$	0.88***	$y = 0.0020x + 2.3$	0.83***	$y = 0.0018x + 2.4$	0.96***
48	$y = 0.0027x + 2.9$	0.89***	$y = 0.0023x + 3.0$	0.93***	$y = 0.0023x + 2.9$	0.91***
55	$y = 0.0020x + 3.3$	0.92***	$y = 0.0021x + 2.9$	0.91***	$y = 0.0015x + 3.0$	0.83***
62	$y = 0.0027x + 2.1$	0.87***	$y = 0.0021x + 2.2$	0.90***	$y = 0.0016x + 2.9$	0.89***
69	$y = 0.0026x + 2.5$	0.59**	$y = 0.0020x + 2.6$	0.79***	$y = 0.0015x + 3.5$	0.86***
76	$y = 0.0028x + 1.6$	0.90***	$y = 0.0020x + 1.9$	0.88***	$y = 0.0019x + 2.3$	0.90***

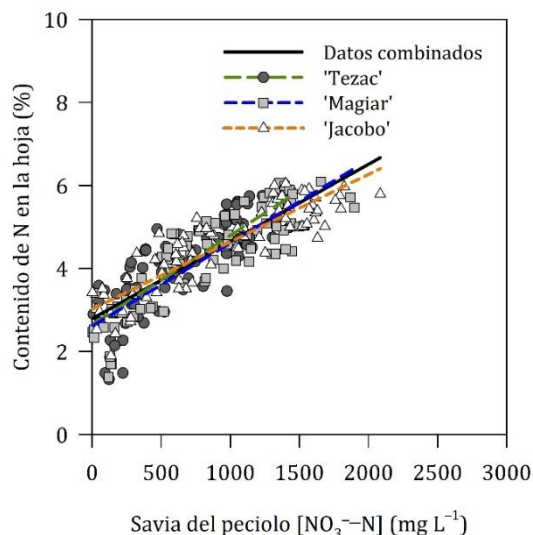


Para todo el ciclo de cada uno de los tres cultivares de melón ‘Tezac’, ‘Magiar’ y ‘Jacobo’ se obtuvieron relaciones lineales altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (Tabla 10). Las relaciones lineales se determinaron para todo el conjunto de datos medidos durante todo el cultivo en cada uno de los tres cultivares de melón, desde 34 DDT hasta 76 DDT (Figura 6; Tabla 10).

Las relaciones lineales presentadas para cada uno de los tres cultivares a los 20 y 27 DDT fueron diferentes a los días posteriores de medición en la pendiente e intersección. Los datos de estos días podrían no ser representativos, debido a que las medidas no siguen la misma tendencia que las medidas en los días siguientes (Figura 5; Tabla 9). La fase de establecimiento del cultivo podría afectar, por tal motivo, han sido excluidas de los análisis adicionales de estas relaciones.

Por lo cual, los cultivares ‘Tezac’, ‘Magiar’ y ‘Jacobo’ tuvieron una fuerte relación lineal entre la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja considerando las mediciones desde 34 DDT hasta 76 DDT, con valores de  $R^2$  de 0.65–0.78 ( $P < 0.001$ ) (Tabla 10). Durante este periodo del cultivo, los valores de las pendientes (0.0016–0.0022) y de las intersecciones (2.6–3.0%) de las relaciones lineales en los cultivares ‘Tezac’, ‘Magiar’ y ‘Jacobo’ fueron similares (Figura 6; Tabla 10). Combinando todos los datos de los tres cultivares de melón se obtuvo una única ecuación lineal general para melón con una pendiente de 0.0019 y una intersección de 2.8% ( $R^2=0.72$ ;  $P < 0.001$ ) para el ciclo del cultivo desde los 34 DDT hasta 76 DDT (Tabla 10).

En general, las relaciones lineales entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja entre 34 y 76 DDT de cada una de los cultivares de melón presentaron comportamientos muy similares. El incremento en el contenido de N en la hoja debido al incremento en la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo fue muy similar. Sin embargo, se presentaron diferencias en las medidas de la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y diferencias en el contenido de N en la hoja medido entre los cultivares (Figura 6). Después de 750 mg  $\text{NO}_3^- - \text{N L}^{-1}$  aproximadamente (Figura 6), el cultivar ‘Tezac’ presentó claramente contenidos de N en la hoja superiores que los cultivares ‘Magiar’ y ‘Jacobo’.



**Figura 6.** Relaciones lineales de las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) durante el ciclo del cultivo desde 34 DDT hasta 76 DDT para los cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. La regresión lineal de todo el conjunto de datos de las medidas que combina los tres cultivares de melón se muestra como una línea negra sólida, también se muestran las relaciones lineales para 'Tezac' (guion largo verde), 'Magiar' (guion mediano azul) y 'Jacobo' (guion corto anaranjado). Las ecuaciones de las regresiones lineales se presentan en la Tabla 10. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y el número del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo (variable  $x$ ) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable  $y$ ) para los cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') cultivados en invernadero durante el ciclo del cultivo desde 34 DDT hasta 76 DDT. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y el número del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*).

Cultivar	Todos los datos	$R^2$	$n$
'Tezac'	$y = 0.0022x + 2.6$	0.65***	84
'Magiar'	$y = 0.0020x + 2.6$	0.73***	84
'Jacobo'	$y = 0.0016x + 3.0$	0.78***	84
Datos combinados	$y = 0.0019x + 2.8$	0.72***	252

### 7.3.3. Efecto de la concentración de N aplicado sobre la $[NO_3^- - N]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pimiento

#### 7.3.3.1. Diferencias en la medida de la $[NO_3^- - N]$ en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (%N) entre cultivares de pimiento

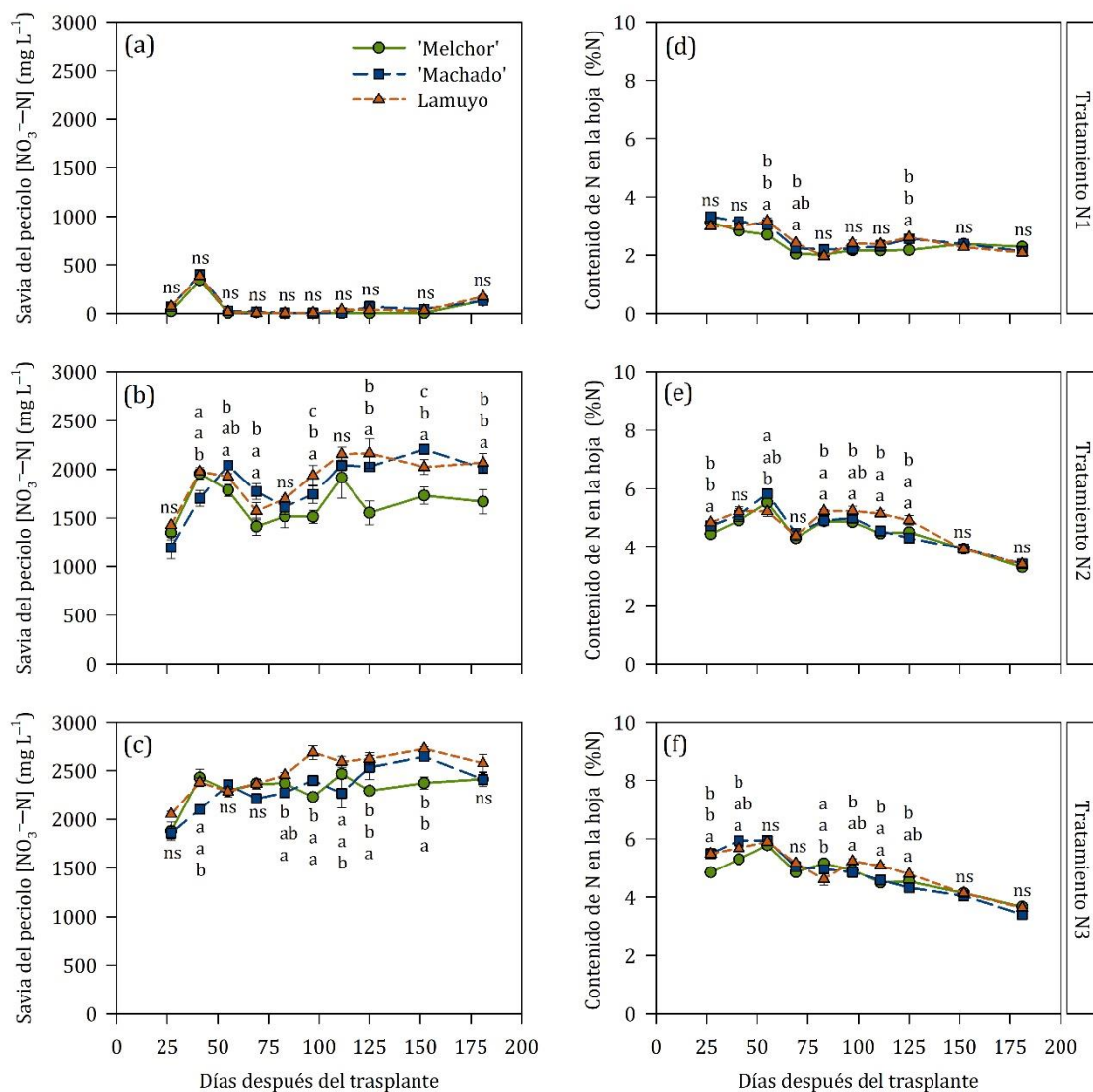
Durante el cultivo de pimiento se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los cultivares 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo en las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo dependiendo del tratamiento de N y del tiempo (RM-ANOVA;  $T \times C \times N$ ,  $P < 0.001$ ) (Tabla 11; Figura 7).

**Tabla 11.** Resultados del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) que prueba el efecto del cultivar, los tratamientos con N y el tiempo en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pimiento. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad (P).

Efecto	g.l	$[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia		Contenido de N en la hoja (%N)	
		F	P	F	P
Cultivar (C)	2	15.40	< 0.001	12.84	< 0.001
Nitrógeno (N)	2	4316.72	< 0.001	2421.31	< 0.001
C × N	4	5.45	0.003	0.89	0.485
Error	26				
Tiempo (T)	9	50.94	< 0.001	281.51	< 0.001
T × C	18	6.13	< 0.001	6.65	< 0.001
T × N	18	19.36	< 0.001	39.93	< 0.001
T × C × N	36	2.37	< 0.001	3.10	< 0.001
Error	234				

7.3.3.2. La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo en pimiento

La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo fue afectada por los tratamientos de N en los cultivares de pimiento ‘Melchor’, ‘Machado’ y Lamuyo (Figura 7 a, b, c; Tabla 12). Se presentaron diferencias entre los tratamientos N1, N2 y N3. La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en el tratamiento N2 se mantuvo relativamente constante entre 55–97 DDT y entre 125–181 DDT (Figura 7 b). El tratamiento N3 presentó algunas fluctuaciones en los valores a lo largo del ciclo, pero se mantuvo relativamente constante durante todo el ciclo (Figura 7 c).



**Figura 7.** Evolución de las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo (a, b, c) y del contenido de N en la hoja (%N) (d, e, f) de tres cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

En el tratamiento N1 las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia durante todo el ciclo del cultivo fueron cero o muy cercanas a cero, el máximo valor promedio de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia durante todo el ciclo del cultivo de los cultivares fue de  $77 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (Figura 7 a).

En el tratamiento N2, hasta los 27 DDT aproximadamente, los cultivares no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 7 b; Tabla 12). Después de esta fecha, a partir de 41 DDT hasta los 111 DDT las diferencias entre los cultivares no fueron consistentes. El cultivar 'Melchor' tuvo significativamente menos  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia que el cultivar 'Machado' y Lamuyo desde 125 DDT hasta finalizar el ciclo del cultivo (Figura 7 b; Tabla 12). Los valores promedios durante el ciclo del cultivo para 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo fueron  $1639$ ,  $1834$  y  $1893 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 7

b; Tabla 12). En el tratamiento N2, el valor promedio de 'Melchor' fue en promedio 11% y 14% menos que el cultivar 'Machado' y Lamuyo.

En el tratamiento N3, el cultivar 'Machado' fue estadísticamente menor que 'Melchor' y Lamuyo solamente a los 41 y 111 DDT y el cultivar 'Melchor' a los 125 y 152 DDT (Figura 7 c; Tabla 12). El cultivar Lamuyo fue estadísticamente mayor que 'Melchor' y 'Machado' a los 97 DDT (Figura 7 c; Tabla 12). En general, las diferencias entre cultivares no fueron consistentes. En promedio, durante el cultivo las  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo fueron 2312, 2306 y 2473 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  en 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo, respectivamente (Figura 7 c). Los valores de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de los cultivares 'Melchor' y 'Machado' fueron en promedio 7% menos que los valores de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del pimiento Lamuyo (Figura 7 c).

#### 7.3.3.3. El contenido de N en la hoja (%N) en pimiento

El contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pimiento en los cultivares 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo fue afectado por las diferentes concentraciones de N aplicadas (Figura 7 d, e, f; Tabla 12) en los tratamientos N1, N2 y N3. Se presentaron diferencias entre los cultivares de pimiento en los diferentes días de medición realizados durante todo el ciclo del cultivo. El contenido de N en la hoja disminuyó en el tratamiento N1 (Figura 7 d) hasta 69 DDT, después se mantuvo constante hasta finalizar el ciclo del cultivo. En los tratamientos N2 y N3 el contenido de N en la hoja mantuvo una tendencia similar en los cultivares, disminuyendo durante el ciclo del cultivo (Figura 7 e, f).

En el tratamiento N1, el contenido de N en la hoja fue estadísticamente significativo en tres fechas de muestreo, en las cuales el cultivar 'Melchor' tuvo el menor contenido de N en dos de ellas (Figura 7 d; Tabla 12). En general, en el tratamiento N1 los promedios de 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo para todo el ciclo del cultivo fueron 2.4, 2.6 y 2.5% respectivamente (Figura 7 d).

En el tratamiento N2 y N3, durante todo el ciclo del cultivo los cultivares 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo no presentaron claras diferencias estadísticamente significativas entre cultivares en el contenido de N en la hoja (Figura 7 e, f). En una fecha de muestreo en el tratamiento N2 y N3, el cultivar 'Melchor' tuvo valores significativamente más bajos que los otros dos cultivares (Figura 7 e, f; Tabla 12). En tres fechas de muestreo en el tratamiento N2 y una fecha del tratamiento N3, el Lamuyo tuvo valores significativamente más altos que los otros dos cultivares (Figura 7 e, f; Tabla 12). En el tratamiento N2, los valores promedios para 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo fueron 4.5, 4.6 y 4.8% y en el tratamiento N3 fueron 4.8, 4.9 y 5.0%, respectivamente (Figura 7 e, f).

En general, el cultivar Lamuyo presentó los valores más altos en la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y en el contenido de N en la hoja durante todo el ciclo del cultivo.

**Tabla 12.** Resumen de la prueba LSD del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) evaluando las diferencias entre los cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) en las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Las celdas de color gris oscuro indican una diferencia estadísticamente significativa con los otros dos cultivares en esta fecha. Las celdas con el color gris claro indican una diferencia estadísticamente significativa con uno de los otros dos cultivares en esta fecha.

Tratamiento y cultivares	[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N] en la savia										Contenido de N en la hoja (%N)									
											<sup>1</sup> Días después de trasplante (DDT)									
	27	41	55	69	83	97	111	125	152	181	27	41	55	69	83	97	111	125	152	181
N1																				
'Melchor'	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
'Machado'	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	ab	a	a	a	b	a	a
Lamuyo	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	a	b	a	a
N2																				
'Melchor'	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ab	a	a	a	a	a	a	a
'Machado'	a	b	b	b	a	b	a	b	b	b	b	a	a	a	a	ab	a	a	a	a
Lamuyo	a	a	ab	a	a	c	a	b	c	b	b	a	b	a	b	b	b	b	a	a
N3																				
'Melchor'	a	a	a	a	ab	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ab	a	ab	a	a
'Machado'	a	b	a	a	a	a	b	b	b	a	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a
Lamuyo	a	a	a	a	b	b	a	b	b	a	b	ab	a	a	b	b	b	b	a	a

<sup>1</sup>Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre cultivares en cada tratamiento.

7.3.3.4. Relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y contenido de N en la hoja (%N) durante el ciclo del cultivo de pimiento

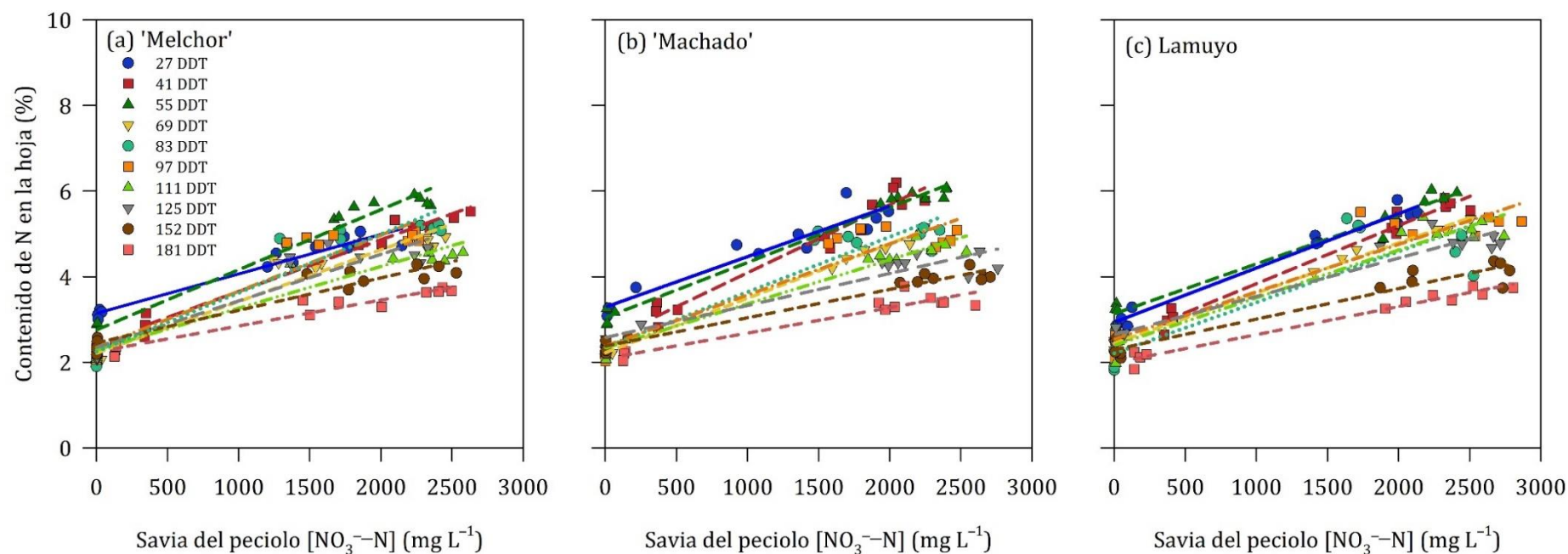
En los tres cultivares de pimiento 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo se obtuvieron relaciones lineales entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja. Las relaciones lineales fueron altamente significativas ( $P < 0.001$ ) para cada día de medición en los tres cultivares (Figura 8; Tabla 13).

El cultivar 'Melchor' tuvo una fuerte relación lineal en cada día de medición, presentando valores de  $R^2$  de 0.89–0.98 ( $P < 0.001$ ) (Figura 8 a; Tabla 13). El cultivar 'Machado' presentó una fuerte relación lineal, con valores de  $R^2$  de 0.91–0.99 ( $P < 0.001$ ) en cada día de medición (Figura 8 b; Tabla 13). Por otro lado, en el cultivar Lamuyo, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja tuvieron una fuerte relación lineal en cada día de medición, con valores de  $R^2$  de 0.77–0.99 ( $P < 0.001$ ) (Figura 8 c; Tabla 13).

Las pendientes de las relaciones lineales entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja del cultivar 'Melchor' tienden a aumentar hasta los 55 DDT (0.0009–0.0014), de aquí en adelante las pendientes tienden a disminuir (0.0014–0.0006) hasta finalizar el ciclo (Figura 8 a; Tabla 13). El cultivar 'Machado' y Lamuyo siguen tendencias muy similares, tienen un leve incremento hasta los 41 DDT (0.0016) y desciende durante los muestreos siguientes (0.0012–0.006) (Figura 8 b, c; Tabla 13). A partir de 152 DDT, las pendientes fueron relativamente constantes en los tres cultivares.

Las intersecciones calculadas con la relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja para los cultivares de pimiento determinadas para cada día de medición tienden a disminuir de igual forma en 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo, desde 3.3 hasta 2.0% (Figura 8; Tabla 13).





**Figura 8.** Relaciones lineales entre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) para cada fecha de muestreo en (a) 'Melchor', (b) 'Machado' y (c) Lamuyo con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=12$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Los valores de la pendiente, intersección,  $R^2$  y significancias son presentados en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Análisis de regresión lineal relacionando la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo (variable *x*) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable *y*) para los cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) cultivados en invernadero para cada día de medición (*n*=12); *n* es el número total del conjunto de datos. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) y significancias son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en *P* < 0.001 (\*\*\*).

DDT	Cultivar					
	'Melchor'	R <sup>2</sup>	'Machado'	R <sup>2</sup>	Lamuyo	R <sup>2</sup>
27	$y = 0.0009x + 3.1$	0.95***	$y = 0.0012x + 3.3$	0.91***	$y = 0.0013x + 2.9$	0.97***
41	$y = 0.0012x + 2.4$	0.98***	$y = 0.0016x + 2.5$	0.95***	$y = 0.0014x + 2.5$	0.97***
55	$y = 0.0014x + 2.8$	0.97***	$y = 0.0013x + 3.0$	0.99***	$y = 0.0012x + 3.1$	0.97***
69	$y = 0.0012x + 2.2$	0.93***	$y = 0.0013x + 2.2$	0.99***	$y = 0.0012x + 2.4$	0.99***
83	$y = 0.0014x + 2.2$	0.91***	$y = 0.0013x + 2.4$	0.91***	$y = 0.0012x + 2.2$	0.77***
97	$y = 0.0013x + 2.4$	0.90***	$y = 0.0012x + 2.4$	0.90***	$y = 0.0011x + 2.5$	0.90***
111	$y = 0.0010x + 2.3$	0.91***	$y = 0.0010x + 2.3$	0.97***	$y = 0.0011x + 2.4$	0.95***
125	$y = 0.0011x + 2.3$	0.89***	$y = 0.0008x + 2.6$	0.90***	$y = 0.0009x + 2.6$	0.94***
152	$y = 0.0008x + 2.5$	0.92***	$y = 0.0007x + 2.4$	0.96***	$y = 0.0007x + 2.3$	0.93***
181	$y = 0.0006x + 2.2$	0.95***	$y = 0.0006x + 2.1$	0.92***	$y = 0.0007x + 2.0$	0.97***

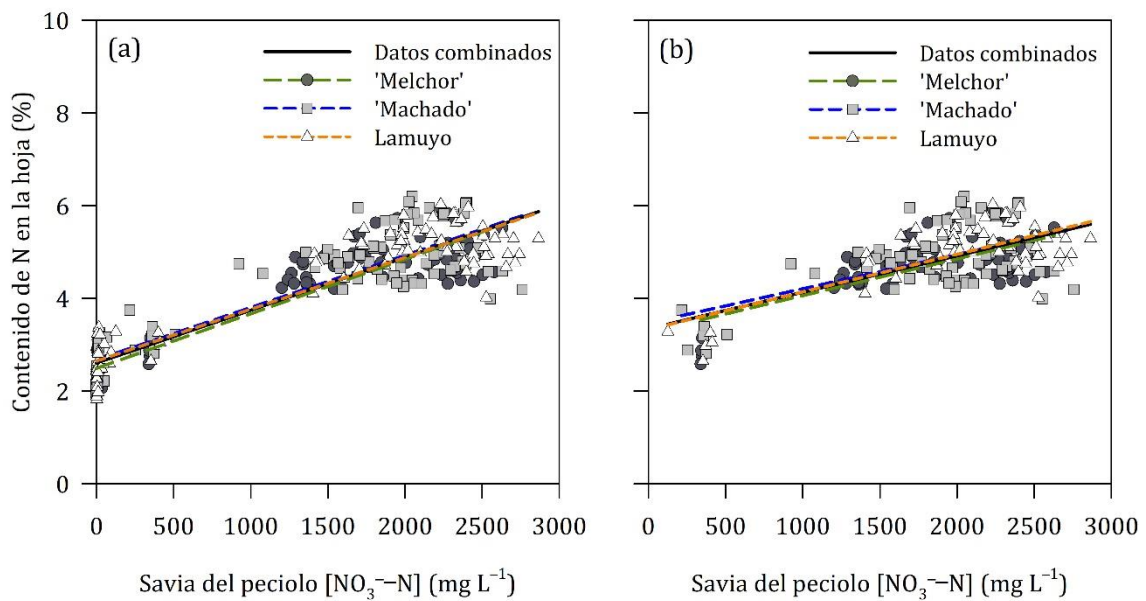
Para todo el ciclo de cada uno de los tres cultivares de pimiento ‘Melchor’, ‘Machado’ y Lamuyo se obtuvieron relaciones lineales altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (Tabla 14). Las relaciones lineales se determinaron para todo el conjunto de datos medidos durante todo el cultivo en cada uno de los tres cultivares de pimiento, desde 27 DDT hasta 125 DDT (Figura 9 a; Tabla 14).

Las relaciones lineales presentadas para cada uno de los tres cultivares a los 152 y 181 DDT fueron diferentes a los días anteriores de medición por las diferencias en la pendiente e intersección (Figura 8; Tabla 13). Los datos medidos en estas fechas podrían no ser representativos y no siguen las mismas tendencias (Figura 8). Es un cultivo de ciclo largo, la edad del material vegetal pudo afectar las medidas realizadas hacia el final del cultivo, por lo que han sido excluidas de los análisis adicionales de estas relaciones.

Por lo tanto, los cultivares ‘Melchor’, ‘Machado’ y Lamuyo tuvieron una fuerte relación lineal entre la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja desde 27 DDT hasta 125 DDT, con valores de  $R^2$  de 0.62–0.75 ( $P < 0.001$ ) (Tabla 14). Durante este periodo, los valores de las pendientes (0.0010–0.0011) y de las intersecciones (2.5–2.6%) de las relaciones lineales en los cultivares ‘Melchor’, ‘Machado’ y Lamuyo fueron muy similares (Figura 9 a; Tabla 14). Combinando los tres cultivares se obtuvo una ecuación lineal general para pimiento con una pendiente de 0.0010 y una intersección de 2.6% ( $R^2 = 0.69$ ;  $P < 0.001$ ), para el ciclo del cultivo desde 22 DDT hasta los 125 DDT.

Como se menciona en la sección 7.3.3.2, el tratamiento N1 presentó valores de cero o muy cercanos a cero (Figura 7 a). Para mostrar una relación que considere medidas de la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo más representativas se relacionó la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja considerando únicamente valores que fueran  $> 100 \text{ mg NO}_3^- - \text{N L}^{-1}$  (Figura 9 b). Este análisis presentó relaciones lineales entre la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja con valores de  $R^2$  de 0.34–0.51 (Tabla 14), para el ciclo del cultivo desde 27 DDT hasta 125 DDT (Tabla 14). Durante este periodo, las pendientes de los cultivares ‘Melchor’, ‘Machado’ y Lamuyo fueron 0.0007–0.0008 (Figura 9 b; Tabla 14) y los valores de la intersección fueron 3.3, 3.5, 3.3%, respectivamente (Tabla 14). Combinando los tres cultivares de pimiento, considerando solamente los valores  $> 100 \text{ mg NO}_3^- - \text{N L}^{-1}$ , se obtuvo una ecuación lineal general con una pendiente de 0.0008 y una intersección de 3.3% ( $R^2 = 0.44$ ;  $P < 0.001$ ) para el ciclo del cultivo desde 27 DDT hasta 125 DDT (Tabla 14).

En general, las relaciones lineales entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja entre 27 y 125 DDT de cada una de los cultivares de pimiento presentaron comportamientos muy similares. El incremento en el contenido de N en la hoja debido al incremento en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo fue muy similar en cada cultivar. Sin embargo, se presentaron diferencias en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo entre los cultivares y diferencias en el contenido de N en la hoja medido entre los cultivares (Figura 9).



**Figura 9.** Relaciones lineales entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) usando (a) todas las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y (b) las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  con valores  $>100 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  durante el ciclo del cultivo desde 27 DDT hasta 125 DDT para los cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. La regresión lineal de todo el conjunto de datos de las medidas que combina los tres cultivares de pimiento se muestra como una línea negra sólida, también se muestran las relaciones lineales para 'Melchor' (guion largo verde), 'Machado' (guion mediano azul) y Lamuyo (guion corto anaranjado). Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y el número del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo (variable  $x$ ) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable  $y$ ) para los cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) cultivados en invernadero considerando todos los datos de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  con valores  $>100 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  durante el ciclo del cultivo desde 27 DDT hasta 125 DDT. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y los números totales del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*)

Cultivar	Todos los datos	$R^2$	$n$	$>100 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$	$R^2$	$n$
'Melchor'	$y = 0.0011x + 2.5$	0.75***	96	$y = 0.0008x + 3.3$	0.48***	68
'Machado'	$y = 0.0010x + 2.6$	0.62***	96	$y = 0.0007x + 3.5$	0.34***	70
Lamuyo	$y = 0.0010x + 2.6$	0.71***	88	$y = 0.0008x + 3.3$	0.51***	61
Datos combinados	$y = 0.0010x + 2.6$	0.69***	280	$y = 0.0008x + 3.3$	0.44***	199

## **7.4. Discusión**

### *7.4.1. Respuesta del cultivar sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo*

En los cultivos de pepino, melón y pimiento, los efectos generales de las diferentes aplicaciones de los tratamientos de N y de las tendencias generales de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo presentadas a través del tiempo, fueron similares en los diferentes cultivares de estas especies de cultivos hortícolas.

En las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo en los cultivares estudiados de pepino ('Strategos', 'Pradera', 'Mitre'), melón ('Tezac', 'Magiar', 'Jacobo') y pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) hubo algunas diferencias consistentes entre los cultivares en dos o tres de los diferentes tratamientos de N aplicados. En los cultivos de pepino y de pimiento, los tratamientos N1 tuvieron valores muy bajos, mayormente con valores de cero o muy cercanos a cero, y estos valores no permitieron evaluar las diferencias entre cultivares en las condiciones de N deficiente.

A diferencia del pepino y pimiento, los valores de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia medida en los tres cultivares de melón en el tratamiento N1 fueron suficientemente altos para determinar diferencias entre los cultivares. Estos valores de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en savia del tratamiento N1 en el cultivo de melón podrían estar relacionadas con los niveles de N mineral residual obtenido del suelo. El N medido en el análisis de suelo antes de iniciar el ciclo del cultivo realizado a una profundidad de 0–40 cm fue de 47 kg N ha<sup>-1</sup>, un 4% menos que el N residual que contenía el suelo en el tratamiento N2 y un 20% más que en el suelo del tratamiento N3, mostrando en el N1 valores más altos al inicio y descendiendo a lo largo del ciclo. Esto podría indicar que el cultivo absorbió todo el N aplicado aprovechando el N residual del suelo.

En el cultivo de pepino, el N mineral medido en el suelo antes de iniciar el ciclo fue de 14 kg N ha<sup>-1</sup>, un 73% menos que el N medido en el suelo del tratamiento N2 y 15% menos que en el suelo del tratamiento N3. En el cultivo de pimiento, el N mineral medido en el suelo antes de iniciar el ciclo fue de 11 kg N ha<sup>-1</sup>, un 69% menos que el N medido en el suelo del tratamiento N2 y 28% menos que en el suelo del tratamiento N3.

En un cultivo de melón reciente, con dos de los tres cultivares estudiados en este trabajo y cultivados en condiciones idénticas, las  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia con un tratamiento N1 muy similar fueron generalmente muy bajas, con la mayoría de los valores inferiores a 500 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (R.B. Thompson, datos sin publicar). Estos datos apoyan la idea de que los valores de las  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de melón presentados en este capítulo fueron influidos por el N mineral residual en el suelo al principio del cultivo.

En pepino, generalmente en el cultivar 'Strategos', la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo se mantuvo superior respecto a 'Pradera' y 'Mitre', en los tratamientos N2 y N3. En melón, 'Tezac' presentó las  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo inferior respecto a 'Magiar' y 'Jacobo', en los tres tratamientos de N. En pimiento, 'Melchor' fue generalmente inferior al cultivar 'Machado' y Lamuyo en el tratamiento N2. En cultivos como patata y zanahoria (Waterer, 1997; Westerveld et al., 2007), se han visto diferencias entre cultivares en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo a través del tiempo.

En este estudio, principalmente en el cultivo de melón y pepino, el cultivar afectó la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo. En general, en el pepino y melón, se presentaron consistentes diferencias entre los cultivares, las diferencias más grandes que se presentaron entre cultivares fueron de 200–330 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ . Por otro lado, en pimiento, algunos cultivares tuvieron menos diferencia. Entonces, estos datos demostraron que entre algunos cultivares de la misma especie de cultivos hortícolas pueden presentarse apreciables diferencias en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia, con el mismo suministro de N. Estos datos sugieren que idealmente se necesitan estudios donde los valores de suficiencia sean específicos para cada cultivar. Por ahora, los valores absolutos de suficiencia para cultivos en general pueden consultarse (Hochmuth, 2012, 1994) y ser usados como una guía práctica.

Las fuertes relaciones entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y el NNI de los cultivares de pepino, melón y pimiento presentados en el Anexo 1 (sección 13) indicaron que hay diferencias entre los cultivares de una misma especie de cultivo. De acuerdo con la relación determinada, es posible que un valor de suficiencia derivado para una máxima DMP sea diferente para cada cultivar en cada especie de cultivo hortícola. Los valores derivados coinciden claramente con las diferencias más grandes presentadas entre los cultivares. En el cultivo de pepino, los valores calculados fueron 510, 387 y 414 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  para 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre', respectivamente. En el melón, Los valores calculados fueron 899, 1003 y 1170 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  para 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo', respectivamente. Y finalmente, para pimiento los valores calculados fueron 1500, 1173 y 1731 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  para 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo, respectivamente. Los valores de NNI máximos determinados, los cuales corresponden al segmento de la línea horizontal estuvieron muy cercanos a  $\text{NNI}=1.0$  en todos los cultivares.

Aunque el número de estudios que han establecido relaciones lineales entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y el NNI son muy pocos (Bélanger et al., 2003; Peña-Fleitas et al., 2015; Rodríguez et al., 2021), se ha obtenido una fuerte relación para considerar que la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia es una medida sensible del estado de N de los cultivos. Esta sensibilidad se ve reflejada aun cuando se comparan diferentes cultivares de una misma especie de cultivo.

#### *7.4.2. Respuesta del cultivar sobre las medidas del contenido de N en la hoja (%N)*

En las medidas del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino ('Strategos', 'Pradera', 'Mitre'), melón ('Tezac', 'Magiar', 'Jacobo') y pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) hubo diferencias significativas entre cultivares, aunque las diferencias no fueron consistentes. En general, las diferencias entre cultivares en el contenido de N en hoja para los tres cultivos, fueron relativamente pequeñas y menos consistentes que las diferencias en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia entre los mismos cultivares.

Comparando las diferencias en valores relativos, en el cultivo de pepino el cultivar 'Strategos' presentó los valores superiores en los tratamientos N2 y N3. La medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del cultivar 'Strategos' fue en promedio un 25% mayor que 'Pradera' y 'Mitre', y en la medida del contenido de N en la hoja un 9% mayor. En el melón, el cultivar 'Tezac' presentó los valores inferiores comparado a 'Magiar' y 'Jacobo', tuvo en promedio un 30% menos en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y un 11% menos en la medida del contenido de N en la hoja en el tratamiento N1. En promedio, en el tratamiento N2 y N3, 'Tezac' presentó un 24% menos en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y un 10% menos en el contenido de N en la hoja respectivamente. En pimiento, las diferencias entre los cultivares parecen ser poco claras. En general, 'Melchor' presentó los valores inferiores comparado a 'Machado' y Lamuyo, tuvo en promedio un 8% menos en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y tuvo solamente un 3% menos en la medida del contenido de N en la hoja en el tratamiento N2 y N3.

Las diferencias de los cultivares entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y entre el contenido de N en la hoja presentadas anteriormente reflejan la sensibilidad que puede tener la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia como un indicador del estado de N en algunos cultivos hortícolas (Farneselli et al., 2014; Goffart et al., 2008). Las mayores diferencias entre los cultivares de un mismo cultivo se presentaron en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia, siendo esta medida más sensible a los cambios en el estado de N del cultivo (Olf et al., 2005; Villeneuve et al., 2002) que el análisis del contenido de N en la hoja (Majić et al., 2008; Olsen and Lyons, 1994).

#### *7.4.3. Evaluación de la relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia y el contenido de N en la hoja*

En general, se presentaron fuertes y consistentes diferencias entre el cultivo de pepino y melón principalmente, durante la mayor parte del cultivo. En la relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y el contenido de N en la hoja se presentaron diferencias entre las pendientes de los cultivares de las tres especies de cultivos hortícolas.

En los cultivares de pepino, las pendientes fueron similares entre 22 y 50 DDT (0.0026–0.0033) con  $R^2$  de 0.71–0.73, en el melón entre el periodo de 34 y 76 DDT



---

(0.0016–0.0022) con  $R^2$  de 0.65–0.78 y en pimiento entre 27 y 125 DDT (0.0010–0.0011) con  $R^2$  de 0.62–0.75, también presentando pendientes muy similares.

Dentro de cada especie de cultivo hortícola, las diferencias en los cultivares tuvieron relaciones similares. El comportamiento de las relaciones en cada cultivo indica que el cultivar puede afectar la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo, pero no la relación que existe entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja. Observaciones similares fueron hechas por Westerveld et al. (2007). Bajo otras condiciones, en un cultivo de tomate sembrado al aire libre, Carson et al. (2016) correlacionó ( $r=0.38$ ) la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y el contenido de N total (%N) considerando esta relación como no significativa en su estudio.

El comportamiento de las relaciones en cada cultivar de cada especie de cultivo indica que el cultivar puede afectar la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo, pero no la relación que existe entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja (Westerveld et al., 2007).

#### 7.4.4. Evaluación de la relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y NNI

Los resultados de la evaluación mediante el análisis de la regresión lineal de rectas segmentadas para las tres especies de cultivos hortícolas se presentan en el Anexo 1 (sección 13). Para cada cultivo de pepino, melón y pimiento, los tres cultivares presentaron ecuaciones generalmente similares. Además, para los tres cultivares de pepino, melón y pimiento, los rangos respectivos de los valores de  $R^2$  para los análisis de regresión de rectas segmentadas fueron 0.76–0.83, 0.56–0.70 y 0.79–0.83, indicando una fuerte relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y el NNI. Los valores de  $Sav_0$  (el valor de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  asociado con el valor máximo de NNI) fueron generalmente similares para las diferentes especies de cultivos, con diferentes valores en cada especie. Las similitudes en las ecuaciones de regresión de rectas segmentadas y los valores de  $R^2$  asociados a los diferentes cultivares en cada especie, sugieren que las relaciones entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia el NNI fueron similares para diferentes cultivares dentro de una especie.

Los valores de  $Sav_0$  al combinar los tres cultivares para cada especie de cultivo fueron 431, 1072 y 1661 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ , para pepino, melón y pimiento, respectivamente. El valor de  $Sav_0$  para el pimiento fue similar al valor de 1400 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  derivado para tres cultivos de pimiento determinados en el Capítulo 3 (Rodríguez et al., 2021). Los valores de  $Sav_0$  son indicadores de los valores umbrales de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia, por debajo de los cuales el cultivo es deficiente en N. Los valores determinados en este trabajo sugieren que existen diferencias entre estas tres especies de cultivos.

## **7.5. Conclusiones**

El cultivar podría tener un efecto sobre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja de los cultivos hortícolas en invernadero. Ambos métodos podrían ser usados para evaluar el estado del N de los cultivos, aunque es posible que sea necesario derivar valores de suficiencia específicos para los diferentes cultivares. Las diferencias relativas entre los cultivares demuestran que la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia es una medida más sensible que el contenido de N en la hoja, principalmente entre los cultivares de pepino y melón. La fuerte relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja en cada uno de los cultivares de los diferentes cultivos y la similitud entre las pendientes sugieren que el comportamiento en la relación fue muy similar. Por lo tanto, el cultivar podría afectar la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja, más no la relación presentada entre ellos. Se recomienda realizar más estudios en otros cultivos y cultivares para comprobar este comportamiento en otras especies hortícolas.

## **7.6. Referencias**

- Anonymous., 1991. Council directive 91/676/EEC concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. Off. J. Eur. Communities. L135, 1-8.
- Bélangier, G., Walsh, J.R., Richards, J.E., Milburn, P.H., Ziadi, N., 2003. Critical Petiole Nitrate Concentration of Two Processing Potato Cultivars in Eastern Canada. *Am. J. Potato Res.* 80, 251–262. <https://doi.org/10.1007/BF02855361>
- BOJA., 2015. Orden de 1 de junio de 2015, por la que se aprueba el programa de actuación aplicable en las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos de fuentes agrarias designadas en Andalucía. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. N°111. [WWW Document]. URL <https://www.juntadeandalucia.es/boja/2015/111/index.html> (accessed 10.22.20).
- Carson, L., Ozores-Hampton, M., Morgan, K., 2016. Correlation of petiole sap nitrate-nitrogen concentration measured by ion selective electrode, leaf tissue nitrogen concentration, and tomato yield in Florida. *J. Plant Nutr.* 39, 1809–1819. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1187743>
- Casas, A., Casas, E., 1999. El análisis de suelo-agua-planta y su aplicación en la nutrición de cultivos hortícolas en la zona del sureste peninsular. Ed. Caja Rural de Almería. España.
- de Souza, R., Grasso, R., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., Padilla, F.M., 2020. Effect of cultivar on chlorophyll meter and canopy reflectance measurements in cucumber. *Sensors* 20. <https://doi.org/10.3390/s20020509>
- Di, H.J., Cameron, K.C., 2002. Nitrate leaching in temperate agroecosystems: Sources, factors and mitigating strategies. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 64 (3), 237–256.

<https://doi.org/10.1023/A:1021471531188>

Farneselli, M., Tei, F., Simonne, E., 2014. Reliability of Petiole Sap Test for N Nutritional Status Assessing in Processing Tomato. *J. Plant Nutr.* 37, 270–278. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.859696>

Gázquez, J.C., Pérez, C., Meca, D.E., Segura, M.D., Domene, M.A., De La Cruz, E., López, J.C., Buendía, D., 2017. Comparative study of tomato production strategies for long-cycle crop in enarenado and for inter-planting in different substrates systems in the Mediterranean area. *Acta Hort.* 1170, 773–776. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.98>

Geraldson, C.M., Tyler, K.B., 1990. Plant analysis as an aid in fertilizing vegetable crops., in: Westerman, R.L. (Ed.), *Soil Testing and Plant Analysis*, 3rd Edn. Soil Science Society of America, USA, pp. 549–562.

Goffart, J.P., Olivier, M., Frankinet, M., 2008. Potato Crop Nitrogen Status Assessment to Improve N Fertilization Management and Efficiency: Past-Present-Future. *Potato Res.* 51, 355–383. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9118-x>

Greenwood, D.J., Lemaire, G., Gosse, G., Cruz, P., Draycott, A., Neeteson, J.J., 1990. Decline in Percentage N of C3 and C4 Crops with Increasing Plant Mass. *Ann. Bot.* 66, 425–436. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088044>

Grizzetti, B., Bouraoui, F., Billen, G., van Grinsven, H., Cardoso, A.C., Thieu, V., Garnier, J., Curtis, C., Howarth, R., Johnes, P., 2011. Nitrogen as a threat to European soil quality, in: *The European Nitrogen Assessment*. Sutton, M. A Howard, C. M Erisman, J. W Billen, G Bleeker, A Grennfelt, P van Grinsven, H, Sutton, M.A., Howard, C.M., Erisman, J.W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., van Grinsven, H. (Eds.). Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 379–404. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511976988.024>

Hartz, T.K., Hochmuth, G.J., 1996. Fertility Management of Drip-irrigated Vegetables. *Horttechnology* 6, 168–172.

Hochmuth, G.J., 1994. Efficiency Ranges for Nitrate-nitrogen and Potassium for Vegetable Petiole Sap Quick Tests. *Horttechnology* 4, 218–222. <https://doi.org/10.21273/horttech.4.3.218>

Hochmuth, G., 2012. Plant Petiole Sap-Testing For Vegetable Crops. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/CV/CV00400.pdf>.

Ju, X.T., Xing, G.X., Chen, X.P., Zhang, S.L., Zhang, L.J., Liu, X.J., Cui, Z.L., Yin, B., Christie, P., Zhu, Z.L., Zhang, F.S., 2009. Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3041–3046. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813417106>

Junta de Andalucía, 2020. Síntesis de la campaña de Hortícolas protegidos de Almería. Campaña 2019/20. Observatorio de precios y mercados. Agencia de Gestión Agraria y Pesquera de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Almería,

- España. (In Spanish). [WWW Document]. URL <https://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?action=RecordContent&table=12030&element=3311406&subsector=&> (accessed 5.5.21).
- Lemaire, G., Jeuffroy, M.H., Gastal, F., 2008. Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. Theory and practices for crop N management. *Eur. J. Agron.* 28, 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.01.005>
- Majić, A., Poljak, M., Sabljo, A., Knezović, Z., Horvat, T., 2008. Efficiency of use of chlorophyll meter and cardy-ion meter in potato nitrogen nutrition supply. VII. *Alps-Adria Sci. Work.* 36, 1431–1434.
- Min, J., Zhao, X., Shi, W.M., Xing, G.X., Zhu, Z.-L., 2011. Nitrogen Balance and Loss in a Greenhouse Vegetable System in Southeastern China. *Pedosphere* 21, 464–472. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60148-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60148-3)
- Olf, H.W., Blankenau, K., Brentrup, F., Jasper, J., Link, A., Lammel, J., 2005. Soil- and plant-based nitrogen-fertilizer recommendations in arable farming. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 414–431. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520526>
- Olsen, J.K., Lyons, D.J., 1994. Petiole sap nitrate is better than total nitrogen in dried leaf for indicating nitrogen status and yield responsiveness of capsicum in subtropical Australia. *Aust. J. Exp. Agric.* 34, 835–843. <https://doi.org/10.1071/EA9940835>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2014. Evaluation of optical sensor measurements of canopy reflectance and of leaf flavonols and chlorophyll contents to assess crop nitrogen status of muskmelon. *Eur. J. Agron.* 58, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.04.006>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2016. Proximal optical sensing of cucumber crop N status using chlorophyll fluorescence indices. *Eur. J. Agron.* 73, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.11.001>
- Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., Farneselli, M., Padilla, F.M., 2015. Assessing crop N status of fertigated vegetable crops using plant and soil monitoring techniques. *Ann. Appl. Biol.* 167, 387–405. <https://doi.org/10.1111/aab.12235>
- Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Padilla, F.M., Rodríguez, A., Thompson, R.B., 2021. Use of a portable rapid analysis system to measure nitrate concentration of nutrient and soil solution, and plant sap in greenhouse vegetable production. *Agronomy.* 11, 819. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050819>
- Rodríguez, A., Peña-Fleitas, M.T., Padilla, F.M., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2021. Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper. *Sci. Hort. (Amsterdam)*. 285, 110157. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110157>
- Soto, F., Gallardo, M., Giménez, C., Peña-Fleitas, T., Thompson, R.B., 2014. Simulation of

- tomato growth, water and N dynamics using the EU-Rotate\_N model in Mediterranean greenhouses with drip irrigation and fertigation. *Agric. Water Manag.* 132, 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.10.002>
- Soto, F., Gallardo, M., Thompson, R.B., Peña-Fleitas, M.T., Padilla, F.M., 2015. Consideration of total available N supply reduces N fertilizer requirement and potential for nitrate leaching loss in tomato production. *Agric. Ecosyst. Environ.* 200, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.10.022>
- Thompson, R.B., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., Giménez, C., Fernández, M.D., 2007. Identification of irrigation and N management practices that contribute to nitrate leaching loss from an intensive vegetable production system by use of a comprehensive survey. *Agric. Water Manag.* 89, 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2007.01.013>
- Thompson, R.B., Tremblay, N., Fink, M., Gallardo, M., Padilla, F.M., 2017. Tools and Strategies for Sustainable Nitrogen Fertilisation of Vegetable Crops, in: Tei, F., Nicola, S., Benincasa, P. (Ed.), *Advances in Research on Fertilization Management of Vegetable Crops*. Springer, Cham, Switzerland, pp. 11–63. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53626-2_2)
- Thompson, R.B., Incrocci, L., van Ruijven, J., Massa, D., 2020. Reducing contamination of water bodies from European vegetable production systems. *Agric. Water Manag.* 240, 106258. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106258>
- Valera, L.D., Belmonte, L.J., Molina, F.D., López, A., 2016. Greenhouse agriculture in Almeria. A comprehensive techno-economic analysis. *Cajamar Caja Rural, Almeria. Spain.*
- Villeneuve, S., Coulombe, J., Bélec, C., Tremblay, N., 2002. A Comparison of Sap Nitrate Test and Chlorophyll Meter for Nitrogen Status Diagnosis in Broccoli (*Brassica oleracea* L. spp. *italica*). *Acta Hortic.* 571, 171–177. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.571.20>
- Waterer, D., 1997. Petiole sap NO<sub>3</sub>-N testing as a method for monitoring nitrogen nutrition of potato crops. *Can. J. Plant Sci.* 77, 273–278. <https://doi.org/10.4141/P96-091>
- Westerveld, S.M., McDonald, M.R., McKeown, A.W., 2007. Establishment of Critical Sap and Soil Nitrate Concentrations using a Cardy Nitrate Meter for Two Carrot Cultivars Grown on Organic and Mineral Soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 38, 1911–1925. <https://doi.org/10.1080/00103620701435654>



## **8. CAPÍTULO CINCO:**

---

**Evaluación del muestreo y almacenamiento de los peciols y la savia sobre la medida de nitrato en savia de peciols en cultivos hortícolas en suelo en invernadero**





### 8.1. Introducción

El trabajo realizado para el desarrollo de este capítulo ha sido elaborado bajo la necesidad de mejorar el monitoreo y la gestión del N en los cultivos hortícolas en invernadero en el sureste de España. Es necesario optimizar la gestión del N con la implementación de prácticas que permitan reducir los problemas medio ambientales que han sido asociados a las prácticas actuales del manejo del N en los cultivos. La problemática respecto a la contaminación por el exceso de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) al medio ambiente y los planes de actuación que han sido implementados se han descrito en la introducción de esta tesis y en los capítulos anteriores.

Un enfoque de monitoreo del estado de N basado en el análisis en las plantas, que brinda resultados útiles y rápidos en los cultivos hortícolas en el campo es la medida directa de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  ( $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ ) en la savia del peciolo de la hoja. Este método es considerado como un indicador sensible a los cambios del estado del N en los cultivos hortícolas (Farneselli et al., 2014; Goffart et al., 2008; Hochmuth, 1994; Olf et al., 2005) y puede evaluarse inmediatamente después de tomar una muestra en la propia finca utilizando equipos de medición rápida (Peña-Fleitas et al., 2021). El Índice de Nutrición de N (Nitrogen Nutrition Index; NNI) es un indicador efectivo y estable de la medida del estado del N del cultivo (Lemaire et al., 2008): ha sido posible relacionarlo consistentemente con la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo en cultivos hortícolas en invernadero como tomate (Peña-Fleitas et al., 2015) y pimiento (Capítulo 3 de esta tesis).

Para realizar el muestreo de los peciolo y determinar la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia se han sugerido algunos procedimientos (Hochmuth, 1994). Hay recomendaciones sobre ciertos factores del muestreo o de la gestión de la muestra que podrían influir en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo (Hochmuth, 1994; Scaife y Stevens, 1983) como la hora del muestreo, la gestión de la muestra y la selección de la hoja que se debe muestrear. Pero existen pocos estudios científicos publicados sobre el efecto de estos factores en la medición de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia como un indicador del estado de N de cultivos hortícolas. El efecto de estos factores sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia podrían causar incertidumbre a la hora de realizar mediciones. Por lo tanto, se considera importante desarrollar recomendaciones basadas en estudios científicos, que demuestren el efecto que pueden tener estos factores sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo.

La influencia que puede tener la hora de muestreo de los peciolo es un factor que se debe considerar para obtener medidas óptimas, por lo que existen ciertas recomendaciones sobre la hora del muestreo. Algunos estudios han encontrado que la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia

fue más consistente en muestreos realizados entre las 11:00 y 14:00 (Zhang et al., 1996). Otros recomiendan que los muestreos se realicen solamente en horas por la mañana (Vitosh y Silva, 1996). Sin embargo, también se ha demostrado que el efecto de la hora sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia no es significativo (Coltman, 1985; Scaife y Stevens, 1983). Además, relacionado a la hora del día, también se ha considerado la radiación solar como otro factor que podría afectar la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia (Zhang et al., 1996).

Se han determinado algunas recomendaciones sobre la forma en que se deben manipular las muestra mientras se realiza la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia. Hochmuth, (1994) informó que el procedimiento de la manipulación de la muestra afectó la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en peciolo de tomate, aunque los estudios que han sido publicados son escasos. En un almacenamiento a corto plazo, Hartz et al. (1994) indicó que con los peciolo en refrigeración la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia no se vio alterada.

Por otro lado, la recomendación de la hoja que se debe muestrear para obtener medidas representativas es la selección de la última hoja completamente expandida, pero también hay pocos estudios publicados que refuerzan esta recomendación. En cultivos como col (Scaife y Stevens, 1983), patata (MacKerron et al., 1995; Westermann et al., 1994) y tomate (Coltman, 1985; Llanderal et al., 2018) se han encontrado diferencias en las  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de acuerdo a la posición de la hoja muestreada. A nivel comercial, empresas privadas recomiendan muestrear hojas jóvenes y maduras por separado para contrastar los parámetros medidos en savia (Nova Crop Control, 2021).

Los objetivos del presente trabajo fueron: (i) evaluar el efecto de la hora de muestreo, (ii) analizar la gestión de los peciolo y savia diluida después del muestreo y (iii) determinar la influencia de la posición de la hoja muestreada sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo.

## 8.2. Materiales y métodos

En un cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L. 'Melchor') y un cultivo de melón (*Cucumis melo* L. 'Bosito') trasplantado en suelo en invernadero, se recolectaron muestras de peciolo de las hojas para medir la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia. Los muestreos se realizaron en el mismo cultivo de pimiento mencionado en el desarrollo del Capítulo 4 de esta tesis (Tabla 1). Los muestreos en el cultivo de melón se hicieron en un ensayo similar al mencionado en el Capítulo 4 de esta tesis, el cual fue trasplantado al año siguiente (Tabla 1). Se seleccionó únicamente un cultivar para el muestreo de los peciolo utilizados en este capítulo; en cada uno de los ensayos muestreados había tres cultivares. En la sección 8.2.2 se presenta más información sobre los cultivos.

### 8.2.1. Sitio experimental

Los cultivos fueron cultivados bajo condiciones similares a las de la producción comercial intensiva de hortalizas en el sureste (SE) de España. El invernadero estaba situado en la Estación Experimental de la Universidad de Almería ubicada en Retamar, Almería, SE España (36° 51' N, 2° 16' O y 92 m de elevación). Los cultivos crecieron en el mismo invernadero, aunque en fechas diferentes.

El invernadero era tipo multitúnel, con una estructura multicapa de acero galvanizado, con paredes de policarbonato y un techo trilaminado de polietileno de baja densidad de 200  $\mu\text{m}$  de espesor con una transmitancia a la radiación fotosintéticamente activa (Photosynthetically Active Radiation; PAR) del 60%. El invernadero tenía ventilación pasiva (dos paneles laterales y ventanas en el techo abatibles), orientado de este a oeste (Padilla et al., 2014). Presenta un suelo típico de la región llamado suelo “enarenado” (Gázquez et al., 2017; Thompson et al., 2007) que consta de una capa de 30 cm de suelo de textura franco limosa importada sobre un suelo franco original y una capa de 10 cm de grava fina (2 a 5 mm de diámetro) colocada como mantillo sobre el suelo importado. El invernadero y el suelo han sido descritos detalladamente en los Capítulos 1, 2 y 3.

Ambos cultivos fueron regados por medio de un sistema de riego por goteo, con un suministro de nutrientes vía fertirriego. Durante los cultivos de pimiento y melón se aplicaron soluciones nutritivas completas. La cinta de goteo se distribuyó en líneas pareadas, la separación entre líneas dentro de cada línea pareada fue de 0.8 m, y la distancia entre líneas pareadas adyacentes fue de 1.2 m, con 0.5 m entre los emisores de goteo, dando una densidad de 2 plantas  $\text{m}^{-2}$ . Cada planta estaba inmediatamente adyacente a un emisor con una descarga de 3 L  $\text{h}^{-1}$ . El coeficiente de uniformidad medido al inicio de cada cultivo fue >95%.

De acuerdo con la distribución requerida para el desarrollo del ensayo mencionado en el Capítulo 4 sobre tres cultivares de pimiento y melón con aplicaciones de tres diferentes tratamientos con concentraciones de N, en cada ciclo de los cultivos, el invernadero se dividió en 12 parcelas de 12 m (ancho)  $\times$  6 m (largo) cada una, con cuatro repeticiones por tratamiento y con hileras del cultivo alineadas de norte a sur. Cada parcela tenía seis líneas pareadas, con 24 plantas por línea pareada y 144 plantas en total, asignando 48 plantas por cultivar (ver capítulo 4). El área de cultivo fue de 1327  $\text{m}^2$  incluyendo el área de los bordes.

De las 12 parcelas, se usaron 4 para muestrear los peciolos para el experimento 1 (Pimiento y melón) y el experimento 2 (Melón). Para el experimento 3 (Melón), se muestreó en las 12 parcelas.

8.2.2. Cultivos y tratamientos de N

El cultivo de pimiento se cultivó desde el 22 de julio del 2020 hasta el 28 de enero del 2021, con una duración del ciclo del cultivo de 190 días después del trasplante (DDT) (Tabla 1). Las plantas de pimiento fueron trasplantadas a los 35 días después de siembra. El melón se cultivó desde el 26 de febrero del 2021 hasta el 07 de junio del 2021, con una duración del ciclo del cultivo de 101 DDT. Las plantas de melón fueron trasplantadas a los 37 días después de siembra. Las fechas de siembra y duración de los cultivos se presentan en la Tabla 1.

Las parcelas estaban organizadas en tres sectores de riego, cada una con cuatro repeticiones en un diseño de bloques al azar. En cada sector de riego se realizó fertirriego con tres diferentes concentraciones de N, siendo: N muy deficiente (N1), N suficiente (N2) y N excesivo (N3). Las cantidades totales de riego y N aplicadas se presentan en la tabla 1. El N mineral se aplicó principalmente como  $\text{NO}_3^-$  (el 92% de lo aplicado), el resto se aplicó como  $\text{NH}_4^+$ . Aparte del N, se aplicaron soluciones nutritivas completas durante los cultivos para asegurar que los demás nutrientes no fueran limitantes (Tabla Suplementaria 1; capítulo 4). En cada riego se aplicaron los nutrientes vía fertirriego cada 1–4 días según la demanda del cultivo, siendo más frecuente durante los periodos cálidos y menos durante los periodos más fríos.

**Tabla 1.** Información general de los cultivos de pimiento y melón y de los tratamientos de N. Incluye la fecha de trasplante y duración del cultivo, la concentración de N aplicada en la solución nutritiva, la cantidad de N mineral aplicado y el riego total aplicado.

Cultivo	Fecha de trasplante	Fecha final (duración)	Tratamiento de N <sup>a</sup>	[N] en la solución nutritiva ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	N total aplicado ( $\text{kg N ha}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	Riego ( $\text{mm}$ ) <sup>c</sup>
Pimiento	22/07/2020	28/01/2021 (190 días)	N3	14.2	704	353
Melón	26/02/2021	07/06/2020 (101 días)	N1	2.8	57	148
			N2	8.2	226	197
			N3	14.9	509	244

<sup>a</sup>N1: muy deficiente; N2: suficiente; N3 excesivo.

<sup>b</sup>Durante el periodo en el que se aplicaron los tratamientos de N.

<sup>c</sup>Durante todo el ciclo del cultivo.

Los riegos fueron programados para mantener el potencial matricial del suelo en la zona radical a 15 cm de profundidad, entre -10 y -30 kPa; se utilizó un tensiómetro (Irrometer, Co., Riverside, CA, EE. UU.) por parcela experimental para medir el potencial matricial del suelo. Para controlar las altas temperaturas dentro del invernadero se

realizaron blanqueos de la cubierta plástica, aplicando suspensiones de  $\text{CaCO}_3$ , reduciéndose la PAR a un 15–50%.

Las plantas de pimiento fueron entutoradas con un sistema local conocido como “enfajado”, que consiste en colocar las cuerdas de nailon horizontalmente al costado del cultivo. A los 17 DDT se eliminaron las flores y frutos recién cuajados (aclareo) hasta la primera cruz del tallo, a los 104 DDT se realizó un deshojado hasta la altura de la primera cruz del tallo, favoreciendo la ventilación y reduciendo el ataque de enfermedades.

Las plantas de melón fueron entutoradas apoyándolas en guías verticales con cuerda de nailon y siendo podadas periódicamente, iniciando las podas a los 17 DDT, con un total de 5 podas durante todo el ciclo, se despuntó el tallo principal de las plantas de melón eliminando el brote apical a los 55 DDT.

### *8.2.3. Medidas climáticas*

Las condiciones climáticas (temperatura del aire y radiación solar) fueron medidas continuamente dentro del invernadero. La temperatura del aire se midió con una sonda de temperatura RTD (modelo 43347; Campbell Scientific Instruments, Logan UT, EEUU). La radiación solar se midió con un piranómetro (modelo SKS 1110; Skye Instruments, Llandrindod Wells, Wales, UK) instalado a 2 m de altura. Todas las mediciones se tomaron cada 30 segundos y los promedios de 30 min se almacenaron utilizando un registrador de datos (modelo CR10X, Campbell Scientific Inc., UT, USA).

### *8.2.4. Medidas de la $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$ en la savia*

Los peciolos se cortaron en trozos de 1 cm de largo y fueron prensados inmediatamente con una prensa manual de ajos. Una parte del líquido extraído fue diluido con agua destilada, con un factor de dilución de 1:10 en el pimiento y melón. Usando una pipeta Pasteur, se colocó una parte (2 mL) de la muestra diluida de savia en un sistema portátil con electrodo de ion selectivo (Ion-selective electrode; ISE) de análisis rápido (LAQUAtwin NO3-11; HORIBA, Ltd., Kyoto, Japan). Con cada muestra replicada y diluida se realizaron dos medidas, de ambas se obtuvo un promedio para obtener una sola medida de la muestra. Antes de cada muestreo, el ISE fue calibrado en dos puntos usando los estándares de 150 y 2000  $\text{mg NO}_3^- \text{L}^{-1}$  sugeridos por el fabricante.

Una consideración importante con los ISE es que la temperatura de la muestra puede afectar notablemente la medida (M. T. Peña-Fleitas, comunicación personal). Por lo tanto, las muestras de la savia diluida contenidas en un matraz aforado de vidrio (25 mL) fueron colocadas en baños de agua caliente o fría hasta mantener la temperatura a 20°C; se usó un

termómetro digital para controlar la temperatura de la muestra. Cada medida se realizó cuando la muestra alcanzó la temperatura indicada.

#### *8.2.5. Experimentos*

Se llevaron a cabo tres diferentes experimentos para medir la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo en un cultivo de pimiento y un cultivo de melón. En el cultivo de pimiento y melón se realizaron los muestreos para el experimento 1, en el cultivo de melón se realizaron los muestreos para el experimento 2 y el experimento 3.

##### 8.2.5.1. Experimento 1: Efecto de la hora de muestreo de los peciolo sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia

En este experimento se realizaron cuatro ensayos, cada ensayo correspondió a un día de muestreo. Dos ensayos fueron realizados en un cultivo de pimiento y los otros dos ensayos en un cultivo de melón. Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo se realizaron en el pimiento el 22 de octubre del 2020 (92 DDT) y el 02 de diciembre del 2020 (133 DDT). En el melón se realizaron el 09 de abril del 2021 (42 DDT) y el 19 de abril del 2021 (52 DDT). En cada día de medición se realizaron los muestreos a las 08:00, 10:00, 12:00 y 14:00 horas. Se seleccionaron los días de muestreos procurando que las condiciones climáticas fueran diferentes en ambos días de medición de cada cultivo.

En cada hora indicada de muestreo, las últimas hojas completamente expandidas de 32 y 16 plantas fueron removidas en el cultivo de pimiento y melón respectivamente. Las hojas se muestrearon de las plantas que recibieron concentraciones excesivas de N (Tratamiento N3). Inmediatamente después del muestreo, los peciolo y las láminas foliares fueron separadas y llevadas a un laboratorio adyacente al invernadero. Los peciolo fueron separados en cuatro repeticiones. La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo se midió como se indica en la sección 8.2.4, manteniendo a 20°C la temperatura de la muestra en el momento de la medición.

##### 8.2.5.2. Experimento 2: Gestión de los peciolo muestreados y savia diluida sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia

Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo para realizar este experimento se realizaron en el cultivo de melón el 16 de abril del 2021 (49 DDT). El análisis de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia se realizó considerando (i) los peciolo de las hojas y (ii) la savia diluida (Figura Suplementaria 1). Ambos métodos fueron simultáneamente expuestos a un almacenamiento refrigerado a 5°C y a un almacenamiento no refrigerado (Tabla 2) a temperatura ambiente, aproximadamente a 20°C. Considerando los efectos de la temperatura sobre la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia usando el ISE, las muestras

refrigeradas se colocaron a temperatura ambiente unos 15 minutos antes de realizar los baños de agua caliente para normalizar la temperatura a 20°C. El muestreo se realizó entre las 08:00 y 09:00 h.

Se muestrearon los peciols de las últimas hojas completamente expandidas de las plantas que recibieron concentraciones excesivas de N (Tratamiento N3). Se usaron 32 peciols para realizar la medida inmediata de la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia después de muestrear. Con esta muestra se aseguró un volumen suficiente de savia diluida para el ensayo de la sección 8.2.5.2.2. Estos peciols fueron procesados según la metodología descrita en la sección 8.2.4. en un laboratorio adyacente al invernadero.

#### 8.2.5.2.1. Gestión de peciols

Para medir la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia del peciolo se muestrearon las últimas hojas completamente expandidas de 16 plantas para cada tratamiento (Tabla 2). Los peciols se cortaron en dos trozos, se mezclaron y se dividieron en porciones. Una porción fue refrigerada, otra porción se mantuvo no refrigerada y otra porción de peciols troceados fueron colocados en el congelador del frigorífico durante 7 días (Tabla 2) (Figura Suplementaria 1). Tanto los peciols refrigerados, los no refrigerados y los peciols en congelación fueron colocados en bolsas de plástico tipo zip, extrayendo el aire y cerrando la bolsa. Los peciols refrigerados fueron almacenados en una nevera portátil a 5°C donde fueron transportados al laboratorio de la Universidad de Almería (UAL) durante aproximadamente 20 min. Al llegar al laboratorio, estas muestras fueron colocadas en un frigorífico.

A las 2, 3, 6 y 24 horas, y a los 7 días después del muestreo se procedió a medir la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  de la savia de los peciols como se indica en la sección 8.2.4. Alrededor de 15 minutos antes de cada hora correspondiente de cada medida, se sacaron las muestras refrigeradas, midiendo a su vez las muestras no refrigeradas, controlando siempre la temperatura de la muestra a 20°C como se menciona en la sección 8.2.4. Para cada medida de la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia se midieron cuatro repeticiones por tratamiento.

#### 8.2.5.2.2. Gestión de savia diluida

La savia diluida restante de la muestra donde se realizó la medida inmediata de la  $[\text{NO}_3^- - \text{N}]$  en la savia que se menciona al final de la sección 8.2.5.2 se dividió en envases Eppendorf de 1.5 mL, almacenando una porción de los envases en refrigeración y la otra porción de envases se mantuvo almacenada sin refrigeración (Figura Suplementaria 1). Los envases refrigerados fueron colocados en una nevera portátil a 5°C donde fueron

transportados al laboratorio de la Universidad de Almería (UAL) durante aproximadamente 20 min. Al llegar al laboratorio, estas muestras fueron colocadas en el frigorífico.

A las 2, 3, 6 y 24 horas después del muestreo se midió la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia previamente diluida (Tabla 2). Alrededor de 15 minutos antes de cada hora correspondiente de medida, se sacaron las muestras refrigeradas, midiendo a su vez las muestras no refrigeradas, controlando siempre la temperatura de la muestra a 20°C. Para cada medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia se midieron cuatro repeticiones por tratamiento. La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia previamente diluida se midió como se indica en la sección 8.2.4.

**Tabla 2.** Tratamientos de los diferentes procedimientos en la gestión de peciolo y savia diluida.

Tratamientos	
<i>Peciolo</i>	<i>Savia diluida</i>
Medida inmediata	Medida inmediata
2 horas, refrigerados	2 horas, refrigerada
3 horas, refrigerados	3 horas, refrigerada
6 horas, refrigerados	6 horas, refrigerada
24 horas, refrigerados	24 horas, refrigerada
7 días en congelación	-
2 horas, no refrigerados	2 horas, no refrigerada
3 horas, no refrigerados	3 horas, no refrigerada
6 horas, no refrigerados	6 horas, no refrigerada
24 horas, no refrigerados	24 horas, no refrigerada

#### 8.2.5.3. Experimento 3: Influencia de la posición de los peciolo de las hojas muestreados en la planta sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia

Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo se realizaron en el melón el 12 de abril del 2021 (45 DDT). Se muestreó diferentes hojas en diferentes posiciones en plantas que recibieron tres concentraciones de N (Tratamientos N1, N2 y N3). Se muestreó en las 12 parcelas en las que estaba organizado el invernadero.

Las muestras se realizaron a primera hora de la mañana, entre las 08:00 y 09:00 h. Se extrajo la última hoja completamente expandida de 8 plantas, siendo ésta la posición alta de muestreo. También, al mismo tiempo se extrajo la quinta y décima hoja por debajo de la posición alta, siendo estas las posiciones media y baja de muestreo. Inmediatamente después del muestreo, los peciolo y las láminas foliares fueron separados.

Los peciolo fueron colocados en bolsas de plástico tipo zip, extrayendo el aire y colocándolos en una nevera portátil a 5°C donde fueron transportados al laboratorio de la



Universidad de Almería (UAL) durante aproximadamente 20 min. En el laboratorio, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo se midió como se indica en la sección 8.2.4.

### 8.2.6. Análisis de datos

#### 8.2.6.1. Experimento 1

Los efectos de las diferentes horas de muestreo sobre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo se evaluaron con análisis de varianza (ANOVA) unifactorial, siendo las diferentes horas de muestreo el único factor.

#### 8.2.6.2. Experimento 2

Para evaluar el efecto de la gestión de los peciolo y la savia diluida almacenada en refrigeración y sin refrigeración, se realizó un ANOVA anidada (NESTED-ANOVA), ya que no todos los niveles de un factor se cruzaron con los niveles del otro factor (Tabla 2). El análisis se realizó (a) anidando el factor “tiempo de almacenamiento” (medida inmediata de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia vs. medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de peciolo congelados; Tabla 2) dentro del factor “tipo de almacenamiento” (refrigerado vs. no refrigerado), en el análisis de los muestreos y gestión de peciolo y (b) anidando el factor “tiempo de almacenamiento” (medida inmediata de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia; Tabla 2) dentro del factor “tipo de almacenamiento” (refrigerado vs. no refrigerado), en el análisis de los muestreos y gestión de la savia diluida. De esta forma se compararon todos los factores de medición para cada una de las formas de gestionar las muestras (peciolo o savia diluida).

Para representar las variaciones entre las medidas, se calcularon como porcentajes los cambios relativos en todas las medidas realizadas en los diferentes tratamientos respecto a las medidas realizadas inmediatamente después del muestreo. El error relativo (Relative Error; RE) promedio se calculó para cada tipo de almacenamiento (refrigerado; no refrigerado) y para cada muestra (peciolo; savia); se calculó como:

$$\frac{\text{valor (refrigerado; peciolo)} - \text{valor (no refrigerado; savia)}}{(\text{valor (refrigerado; peciolo)})} \times 100$$

#### 8.2.6.3. Experimento 3

Se realizó un ANOVA factorial para evaluar los efectos de las diferentes posiciones de la hoja (alta, media, y baja; Tabla 11) y las tres concentraciones de N (deficiente, suficiente y excesivo; Tabla 11), sobre la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia.

Los diferentes ANOVA se realizaron tras la verificación de los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad. Se emplearon pruebas LSD para comparaciones múltiples de las medias cuando los efectos del tratamiento fueron significativos a  $P < 0.05$ .

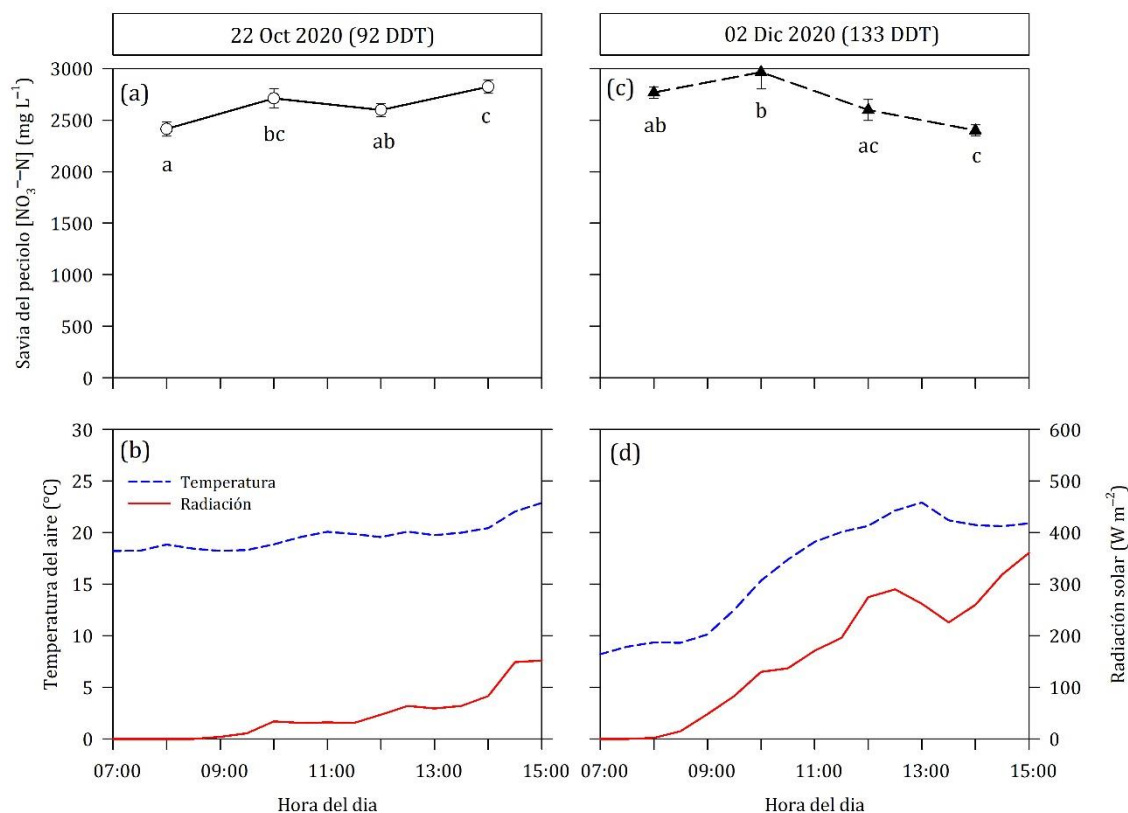
Los resultados de ANOVA se indicaron como: sin diferencias significativas en  $P \geq 0.05$  (ns), significativa en  $P < 0.05$  (\*), muy significativa en  $P < 0.01$  (\*\*) y altamente significativa en  $P < 0.001$  (\*\*\*). Para estos análisis estadísticos se utilizó el software Statistica 13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, EE. UU.).

### 8.3. Resultados

#### 8.3.1. Experimento 1: Efecto de la hora del día sobre las medidas de la $[NO_3^- - N]$ en la savia

##### 8.3.1.1. Medidas de la $[NO_3^- - N]$ en la savia en el cultivo de pimiento

El efecto de la hora de muestreo sobre las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia evaluadas en dos fechas durante el ciclo fueron inconsistentes (Figura 1; Tabla 3). Las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  mostraron cambios estadísticamente significativos debido a las diferentes horas de muestreo de los peciolo ( $P < 0.05$ ; Tabla 3).



**Figura 1.** Variación diurna de la (a, c)  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y la (b, d) evolución de la temperatura del aire (°C; línea punteada azul), y de la radiación solar ( $W m^{-2}$ ; línea continua roja) medida el 22 de octubre del 2020 (92 DDT) y el 02 de diciembre del 2020 (133 DDT) en un cultivo de pimiento en invernadero. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las horas del día según la prueba LSD. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

A los 92 DDT se presentó un aumento estadísticamente significativo entre la  $[NO_3^- - N]$  en la savia medida a las 08:00 h y a las 10:00 h, este aumento en valores absolutos fue de

297 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> (10%), manteniéndose constante en 2600 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> aproximadamente entre las 10:00 h y las 12:00 h y aumentando en valores relativos en 226 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> (6%) desde las 12:00 h hasta las 14:00 h (Figura 1 a; Tabla 3). Por otro lado, a los 133 DDT la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia tuvo una tendencia a disminuir después de las medidas del muestreo realizado a las 10:00 h, las diferencias entre las medidas de las 12:00 h y 14:00 h no fueron estadísticamente significativas. En promedio la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia disminuyó 565 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> (19%) (Figura 1 c; Tabla 3).

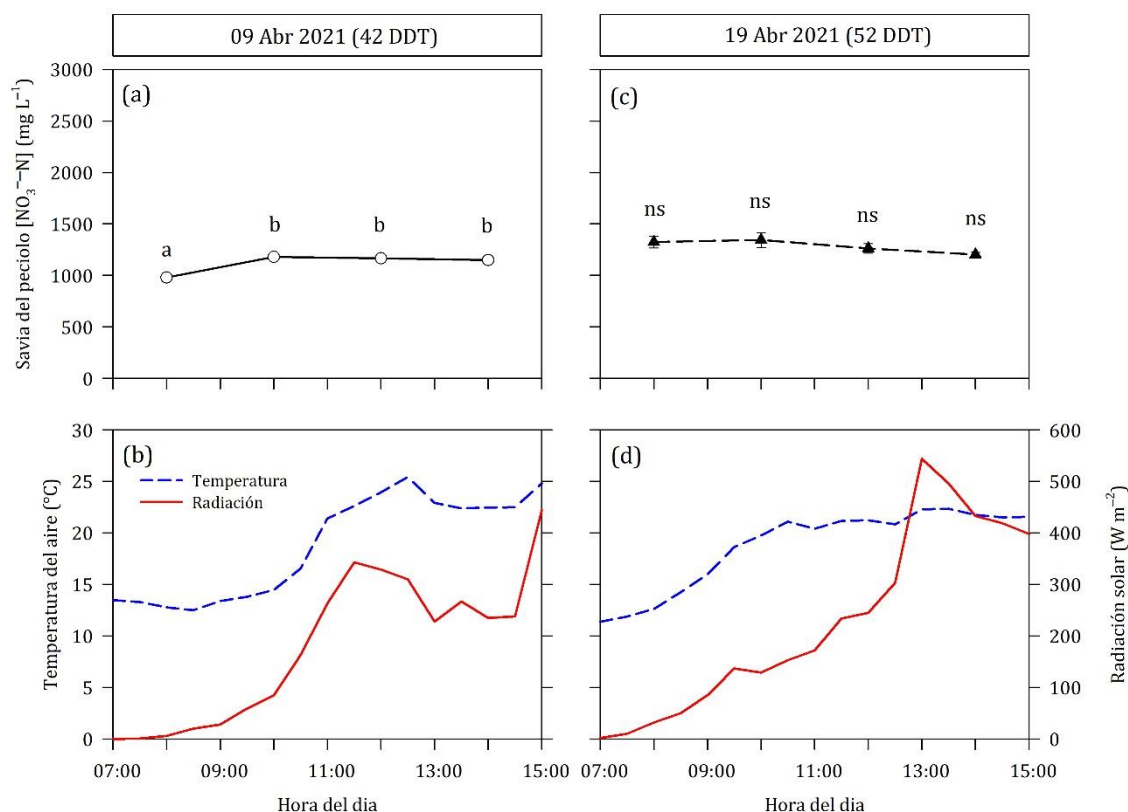
La relación entre la tendencia de las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia y las condiciones climáticas no fue clara (Figura 1). A los 92 DDT la temperatura del aire y la radiación solar fueron relativamente constantes durante las horas de los muestreos (Figura 1 b). No se observó una relación entre los cambios presentados en la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia y los cambios en la temperatura del aire y la radiación solar. A los 133 DDT la tendencia de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia a disminuir después de las 10:00 h coincidió con el aumento presentado en la temperatura del aire y la radiación solar (Figura 1d).

**Tabla 3.** Medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia realizadas a diferentes horas del día a los 92 y 133 DDT en el cultivo de pimiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las horas del día según la prueba LSD. El resumen del ANOVA se presenta como: no significativo en  $P > 0.05$  (ns), significativo en  $P < 0.05$  (\*), muy significativo en  $P < 0.01$  (\*\*) y altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*). Los valores son medias ( $n=4$ ) ± el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

Hora	Cultivo de pimiento	
	92 DDT <i>22 oct 2020</i>	133 DDT <i>02 dic 2020</i>
08:00	2414 ± 71 a	2767 ± 56 ab
10:00	2711 ± 92 bc	2965 ± 162 b
12:00	2598 ± 65 ab	2598 ± 103 ac
14:00	2824 ± 65 c	2400 ± 54 c
<i>Significancia</i>	*	**

### 8.3.1.2. Medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia en el cultivo de melón

El efecto de la hora de muestreo sobre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia evaluadas en dos fechas durante el ciclo fueron consistentes, aunque se presentó una excepción (Figura 2; Tabla 4).



**Figura 2.** Variación diurna de la (a, c) [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo y la (b, d) evolución de la temperatura del aire (°C; línea punteada azul), y de la radiación solar (W m<sup>-2</sup>; línea continua roja) medida el 09 de abril del 2021 (42 DDT) y el 19 de abril del 2021 (52 DDT) en un cultivo de melón en invernadero. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las horas del día según la prueba LSD. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

La [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia mostró diferencias estadísticamente significativas debido a las diferentes horas de muestreo de los peciolo ( $P < 0.05$ ; Tabla 4) en las medidas realizadas a los 42 DDT entre las 08:00 h y las 10:00 h, 12:00 h y 14:00 h únicamente, en promedio, el incremento en valores absolutos correspondió a 185 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> (16%) (Figura 2 a), a los 52 DDT entre la misma hora de muestreo no hubo diferencias significativas (Figura 2 b). Después de las 10:00h, la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia se mantuvo constante en 1165 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> aproximadamente, hasta las medidas de las 14:00 h. Por otro lado, a los 52 DDT, la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia fue constante desde la medida realizada a las 08:00 h hasta las 14:00 h, en promedio el valor de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia fue de 1283 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> durante las horas de medición (Figura 2 d; Tabla 4). De forma general, no se presentó ningún efecto de la hora de muestreo en las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia en el melón en ninguna de las dos fechas de muestreo.

Los cambios considerables en la temperatura del aire y la radiación solar durante el periodo de muestreo en los dos días de mediciones no influyeron en las medidas de la

[NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia (Figura 2). La diferencia significativa entre la medida de las 08:00 h y 10:00 h a los 42 DDT se presentó con un cambio relativamente muy pequeño en la radiación solar, y ningún cambio en la temperatura del aire (Figura 2 b).

**Tabla 4.** Medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia realizadas a diferentes horas del día a los 42 y 52 DDT en el cultivo de melón. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las horas del día según la prueba LSD. El resumen del ANOVA se presenta como: no significativo en  $P > 0.05$  (ns), significativo en  $P < 0.05$  (\*), muy significativo en  $P < 0.01$  (\*\*) y altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*). Los valores son medias ( $n=4$ ) ± el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

Hora	Cultivo de melón	
	42 DDT 09 abr 2021	52 DDT 19 abr 2021
08:00	980 ± 23 a	1324 ± 57
10:00	1180 ± 21 b	1344 ± 73
12:00	1166 ± 25 b	1262 ± 47
14:00	1149 ± 5 b	1203 ± 23
Significancia	***	ns

### 8.3.2. Experimento 2: Gestión de los peciolo muestreados y savia diluida sobre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia

#### 8.3.2.1. Gestión de los peciolo

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia debido al tiempo de almacenamiento de los peciolo (NESTED-ANOVA; Tiempo de almacenamiento,  $P < 0.001$ ) (Tabla 5). Sin embargo, el tipo de almacenamiento (refrigerado; no refrigerado) no tuvo ningún efecto sobre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia (NESTED-ANOVA; Tipo de almacenamiento(Tiempo de almacenamiento),  $P > 0.05$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados del análisis de varianza anidada (NESTED-ANOVA) que prueba el efecto del factor tipo de almacenamiento y el factor tiempo de almacenamiento en las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia en la gestión de peciolo de melón muestreados. Se presentan los grados de libertad (g.l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad ( $P$ ).

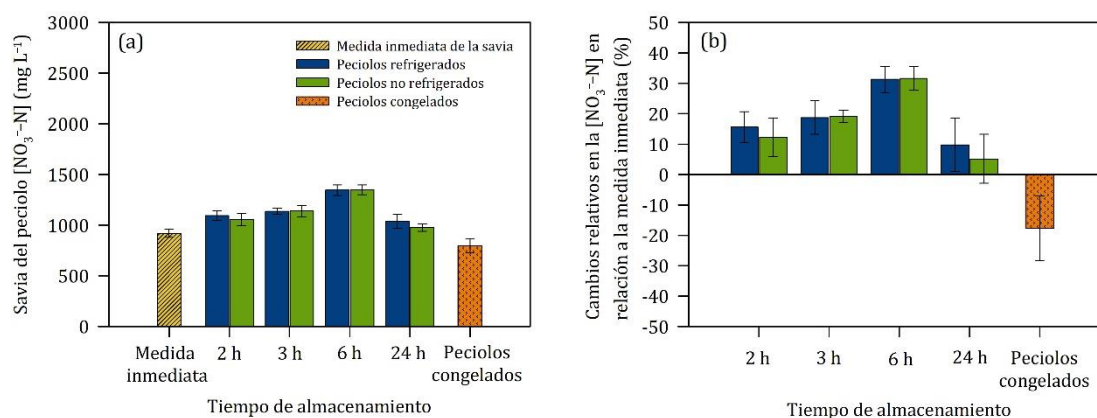
Efecto	g.l	F	P
<sup>a</sup> Tipo de almacenamiento(Tiempo de almacenamiento)	4	0.31	0.931
<sup>b</sup> Tiempo de almacenamiento	5	19.58	<0.001
Bloque	3	0.12	0.783
Error	27		

<sup>a</sup>Refrigerado, no refrigerado

<sup>b</sup>Medida inmediata, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 24 horas, 7 días en congelación

### 8.3.2.1.1. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia de peciolo almacenados

Se presentó un aumento estadísticamente significativo entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia medida inmediatamente después del muestreo y la medida realizada a las 2 horas y 3 horas de almacenamiento de los peciolo (Tabla 6). Este aumento en valores absolutos fue de 157  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  y 219  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (Figura 3 a), en valores relativos este aumento significó un 14% y 19% respectivamente (Figura 3 b). En promedio, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia se mantuvo constante en 1086  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  entre 2 horas y 3 horas y aumentó en valores relativos en 428  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (31%) a las 6 horas de almacenamiento desde la medida inmediata después del muestreo (Figura 3 a; Tabla 6). La medida realizada a las 6 horas fue estadísticamente superior a las demás medidas con peciolo almacenados durante diferentes horas.



**Figura 3.** Efecto del (a) tiempo de almacenamiento de los peciolo y los (b) cambios relativos en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en un cultivo de melón en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

Desde las 6 horas hasta las 24 horas de almacenamiento de los peciolo la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia comenzó a disminuir, en promedio disminuyó 339  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (24%). A partir de la medida realizada inmediatamente después del muestreo (Figura 3 b; Tabla 6) hasta las 24 horas de almacenamiento, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia fue solamente 89  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (7%) superior, por lo que ambas medidas fueron estadísticamente iguales.

Después de mantener los peciolo en congelación durante siete días, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia medida no presentó diferencias estadísticamente significativas con la medida realizada inmediatamente después del muestreo (Tabla 6), la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia disminuyó solamente 121  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (Figura 3 a). En relación a la medida realizada inmediatamente después del muestreo, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia después de mantener los peciolo durante 7 días en congelación disminuyó 18% (Figura 3 b).

**Tabla 6.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia afectadas por el tiempo de almacenamiento de los peciolos. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias entre tratamientos según la prueba LSD. Los valores de las medidas a las 2, 3, 6 y 24 horas son una media entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de peciolos refrigerados y no refrigerados ( $n=8$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

Tratamientos	Savia $[\text{N}-\text{NO}_3^-]$ (mg L <sup>-1</sup> )
Medida inmediata	918 $\pm$ 39 ae
2 horas	1074 $\pm$ 35 bd
3 horas	1137 $\pm$ 30 b
6 horas	1345 $\pm$ 33 c
24 horas	1007 $\pm$ 38 ad
7 días en congelación	796 $\pm$ 67 e

### 8.3.2.2. Gestión de la savia diluida

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia debido al tipo de almacenamiento (refrigerado; no refrigerado) (NESTED-ANOVA; Tipo de almacenamiento(Tiempo de almacenamiento),  $P < 0.05$ ) y debido al tiempo de almacenamiento (NESTED-ANOVA; Tiempo de almacenamiento,  $P < 0.001$ ) de la savia (Tabla 7).

**Tabla 7.** Resultados del análisis de varianza anidada (NESTED-ANOVA) que prueba el efecto del factor tipo de almacenamiento y el factor tiempo de almacenamiento en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en la gestión de savia diluida de melón muestreada. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad ( $P$ ).

Efecto	g.l	F	P
<sup>a</sup> Tipo de almacenamiento(Tiempo de almacenamiento)	4	3.83	0.02
<sup>b</sup> Tiempo de almacenamiento	4	96.94	<0.001
Bloque	3	11	<0.001
Error	24		

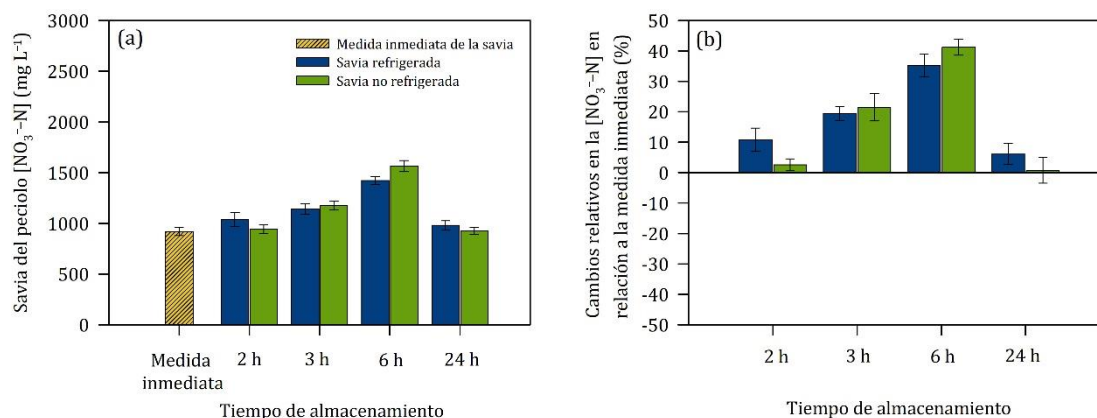
<sup>a</sup>Refrigerado, no refrigerado

<sup>b</sup>Medida inmediata, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 24 horas

#### 8.3.2.2.1. Efecto del tipo de almacenamiento sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia almacenada

Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia que fue almacenada en los tratamientos refrigerado y no refrigerado fueron similares en cada una de las diferentes horas de medición. Después de 2 horas, 3 horas y 24 horas de mantener la savia almacenada, las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  realizadas en los tratamientos de savia refrigerada y no refrigerada no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 4; Tabla 8). Sin embargo,

a las 6 horas de almacenamiento de la savia, las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia fueron estadísticamente diferentes, la medida de la savia del tratamiento no refrigerado fue  $141 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (6%) superior que la medida del tratamiento refrigerado (Figura 4 a; Tabla 8). Este incremento de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia correspondió a un 35% y 41% en el tratamiento refrigerado y no refrigerado, respectivamente, respecto a la medida inmediata (Figura 4 b).



**Figura 4.** Efecto de (a) diferentes horas de almacenamiento de la savia y los (b) cambios relativos en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en un cultivo de melón en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

**Tabla 8.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia afectada por el tipo de almacenamiento de la savia diluida. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias entre tratamientos según la prueba LSD. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

Tipo de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento			
	2 horas	3 horas	6 horas	24 horas
Refrigerado	$1036 \pm 70$ a	$1141 \pm 51$ a	$1423 \pm 39$ a	$980 \pm 45$ a
No refrigerado	$943 \pm 45$ a	$1175 \pm 44$ a	$1564 \pm 55$ b	$926 \pm 34$ a

#### 8.3.2.2.2. Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las medidas de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia almacenada

Se presentó un aumento estadísticamente significativo entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia medida inmediatamente después del muestreo y la medida a las 3 horas de almacenamiento de la savia (Tabla 9), el promedio entre las medidas refrigeradas y no refrigeradas a las 3 horas muestran un aumento en valores absolutos de  $240 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (Figura 4 a), en valores relativos este aumento fue del 20% (Figura 4 b). La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia entre 3 horas y hasta 6 horas de almacenamiento incrementó significativamente en  $336 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  (12%) (Figura 4 a; Tabla 9). La savia que se mantuvo almacenada durante 6 horas



presentó un incremento estadísticamente superior a los demás tratamientos, alcanzando valores de 1494 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>.

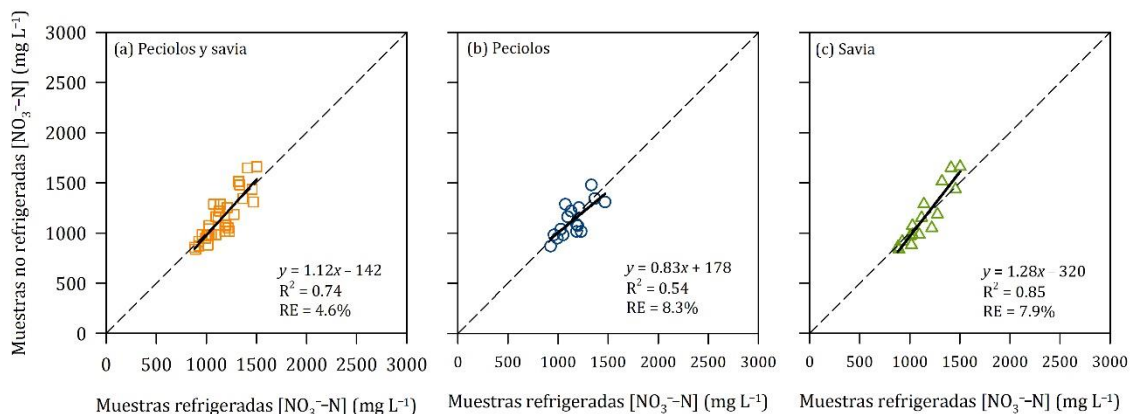
Por otro lado, entre 6 horas y hasta 24 horas de almacenamiento de la savia, la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] disminuyó significativamente en 541 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> (24%) (Figura 4 b). Desde la medida inmediata después del muestreo hasta 24 horas de almacenamiento, la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] disminuyó solamente 35 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> (7%) (Figura 4 b) sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos (Tabla 9).

**Tabla 9.** Medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia afectada por el tiempo de almacenamiento de la savia diluida. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias entre tratamientos según la prueba LSD. Los valores son medias ( $n=8$ )  $\pm$  el error estándar (SE) entre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia de los tratamientos almacenados como refrigerados y no refrigerados;  $n$  es el número de datos.

Tratamientos	Savia [N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (mg L <sup>-1</sup> )
Medida inmediata	918 $\pm$ 39 a
2 horas	990 $\pm$ 42 a
3 horas	1158 $\pm$ 32 b
6 horas	1494 $\pm$ 41 c
24 horas	953 $\pm$ 28 a

### 8.3.2.3. Relación entre el almacenamiento no refrigerado y refrigerado en las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] de la savia

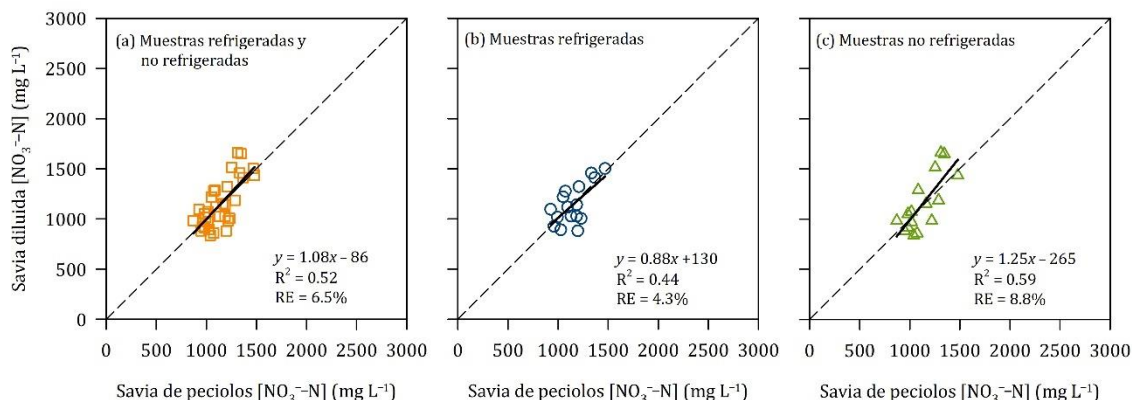
Las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] de la savia del tratamiento no refrigerado fueron linealmente relacionadas con las medidas del tratamiento refrigerado (Figura 5). Esta relación fue determinada para (i) el conjunto de datos combinando las medidas de los peciolo y de la savia almacenada (Figura 5 a), (ii) los peciolo almacenados (Figura 5 b), y (iii) la savia diluida almacenada (Figura 5 c) durante los tiempos de almacenamiento de 2 horas, 3 horas, 6 horas y 24 horas. Para los datos combinados, la relación fue descrita por  $y = 1.12x - 142$  con un R<sup>2</sup> de 0.74 (Figura 5 a), para las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] de la savia de los peciolo almacenados, la relación fue descrita por  $y = 0.83x + 178$  con un R<sup>2</sup> de 0.54 (Figura 5 b), y para la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] de la savia diluida almacenada, la relación fue descrita por  $y = 1.28x - 320$  con un R<sup>2</sup> de 0.85 (Figura 5 c). El error relativo (RE) para las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] de la savia de los datos combinados, de los peciolo y de la savia almacenada fue de 4.6%, 8.3% y 7.9%, respectivamente (Figura 5).



**Figura 5.** Relación lineal entre las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia no refrigerada y refrigerada para (a) el conjunto de datos de las medidas de las muestras de peciolo y savia almacenada, (b) peciolo almacenados y (c) savia almacenada durante 2, 3, 6 y 24 horas en un cultivo de melón en invernadero. Los valores presentados son repeticiones individuales ( $n=32$  (a);  $n=16$  (b, c));  $n$  es el número de datos. La línea punteada representa la línea 1:1. La línea continua negra representa la línea de la regresión lineal.

#### 8.3.2.4. Comparación entre la $[NO_3^- - N]$ de la savia previamente extraída y almacenada con la savia de los peciolo almacenados

Las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  de la savia que fue extraída y almacenada fueron linealmente relacionadas con las medidas de la savia extraída de los peciolo que fueron almacenados (Figura 6). Esta relación fue determinada para (i) el conjunto de datos combinando las medidas refrigeradas y no refrigeradas (Figura 6 a), (ii) las medidas refrigeradas (Figura 6 b), y (iii) las medidas no refrigeradas (Figura 6 c), de la savia y de los peciolo almacenados durante los tiempos de almacenamiento de 2 horas, 3 horas, 6 horas y 24 horas. Para los datos combinados de la  $[NO_3^- - N]$ , la relación fue descrita por  $y = 1.08x - 86.46$  con un  $R^2$  de 0.52 (Figura 6 a), para las muestras que se mantuvieron en refrigeración la relación fue descrita por  $y = 0.88x + 129.95$  con un  $R^2$  de 0.44 (Figura 6 b) y para las muestras no refrigeradas la relación fue  $y = 1.25x - 264.77$  con un  $R^2$  de 0.59 (Figura 6 c). El error relativo (RE) para las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  de la savia combinando las muestras refrigeradas, para solamente las refrigeradas y las no refrigeradas fue de 6.5%, 4.3% y 8.8%, respectivamente (Figura 6). Todas las relaciones fueron similares, con pendientes cercanas a la línea 1:1, principalmente al combinar los datos (Figura 6 a).



**Figura 6.** Relación lineal entre las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  de la savia diluida almacenada y savia de peciolo almacenados para (a) el conjunto de datos de las medidas de las muestras refrigeradas y no refrigeradas, (b) muestras refrigeradas y (c) muestras no refrigeradas durante 2, 3, 6 y 24 horas en un cultivo de melón en invernadero. Los valores presentados son repeticiones individuales ( $n=32$  (a);  $n=16$  (b, c));  $n$  es el número de datos. La línea punteada representa la línea 1:1. La línea continua negra representa la línea de la regresión lineal.

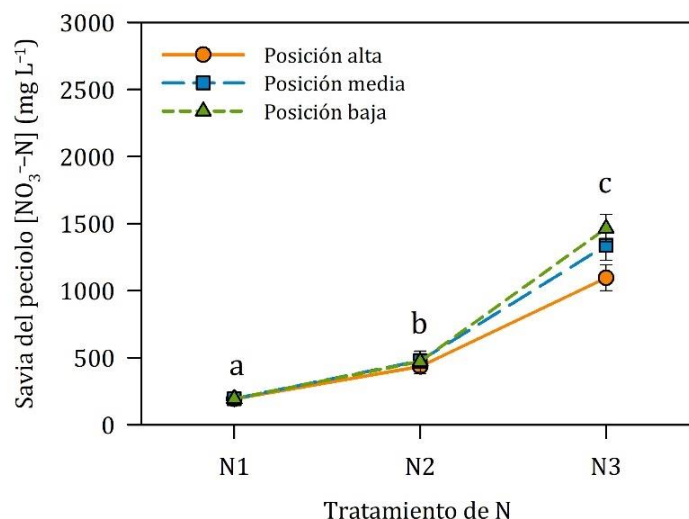
*8.3.3. Experimento 3: Influencia de la posición de los peciolo de las hojas muestreados en la planta sobre las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia*

Las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia fueron afectadas significativamente por los tratamientos de N (ANOVA Nitrógeno,  $P < 0.001$ ), pero no por la posición de la hoja muestreada en la planta (ANOVA Posición,  $P > 0.05$ ) ni por la interacción significativa entre ambos factores (ANOVA  $N \times P$ ,  $P > 0.05$ ) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Resultados del análisis de varianza (FACTORIAL-ANOVA) que prueba el efecto del nitrógeno y la posición de la hoja muestreada en las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad (P).

Efecto	g. l	F	P
Bloque	3	6.66	0.002
Nitrógeno (N)	2	419.87	<0.001
Posición (P)	2	2.06	0.150
$N \times P$	4	0.93	0.461
Error	24		

La  $[NO_3^- - N]$  en la savia de los peciolo de las hojas muestreadas en diferentes posiciones en la planta no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los tratamientos de N (Figura 7; Tabla 11). Por lo tanto, las diferencias en las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia no dependen de la posición de la hoja muestreada. Las diferencias estadísticamente significativas se presentaron entre los tratamientos de N (Figura 7; Tabla 11).



**Figura 7.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de los peciolo de hojas ubicadas en tres diferentes posiciones en las plantas con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias entre tratamientos de N según la prueba LSD.

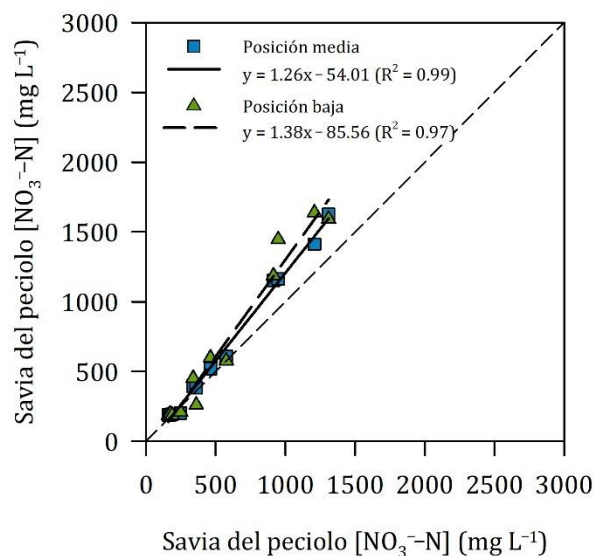
La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia tuvo una tendencia a incrementar mientras los tratamientos de N aumentaban. La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia incrementó desde el tratamiento N1, N2 y N3 del mismo modo en cada una de las diferentes posiciones de las hojas. Es decir, las medidas en la posición alta, media y baja en el tratamiento N1, N2 y N3 fueron muy similares, principalmente en los tratamientos N1 y N2. Sin embargo, en el tratamiento N3 parece que la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia tuvo una mayor tendencia a incrementar en la posición baja y menos en la posición alta.

Cuando el tratamiento de N fue deficiente (N1), las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  tuvieron en promedio  $193 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  siendo estadísticamente inferior al tratamiento N2 y N3 (Tabla 11). Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en la posición alta, media y baja tuvieron en promedio  $461 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  y  $1300 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  en el tratamiento N2 y N3, respectivamente, siendo estadísticamente diferentes (Figura 8; Tabla 11).

**Tabla 11.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de los peciolos para cada posición de muestreo de los peciolos de las hojas en la planta con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias según la prueba LSD; las letras mayúsculas se refieren a la comparación entre tratamientos de N y las minúsculas entre las posiciones de las hojas muestreadas. El resumen del ANOVA se presenta como: no significativo en  $P > 0.05$  (ns) y altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*). Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos.

Posición de la hoja	Tratamientos		
	Savia $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ (mg L <sup>-1</sup> )		
	N1 (N deficiente)	N2 (N suficiente)	N3 (N Excesivo)
	193 $\pm$ 6 A	461 $\pm$ 33 B	1300 $\pm$ 71 C
Posición alta	193 $\pm$ 19 a	435 $\pm$ 54 a	1096 $\pm$ 97 a
Posición media	193 $\pm$ 3 a	477 $\pm$ 54 a	1338 $\pm$ 113 a
Posición baja	194 $\pm$ 6 a	472 $\pm$ 78 a	1466 $\pm$ 102 a
Análisis de varianza			
Nitrógeno (N)	***	***	***
Posición (P)	ns	ns	ns
N $\times$ P	ns	ns	ns

Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia de las hojas muestreadas en la posición alta fueron linealmente relacionadas con las medidas de las hojas muestreadas en la posición media y baja (Figura 8). Esta relación fue determinada para el conjunto de datos de los tratamientos de N (N1, N2 y N3). Para los datos de las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia de las hojas de la posición media la relación fue descrita por  $y = 1.26x + 54.06$  con un  $R^2$  de 0.99, y para la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia de las hojas de la posición baja la relación fue descrita por  $y = 1.38x - 85.56$  con un  $R^2$  de 0.97 (Figura 8).



**Figura 8.** Relación entre (i) la hoja ubicada en la posición alta y la posición media y entre (ii) la hoja ubicada en la posición alta y la posición baja. Los valores presentados son repeticiones individuales ( $n=16$ );  $n$  es el número de datos. La línea punteada de guiones cortos representa la línea 1:1. La regresión lineal para la posición media se presenta como una línea continua y para la posición baja se presenta como una línea punteada de guiones largos.

La pendiente de la relación entre la posición alta y la posición media incrementó (1.26) respecto a la relación entre la posición alta y la posición baja (1.38) de la hoja muestreada mientras incrementó la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia. Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia fueron muy similares cuando los valores fueron  $<500 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  para las posiciones alta, media y baja de la hoja muestreada (Figura 8). Después de este valor, conforme incrementó la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de la hoja en la posición media estuvo ligeramente por encima de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de la hoja en la posición alta; y la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de la hoja en la posición baja estuvo por encima de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de la hoja en la posición alta. Las relaciones lineales mostraron que la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia tuvo una tendencia a incrementar en la posición baja de la hoja con concentraciones de N excesivo, a pesar de que la diferencia en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en valores absolutos fue de 370 y 128  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  respecto a la posición alta y media respectivamente, estas diferencias no fueron significativas (Tabla 11).

## 8.4. Discusión

### 8.4.1. La $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo durante el día

Los datos de los cuatro ensayos considerados de forma individual, dos realizados en pimiento y dos realizados en melón, mostraron algunas fluctuaciones durante las horas de muestreo durante cada día de medición, aunque no se presentaron tendencias claras que fueran consistentes durante las seis horas de los muestreos (desde las 8:00 horas hasta las

---

14:00 horas) de forma general o durante los intervalos consecutivos (de cada dos horas entre medición).

En dos de los cuatro ensayos realizados, uno en pimiento y el otro en melón se presentaron incrementos en la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia significativos entre las 08:00 h y las 10:00 h. Estos datos podrían indicar que existe un efecto inconsistente de la hora del muestreo en este rango de tiempo, aunque no fue una respuesta que se presentó de forma general en los cuatro ensayos realizados. Las fluctuaciones presentadas en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia fueron alrededor del 20% respecto a la medida realizada a las 10:00 h, estas medidas fueron inconsistentes, y no mostraron relación alguna con los cambios en la temperatura del aire y de la radiación solar.

Se han informado resultados inconsistentes sobre el efecto de la hora de muestreo de los peciolo (Coltman, 1985; Scaife y Stevens, 1983). Aunque, Zhang et al. (1996) observó incrementos en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia que podían deberse a la tasa de transpiración de las plantas que incrementó a medida que aumentó la temperatura del aire, y Vitosh y Silva, (1996) relacionó incrementos con cambios asociados al potencial hídrico durante el transcurso del día.

En general, en este estudio la hora del día del muestreo de los peciolo no representa un factor que afecte de forma significativa las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia, lo cual es consistente con las observaciones de Coltman (1985) y Scaife y Stevens (1983). Aunque para asegurar una comparación de muestras durante o entre cultivos es recomendable que los muestreos se realicen a la misma hora del día. Sin embargo, al presentarse inconsistencias en los ensayos realizados con aumentos significativos entre las 08:00 y las 10:00, se sugiere realizar el muestreo de los peciolo entre las 10:00 h y las 14:00 h.

#### *8.4.2. Respuesta de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ sobre la gestión de peciolo y savia almacenada*

##### 8.4.2.1. Cambios en la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ a través del tiempo

Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la extracción de savia de los peciolo, refrigerado y no refrigerado, y la savia previamente exprimida, refrigerada y no refrigerada, mostraron la misma tendencia general durante el tiempo de almacenamiento respecto a la extracción y medida inmediata después del muestreo del peciolo. La medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  aumentó durante las primeras 6 horas y disminuyó entre las 6 horas y 24 horas de almacenamiento; a las 24 horas, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  mostró valores similares a la medida realizada inmediatamente después del muestreo.

Entre los intervalos de tiempo que se establecieron entre la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  realizada inmediatamente después del muestreo y los tiempos de almacenamiento de 2 horas, 3 horas y 6 horas, en dos de estos tres intervalos los incrementos en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  fueron significativos, tanto para las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de peciolo almacenado como para la savia almacenada. Esto sugiere que la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  es inestable a lo largo del tiempo, tanto en la savia extraída de peciolo almacenado o de savia previamente extraída que haya sido almacenada.

#### 8.4.2.2. Efecto de la refrigeración en la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia

En general, los peciolo y la savia almacenada no mostraron diferencias significativas en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  al comparar los tratamientos refrigerado ( $5^\circ\text{C}$ ) y no refrigerado ( $20^\circ\text{C}$  aproximadamente) en cada una de las respectivas horas de medición. La única excepción fue la diferencia significativa que mostró la savia refrigerada y no refrigerada a las 6 horas de almacenamiento. Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en los peciolo y en la savia diluida almacenados no se vieron afectadas en gran medida por la refrigeración de las muestras, el efecto que pudo tener este tipo de almacenamiento fue poco. Una respuesta similar se presentó en un ensayo donde se almacenaron peciolo de plantas de tomate a diferentes horas (Hochmuth, 1994).

Sin embargo, los bajos errores relativos (RE) presentados en las medidas de las muestras de peciolo y savia refrigeradas sugieren que la refrigeración de las muestras podría reducir ligeramente los cambios que se pueden presentar durante las horas que transcurren entre el muestreo y la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ .

En el presente trabajo, las muestras no refrigeradas se mantuvieron a temperatura ambiente en el laboratorio a  $20^\circ\text{C}$  aproximadamente. Las muestras de savia o peciolo mantenidas a temperaturas superiores a  $20^\circ\text{C}$  podrían comportarse de manera diferente.

#### 8.4.2.3. Efecto de la congelación de los peciolo en la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia

Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de las muestras de peciolo que fueron congelados durante una semana presentaron valores significativamente inferiores a todas las medidas realizadas en las diferentes horas de almacenamiento, excepto en la medida realizada inmediatamente después del muestreo. En un cultivo de tomate, los análisis de las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia no se vieron afectados en peciolo que fueron congelados por 24 horas (Hochmuth, 1994). No se presentaron datos suficientes para hacer conclusiones claras sobre el efecto de congelación sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la



savia. Sin embargo, los pocos datos disponibles son prometedores y justifican que se continúe investigando sobre el uso de los peciolo congelados.

#### 8.4.2.4. Comparación de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en peciolo almacenados y en savia almacenada

En general, la relación lineal y los errores relativos (RE) determinados mostraron una similitud entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de (a) la savia medida de los peciolo almacenados y (b) la savia extraída inmediatamente después del muestreo del peciolo y almacenada. La similitud en los valores de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia entre las dos formas de almacenar las muestras fue prácticamente igual para las muestras refrigeradas y para las muestras no refrigeradas.

Los datos sugieren que el almacenamiento de peciolo no es estrictamente necesario, ya que se pueden obtener resultados similares cuando la savia ha sido extraída, diluida y almacenada inmediatamente después del muestreo. Como se indicó en la sección 8.4.2.2, no hubo diferencia entre las muestras de peciolo o savia diluida, que se refrigeraron o almacenaron a una temperatura ambiente en el laboratorio de 20°C aproximadamente. Los resultados no refrigerados no se deben extrapolar a temperaturas más altas.

Las medidas realizadas de la savia de los peciolo almacenados mantuvieron RE menores que las medidas de la savia que fue previamente almacenada como tal. Durante el tiempo de almacenamiento la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  tiende a incrementar, por lo que mantener los peciolo y exprimirlos cuando se vaya a realizar la medida permitirá mantener valores de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia más certeros.

#### 8.4.2.5. Recomendaciones generales sobre la gestión de las muestras de peciolo y savia

La forma de almacenar la muestra, siendo peciolo o savia, ya sea en refrigeración o no, tuvo relativamente poco efecto. Si por alguna razón no es posible analizar las muestras de peciolo o savia inmediatamente después del muestreo de los peciolo, se recomienda que las muestras se almacenen durante 2 horas o 3 horas, lo cual indica un intervalo de tiempo adecuado para realizar los análisis de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia. Después de este intervalo parece que se podrían presentar incrementos apreciables en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ .

En caso de tener que almacenar la muestra y por razones prácticas de manipulación, se recomienda almacenar los peciolo en lugar de almacenar las muestras de savia diluida. Además, se sugiere que los peciolo se mantengan refrigerados a una temperatura constante de 5°C durante no más de 3 horas. Además, si la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia se va a realizar con un sistema portátil con electrodo de ion selectivo (ISE), es importante asegurarse que la muestra de savia diluida se encuentre a 20°C aproximadamente en el momento de medir (M. T. Peña-Fleitas, comunicación personal). Aunque las medidas de la

[NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia de los peciolo congelados presentaron la misma medida que la savia extraída y medida inmediatamente después del muestreo de los peciolo, no se presentaron suficientes datos para determinar si la congelación de los peciolo podría ser una opción válida para gestionar una muestra.

Cuando se requiera evaluar tendencias o comparar tratamientos durante el ciclo de un cultivo, cualquier procedimiento recomendado que se utilice debe usarse de forma consistente para todos los muestreos que se realicen. De la misma forma, los valores de referencia de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] deben obtenerse siguiendo un mismo procedimiento, y cuando se requiera hacer comparaciones con estos valores de referencia se debe considerar que se hayan seguido los mismos procedimientos en los que estos hayan sido derivados.

#### *8.4.3. Efecto de la posición de la hoja muestreada*

La selección de la hoja muestreada ubicada en una posición alta, media o baja no mostró ninguna diferencia significativa en la medida de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia considerando condiciones de N deficiente, N suficiente y N excesivo. En estudios en un cultivo de patata, hubo poco efecto de la posición de la hoja sobre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia cuando el N disponible fue deficiente, aunque se vio un incremento de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en los peciolo de la posición baja de la planta (Westermann et al., 1994). Por otro lado, Scaife y Stevens, (1983) encontraron diferencias entre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia en hojas de col superiores, medias y bajas.

En este experimento, los datos sugieren que en cultivos en condiciones de N óptimas o deficientes el efecto de la selección de la hoja muestreada sobre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia no tiene un efecto significativo. Sin embargo, hubo una consistente tendencia a que la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia de las hojas ubicadas en la posición baja incrementara en condiciones de N excesivo, lo cual es consistente con Westermann et al. (1994). Estas tendencias podrían ser un indicio de que, bajo otras condiciones, la posición de la hoja podría afectar la medida de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia.

Por lo tanto, es necesario seguir el mismo criterio de selección cuando se requiera hacer comparaciones de las medidas. Se deben realizar más ensayos en otros cultivos y en diferentes etapas fenológicas para comprobar la respuesta de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en diferentes posiciones de las hojas muestreadas.

---

## 8.5. Conclusiones

El efecto de la hora de muestreo entre las 08:00 y las 14:00 horas sobre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia no fue consistente. Entre las 08:00 y las 10:00 horas y entre las 12:00 y 14:00 horas se presentaron algunos efectos inconsistentes, por lo que se recomienda muestrear los peciolo siempre a la misma hora del día, principalmente entre las 10:00 h y las 12:00 h para minimizar los posibles efectos.

A través del tiempo, el efecto en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  al refrigerar o no refrigerar los peciolo y la savia fue el mismo. Pero para mantener una mejor estabilidad de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  se recomienda almacenar los peciolo en refrigeración hasta por 3 horas, y seguir el mismo protocolo siempre que se realicen los muestreos.

La selección de la posición de la hoja de muestreo parece no ser un factor significativo en cultivos con aplicaciones frecuentes de fertirriego. Sin embargo, debido a la tendencia presentada en el incremento de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en la posición baja de la hoja, se deben realizar más estudios.

Si se utiliza un medidor de electrodo de ion selectivo, se recomienda mantener la muestra a 20°C al momento de la medición. Es necesario realizar más estudios que demuestren el efecto de los factores sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en diferentes condiciones de muestreo y almacenamiento.

## 8.6. Referencias

- Coltman, R.R., 1985. Sap Testing Of Nitrate Nitrogen In Tomato, in: 21st Annual Meeting, September 8-13, Port of Spain, Trinidad and Tobago, Caribbean Food Crops Society. pp. 182-186. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.261461>
- Farneselli, M., Tei, F., Simonne, E., 2014. Reliability of Petiole Sap Test for N Nutritional Status Assessing in Processing Tomato. *J. Plant Nutr.* 37, 270-278. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.859696>
- Gázquez, J.C., Pérez, C., Meca, D.E., Segura, M.D., Domene, M.A., De La Cruz, E., López, J.C., Buendía, D., 2017. Comparative study of tomato production strategies for long-cycle crop in enarenado and for inter-planting in different substrates systems in the Mediterranean area. *Acta Hortic.* 1170, 773-776. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1170.98>
- Goffart, J.P., Olivier, M., Frankinet, M., 2008. Potato Crop Nitrogen Status Assessment to Improve N Fertilization Management and Efficiency: Past-Present-Future. *Potato Res.* 51, 355-383. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9118-x>
- Greenwood, D.J., Lemaire, G., Gosse, G., Cruz, P., Draycott, A., Neeteson, J.J., 1990. Decline in

- Percentage N of C3 and C4 Crops with Increasing Plant Mass. *Ann. Bot.* 66, 425–436. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088044>
- Hartz, T.K., Smith, R.F., Schulbach, K.F., LeStrange, M., 1994. On-farm nitrogen tests improve fertilizer efficiency, protect groundwater. *Calif. Agric.* 48, 29–32.
- Hochmuth, G.J., 1994. Efficiency Ranges for Nitrate-nitrogen and Potassium for Vegetable Petiole Sap Quick Tests. *Horttechnology* 4, 218–222. <https://doi.org/10.21273/horttech.4.3.218>
- Hochmuth, G., 2012. Plant Petiole Sap-Testing For Vegetable Crops. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/CV/CV00400.pdf>.
- Lemaire, G., Jeuffroy, M.H., Gastal, F., 2008. Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. Theory and practices for crop N management. *Eur. J. Agron.* 28, 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.01.005>
- Llanderal, A., García-Caparrós, P., Contreras, J.I., Segura, M.L., Lao, M.T., 2018. Evaluation of the Nutrients Variability in Sap of Different Petiole Samples in Tomato Plant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 49:6. <https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1435797>
- MacKerron, D.K.L., Young, M.W., Davies, H. V., 1995. A critical assessment of the value of petiole sap analysis in optimizing the nitrogen nutrition of the potato crop. *Plant Soil* 172, 247–260. <https://doi.org/10.1007/BF00011327>
- Nova Crop Control [WWW Document], 2021. URL <https://www.novacropcontrol.nl/en/sampling> (accessed 7.12.21).
- Olfs, H.W., Blankenau, K., Brentrup, F., Jasper, J., Link, A., Lammel, J., 2005. Soil- and plant-based nitrogen-fertilizer recommendations in arable farming. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 168, 414–431. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520526>
- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2014. Evaluation of optical sensor measurements of canopy reflectance and of leaf flavonols and chlorophyll contents to assess crop nitrogen status of muskmelon. *Eur. J. Agron.* 58, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2014.04.006>
- Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., Farneselli, M., Padilla, F.M., 2015. Assessing crop N status of fertigated vegetable crops using plant and soil monitoring techniques. *Ann. Appl. Biol.* 167, 387–405. <https://doi.org/10.1111/aab.12235>
- Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Padilla, F.M., Rodríguez, A., Thompson, R.B., 2021. Use of a portable rapid analysis system to measure nitrate concentration of nutrient and soil solution , and plant sap in greenhouse vegetable production. *Agronomy.* 11, 819. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050819>
- Scaife, A., Stevens, K.L., 1983. Monitoring sap nitrate in vegetable crops: Comparison of test strips with electrode methods, and effects of time of day and leaf position. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 14, 761–771.

- Thompson, R.B., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., Giménez, C., Fernández, M.D., 2007. Identification of irrigation and N management practices that contribute to nitrate leaching loss from an intensive vegetable production system by use of a comprehensive survey. *Agric. Water Manag.* 89, 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2007.01.013>
- Vitosh, M.L., Silva, G.H., 1996. Factors Affecting Potato Petiole Sap Nitrate Test. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27, 1137–1152. <https://doi.org/10.1080/00103629609369622>
- Westermann, D.T., Bosma, S.M., Kay, M.A., 1994. Nutrient concentration relationships between the fourth petiole and upper-stem of potato plants. *Am. Potato J.* 71, 817–828. <https://doi.org/10.1007/BF02849377>
- Zhang, H., Smeal, D., Arnold, R.N., Gregory, E.J., 1996. Potato Nitrogen Management by Monitoring Petiole Nitrate Level. *J. Plant Nutr.* 19, 1405–1412. <https://doi.org/10.1080/01904169609365208>



## 9. Discusión

---





En esta tesis se evaluaron diferentes técnicas de monitorización del estado de nitrógeno (N) en el cultivo de pimiento, pepino y melón enfocados en las medidas de la concentración de nitrato ( $[\text{NO}_3^-]$ ) en el suelo y la planta. Se evaluó la respuesta del cultivo de pimiento a niveles crecientes de N para determinar (i) una curva crítica de N (CNC) para pimiento, (ii) el valor óptimo del N total disponible (TAN) para una máxima producción de pimiento, (iii) un rango de suficiencia de la  $[\text{NO}_3^-]$  en el suelo usando sondas de succión y el extracto 1:2 suelo:agua para el cultivo de pimiento, (iv) el valor de suficiencia de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo como indicador del estado de N en pimiento, (v) el efecto del cultivar sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en el manejo del cultivo de pepino, melón y pimiento y (vi) el efecto del muestreo y almacenamiento de los peciolo y savia sobre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia pimiento y melón.

La CNC específica  $\%Nc = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  se determinó para el cultivo de pimiento usando tres diferentes cultivos de pimiento. La CNC determinada tuvo una baja dilución de N en comparación a otras CNCs generales (Lemaire y Gastal, 1997). La baja dilución de la curva pudo ser debido a la condición del propio cultivo, el pimiento fue un cultivo indeterminado, con una baja densidad de siembra (Lemaire y Gastal, 1997; Seginer, 2004). Los valores integrados del Índice de Nutrición de N (NNI $i$ ) calculados con la CNC y las medidas del rendimiento total en valores relativos fueron estrechamente relacionados. Los valores de NNI $i$  identificaron situaciones de deficiencia y suficiencia de N, con lo cual, esto puede ser usado para evaluar el estado del N del pimiento en invernadero en el SE de España.

Con los datos combinados de los tres cultivos se obtuvo una buena respuesta del rendimiento relativo a cantidades crecientes de N (TAN) usando la regresión de rectas segmentadas. Este análisis permitió recomendar un valor mínimo de TAN de 430 kg N ha $^{-1}$  para una máxima producción. Es un valor similar al obtenido al relacionar el valor óptimo de NNI $i$  con TAN. En la producción intensiva de cultivos hortícolas, las pérdidas potenciales por lixiviación de  $\text{NO}_3^-$  se incrementan exponencialmente según se realizan excesivas aplicaciones de N (Domínguez, 2014; Pulido-Bosch, 2005; Thompson et al., 2013), excediendo el valor óptimo de TAN. La recomendación del valor de TAN demostró que es posible reducir los incrementos en la lixiviación de  $\text{NO}_3^-$ . La combinación del manejo correcto del sistema de fertirriego y las aplicaciones de cantidades recomendadas de TAN podrían reducir en gran medida las pérdidas de N al medio ambiente, sin suponer una reducción en los rendimientos totales del cultivo.

En cuanto al comportamiento de las medidas de la  $[\text{NO}_3^-]$  de la solución del suelo determinados con las sondas de succión y con el extracto 1:2 suelo:agua fueron sensibles a lo largo del cultivo. Los tratamientos con concentraciones de N bajas (N1 y N2) mantuvieron valores muy cercanos a cero, sin mostrar incrementos durante el ciclo del cultivo. Mientras que los tratamientos con concentraciones de N superiores tuvieron una clara tendencia a mostrar constantes y rápidos incrementos a lo largo del ciclo del cultivo. Esta respuesta fue consistente con los valores de NNI correspondientes. Considerando los dos métodos de extracción para medir la  $[\text{NO}_3^-]$  en el suelo, se demostró una buena relación de las medidas de la  $[\text{NO}_3^-]$  con el NNI. Las medidas entre las diferentes etapas fenológicas del cultivo de pimiento no demostraron diferencias al relacionarlas con el NNI.

Según el enfoque de interpretación usado, el rango de suficiencia determinado de 5.0–15.0  $\text{mmol L}^{-1}$  para el cultivo de pimiento en invernadero midiendo la  $[\text{NO}_3^-]$  de la solución del suelo es consistente con otros estudios, con recomendaciones generales de 5.0  $\text{mmol L}^{-1}$  como recomendación mínima (Burt et al., 1995; Hartz y Hochmuth, 1991; Magán et al., 2019) y con recomendaciones de hasta 15  $\text{mmol L}^{-1}$  como valor de suficiencia máximo. Siguiendo el mismo enfoque de interpretación de las medidas de la  $[\text{NO}_3^-]$  obtenidas con el método de extracción 1:2 suelo:agua se recomendó un rango de valores de 1.0–2.5  $\text{mmol L}^{-1}$ . En Holanda, donde el método es frecuentemente usado, recomiendan valores considerablemente superiores (Incrocci et al., 2017; Sonneveld y Voogt, 2009). En las medidas de  $[\text{NO}_3^-]$  de la solución del suelo es posible que se presente una apreciable variación espacial (Hartz, 2003). Sin embargo, con cuidados como la ubicación, repeticiones y gestión de las sondas de succión se puede reducir el coeficiente de variación (CV) (Granados et al., 2013). En este trabajo, los CV determinados con ambos métodos fueron similares.

Respecto a la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  medida en la savia de los peciolo de las plantas de tres cultivos de pimiento con aplicaciones crecientes de N, en general, se mantuvieron constantes a lo largo de todo el cultivo. Esto ha sido observado en otros cultivos hortícolas en invernadero como pimiento (Magán et al., 2019), tomate (Peña-Fleitas et al., 2015), melón (Peña-Fleitas et al., 2015) y en tomate sembrado a campo abierto (Farneselli et al., 2010), todos recibieron frecuentes aplicaciones de N por fertirriego. Sin embargo, también se ha demostrado que las  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  tienden a disminuir mientras se desarrolla el cultivo (Vitosh y Silva, 1996; Westerveld et al., 2004). La  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia relacionada con el NNI como indicador del estado de N presentó una fuerte relación usando la combinación de todos los datos de los tres cultivos de pimiento.

---

Estos resultados permitieron sugerir un valor de suficiencia de 1400 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>. Para cada etapa fenológica evaluada, los valores de suficiencia determinados fueron similares, lo que indica una constancia en la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia durante todo el ciclo del cultivo. El valor de suficiencia determinado es consistente a los reportados por Hochmuth (2012, 1994) para las dos primeras etapas fenológicas del cultivo. La medida de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia es una medida sensible del estado de N (Farneselli et al., 2014; Goffart et al., 2008), inclusive más sensible que el contenido de N en la hoja (Olsen y Lyons, 1994). Esta sensibilidad permite asociar la rápida respuesta a los cambios en la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] con el aporte de N al cultivo, principalmente para determinar la deficiencia de N en el cultivo de pimiento. Sin embargo, es importante tomar en cuenta la región y el cultivo para considerar las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo como una herramienta de manejo del N.

Las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo en diferentes cultivares de pepino, melón y pimiento presentaron algunas diferencias consistentes entre los cultivares. En pepino, el cultivar 'Strategos', mantuvo valores superiores respecto a 'Pradera' y 'Mitre'. En melón, 'Tezac' presentó valores inferiores respecto a 'Magiar' y 'Jacobo'. En pimiento, 'Melchor' fue generalmente inferior a 'Machado' y Lamuyo. En cultivos como patata y zanahoria (Waterer, 1997; Westerveld et al., 2007), se han visto diferencias entre cultivares en las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo a través del tiempo.

En las medidas del contenido de N en la hoja hubo diferencias significativas entre cultivares, siendo relativamente pequeñas y menos consistentes que las diferencias en la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia entre los mismos cultivares. Lo anterior refleja la sensibilidad de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia como un indicador del estado de N en algunos cultivos hortícolas (Farneselli et al., 2014; Goffart et al., 2008), siendo esta medida más sensible a los cambios en el estado de N del cultivo (Olfs et al., 2005; Villeneuve et al., 2002) que el análisis del contenido de N en la hoja (Majić et al., 2008; Olsen y Lyons, 1994). Los datos obtenidos sugieren la necesidad de valores de suficiencia específicos para cada cultivar. Por ahora, los valores absolutos de suficiencia para cultivos en general pueden consultarse (Hochmuth, 2012, 1994) y ser usados como una guía práctica.

Para realizar el muestreo y almacenamiento de los peciolos y determinar la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia se han sugerido algunos procedimientos (Hochmuth, 1994). Algunos factores como la hora del muestreo, la gestión de la muestra y la selección de la hoja que se debe muestrear podrían influir en las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo (Hochmuth, 1994; Scaife y Stevens, 1983). La [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia medida en pimiento y melón en muestreos realizados a diferentes horas del día (desde las 8:00 horas hasta las 14:00 horas) mostraron algunas fluctuaciones, estas medidas no mostraron relación alguna con los

cambios en la temperatura del aire y de la radiación solar. En general, en este estudio la hora del día no representa un factor que afecte de forma significativa las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia, lo cual es consistente con las observaciones de Coltman (1985) y Scaife y Stevens (1983).

Los datos presentados en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de muestras de peciolo y savia refrigerada o no refrigerada mostraron la misma tendencia durante el tiempo de almacenamiento. Las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de las muestras de peciolo que fueron congelados durante una semana fueron similares a las medidas realizadas inmediatamente después del muestreo. En un cultivo de tomate, los análisis de las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia no se vieron afectados en peciolo que fueron congelados por 24 horas (Hochmuth, 1994). La selección de la hoja muestreada ubicada en una posición alta, media o baja no mostró ninguna diferencia significativa en la medida de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia. En estudios en un cultivo de patata, hubo poco efecto de la posición de la hoja sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia (Westermann et al., 1994). Sin embargo, hubo una consistente tendencia a que la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de las hojas ubicadas en la posición baja incrementara en condiciones de N excesivo, lo cual es consistente con Westermann et al. (1994).

En general, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que ambos enfoques, uno orientado a medidas en el suelo y otro a medidas en la planta son herramientas útiles para monitorear el estado del N en el cultivo de pimiento. Estas medidas pueden ser usadas para identificar condiciones de exceso y/o deficiencia de N. La CNC para determinar los valores de NNI y considerar todas las fuentes de N como TAN deben ser usadas para optimizar los rendimientos y ayudar a los productores de hortalizas a reducir las aplicaciones de N y los riesgos de lixiviación por  $\text{NO}_3^-$ .

La respuesta de las  $[\text{NO}_3^-]$  en el suelo extraída con sondas de succión o con el método 1:2 suelo:agua (v/v) a aplicaciones crecientes de N mostraron una sensibilidad al exceso de N sugiriendo un rango de suficiencia para todo el ciclo del cultivo. Por otro lado, la respuesta de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia del peciolo a aplicaciones crecientes de N mostraron una mayor sensibilidad a la deficiencia de N.

Las diferencias presentadas en diferentes cultivares de pepino, melón y pimiento muestran que el cultivar tiene un efecto sobre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia y el contenido de N en la hoja, ambos métodos podrían ser usados para evaluar el estado del N de los cultivos, aunque es posible que sea necesario derivar valores de suficiencia específicos para los diferentes cultivares.

---

En términos generales, se recomienda muestrear los peciolos siempre a la misma hora del día, almacenar los peciolos en refrigeración hasta por 3 horas, y seguir el mismo protocolo siempre que se realicen los muestreos.

### 9.1. Referencias

- Burt, C., O'Connor, K., Ruehr, T., 1995. Fertigation. San Luis Obispo, CA: Irrigation Training and Research Center, California Polytechnic State University.
- Domínguez, P., 2014. Estado Actual de los Acuíferos del Sur de la Sierra de Gádor-Campo de Dalías. Instituto Geológico y Minero de España. Ministerio de Economía y Competitividad. (In Spanish) [WWW Document]. URL <http://info.igme.es/ConsultaSID/presentacion.asp?Id=166757> (accessed 5.21.19).
- Farneselli, M., Benincasa, P., Tei, F., 2010. Validation of N Nutritional Status Tools for Processing Tomato. *Acta Hort.* 852, 227–232. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.852.27>
- Farneselli, M., Tei, F., Simonne, E., 2014. Reliability of Petiole Sap Test for N Nutritional Status Assessing in Processing Tomato. *J. Plant Nutr.* 37, 270–278. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.859696>
- Goffart, J.P., Olivier, M., Frankinet, M., 2008. Potato Crop Nitrogen Status Assessment to Improve N Fertilization Management and Efficiency: Past-Present-Future. *Potato Res.* 51, 355–383. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9118-x>
- Granados, M.R., Thompson, R.B., Fernández, M.D., Martínez-Gaitán, C., Gallardo, M., 2013. Prescriptive-corrective nitrogen and irrigation management of fertigated and drip-irrigated vegetable crops using modeling and monitoring approaches. *Agric. Water Manag.* 119, 121–134. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2012.12.014>
- Hartz, T.K., Hochmuth, G.J., 1991. Fertility Management of Drip-Irrigated Vegetables. UC Davis, Vegetable Research and Information Center.
- Hartz, T.K., 2003. The assessment of soil and crop nutrient status in the development of efficient fertilizer recommendations. *Acta Hort.* 627, 231–240. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.627.30>
- Hochmuth, G.J., 1994. Efficiency Ranges for Nitrate-nitrogen and Potassium for Vegetable Petiole Sap Quick Tests. *Horttechnology* 4, 218–222. <https://doi.org/10.21273/horttech.4.3.218>
- Hochmuth, G., 2012. Plant Petiole Sap-Testing For Vegetable Crops. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/CV/CV00400.pdf>.
- Incrocci, L., Massa, D., Pardossi, A., 2017. New trends in the fertigation management of irrigated vegetable crops. *Horticulturae*. 3. 37. <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020037>
- Lemaire, G., Gastal, F., 1997. N uptake and distribution in plant canopies., in: Lemaire, G. (Ed)

- (Ed.), *Diagnosis of Nitrogen Status in Crops*. Springer, Berlin, Germany, pp. 3–41. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-60684-7>
- Magán, J.J., Gallardo, M., Fernández, M.D., García, M.L., Granados, M.R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2019. Showcasing a fertigation management strategy for increasing water and nitrogen use efficiency in soil-grown vegetable crops in the FERTINNOWA project. *Acta Hortic.* 1253, 17–24. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1253.3>
- Olsen, J.K., Lyons, D.J., 1994. Petiole sap nitrate is better than total nitrogen in dried leaf for indicating nitrogen status and yield responsiveness of capsicum in subtropical Australia. *Aust. J. Exp. Agric.* 34, 835–843. <https://doi.org/10.1071/EA9940835>
- Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., Farneselli, M., Padilla, F.M., 2015. Assessing crop N status of fertigated vegetable crops using plant and soil monitoring techniques. *Ann. Appl. Biol.* 167, 387–405. <https://doi.org/10.1111/aab.12235>
- Pulido-Bosch, A., 2005. Recarga en la Sierra de Gádor e hidrogeoquímica de los acuíferos del Campo de Dalías. Escobar Impresores S.L., El Ejido, Almería, España. (In Spanish).
- Seginer, I., 2004. Plant spacing effect on the nitrogen concentration of a crop. *Eur. J. Agron.* 21, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2003.10.007>
- Sonneveld, C., Voogt, W., 2009. *Plant Nutrition of Greenhouse Crops*, Springer. ed. The Netherlands.
- Thompson, R.B., Gallardo, M., Fernández-Fernández, M.D., 2013. Measurement of Nitrate Leaching in Commercial Vegetable Production in SE Spain, in: Fontana, E., Grignani, C., Nicola, S. (Ed.), *Book of Abstracts, International Workshop on Nitrogen, Environment and Vegetables*. NEV 2013, Turín, Italy, 15-17 April. pp. 67–69.
- Vitosh, M.L., Silva, G.H., 1996. Factors Affecting Potato Petiole Sap Nitrate Test. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27, 1137–1152. <https://doi.org/10.1080/00103629609369622>
- Westerveld, S.M., Mckeown, A.W., Scott-Dupree, C.D., McDonald, M.R., 2004. Assessment of Chlorophyll and Nitrate Meters as Field Tissue Nitrogen Tests for Cabbage, Onions, and Carrots. *Horttechnology* 14, 179–188. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.14.2.0179>

## **10. Conclusiones**

---





### 10.1. Capítulo uno

Rodríguez, A., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., de Souza, R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2020. Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss. *Eur. J. Agron.* 117, 126046.

- Se desarrolló la curva crítica de N  $\%Nc = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  para el cultivo de pimiento. Esta CNC tiene una dilución de N apreciablemente menor, para una DMP creciente, que la CNC general para cultivos C3 de Lemaire and Gastal, (1997).
- Se asoció un valor de  $NNI_i$  de 0.86 para un rendimiento relativo máximo; la cantidad asociada de N total disponible (TAN, es decir, la suma del N mineralizado del estiércol y materia orgánica, N mineral del suelo y el fertilizante mineral) fue de 463 kg N ha<sup>-1</sup>.
- El análisis lineal de rectas segmentadas del rendimiento relativo versus TAN sugirió que 425 kg N ha<sup>-1</sup> es la cantidad mínima de TAN requerida para un rendimiento máximo del cultivo de pimiento cultivado en un ciclo de otoño-invierno en suelo, en condiciones de invernadero en el sureste de España.
- Este valor se asoció con un  $N_{uptE}$  de 0.63 kg kg<sup>-1</sup> y con pérdidas potenciales por lixiviación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de 125 kg N ha<sup>-1</sup>.
- Se recomendó un valor de TAN de 430 kg N ha<sup>-1</sup> para pimiento bajo estas condiciones. Con un aumento de TAN por encima del valor recomendado, el  $N_{uptE}$  disminuyó progresivamente y las pérdidas potenciales por lixiviación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> aumentaron considerablemente.
- La CNC desarrollada en este trabajo será muy útil para los futuros trabajos sobre el desarrollo y evaluación de prácticas para el manejo de N en el pimiento.
- El uso del TAN en lugar de solo considerar el fertilizante nitrogenado es un enfoque más integral, que dará como resultado recomendaciones de N que optimizarán la producción, reduciendo el uso de fertilizante y reduciendo las pérdidas de N al medio ambiente.

### 10.2. Capítulo dos

Rodríguez, A., Peña-fleitas, M.T., Padilla, F.M., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2020. Soil monitoring methods to assess immediately available soil N for fertigated sweet pepper. *Agronomy.* 10, 2000.

- La [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] en la solución del suelo y en el extracto del método 1:2 suelo:agua (v/v) fue sensible a la aplicación excesiva de N en el cultivo de pimiento en invernadero.

- La aplicación excesiva de N fue indicada por las tendencias crecientes de N y por las claras diferencias entre el suministro de N adecuado, excesivo y muy excesivo.
- Ambos métodos fueron sensibles a la aplicación deficiente de N, lo que se evidenció con valores muy cercanos a cero.
- Para ambos métodos, el análisis de regresión lineal de rectas segmentadas describió la relación con el NNI, utilizado como medida del estado de N del cultivo. Los resultados fueron generalmente consistentes entre las etapas fenológicas y entre cultivos. Se determinó un rango de valores de suficiencia, para todo el cultivo, para cada método.
- La  $[\text{NO}_3^-]$  en la solución del suelo monitorizó el suministro de N disponible en el suelo para el pimiento cultivado en invernadero en el sureste de España. Es probable que este método y los rangos de suficiencia determinados puedan ser aplicados en otras especies hortícolas cultivadas en este sistema.
- El método de extracción 1:2 suelo:agua (v/v) es un método prometedor, pero requiere evaluaciones adicionales en este sistema.

### **10.3. Capítulo tres**

Rodríguez, A., Peña-Fleitas, M.T., Padilla, F.M., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2021. Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 285, 110157.

- La fuerte relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el NNI sugiere que la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo se puede utilizar para mejorar el manejo del N en el pimiento cultivado en invernadero.
- En cada tratamiento de N en los tres cultivos de pimiento, que recibieron aplicaciones frecuentes de N, la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo fue relativamente constante.
- Utilizando los datos combinados de los tres ciclos de cultivo, se obtuvo un valor de suficiencia para el crecimiento máximo del cultivo de  $1400 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  para el ciclo completo.
- Para dos de las tres etapas fenológicas (para la etapa de floración y crecimiento temprano de la fruta, y la etapa de cosecha) los valores de suficiencia derivados fueron similares al valor de suficiencia derivado para la duración de todo el ciclo.
- Este valor de suficiencia puede ser una guía para los agricultores y técnicos de hortalizas para lograr una fertilización óptima de N. Sin embargo, se recomienda verificarlo en cada región y sistema de cultivo.

- 
- El análisis de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo es una herramienta práctica y eficaz para evaluar el estado de N de los cultivos de pimiento en invernadero.

#### 10.4. Capítulo cuatro

Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero.

- El cultivar podría tener un efecto sobre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja de los cultivos hortícolas en invernadero.
- Ambos métodos podrían ser usados para evaluar el estado del N de los cultivos, aunque es posible que sea necesario derivar valores de suficiencia específicos para los diferentes cultivares.
- Las diferencias relativas entre los cultivares demuestran que la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia es una medida más sensible que el contenido de N en la hoja, principalmente entre los cultivares de pepino y melón.
- La fuerte relación entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja en cada uno de los cultivares de los diferentes cultivos y la similitud entre las pendientes sugieren que el comportamiento en la relación fue muy similar. Por lo tanto, el cultivar podría afectar la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y el contenido de N en la hoja, más no la relación presentada entre ellos.
- Se recomienda realizar más estudios en otros cultivos y cultivares para comprobar este comportamiento en otras especies hortícolas.

#### 10.5. Capítulo cinco

Evaluación del muestreo y almacenamiento de los peciolos y la savia sobre la medida de nitrato en savia de peciolos en cultivos hortícolas en suelo en invernadero.

- El efecto de la hora de muestreo entre las 08:00 y las 14:00 horas sobre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia no fue consistente. Entre las 08:00 y las 10:00 horas y entre las 12:00 y 14:00 horas se presentaron algunos efectos inconsistentes, por lo que se recomienda muestrear los peciolos siempre a la misma hora del día, principalmente entre las 10:00 h y las 12:00 h para minimizar los posibles efectos.
- A través del tiempo, el efecto en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  al refrigerar o no refrigerar los peciolos y la savia fue el mismo. Pero para mantener una mejor estabilidad de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  se recomienda almacenar los peciolos en refrigeración hasta por 3 horas, y seguir el mismo protocolo siempre que se realicen los muestreos.

- La selección de la posición de la hoja de muestreo parece no ser un factor significativo en cultivos con aplicaciones frecuentes de fertirriego. Sin embargo, debido a la tendencia presentada en el incremento de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en la posición baja de la hoja, se deben realizar más estudios.
- Si se utiliza un medidor de electrodo de ion selectivo, se recomienda mantener la muestra a 20°C al momento de la medición.
- Es necesario realizar más estudios que demuestren el efecto de los factores sobre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en diferentes condiciones de muestreo y almacenamiento.

## **11. Material suplementario**

---



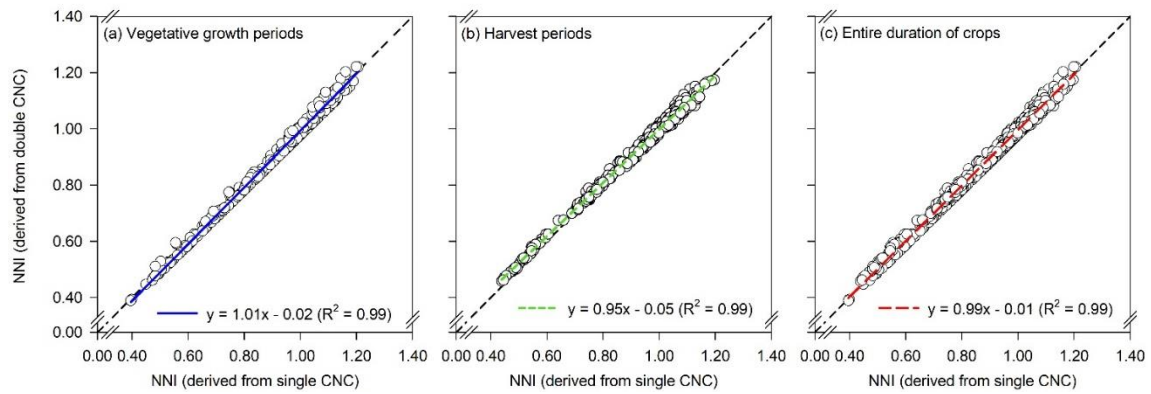
## 11.1. Chapter one: Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss

### 11.1.1. Supplementary Table

**Table S1.** Total dry matter production (DMP) and N concentration (%) on different sampling dates after transplant (DAT) in the 2014, 2016 and 2017 crops. Critical data points selected for deriving the critical N curve are highlighted in bold and italics, this point is the critical treatment that maximized the production with the lowest amount of N according the methodology followed by Greenwood et al. (1990). The values are means  $\pm$  SE. The crops were subjected to five different increasing N treatments with four replicate plots.

Crop year	Sampling (DAT)	Total DMP (t ha <sup>-1</sup> )					N concentration (%)				
		N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5
2014	42	0.7 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	<b><i>1.1 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	1.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.1	<b><i>5.0 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	5.0 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.1
	63	2.1 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.1	<b><i>3.2 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	3.5 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.1	<b><i>3.7 <math>\pm</math> 0.0</i></b>	3.9 $\pm$ 0.0	3.9 $\pm$ 0.0
	84	3.5 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.3	<b><i>4.9 <math>\pm</math> 0.2</i></b>	5.7 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.1	<b><i>3.3 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	3.5 $\pm$ 0.0	3.6 $\pm$ 0.1
	104	3.8 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.0	<b><i>7.2 <math>\pm</math> 0.6</i></b>	8.0 $\pm$ 0.5	8.3 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.1	<b><i>3.1 <math>\pm</math> 0.0</i></b>	3.2 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.1
	125	5.2 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 0.3	<b><i>7.7 <math>\pm</math> 0.3</i></b>	9.1 $\pm$ 0.3	8.5 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1	<b><i>3.0 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	3.0 $\pm$ 0.0	2.9 $\pm$ 0.0
	148	5.3 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 0.3	<b><i>7.9 <math>\pm</math> 0.5</i></b>	9.1 $\pm$ 0.8	8.8 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.1	<b><i>2.9 <math>\pm</math> 0.0</i></b>	2.9 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.0
	170	5.7 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.4	<b><i>9.7 <math>\pm</math> 0.2</i></b>	9.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.0	<b><i>2.8 <math>\pm</math> 0.0</i></b>	2.8 $\pm$ 0.0
2016	43	0.5 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.1	<b><i>1.0 <math>\pm</math> 0.0</i></b>	2.9 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.1	<b><i>4.5 <math>\pm</math> 0.1</i></b>
	63	1.9 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.2	<b><i>2.5 <math>\pm</math> 0.3</i></b>	2.6 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.1	<b><i>3.5 <math>\pm</math> 0.0</i></b>	4.0 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.1
	83	3.3 $\pm$ 0.4	4.6 $\pm$ 0.3	<b><i>4.9 <math>\pm</math> 0.2</i></b>	4.6 $\pm$ 0.2	5.0 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.1	<b><i>3.2 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	3.8 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.1
	106	3.9 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.4	<b><i>6.4 <math>\pm</math> 0.3</i></b>	6.9 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.2	2.7 $\pm$ 0.0	<b><i>3.2 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	3.2 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1
	133	6.4 $\pm$ 0.4	<b><i>8.6 <math>\pm</math> 0.9</i></b>	7.3 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.7	9.5 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.1	<b><i>2.7 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	3.0 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1
	162	7.1 $\pm$ 0.6	<b><i>9.9 <math>\pm</math> 0.8</i></b>	11.6 $\pm$ 0.6	10.6 $\pm$ 1.3	11.9 $\pm$ 1.2	2.3 $\pm$ 0.0	<b><i>2.8 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	2.9 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.0
	189	8.4 $\pm$ 0.5	10.3 $\pm$ 1.1	<b><i>12.8 <math>\pm</math> 0.7</i></b>	11.7 $\pm$ 0.9	12.5 $\pm$ 1.0	2.2 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.1	<b><i>2.8 <math>\pm</math> 0.0</i></b>	2.8 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.0
	217	9.1 $\pm$ 0.7	13.2 $\pm$ 0.4	12.8 $\pm$ 0.2	<b><i>15.8 <math>\pm</math> 1.3</i></b>	15.0 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 0.1	<b><i>2.8 <math>\pm</math> 0.0</i></b>	2.7 $\pm$ 0.0
	233	8.8 $\pm$ 0.5	12.6 $\pm$ 0.3	<b><i>15.2 <math>\pm</math> 0.6</i></b>	14.4 $\pm$ 0.3	13.6 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.0	<b><i>2.7 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	2.9 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.0
2017	60	1.0 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.0	<b><i>2.0 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	2.4 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.1	<b><i>4.2 <math>\pm</math> 0.1</i></b>
	80	1.6 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.2	<b><i>4.1 <math>\pm</math> 0.2</i></b>	4.0 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1	<b><i>3.4 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	3.6 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.1
	101	3.4 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.7	<b><i>6.1 <math>\pm</math> 0.3</i></b>	6.8 $\pm$ 0.9	6.5 $\pm$ 0.8	1.9 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1	<b><i>3.2 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	3.5 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.1
	130	4.7 $\pm$ 0.6	7.9 $\pm$ 0.5	<b><i>9.1 <math>\pm</math> 0.7</i></b>	8.9 $\pm$ 1.1	9.3 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1	<b><i>2.9 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	3.1 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.1
	160	5.1 $\pm$ 0.5	8.6 $\pm$ 0.5	<b><i>10.2 <math>\pm</math> 0.8</i></b>	10.6 $\pm$ 1.1	12.7 $\pm$ 1.3	1.7 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	<b><i>2.7 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	2.9 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.1
	187	5.5 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 0.8	<b><i>11.4 <math>\pm</math> 0.6</i></b>	11.6 $\pm$ 0.3	11.5 $\pm$ 0.8	1.6 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.0	<b><i>2.6 <math>\pm</math> 0.1</i></b>	2.9 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.1
	217	5.1 $\pm$ 0.4	9.3 $\pm$ 0.8	10.5 $\pm$ 0.1	<b><i>12.6 <math>\pm</math> 0.4</i></b>	12.6 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.1	<b><i>2.8 <math>\pm</math> 0.0</i></b>	2.7 $\pm$ 0.1

11.1.2. Supplementary Figure



**Figure S1.** Relationships between NNI values derived from (i) a double CNC that combined  $\%Nc = 4.82 \times DMP^{-0.24}$  for the vegetative growth period, and  $\%Nc = 4.13 \times DMP^{-0.16}$  for the harvest period, and (ii) the single CNC of  $\%Nc = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  for the entire crop, for the 2014, 2016 and 2017 pepper crops. These relationships are presented for (a) the vegetative growth periods, (b) the harvest periods, and (c) the entire duration of the crops, i.e. the combined vegetative growth and harvest periods. The crops were subjected to five different increasing N treatments with four replications. The lines and equations represent the best-fit equation. The dashed line represents the 1:1 line.



## 11.2. Chapter three: Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper

### 11.2.1. Supplementary Table

**Table S1.** Concentrations of macronutrients and the micronutrients in irrigation water and the nutrient solution used in the N3 treatments (conventional N management) in the three different sweet pepper crops. There were some fluctuations in concentration during the crops. In the other N treatments, the concentrations of the macronutrients and the micronutrients were very similar to those in the N3 treatment.

	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH	Macronutrients (mmol L <sup>-1</sup> )							Micronutrients (mg L <sup>-1</sup> )				
			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Fe	Mn	Zn	B	Cu
<i>Irrigation water</i>	0.35	7.9	0.04	0.03	0.08	-	0.05	0.40	0.10	-	-	-	0.20	0.20
<i>Nutrient solution</i>														
2014 crop	2.50	5.9	12.0	1.00	3.50	1.10	5.00	6.00	1.50	1.50	0.68	0.12	0.34	0.26
2016 & 2017 crops	2.20	6.3	10.0	1.00	3.10	0.90	5.00	4.90	1.50	1.50	0.68	0.12	0.34	0.26

### 11.3. Capítulo cuatro: Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero

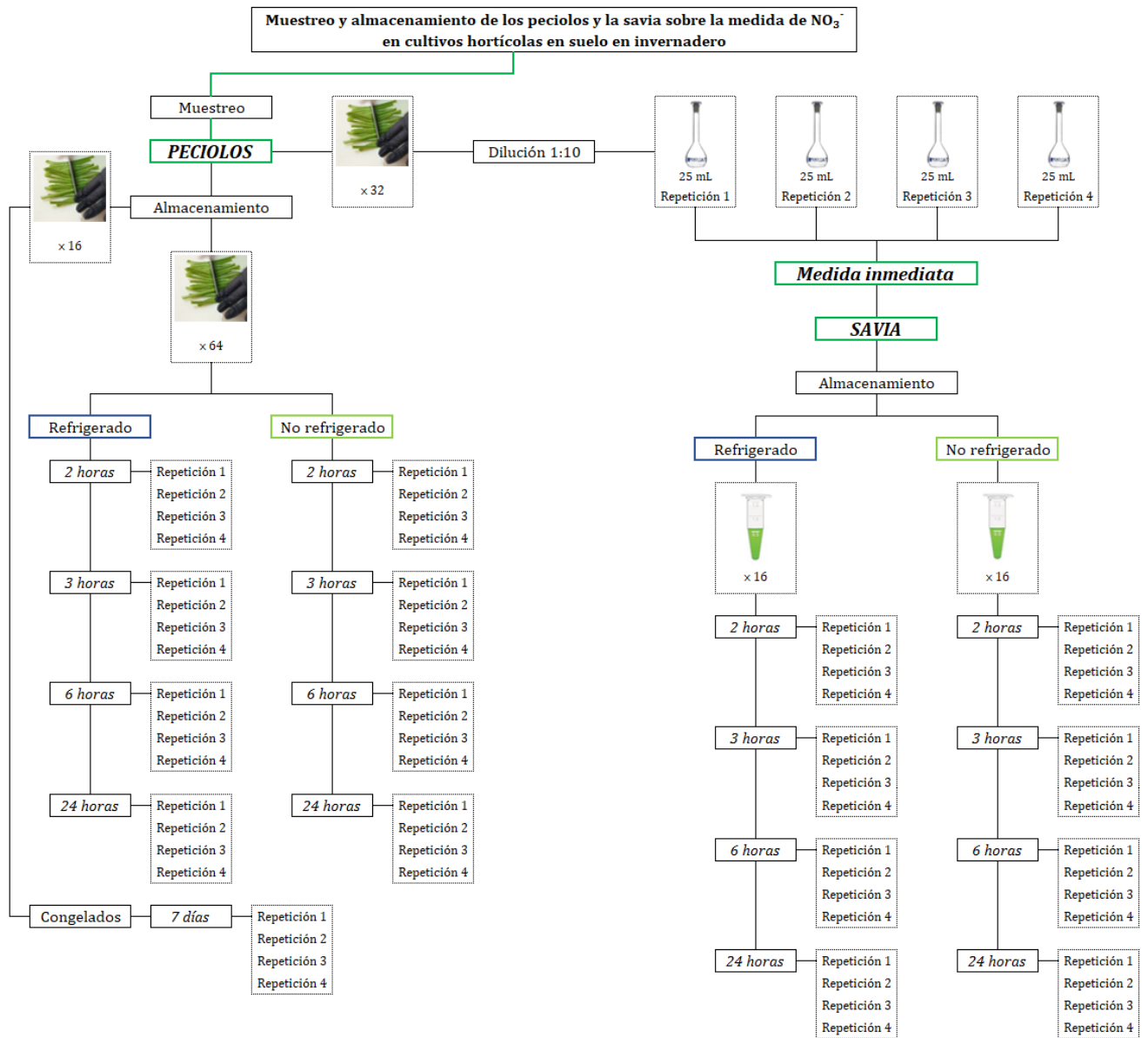
#### 11.3.1. Tabla Suplementaria

**Tabla S1.** Concentraciones de macronutrientes y micronutrientes en el agua de riego y la solución nutritiva utilizada en los tratamientos N3 (N excesivo) en los cultivos de pepino, melón y pimiento. Se presentaron algunas fluctuaciones en la concentración durante el ciclo del cultivo. En los otros tratamientos de N, las concentraciones de macronutrientes y micronutrientes fueron muy similares a las del tratamiento N3.

	EC (dS m <sup>-1</sup> )	pH	Macronutrientes (mmol L <sup>-1</sup> )						Micronutrientes (mg L <sup>-1</sup> )					
			NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Fe	Mn	Zn	B	Cu
<i>Agua de riego</i>	0.35	7.9	0.04	0.03	0.08	-	0.05	0.40	0.10	-	-	-	0.20	0.20
<i>Solución nutritiva</i>														
Pepino	2.60	6.10	14.0	2.00	2.40	1.30	4.00	6.70	1.50	1.50	0.68	0.12	0.34	0.26
Melón	2.30-2.60	6.30	12.0	2.50	4.00	1.30	6.00-10.00	6.00	1.20	1.50	0.68	0.12	0.34	0.26
Pimiento	2.30	6.50	14.0	2.00	4.00	1.30	4.00	7.90	0.20	1.50	0.68	0.12	0.34	0.26

### 11.4. Capítulo cinco: Evaluación del muestreo y almacenamiento de los peciolo y la savia sobre la medida de nitrato en savia de peciolo en cultivos hortícolas en suelo en invernadero

#### 11.4.1. Figura Suplementaria



**Figura S1.** Metodología realizada para el muestreo y almacenamiento de los peciolo y la savia en un cultivo de melón en invernadero.



## **12. Lista de Tablas y Figuras**

---



**12.1. Lista de Tablas**

**Chapter one: Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss**

**Table 1.** General description for the three pepper crops and N treatments, including dates of transplanting and end of crop, total irrigation and drainage volumes, soil mineral N at transplanting, N fertigation treatments defined on the basis of N concentration of the applied nutrient solution, total amount of N applied and total available N (TAN) supplied to the crop. Apparent N mineralization, included in the calculation of TAN, was 24.3, 43.2 and 1.7 kg N ha<sup>-1</sup> in the 2014, 2016 and 2017 crops, respectively.....40

**Table 2.** For each pepper crop, means values for the cropping period of 24-h minimum, average and maximum air temperature and relative humidity (RH) values, and average values for the duration of the crop of the daily integral of solar radiation and of daily reference evapotranspiration (ET<sub>0</sub>), inside the greenhouse. ....43

**Table 3.** Integrated nitrogen nutrition index (NNI<sub>i</sub>) values for different N treatments for each of the three sweet pepper crops. Different letters indicate significant differences (*P* <0.05) between means within each crop year, according to the procedure of least significant difference (LSD). A summary of the analysis of variance is presented as highly significant at *P* <0.001 (\*\*\*). The NNI<sub>i</sub> data are means ± SE over all sampling dates, from four replicate plots.....52

**Table 4.** Total yield, total dry matter production (DMP), total crop N uptake, harvest index (HI) and nitrogen harvest index (NHI) for each treatment in the 2014, 2016 and 2017 pepper crops. Different letters indicate significant differences (*P* <0.05) between means within each crop year, according to the procedure of least significant difference (LSD). A summary of the analysis of variance is presented as: no significant at *P* >0.05 (ns), significant at *P* <0.05 (\*), very significant at *P* <0.01 (\*\*) and highly significant at *P* <0.001 (\*\*\*). Data are means of four replicate plots.....55

**Table 5.** Nitrogen use efficiency for total yield (NUE<sub>Yield</sub>) and for dry matter production (NUE<sub>DMP</sub>), N uptake efficiency (N<sub>upt</sub>E), and N utilization efficiency for total yield (N<sub>ut</sub>E<sub>Yield</sub>) and for dry matter production (N<sub>ut</sub>E<sub>DMP</sub>) for the different N treatments during the 2014, 2016 and 2017 pepper crops. Different letters indicate significant differences (*P* <0.05) between means within each crop year according to the procedure of least significant difference (LSD). A summary of the analysis of variance is presented as highly significant at *P* <0.001 (\*\*\*). Data are means from four replicate plots.....59

**Chapter two: Soil monitoring methods to assess immediately available soil N for fertigated sweet pepper.**

**Table 1.** Information of the three pepper crops and N treatments. Duration of the crops, total mineral N applied, irrigation amount, the average applied N concentration by nutrient solution, total dry matter production (DMP), and total yield (TY). ....80

**Table 2.** Inclined linear equation of segmented linear regression relating NNI values to soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (mmol L<sup>-1</sup>) for each and combined dataset of the three pepper crops and for combined dataset of the three pepper crops for each phenological stage. Equation,  $x_0$  value, maximum NNI value reached, coefficients of determination (R<sup>2</sup>), standard error (±SE) and the number of data points ( $n$ ) are shown. ....88

**Table 3.** Inclined linear equation of segmented linear regression relating NNI values to 1:2 soil to water (v/v) [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] (mmol L<sup>-1</sup>) extract method for each and combined dataset of the two pepper crops and for combined dataset of the two pepper crops for each phenological stage. Equation,  $x_0$  value maximum NNI value reached, coefficients of determination (R<sup>2</sup>), standard error (±SE), and the number of data points ( $n$ ) are shown. ....92

**Table 4.** Linear relationship relating soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] and to the applied nutrient solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] for sweet pepper crops, considering the entire crops and crops after 70 days after transplanting (DAT). The equation, coefficients of determination (R<sup>2</sup>), standard error (±SE), and the number of data points ( $n$ ) are presented. ....94

**Table 5.** Linear relationship relating 1:2 soil to water (v/v) extract method [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] to the applied nutrient solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] for sweet pepper crops, considering the entire crops and crops after 70 days after transplanting (DAT). The equation, coefficients of determination (R<sup>2</sup>), standard error (±SE), and the number of data points ( $n$ ) are presented. ....97

**Table 6.** Linear regressions analysis relating 1:2 soil to water (v/v) extract method [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] and soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] for 2016 and 2017 pepper crops and combined all dataset of the two pepper crops. The equation, coefficients of determination (R<sup>2</sup>), standard error (±SE), and the number of data points ( $n$ ) are presented. ....98

**Table 7.** Coefficient of variation (CV) of the measurements of [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] extract method of soil solution and 1:2 soil to water (v/v) for each pepper crop. ....99

### **Chapter three: Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper**

**Table 1.** General information of the three pepper crops, and of each N treatment. Provided are the dates of the crops, and of the N treatments expressed as the average nutrient solution N concentration, and total quantity of N applied. Total dry matter production (DMP) and total yield (TY; fresh weight) data are presented. .... 114

**Table 2.** Integrated petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] (Sap<sub>i</sub>) (mg L<sup>-1</sup>) values for each treatment, the entire crop and phenological stage for the 2014, 2106 and 2017 crops. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments in each crop, using LSD. A summary of the significance of the N treatments in the ANOVA is presented, with highly significant differences indicated by  $P < 0.001$  (\*\*\*). Values are means ( $n=4$ ) ± standard error (SE). .... 122

**Table 3.** Integrated Nitrogen Nutrition Index (NNI<sub>i</sub>) values for each treatment for the complete crop and for phenological stage for the 2014, 2106 and 2017 crops. Different



letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between means in each crop year according to LSD. A summary of the significance of the N treatments in the ANOVA is presented, with highly significant differences indicated by  $P < 0.001$  (\*\*\*). Values are means ( $n=4$ )  $\pm$  standard error (SE). ..... 125

**Table 4 (a).** Polynomial regression analysis relating NNI to petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  for 2014 ( $n=359$ ), 2016 ( $n=299$ ) and 2017 ( $n=220$ ) pepper crops, and using pooled data for the duration of the three crops ( $n=878$ );  $n$  is the number of data points. The fitted equations and coefficients of determination ( $R^2$ ) are shown. SE is standard error of the estimation. The values of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) that correspond to NNI values of 1.0 are presented. .... 128

**Table 4 (b).** Segmented linear regression analysis relating NNI to petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  for 2014 ( $n=359$ ), 2016 ( $n=299$ ) and 2017 ( $n=220$ ) pepper crops, and using pooled data for the duration of the three crops ( $n=878$ );  $n$  is the number of data points. The fitted equations and coefficients of determination ( $R^2$ ) are shown. SE is standard error of the estimation. The two linear equations of the segmented analysis are presented as (i) the sloped equation and (ii) the horizontal equation, which is presented as the maximum NNI value. The values of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) that correspond to  $Sap_0$ , which is the petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  value associated with the maximum NNI value, are presented..... 128

**Table 5 (a).** Polynomial regression analysis relating NNI to petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  for vegetative ( $n=139$ ), flowering and early fruit growth ( $n=320$ ) and harvest ( $n=419$ ) stages using combined data from the 2014, 2016, and 2017 pepper crops;  $n$  is the number of data points. The fitted equations and coefficients of determination ( $R^2$ ) are shown. SE is the standard error of the estimation. The values of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) that correspond to NNI values of 1.0 are presented..... 130

**Table 5 (b).** Segmented linear regression analysis relating NNI to petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  for vegetative ( $n=139$ ), flowering and early fruit growth ( $n=320$ ) and harvest ( $n=419$ ) stages using combined data from the 2014, 2016, and 2017 pepper crops;  $n$  is the number of data points. The fitted equations and coefficients of determination ( $R^2$ ) are shown. SE is the standard error of the estimation. The two linear equations of the segmented analysis are presented as (i) the sloped equation, and (ii) the horizontal equation, which is presented as the maximum NNI value. The values of petiole sap  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) that correspond to maximum NNI (i.e.  $Sap_0$  value) are presented..... 130

**Capítulo cuatro: Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero**

**Tabla 1.** Información general de los cultivos de pepino, melón y pimiento y de los tratamientos de N. Se incluye la fecha de trasplante y duración del cultivo, la concentración de N aplicada en la solución nutritiva, la cantidad de N mineral aplicado y el riego total aplicado..... 145

**Tabla 2.** Producción total de materia seca (DMP) y producción total de frutos (PT; peso fresco) para cada cultivar de los diferentes cultivos de pepino, melón y pimiento..... 148

**Tabla 3.** Resultados del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) que prueba el efecto del cultivar, los tratamientos con N y el tiempo en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pepino. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad (P). ..... 149

**Tabla 4.** Resumen de la prueba LSD del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) evaluando las diferencias entre los cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Las celdas de color gris oscuro indican una diferencia estadísticamente significativa con los otros dos cultivares en esta fecha. Las celdas de color gris claro indican una diferencia estadísticamente significativa con uno de los otros dos cultivares en esta fecha. .... 152

**Tabla 5.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo (variable x) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable y) para los cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') cultivados en invernadero para cada día de medición ( $n=12$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y significancias son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*) y muy significativo en  $P < 0.01$  (\*\*). ..... 155

**Tabla 6.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo (variable x) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable y) para los cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') cultivados en invernadero considerando todos los datos de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  con valores  $>100 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  durante el ciclo del cultivo desde 22 DDT hasta 50 DDT. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y los números totales del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*) . ..... 158

**Tabla 7.** Resultados del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) que prueba el efecto del cultivar, los tratamientos con N y el tiempo en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de melón. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad (P). ..... 159

**Tabla 8.** Resumen de la prueba LSD del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) evaluando las diferencias entre los cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobó') en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Las celdas de color gris oscuro indican una diferencia estadísticamente significativa con los otros dos cultivares en esta fecha. Las celdas con el color gris claro indican una diferencia estadísticamente significativa con uno de los otros dos cultivares en esta fecha. .... 163

**Tabla 9.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  en la savia del peciolo (variable  $x$ ) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable  $y$ ) para los cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') cultivados en invernadero para cada día de medición ( $n=12$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y significancias son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*) y muy significativo en  $P < 0.01$  (\*\*). 166

**Tabla 10.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  en la savia del peciolo (variable  $x$ ) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable  $y$ ) para los cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') cultivados en invernadero durante el ciclo del cultivo desde 34 DDT hasta 76 DDT. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y el número del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*) 168

**Tabla 11.** Resultados del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) que prueba el efecto del cultivar, los tratamientos con N y el tiempo en las medidas de la  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) en el cultivo de pimiento. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad ( $P$ ). 169

**Tabla 12.** Resumen de la prueba LSD del análisis de varianza de las medidas repetidas (RM-ANOVA) evaluando las diferencias entre los cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) en las medidas de la  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  en la savia y del contenido de N en la hoja (%N) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Las celdas de color gris oscuro indican una diferencia estadísticamente significativa con los otros dos cultivares en esta fecha. Las celdas con el color gris claro indican una diferencia estadísticamente significativa con uno de los otros dos cultivares en esta fecha. 173

**Tabla 13.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  en la savia del peciolo (variable  $x$ ) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable  $y$ ) para los cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) cultivados en invernadero para cada día de medición ( $n=12$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y significancias son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*) 176

**Tabla 14.** Análisis de regresión lineal relacionando la  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  en la savia del peciolo (variable  $x$ ) con el contenido de N en la hoja (%N) (variable  $y$ ) para los cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) cultivados en invernadero considerando todos los datos de la  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  en la savia y las medidas de la  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  con valores  $>100 \text{ mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$  durante el ciclo del cultivo desde 27 DDT hasta 125 DDT. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y los números totales del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados. El análisis de la varianza se presenta como altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*) 179

**Capítulo cinco: Evaluación del muestreo y almacenamiento de los peciolos y la savia sobre la medida de nitrato en savia de peciolos en cultivos hortícolas en suelo en invernadero**

**Tabla 1.** Información general de los cultivos de pimiento y melón y de los tratamientos de N. Incluye la fecha de trasplante y duración del cultivo, la concentración de N aplicada en la solución nutritiva, la cantidad de N mineral aplicado y el riego total aplicado. .... 194

**Tabla 2.** Tratamientos de los diferentes procedimientos en la gestión de peciolos y savia diluida. .... 198

**Tabla 3.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia realizadas a diferentes horas del día a los 92 y 133 DDT en el cultivo de pimiento. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las horas del día según la prueba LSD. El resumen del ANOVA se presenta como: no significativo en  $P > 0.05$  (ns), significativo en  $P < 0.05$  (\*), muy significativo en  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*). Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. .... 201

**Tabla 4.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia realizadas a diferentes horas del día a los 42 y 52 DDT en el cultivo de melón. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las horas del día según la prueba LSD. El resumen del ANOVA se presenta como: no significativo en  $P > 0.05$  (ns), significativo en  $P < 0.05$  (\*), muy significativo en  $P < 0.01$  (\*\*), y altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*). Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. .... 203

**Tabla 5.** Resultados del análisis de varianza anidada (NESTED-ANOVA) que prueba el efecto del factor tipo de almacenamiento y el factor tiempo de almacenamiento en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en la gestión de peciolos de melón muestreados. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad ( $P$ ). .... 203

**Tabla 6.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia afectadas por el tiempo de almacenamiento de los peciolos. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias entre tratamientos según la prueba LSD. Los valores de las medidas a las 2, 3, 6 y 24 horas son una media entre la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de peciolos refrigerados y no refrigerados ( $n=8$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. .... 205

**Tabla 7.** Resultados del análisis de varianza anidada (NESTED-ANOVA) que prueba el efecto del factor tipo de almacenamiento y el factor tiempo de almacenamiento en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en la gestión de savia diluida de melón muestreada. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad ( $P$ ). .... 205

**Tabla 8.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia afectada por el tipo de almacenamiento de la savia diluida. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias entre tratamientos según la prueba LSD. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. .... 206

**Tabla 9.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia afectada por el tiempo de almacenamiento de la savia diluida. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias entre tratamientos según la prueba LSD. Los valores son medias ( $n=8$ )  $\pm$  el error estándar (SE) entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de los tratamientos almacenados como refrigerados y no refrigerados;  $n$  es el número de datos..... 207

**Tabla 10.** Resultados del análisis de varianza (FACTORIAL-ANOVA) que prueba el efecto del nitrógeno y la posición de la hoja muestreada en las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia. Se presentan los grados de libertad (g. l), el valor de Fisher (F) y el valor de la probabilidad ( $P$ )..... 209

**Tabla 11.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de los peciolos para cada posición de muestreo de los peciolos de las hojas en la planta con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias según la prueba LSD; las letras mayúsculas se refieren a la comparación entre tratamientos de N y las minúsculas entre las posiciones de las hojas muestreadas. El resumen del ANOVA se presenta como: no significativo en  $P > 0.05$  (ns) y altamente significativo en  $P < 0.001$  (\*\*\*)). Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos..... 211

**Material suplementario**

**Chapter one: Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss**

**Table S1.** Total dry matter production (DMP) and N concentration (%) on different sampling dates after transplant (DAT) in the 2014, 2016 and 2017 crops. Critical data points selected for deriving the critical N curve are highlighted in bold and italics, this point is the critical treatment that maximized the production with the lowest amount of N according to the methodology followed by Greenwood et al. (1990). The values are means  $\pm$  SE. The crops were subjected to five different increasing N treatments with four replicate plots..... 237

**Chapter three: Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper**

**Table S1.** Concentrations of macronutrients and the micronutrients in irrigation water and the nutrient solution used in the N3 treatments (conventional N management) in the three different sweet pepper crops. There were some fluctuations in concentration during the crops. In the other N treatments, the concentrations of the macronutrients and the micronutrients were very similar to those in the N3 treatment..... 239

**Capítulo cuatro: Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero**

**Tabla S1.** Concentraciones de macronutrientes y micronutrientes en el agua de riego y la solución nutritiva utilizada en los tratamientos N3 (N excesivo) en los cultivos de pepino, melón y pimiento. Se presentaron algunas fluctuaciones en la concentración durante el ciclo del cultivo. En los otros tratamientos de N, las concentraciones de macronutrientes y micronutrientes fueron muy similares a las del tratamiento N3..... 240

**Anexo**

**Capítulo cuatro: Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero**

**Tabla 1.** Análisis de la regresión de rectas segmentadas relacionando el NNI con la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') ( $n=84$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Se presenta la ecuación, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar (SE). Las líneas de la regresión de rectas segmentadas se presentan como la pendiente de la ecuación y la ecuación de la línea horizontal, indicando el valor máximo de NNI alcanzado. Se presenta el valor de la  $[NO_3^- - N]$  ( $mg L^{-1}$ ) en la savia del peciolo indicado como  $Sav_0$ , siendo el valor de la  $[NO_3^- - N]$  asociado con el valor máximo de NNI. .... 266

**Tabla 2.** Análisis de la regresión de rectas segmentadas relacionando el NNI con la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') ( $n=72$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Se presenta la ecuación, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar (SE). Las líneas de la regresión de rectas segmentadas se presentan como la pendiente de la ecuación y la ecuación de la línea horizontal, indicando el valor máximo de NNI alcanzado. Se presenta el valor de la  $[NO_3^- - N]$  ( $mg L^{-1}$ ) en la savia del peciolo indicado como  $Sav_0$ , siendo el valor de la  $[NO_3^- - N]$  asociado con el valor máximo de NNI. .... 269

**Tabla 3.** Análisis de la regresión de rectas segmentadas relacionando el NNI con la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y 'Lamuyo') ( $n=120$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Se presenta la ecuación, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar (SE). Las líneas de la regresión de rectas segmentadas se presentan como la pendiente de la ecuación y la ecuación de la línea horizontal, indicando el valor máximo de NNI alcanzado. Se presenta el valor de la  $[NO_3^- - N]$  ( $mg L^{-1}$ ) en la savia del peciolo indicado como  $Sav_0$ , siendo el valor de la  $[NO_3^- - N]$  asociado con el valor máximo de NNI. .... 271

12.2. Lista de Figuras

**Chapter one: Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss**

**Figure 1.** (a) Critical N curve for pepper using (i) total crop N content and total DMP (red), (ii) vegetative DMP and vegetative crop N content (black broken line) from the 2014, 2016 and 2017 crops and (iii) CNC for C3 crops of Lemaire and Gastal, (1997) (gray broken line), and (b) relationship between the natural logarithm (LN) of total crop N content and the LN of total DMP for (i) the entire crop cycle (red), (ii) until harvest (blue), and (iii) harvest period (green). The CNC derived for total and vegetative DMP and N content was calculated following the methodology of Greenwood et al. (1990). Each data point is the critical treatment that maximized the production with the lowest amount of N. The values represented are means from four replicate plots. The lines and equations represent the best-fit equations.....51

**Figure 2.** Relationship between relative yield and the integrated nitrogen nutrition index (NNI<sub>i</sub>) of sweet pepper from 2014, 2016 and 2017 crops. The inclined line was described by  $Y = a + bNNI_i$  (if  $NNI_i < NNI_{i_0}$ ), the horizontal line by  $Y = P$  (if  $NNI_i > NNI_{i_0}$ );  $a$  is the intercept,  $b$  is the slope,  $NNI_{i_0}$  is the critical NNI<sub>i</sub> value (the intersection of the inclined and horizontal line). NNI<sub>i</sub> data were the NNI over all sampling dates, from four replicate plots. The line and equation represent the best-fit equation. ....53

**Figure 3.** Measured crop N uptake and critical N uptake ( $N_{Cupt}$ ) calculated for DMP values following the equation  $N_{Cupt} = 47.1a \times DMP^{0.78}$  for the five N treatments in the (a) 2014, (b) 2016, and (c) 2017 pepper crops. The values represented are the means over all sampling treatment date. Dashed line represents the 1:1 line.....54

**Figure 4.** Total yield in response to total available nitrogen (TAN) for 2014, 2016 and 2017 pepper crops applying a linear-plateau regression model with (a) absolute total yield and (b) relative yield values. The inclined line was described by  $Y = a + bN$  (if  $N < N_0$ ), the horizontal line by  $Y = P$  (if  $N > N_0$ );  $a$  is the intercept,  $b$  is the slope,  $N_0$  is the critical TAN value (the intersection of the inclined and horizontal lines). The values represented are individual replications. The lines and equations represent the best-fit equations.....56

**Figure 5.** Relationship between total available nitrogen (TAN) and the integrated nitrogen nutrition index (NNI<sub>i</sub>) of pepper from 2014, 2016 and 2017 pepper crops.  $NNI_{i_0\text{ RY-Max}}$  is the maximum value of NNI<sub>i</sub> associated with maximum relative yield from Figure 2. NNI<sub>i</sub> data were the NNI over all sampling dates, from four replicate plots for each crop. The line and equation represent the best-fit equation.....57

**Figure 6.** Nitrogen utilization efficiency for (a) yield per unit of N uptake ( $N_{utE_{Yield}}$ ), and for (b) dry matter production per unit of N uptake ( $N_{utE_{DMP}}$ ), in relation to crop N uptake in the 2014, 2016 and 2017 pepper crops using a combined data set for the 2014, 2016 and 2017 pepper crops. The inclined line was described by  $Y = a + bN$  (if  $N < N_{upt}$ ), the horizontal line by  $Y = P$  (if  $N > N_{upt}$ );  $a$  is the intercept,  $b$  is the slope,  $N_{upt}$  is the critical N uptake value

(the intersection of the inclined and horizontal lines). The values represented are individual replications. The lines and equations represent the best-fit equations.....60

**Figure 7.** Relationship between N uptake efficiency ( $N_{\text{uptE}}$ ) and total available N (TAN) for the different N treatments in the 2014, 2016 and 2017 pepper crops.  $TAN_{\text{RY-Max}}$  is the maximum amount of TAN associated with maximum relative yield from Figure 4 b. The values represented are individual replications. The line and equation represent the best-fit equation.....60

**Figure 8.** Relationship between residual mineral N in the soil at the end of the 2014, 2016 and 2017 crops, and (a) total available nitrogen (TAN) and (b) integrated nitrogen nutrition index ( $NNI_i$ ).  $TAN_{\text{RY-Max}}$  is the maximum amount of TAN associated with maximum relative yield from Figure 4 b and  $NNI_{i0 \text{ RY-Max}}$  is the maximum value of  $NNI_i$  associated with maximum relative yield from Figure 2. The values represented are individual replications. The lines and equations represent the best-fit equations.....61

**Figure 9.** Relationship between potential  $\text{NO}_3^-$  leaching loss at the end of the 2014, 2016 and 2017 crops, and total available nitrogen (TAN).  $TAN_{\text{RY-Max}}$  is the maximum amount of TAN associated with maximum relative yield from Figure 4 b. The values represented are means  $\pm$  SE of four replicate plots. The line and equation represent the best-fit equation.62

## Chapter two: Soil monitoring methods to assess immediately available soil N for fertigated sweet pepper.

**Figure 1.** Evolution of the soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  and nitrogen nutrition index (NNI) values as a function of time (days after transplanting (DAT)) during the 2014 (a, b), 2016 (c, d), and 2017 (e, f) pepper crops, each with five N treatments. Values are means ( $n=4$ )  $\pm$  standard error (SE). The horizontal dotted lines (Figure a, c, e) represent the sufficiency values of 5.0  $\text{mmol L}^{-1}$  and 15.0  $\text{mmol L}^{-1}$  determined in this work. Arrows (Figure a, c, e) indicate the date of the commencement of the additional irrigation or fertigation during 80–103 DAT (N3, N4, and N5) in the 2014 crop, during 66–71 DAT, 104–111 DAT, and 178–180 DAT (N1 to N5) in the 2016 crop, and during 72–110 DAT, 129–143 DAT, and 185–208 DAT (N3 to N5) in the 2017 crop. The horizontal long dashed lines (Figure b, d, f) represent  $NNI=1.0$ . The NNI figures (b, d, f) were modified from (de Souza et al., 2019). The use of chlorophyll meters to assess crop N status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. Sensors 19: 2949, published by MDPI and distributed as open access under the Creative Commons Attribution (CC BY) license.....85

**Figure 2.** Relationships of NNI values with soil solution  $[\text{NO}_3^-]$  for (a) the entire 2014, 2016, and 2017 pepper crops considered together, and (b) the vegetative, flowering and early fruit growth, and harvest phenological stages using combined data from the three pepper crops. The vertical dotted lines represent the sufficiency values of 5.0  $\text{mmol L}^{-1}$  and 15.0  $\text{mmol L}^{-1}$  determined in this work. The segmented linear regression was represented by an inclined segment defined by  $y = ax + b$  (if  $x < x_0$ ) and the horizontal segment by  $y = c$  (if  $x \geq x_0$ ), where  $y$  is NNI value,  $x$  is soil solution  $[\text{NO}_3^-]$ ,  $a$  is the slope,  $b$  is the intercept of the inclined segment and  $x_0$  is the intersection of the two segments. The  $x_0$  is the soil solution



[NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] required to reach  $c$ , the maximum NNI value. After reaching the maximum NNI value, the response is constant. The equations of the segmented regression are presented in Table 2.....87

**Figure 3.** Evolution of the [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] in the 1:2 soil to water (v/v) extract and NNI values as a function of time (days after transplanting (DAT)) during 2016 (a, b) and 2017 (c, d) pepper crops, each with five N treatments. Values are means ( $n=4$ )  $\pm$  standard error (SE). The horizontal dotted lines (Figure a, c) represent the sufficiency values of 1.0 mmol L<sup>-1</sup> and 2.5 mmol L<sup>-1</sup> determined in this work. Arrows (Figure a, c) indicate the date of the commencement of the additional irrigation or fertigation during 66–71 DAT, 104–111 DAT, and 178–180 DAT (N1 to N5) in the 2016 crop, and during 72–110 DAT, 129–143 DAT, and 185–208 DAT (N3 to N5) in the 2017 crop. The horizontal long dashed lines (Figure b, d) represent NNI=1.0. The NNI figures (b, d) were modified from (de Souza et al., 2019). The use of chlorophyll meters to assess crop N status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. Sensors 19: 2949, published by MDPI and distributed as open access under the Creative Commons Attribution (CC BY) license. ....90

**Figure 4.** Relationships of NNI values with the [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] of the 1:2 soil to water (v/v) extract for (a) the entire 2016 and 2017 pepper crops considered together, and (b) the vegetative, flowering and early fruit growth and harvest stage using combined data from the two pepper crops. The vertical dotted lines represent the sufficiency values of 1.0 mmol L<sup>-1</sup> and 2.5 mmol L<sup>-1</sup> determined in this work. The segmented linear regression was represented by an inclined segment defined by  $y = ax + b$  (if  $x < x_0$ ) and the horizontal segment by  $y = c$  (if  $x \geq x_0$ ), where  $y$  is NNI value,  $x$  is the [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] of the 1:2 soil to water (v/v) extract,  $a$  is the slope,  $b$  is the intercept of the inclined segment and  $x_0$  is the intersection of the two segments. The  $x_0$  is the [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] of the 1:2 soil to water (v/v) extract required to reach  $c$ , the maximum NNI value. After reaching the maximum NNI value, the response is constant. The equations of the segmented regression are presented in Table 3.....91

**Figure 5.** Linear relationship between soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] and the applied nutrient solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] during (a) the entire crop, considering the entire crops and the (b) crops after 70 days after transplanting (DAT). The linear regression of all dataset combining the three pepper crops of the soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] is presented as a black solid line, the linear regression for 2014 (dotted line), 2016 (short dash) and 2017 (long dash) crops is shown. The equations of the linear regressions are presented in Table 4.....93

**Figure 6.** Linear relationship between 1:2 soil to water (v/v) extract method [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] and the applied nutrient solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] during (a) the entire crop, considering the entire crops and the (b) crops after 70 days after transplanting (DAT). The linear regression of all dataset combining the two pepper crops of the 1:2 soil to water (v/v) extract method [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] is presented as a black solid line, the linear regression for 2016 (short dash) and 2017 (long dash) crops is shown. The equations of the linear regressions are presented in Table 5....95

**Figure 7.** Linear relationship between 1:2 soil to water (v/v) extract method [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] and soil solution [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] during the cropping cycle. The linear regression for combining the 2016 and 2017 pepper crops is presented as a black solid line, the linear regression for 2016 (short dash) and 2017 (long dash) crops is shown. The equations of the linear regressions are presented in Table 6.....98

### Chapter three: Petiole sap nitrate concentration to assess crop nitrogen status of greenhouse sweet pepper

**Figure 1.** Effect of increasing N concentration in nutrient solution, on petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] values throughout the (a) 2014, (b) 2016 and (c) 2017 pepper crops. The data presented are means ( $n=4$ ) ± standard error (SE). ..... 121

**Figure 2.** NNI values throughout the (a) 2014, (b) 2016, and (c) 2017 pepper crops. Presented values are means ( $n=4$ ) ± standard error (SE). The horizontal dotted line represents NNI=1.0. Modified from de Souza et al. (2019). The use of chlorophyll meters to assess crop N status and derivation of sufficiency values for sweet pepper. Sensors 19, 2949, published by MDPI and distributed as open access under the Creative Commons Attribution (CC BY) license. .... 124

**Figure 3.** Relationship between N nutrition index (NNI) and petiole sap [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] for pooled data from the three different pepper crops. The red line is the polynomial regression of  $NNI = -1.10E - 07 \times Sap^2 + 0.000473 \times Sap + 0.5514$  ( $R^2=0.84$ ) and the blue dotted lines are the linear segmented regression described by the sloped line of  $NNI = 0.00034 \times Sap + 0.572$  (if  $Sap < Sap_0$ ) and the horizontal line described by  $NNI = 1.04$  (if  $Sap \geq Sap_0$ ) ( $R^2=0.83$ ). The values are from five different N treatments with four replications from the 2014, 2016 and 2017 pepper crops ( $n=878$ );  $n$  is the number of data points. .... 126

### Capítulo cuatro: Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero

**Figura 1.** Evolución de las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo (a, b, c) y del contenido de N en la hoja (%N) (d, e, f) de tres cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ ) ± el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. Las figuras del contenido de N en la hoja (%N) (d, e, f) fueron modificadas de de Souza et al. (2020). Effect of cultivar on chlorophyll meter and canopy reflectance measurements in cucumber. Sensors 20: 509, publicado por MDPI y distribuido como acceso abierto (open access) bajo la licencia Creative Commons Attribution (CC BY). .....150

**Figura 2.** Relaciones lineales entre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) para cada fecha de muestreo en (a) 'Strategos', (b) 'Pradera' y (c) 'Mitre' con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y significancias son presentados en la Tabla 5. .... 154

**Figura 3.** Relaciones lineales entre las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) usando (a) todas las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] en la savia y (b) las medidas de la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N] con valores >100 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> durante el ciclo del cultivo desde 22 DDT hasta 50 DDT para los cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre')

con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. La regresión lineal de todo el conjunto de datos de las medidas que combina los tres cultivares de pepino se muestra como una línea negra sólida, también se muestran las relaciones lineales para 'Strategos' (guion largo verde), 'Pradera' (guion mediano azul) y 'Mitre' (guion corto anaranjado). Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y el número del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados en la Tabla 6. .... 157

**Figura 4.** Evolución de las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo (a, b, c) y del contenido de N en la hoja (%N) (d, e, f) de tres cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. .... 160

**Figura 5.** Relaciones lineales entre las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) para cada fecha de muestreo en (a) 'Tezac', (b) 'Magiar' y (c) 'Jacobo' con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=12$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y significancias son presentados en la Tabla 9. .... 165

**Figura 6.** Relaciones lineales de las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) durante el ciclo del cultivo desde 34 DDT hasta 76 DDT para los cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. La regresión lineal de todo el conjunto de datos de las medidas que combina los tres cultivares de melón se muestra como una línea negra sólida, también se muestran las relaciones lineales para 'Tezac' (guion largo verde), 'Magiar' (guion mediano azul) y 'Jacobo' (guion corto anaranjado). Las ecuaciones de las regresiones lineales se presentan en la Tabla 10. Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y el número del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados en la Tabla 10. .... 168

**Figura 7.** Evolución de las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo (a, b, c) y del contenido de N en la hoja (%N) (d, e, f) de tres cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. .... 170

**Figura 8.** Relaciones lineales entre las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) para cada fecha de muestreo en (a) 'Melchor', (b) 'Machado' y (c) Lamuyo con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=12$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Los valores de la pendiente, intersección,  $R^2$  y significancias son presentados en la Tabla 13. .... 175

**Figura 9.** Relaciones lineales entre las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja (%N) usando (a) todas las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  en la savia y (b) las medidas de la  $[NO_3^- - N]$  con valores  $>100$  mg  $NO_3^- - N$  L<sup>-1</sup> durante el ciclo del cultivo desde 27 DDT hasta 125 DDT para los cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero. La regresión lineal de todo el conjunto de datos de las medidas que combina los tres cultivares de pimiento se muestra como una línea negra sólida, también se muestran las relaciones lineales para 'Melchor' (guion largo verde), 'Machado' (guion mediano azul) y Lamuyo

(guion corto anaranjado). Las ecuaciones, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), las significancias y el número del conjunto de datos ( $n$ ) son presentados en la Tabla 14..... 178

### Capítulo cinco: Evaluación del muestreo y almacenamiento de los peciolo y la savia sobre la medida de nitrato en savia de peciolo en cultivos hortícolas en suelo en invernadero

**Figura 1.** Variación diurna de la (a, c)  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y la (b, d) evolución de la temperatura del aire ( $^{\circ}\text{C}$ ; línea punteada azul), y de la radiación solar ( $\text{W m}^{-2}$ ; línea continua roja) medida el 22 de octubre del 2020 (92 DDT) y el 02 de diciembre del 2020 (133 DDT) en un cultivo de pimiento en invernadero. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las horas del día según la prueba LSD. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos..... 200

**Figura 2.** Variación diurna de la (a, c)  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo y la (b, d) evolución de la temperatura del aire ( $^{\circ}\text{C}$ ; línea punteada azul), y de la radiación solar ( $\text{W m}^{-2}$ ; línea continua roja) medida el 09 de abril del 2021 (42 DDT) y el 19 de abril del 2021 (52 DDT) en un cultivo de melón en invernadero. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las horas del día según la prueba LSD. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos..... 202

**Figura 3.** Efecto del (a) tiempo de almacenamiento de los peciolo y los (b) cambios relativos en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en un cultivo de melón en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos..... 204

**Figura 4.** Efecto de (a) diferentes horas de almacenamiento de la savia y los (b) cambios relativos en la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia en un cultivo de melón en invernadero. Los valores son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos..... 206

**Figura 5.** Relación lineal entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia no refrigerada y refrigerada para (a) el conjunto de datos de las medidas de las muestras de peciolo y savia almacenada, (b) peciolo almacenados y (c) savia almacenada durante 2, 3, 6 y 24 horas en un cultivo de melón en invernadero. Los valores presentados son repeticiones individuales ( $n=32$  (a);  $n=16$  (b, c));  $n$  es el número de datos. La línea punteada representa la línea 1:1. La línea continua negra representa la línea de la regresión lineal..... 208

**Figura 6.** Relación lineal entre las medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia diluida almacenada y savia de peciolo almacenados para (a) el conjunto de datos de las medidas de las muestras refrigeradas y no refrigeradas, (b) muestras refrigeradas y (c) muestras no refrigeradas durante 2, 3, 6 y 24 horas en un cultivo de melón en invernadero. Los valores presentados son repeticiones individuales ( $n=32$  (a);  $n=16$  (b, c));  $n$  es el número de datos. La línea punteada representa la línea 1:1. La línea continua negra representa la línea de la regresión lineal..... 209

**Figura 7.** Medidas de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia de los peciolo de hojas ubicadas en tres diferentes posiciones en las plantas con tres tratamientos de N (N1, N2 y N3). Los valores

son medias ( $n=4$ )  $\pm$  el error estándar (SE);  $n$  es el número de datos. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre medias entre tratamientos de N según la prueba LSD. .... 210

**Figura 8.** Relación entre (i) la hoja ubicada en la posición alta y la posición media y entre (ii) la hoja ubicada en la posición alta y la posición baja. Los valores presentados son repeticiones individuales ( $n=16$ );  $n$  es el número de datos. La línea punteada de guiones cortos representa la línea 1:1. La regresión lineal para la posición media se presenta como una línea continua y para la posición baja se presenta como una línea puntuada de guiones largos..... 212

**Material suplementario**

**Chapter one: Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss**

**Figure S1.** Relationships between NNI values derived from (i) a double CNC that combined  $\%Nc = 4.82 \times DMP^{-0.24}$  for the vegetative growth period, and  $\%Nc = 4.13 \times DMP^{-0.16}$  for the harvest period, and (ii) the single CNC of  $\%Nc = 4.71 \times DMP^{-0.22}$  for the entire crop, for the 2014, 2016 and 2017 pepper crops. These relationships are presented for (a) the vegetative growth periods, (b) the harvest periods, and (c) the entire duration of the crops, i.e. the combined vegetative growth and harvest periods. The crops were subjected to five different increasing N treatments with four replications. The lines and equations represent the best-fit equation. The dashed line represents the 1:1 line..... 238

**Capítulo cinco: Evaluación del muestreo y almacenamiento de los peciolo y la savia sobre la medida de nitrato en savia de peciolo en cultivos hortícolas en suelo en invernadero**

**Figura S1.** Metodología realizada para el muestreo y almacenamiento de los peciolo y la savia en un cultivo de melón en invernadero. .... 241

**Anexo**

**Capítulo cuatro: Efecto del cultivar sobre las medidas de la concentración de nitrato en la savia del peciolo y del contenido de N en la hoja en el cultivo de pepino, melón y pimiento en suelo en invernadero**

**Figura 1.** Relación entre el índice de nutrición de N (NNI) y la  $[NO_3^- - N]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre'). Las ecuaciones de las regresiones de rectas segmentadas son descritas como  $NNI = a \times Sav + b$  (si  $Sav < Sav_0$ ) y con una línea horizontal descrita por  $NNI = c$  (si  $Sav \geq Sav_0$ ). Los valores son de tres

tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=84$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos..... 265

**Figura 2.** Relación entre el índice de nutrición de N (NNI) y la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo'). Las ecuaciones de las regresiones de rectas segmentadas son descritas como  $\text{NNI} = a \times \text{Sav} + b$  (si  $\text{Sav} < \text{Sav}_0$ ) y con una línea horizontal descrita por  $\text{NNI} = c$  (si  $\text{Sav} \geq \text{Sav}_0$ ). Los valores son de tres tratamientos de concentraciones crecientes de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=72$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos..... 268

**Figura 3.** Relación entre el índice de nutrición de N (NNI) y la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo). Las ecuaciones de las regresiones de rectas segmentadas son descritas como  $\text{NNI} = a \times \text{Sav} + b$  (si  $\text{Sav} < \text{Sav}_0$ ) y con una línea horizontal descrita por  $\text{NNI} = c$  (si  $\text{Sav} \geq \text{Sav}_0$ ). Los valores son de tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=120$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos..... 270

## **13. Anexo**

---





### 13.1. Relación entre la $[\text{NO}_3\text{--N}]$ en la savia del peciolo y el NNI en diferentes cultivares de pepino, melón y pimiento

#### 13.1.1. Introducción

El trabajo presentado en este anexo contiene información adicional del Capítulo 4. Se estudió la relación entre la  $[\text{NO}_3\text{--N}]$  en la savia del peciolo y el NNI en diferentes cultivares de pepino, melón y pimiento. Los valores de la  $[\text{NO}_3\text{--N}]$  en la savia del peciolo que se muestran son los valores presentados en el Capítulo 4. Los cultivos fueron descritos en la sección 7.2.2 y la metodología para la determinación de la  $[\text{NO}_3\text{--N}]$  en la savia del peciolo en la sección 7.2.3.1 de ese mismo capítulo. El procedimiento para determinar el contenido de N en la hoja, el cual fue usado para estimar los valores de NNI, fue descrito en la sección 7.2.3.2 del Capítulo 4 de esta tesis.

#### 13.1.2. Metodología

##### 13.1.2.1. Determinación del Índice de Nutrición de N (Nitrogen Nutrition Index; NNI)

Para determinar los valores de NNI para cada uno de los diferentes cultivos y para cada cultivar de este estudio, se determinó la relación entre el NNI y el contenido de N en la hoja basados en medidas realizadas en estudios previos (Padilla et al., 2016; Peña-Fleitas et al., 2015; Rodríguez et al., 2020). Las medidas de NNI establecidas en estos estudios se determinaron realizando muestreos periódicos de biomásas. Los muestreos periódicos de biomásas permitieron calcular el N crítico ( $N_c$ ) total usando la curva crítica de nitrógeno (Critical Nitrogen Curve; CNC;  $\%N_c = a \times \text{DMP}^{-b}$ ) específica para cada cultivo. De esta forma, el NNI fue calculado como:

$$\text{NNI} = \frac{N_{act}}{N_c}$$

Para cada ciclo de los cultivos usados previamente y para los cultivos de este estudio se calculó el tiempo térmico acumulativo ( $^{\circ}\text{D}$ ) para cada día del ciclo del cultivo. El tiempo térmico se calculó a partir del promedio de las temperaturas del aire máxima y mínimas diarias, usando una temperatura base de  $10^{\circ}\text{C}$  (Zalom et al., 1983).

Los ciclos de los cultivos previos se dividieron en rangos de tiempo térmico acumulado ( $150\text{--}250^{\circ}\text{D}$ ) y para cada rango de tiempo térmico se determinaron diferentes relaciones lineales entre el NNI (variable dependiente) y el contenido de N en la hoja (variable independiente) para los cultivos previos. Para obtener valores diarios, el contenido de N en la hoja y los valores de NNI fueron interpolados. Con las ecuaciones lineales calculadas previamente se determinaron los valores de NNI como  $\text{NNI} =$

$a$  (contenido de N en la hoja (%)) +  $b$ ; para cada cultivar en este estudio, según la ecuación correspondiente al rango de tiempo térmico definido.

#### 13.1.2.2. Análisis de datos de la relación de la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y NNI.

Se usó el análisis de la regresión lineal de rectas segmentadas. Este método ha sido descrito en detalle en la sección 6.3.6.1 del Capítulo 3 de esta tesis.

#### *13.1.3. Resultados*

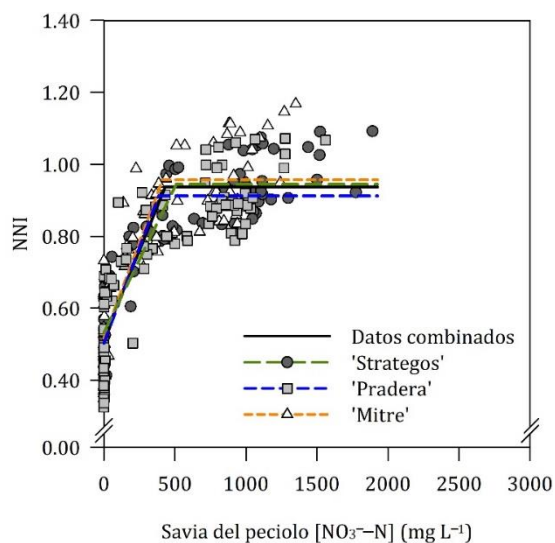
##### 13.1.3.1. Relación entre la $[\text{NO}_3^--\text{N}]$ en la savia del peciolo y el estado de N

###### 13.1.3.1.1. Cultivo de pepino

El índice de nutrición de N (NNI) presentó una fuerte relación en la regresión lineal de rectas segmentadas con la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo en cada uno de los tres cultivares de pepino, con valores de  $R^2$  de 0.83, 0.76 y 0.77 para 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre', respectivamente (Figura 1; Tabla 1).

Para una máxima DMP, las intersecciones de los segmentos inclinados y lineales ( $Sav_0$ ) determinados fueron diferentes para cada cultivar. Los valores calculados fueron 510, 387 y 414 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  para 'Strategos', 'Pradera' y 'Mitre', respectivamente (Tabla 1). El valor de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia determinado para 'Strategos' fue 190 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  más alto que 'Pradera' y 'Mitre', teniendo 'Pradera' y 'Mitre' una diferencia de 27 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ . Los valores correspondientes a la línea horizontal en la regresión lineal de rectas segmentadas como valores de NNI máximos alcanzados fueron muy similares para los tres cultivares (0.91–0.96), siendo valores muy cercanos a  $\text{NNI}=1.0$  (Figura 1).

Combinando los datos de los tres cultivares, con la ecuación de regresión lineal de rectas segmentadas se calculó un valor general para el cultivo de pepino de 431 mg  $\text{NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  como medida de la intersección de los segmentos inclinados y lineales ( $Sav_0$ ) alcanzando un valor máximo de  $\text{NNI}=0.94$  para un máximo crecimiento (Tabla 1).



**Figura 1.** Relación entre el índice de nutrición de N (NNI) y la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre'). Las ecuaciones de las regresiones de rectas segmentadas son descritas como  $\text{NNI} = a \times \text{Sav} + b$  (si  $\text{Sav} < \text{Sav}_0$ ) y con una línea horizontal descrita por  $\text{NNI} = c$  (si  $\text{Sav} \geq \text{Sav}_0$ ). Los valores son de tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=84$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos.

**Tabla 1.** Análisis de la regresión de rectas segmentadas relacionando el NNI con la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de pepino ('Strategos', 'Pradera' y 'Mitre') ( $n=84$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Se presenta la ecuación, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar (SE). Las líneas de la regresión de rectas segmentadas se presentan como la pendiente de la ecuación y la ecuación de la línea horizontal, indicando el valor máximo de NNI alcanzado. Se presenta el valor de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en la savia del peciolo indicado como  $Sav_0$ , siendo el valor de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  asociado con el valor máximo de NNI.

Cultivar	Ecuación de la línea inclinada de la regresión	Valor NNI máximo	Valor de $Sav_0$ ( $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ )	$R^2$	SE
'Strategos'	$\text{NNI} = 0.00081 \times Sav + 0.532$	0.94	510	0.83	0.02
'Pradera'	$\text{NNI} = 0.00106 \times Sav + 0.503$	0.91	387	0.76	0.02
'Mitre'	$\text{NNI} = 0.00106 \times Sav + 0.517$	0.96	414	0.77	0.02
Datos combinados	$\text{NNI} = 0.00097 \times Sav + 0.518$	0.94	431	0.78	0.01

---

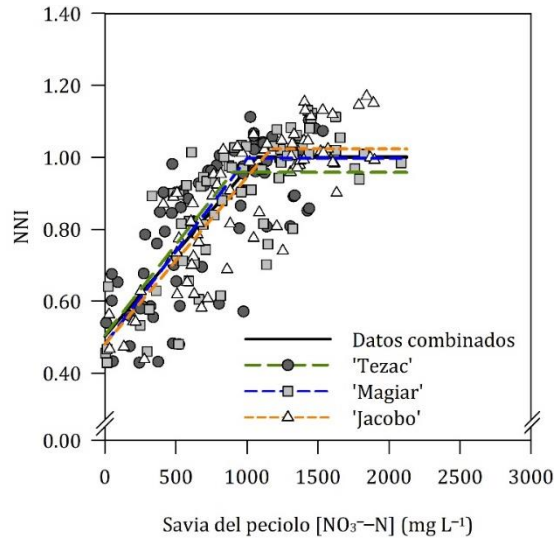
### 13.1.3.1.2. Cultivo de melón

El índice de nutrición de N (NNI) presentó una relación con la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo en cada uno de los tres cultivares de melón, con valores de  $R^2$  de 0.56, 0.64 y 0.70 para 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo', respectivamente (Figura 2; Tabla 2).

En la relación presentada en la Figura 8 se excluyen los datos de la última parte del ciclo del cultivo de melón, desde 62 hasta 76 DDT. Los datos del cultivo de melón previo para calcular los valores de NNI fueron muy altos para obtener alguna relación en esta última parte del ciclo, esto ha sido informado por Peña-Fleitas et al. (2015) en su investigación.

Para una máxima DMP, las intersecciones de los segmentos inclinados y lineales ( $S_{av_0}$ ) determinados fueron diferentes para cada cultivar. Los valores calculados fueron 899, 1003 y 1170  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  para 'Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo', respectivamente (Tabla 2). En promedio, 'Tezac' tuvo 104  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  menos que 'Magiar' y 'Jacobo', teniendo 'Magiar' y 'Jacobo' una diferencia de 167  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ . Los valores correspondientes a NNI máximos fueron muy similares para los tres cultivares (0.96–1.02), siendo valores muy cercanos a  $\text{NNI}=1.0$  (Figura 2; Tabla 2).

Combinando los datos de los tres cultivares, con la ecuación de regresión lineal de rectas segmentadas se calculó un valor general para el cultivo de melón de 1072  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  como medida de la intersección de los segmentos inclinados y lineales ( $S_{av_0}$ ) alcanzando un valor máximo de  $\text{NNI}=1.00$  para un máximo crecimiento (Tabla 2).



**Figura 2.** Relación entre el índice de nutrición de N (NNI) y la  $[\text{NO}_3\text{-N}]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo'). Las ecuaciones de las regresiones de rectas segmentadas son descritas como  $\text{NNI} = a \times \text{Sav} + b$  (si  $\text{Sav} < \text{Sav}_0$ ) y con una línea horizontal descrita por  $\text{NNI} = c$  (si  $\text{Sav} \geq \text{Sav}_0$ ). Los valores son de tres tratamientos de concentraciones crecientes de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=72$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos.

**Tabla 2.** Análisis de la regresión de rectas segmentadas relacionando el NNI con la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de melón ('Tezac', 'Magiar' y 'Jacobo') ( $n=72$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Se presenta la ecuación, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar (SE). Las líneas de la regresión de rectas segmentadas se presentan como la pendiente de la ecuación y la ecuación de la línea horizontal, indicando el valor máximo de NNI alcanzado. Se presenta el valor de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en la savia del peciolo indicado como  $Sav_0$ , siendo el valor de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  asociado con el valor máximo de NNI.

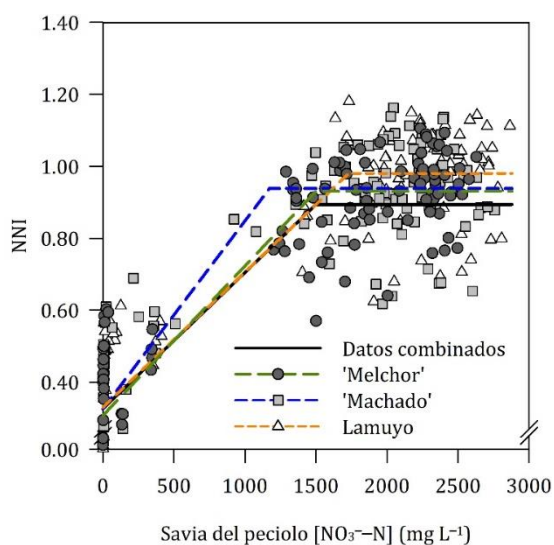
Cultivar	Ecuación de la línea inclinada de la regresión	Valor NNI máximo	Valor de $Sav_0$ ( $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ )	$R^2$	SE
'Tezac'	$\text{NNI} = 0.00050 \times Sav + 0.506$	0.96	899	0.56	0.05
'Magiar'	$\text{NNI} = 0.00052 \times Sav + 0.481$	1.00	1003	0.64	0.04
'Jacobo'	$\text{NNI} = 0.00046 \times Sav + 0.480$	1.02	1170	0.70	0.04
Datos combinados	$\text{NNI} = 0.00046 \times Sav + 0.502$	1.00	1072	0.63	0.02

### 13.1.3.1.3. Cultivo de pimiento

El índice de nutrición de N (NNI) presentó una fuerte relación con la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  de la savia del peciolo en cada uno de los tres cultivares de pimiento, con valores de  $R^2$  de 0.83, 0.79 y 0.81 para 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo, respectivamente (Figura 3; Tabla 3).

Para una máxima DMP, las intersecciones de los segmentos inclinados y lineales ( $Sav_0$ ) determinados fueron diferentes para cada cultivar. Los valores calculados fueron 1500, 1173 y 1731  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  para 'Melchor', 'Machado' y Lamuyo, respectivamente (Tabla 3). En general, 'Machado' presentó 327  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  menos que 'Melchor' y 558  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  menos que Lamuyo. Los valores correspondientes a NNI máximos fueron muy similares para los tres cultivares (0.93–0.98), siendo valores muy cercanos a  $\text{NNI}=1.0$  (Figura 3; Tabla 3).

Combinando los datos de los tres cultivares, con la ecuación de regresión lineal de rectas segmentadas se calculó un valor general para el cultivo de pimiento de 1661  $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$  como medida de la intersección de los segmentos inclinados y lineales ( $Sav_0$ ) alcanzando un valor máximo de  $\text{NNI}=0.89$  para un máximo crecimiento (Tabla 3).



**Figura 3.** Relación entre el índice de nutrición de N (NNI) y la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo). Las ecuaciones de las regresiones de rectas segmentadas son descritas como  $\text{NNI} = a \times \text{Sav} + b$  (si  $\text{Sav} < \text{Sav}_0$ ) y con una línea horizontal descrita por  $\text{NNI} = c$  (si  $\text{Sav} \geq \text{Sav}_0$ ). Los valores son de tres tratamientos de N (N1, N2 y N3) cultivados en invernadero ( $n=120$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos.



**Tabla 3.** Análisis de la regresión de rectas segmentadas relacionando el NNI con la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  en la savia del peciolo para tres cultivares de pimiento ('Melchor', 'Machado' y Lamuyo) ( $n=120$ );  $n$  es el número total del conjunto de datos. Se presenta la ecuación, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar (SE). Las líneas de la regresión de rectas segmentadas se presentan como la pendiente de la ecuación y la ecuación de la línea horizontal, indicando el valor máximo de NNI alcanzado. Se presenta el valor de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en la savia del peciolo indicado como  $Sav_0$ , siendo el valor de la  $[\text{NO}_3^--\text{N}]$  asociado con el valor máximo de NNI.

Cultivar	Ecuación de la línea inclinada de la regresión	Valor NNI máximo	Valor de $Sav_0$ ( $\text{mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$ )	$R^2$	SE
'Melchor'	$\text{NNI} = 0.00042 \times Sav + 0.307$	0.93	1500	0.83	0.02
'Machado'	$\text{NNI} = 0.00052 \times Sav + 0.325$	0.94	1173	0.79	0.02
Lamuyo	$\text{NNI} = 0.00038 \times Sav + 0.330$	0.98	1731	0.81	0.02
Datos combinados	$\text{NNI} = 0.00038 \times Sav + 0.326$	0.89	1661	0.81	0.01

*13.1.4. Referencias*

- Padilla, F.M., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., 2016. Proximal optical sensing of cucumber crop N status using chlorophyll fluorescence indices. *Eur. J. Agron.* 73, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.11.001>
- Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., Thompson, R.B., Farneselli, M., Padilla, F.M., 2015. Assessing crop N status of fertigated vegetable crops using plant and soil monitoring techniques. *Ann. Appl. Biol.* 167, 387–405. <https://doi.org/10.1111/aab.12235>
- Rodríguez, A., Peña-Fleitas, M.T., Gallardo, M., de Souza, R., Padilla, F.M., Thompson, R.B., 2020. Sweet pepper and nitrogen supply in greenhouse production: Critical nitrogen curve, agronomic responses and risk of nitrogen loss. *Eur. J. Agron.* 117, 126046. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126046>
- Zalom, F.G., Goodell, P.B., Wilson, L.T., Barnett, W.W., Bentley, W.J., 1983. Degree-days: The Calculation and Use of Heat Units in Pest Management. Cooperative Extension Publ. Univ, California (10 pp.)