

Relationship between chlorophyll and nitrogen concentration, and fresh matter production in basil 'Nufar' (*Ocimum basilicum*) with three handheld chlorophyll meter readings: SPAD, atLEAF and MC-100

Relación entre concentraciones de clorofila y nitrógeno, y producción de materia fresca en albahaca 'Nufar' (*Ocimum basilicum*), con lecturas de tres medidores manuales de clorofila: SPAD, atLEAF y MC-100

Ronald Ernesto Ontiveros-Capurata¹; Porfirio Juárez-López^{2*}; Rodrigo Omar Mendoza-Tafolla²; Irán Alia-Tejaca²; Oscar Gabriel Villegas-Torres²; Dagoberto Guillén-Sánchez²; Andrew D. Cartmill³

¹Cátedra CONACYT - Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Paseo Cuauhnáhuac, núm. 8532, Jiutepec, Morelos, C. P. 62550, MÉXICO.

²Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Av. Universidad, núm. 1001, Cuernavaca, Morelos, C. P. 62210, MÉXICO.

³University of Wisconsin-Platteville. University Plaza, Platteville, Wisconsin, 53818, UNITED STATES OF AMERICA.

*Corresponding author: porfirio.juarez@uaem.mx, tel. 777 103 3426.

Abstract

Determinations of nitrogen (N) and chlorophyll (Chl) by destructive methods are precise but time-consuming and frequently expensive. The objective of this study was to determine the relationship between SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with the concentrations of Chl, N, and fresh matter (FM) in basil 'Nufar'. In addition, we determined the relationship of the N concentration with fresh matter (FM). The plants were irrigated with five levels of N (0, 4, 8, 12, and 16 mEq·L⁻¹ of NO₃) based on a modified Steiner solution for 42 days after transplant. Plants were evaluated weekly with SPAD, atLEAF and MC-100 portable chlorophyll meters in the greenhouse, while FM and the concentration of Chl and N were determined in the laboratory using conventional techniques. The relationship between SPAD readings, Chl, N, and FM was strong, positive, linear, and significant, with correlation coefficients (R²) between 0.94 and 0.98. For atLEAF and MC-100 readings, R² values were 0.96 to 0.99 and 0.96 to 0.99, respectively. The relationships between SPAD, atLEAF and MC-100 readings were strong, positive, and significant, with R² values of 0.98. Similar behavior was shown by the relationship of N concentration and FM with R² of 0.88. With these results, we conclude that SPAD, atLEAF, and MC-100 can be used to estimate the nutrient status of N in a non-destructive, rapid and reliable manner during basil production.

Keywords: non-destructive analysis; aromatic plant, soilless culture.

Resumen

Las determinaciones de nitrógeno (N) y clorofila (Chl) por métodos destructivos son precisas, pero demandantes en tiempo y frecuentemente costosas. El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre las lecturas SPAD, atLEAF y MC-100, y las concentraciones de Chl, N y materia fresca (MF) en albahaca 'Nufar'. Las plantas se irrigaron con cinco niveles de N (0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ de NO₃), basados en una solución de Steiner modificada, durante 42 días después del trasplante. Las plantas se evaluaron semanalmente en el invernadero con los medidores portátiles de clorofila SPAD, atLEAF y MC-100. La MF, la Chl y el N se determinaron en laboratorio mediante técnicas convencionales. La relación entre las lecturas SPAD, la Chl, el N y la MF fue lineal, positiva y significativa, con coeficientes de determinación (R²) entre 0.94 y 0.98. Para las lecturas atLEAF y MC-100, los valores de R² fueron 0.96 a 0.99 y 0.96 a 0.99, respectivamente. Las relaciones entre las lecturas SPAD, atLEAF y MC-100 resultaron positivas y significativas, con valores de R² de 0.98. Un comportamiento similar se presentó en la relación de concentración de N y MF, con R² de 0.88. Con base en estos resultados, se concluye que los medidores SPAD, atLEAF y MC-100 se pueden utilizar para estimar los estatus de N de forma no destructiva, rápida y confiable durante la producción de albahaca.

Palabras clave: análisis no destructivo, plantas aromáticas, cultivo sin suelo.

Please cite this article as follows (APA 6): Ontiveros-Capurata, R. E., Juárez-López, P., Mendoza-Tafolla, R. O., Alia-Tejaca, I., Villegas-Torres, O. G., Guillén-Sánchez, D., & Cartmill, A. D. (2022). Relationship between chlorophyll and nitrogen concentration, and fresh matter production in basil 'Nufar' (*Ocimum basilicum*) with three handheld chlorophyll meter readings: SPAD, atLEAF and MC-100. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 28(3), 189-202. doi: 10.5154/r.rchsh.2021.09.018



Revista Chapingo
Serie Horticultura

Introduction

Nitrogen (N) is an essential and indispensable element for plant growth and development because it is an integral component of proteins, amino and nucleic acids, and chlorophyll (Chl). Chl generates the green color of plants and is an essential pigment for photosynthesis (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2014). The Chl concentration of the leaf is closely correlated with the concentration of N in the plant (Zebarth, Younie, Paul, & Bittman, 2002). Therefore, monitoring Chl and N concentrations may help maximize nutrient management for optimal plant growth and yield of agricultural and horticultural crops (Argenta et al., 2003; Cruz-Álvarez et al., 2020).

Determinations of N and Chl by destructive methods are precise but time-consuming and frequently expensive (Kalaji et al., 2017). In contrast, non-destructive portable meters have been successfully used for some plant species to estimate Chl and N (Cunha, Katz, Sousa, & Martinez-Urbe, 2015) and thereby allow for the monitoring of Chl and N in the same leaf, in different portions of the crop production cycle (Kalaji et al., 2017).

The SPAD 502 Plus chlorophyll meter (Konica Minolta®, Japan) may be used for the rapid and non-destructive determination of the relative concentration of Chl in the leaf (Ali, Al-Ani, Eamus, & Tan, 2007). The transmission of light through the leaf is measured at 650 and 940 nm, and the wavelength of 650 nm coincides with the spectral region of the maximum Chl activity. The transmittance at 940 nm is used to compensate for factors such as the moisture content of the leaf (Padilla, Gallardo, Peña-Fleitas, de Souza, & Thompson, 2018b). Therefore, the SPAD readings are related to the concentration of leaf Chl (Basyouni, Dunn, & Goad, 2015; Uddling, Gelang-Alfredsson, Piikki, & Pleijel, 2007).

The atLEAF Plus chlorophyll meter (FT Green LLC®, USA) works similarly to the SPAD meter. However, it uses a wavelength of 660 nm instead of 650 nm (Padilla et al., 2018b), and it is a cheaper alternative when compared to the SPAD meter (de Souza et al., 2019). The MC-100 chlorophyll meter (Apogee Instruments Inc. Logan, USA) records the relative concentration of Chl at the wavelengths of 653 and 931 nm in an area of approximately 64 mm² (de Souza et al., 2019). It has been used to determine Chl concentration in leaves and evaluate nutritional stress and crop optimization (Padilla et al., 2018a).

The concentration of Chl and N determined in the laboratory correlates with SPAD readings in crops. For

Introducción

El nitrógeno (N) es un elemento esencial e indispensable para el crecimiento y el desarrollo de las plantas, al ser un componente estructural de las proteínas, los aminoácidos, los ácidos nucleicos y la clorofila (Chl). La Chl confiere el color verde y es un pigmento esencial para la fotosíntesis en las plantas (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2014). La concentración de Chl en la hoja se correlaciona con la concentración de N en la planta (Zebarth, Younie, Paul, & Bittman, 2002). Por ello, el monitoreo de las concentraciones de Chl y N permite maximizar el manejo de nutrientes para un óptimo crecimiento de la planta, así como el rendimiento de los cultivos agrícolas y hortícolas (Argenta et al., 2003; Cruz-Álvarez et al., 2020).

Las determinaciones de N y Chl mediante métodos destructivos son precisas, pero demandantes en tiempo y, a menudo, costosas (Kalaji et al., 2017). En contraste, los medidores portátiles no destructivos se han empleado en algunas especies vegetales para estimar (Cunha, Katz, Sousa, & Martinez-Urbe, 2015) y monitorear la Chl y el N en la misma hoja durante el ciclo de producción del cultivo (Kalaji et al., 2017).

El medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Konica Minolta®, Japón) se ha utilizado para la determinación, rápida y no destructiva, de la concentración relativa de Chl en la hoja (Ali, Al-Ani, Eamus, & Tan, 2007). La transmisión de luz a través de la hoja se mide a 650 y 940 nm, y la longitud de onda de 650 nm coincide con la región espectral de la actividad máxima de la Chl, mientras que la transmitancia a 940 nm se usa para compensar los factores como el contenido de humedad de la hoja (Padilla, Gallardo, Peña-Fleitas, de Souza, & Thompson, 2018b). Las lecturas del SPAD están relacionadas con la concentración de Chl foliar (Basyouni, Dunn, & Goad, 2015; Uddling, Gelang-Alfredsson, Piikki, & Pleijel, 2007).

El medidor de clorofila atLEAF Plus (FT Green LLC®, EUA) trabaja de manera similar al medidor SPAD, pero usa una longitud de onda de 660 nm (Padilla et al., 2018b) y es una alternativa más costeable (de Souza et al., 2019). El medidor de clorofila MC-100 (Apogee Instruments Inc. Logan, EUA) registra la concentración relativa de Chl con las longitudes de onda de 653 y 931 nm en un área de aproximadamente 64 mm² (de Souza et al., 2019). Se ha empleado para determinar la concentración de Chl en hojas, y evaluar el estrés nutricional y la optimización de cultivos (Padilla et al., 2018a).

Las concentraciones de Chl y N determinadas en el laboratorio se correlacionan con las lecturas del SPAD en cultivos como el maíz (*Zea mays*), el trigo (*Triticum aestivum*) (Hurtado et al., 2010), el jitomate (*Solanum*

example, this technique has been used in corn (*Zea mays*), wheat (*Triticum aestivum*) (Hurtado et al., 2010), and vegetable crops, including tomatoes (*Solanum lycopersicum*) (Macedo-Ferreira, Barbosa-Ferreira, Rezende-Fontes, & Pires-Dantas, 2006) and cabbage (*Brassica oleracea*). In contrast, the atLEAF system has been reported to have high correlations for crops including corn and wheat (Zhu, Tremblay, & Liang, 2012) and ornamental horticultural crops, including poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) (Dunn, Singh, & Goad, 2018a) and aromatic herbs such as sage (*Salvia splendens*) (Dunn, Singh, Payton, & Kincheloe, 2018b). The MC-100 meter is relatively new, i.e., de Souza et al. (2019) have reported statistically significant correlations in sweet pepper (*Capsicum annuum*).

Basil (*Ocimum basilicum*) is a major global crop, accounting for approximately 14.9 million tons of production worldwide (Food and Agriculture Organization [FAO], 2019). In Mexico, basil is an important leafy vegetable crop, ranking third in production, with 352.78 tons produced (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2019).

In leafy vegetables and aromatic herbs, the green color of the leaves is essential as a quality indicator for fresh consumption and marketability. Therefore, determining N and Chl concentration in leaves *in situ* over time represents a valuable crop production tool to maximize quality and marketability. The objective of this study was to determine the relationship between SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with Chl, N, and fresh matter (FM) in basil 'Nufar'.

Material and methods

Site study and plant material

The experiment was carried out in a tunnel greenhouse at the Facultad de Ciencias Agropecuarias belonging to the Universidad Autónoma del Estado Morelos, located in Cuernavaca, Morelos, Mexico (18° 58' 51" N and 99° 13' 55" W, at 1,866 m a. s. l.) during May and June 2019.

The tunnel greenhouse was covered with white plastic and anti-aphids mesh on the side walls. The temperature, relative humidity, and solar radiation values were recorded every 5 min with a datalogger for the duration of the study (model U12-012, Hobo®, Onset®, USA). The maximum and minimum temperatures recorded were 42 and 14 °C, respectively, with an average of 26 °C. Relative humidity was 80, 20, and 49 %, corresponding to maximum, minimum, and average. The average solar radiation was 545 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

lycopersicum) y la col (*Brassica oleracea*) (Macedo-Ferreira, Barbosa-Ferreira, Rezende-Fontes, & Pires-Dantas, 2006). Por otro lado, el sistema atLEAF tiene correlaciones altas en cultivos como el maíz, el trigo (Zhu, Tremblay, & Liang, 2012), la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) (Dunn, Singh, & Goad, 2018a) y hierbas aromáticas como la salvia (*Salvia splendens*) (Dunn, Singh, Payton, & Kincheloe, 2018b). El medidor MC-100 es relativamente nuevo; Souza et al. (2019) reportan correlaciones estadísticamente significativas en pimiento dulce (*Capsicum annuum*).

La albahaca (*Ocimum basilicum*) es un cultivo con una producción de aproximadamente 14.9 millones de toneladas a nivel mundial (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2019). En México, se aprovecha la hoja, y ocupa el tercer lugar en producción con 352.78 t producidas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2019).

Para las hortalizas de hoja y las hierbas aromáticas, el color verde de las hojas es esencial como indicador de calidad para el consumo en fresco. Por lo tanto, determinar la concentración de N y Chl en las hojas *in situ* representa una herramienta valiosa de producción del cultivo para maximizar la calidad y la comerciabilidad. El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100, con los valores de Chl, N y materia fresca (MF) de albahaca 'Nufar'.

Materiales y métodos

Sitio experimental y material vegetal

El experimento se llevó a cabo de mayo a junio de 2019 en un invernadero tipo túnel en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado Morelos, localizado en Cuernavaca, Morelos, México (18° 58' 51" N y 99° 13' 55" O, a 1,866 m s. n. m.).

El invernadero se cubrió con plástico blanco y malla anti-áfidos en las paredes laterales. Los valores de temperatura, humedad relativa y radiación solar se registraron cada 5 min con un datalogger (modelo U12-012, Hobo®, Onset®, EUA) durante todo el estudio. Las temperaturas máxima y mínima registradas fueron 42 y 14 °C, respectivamente, con un valor promedio de 26 °C. La humedad relativa fue de 80, 20, y 49 %, como máxima, mínima y promedio, respectivamente. La radiación solar promedio fue 545 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Se sembraron semillas de albahaca 'Nufar' (Johnny's Selected Seeds, EUA) el primero de abril de 2019 en una

Basil 'Nufar' seeds (Johnny's Selected Seeds, USA) were sown on April 1, 2019, into a 200-cavity polystyrene tray filled with BM2 Berger® commercial seed germination substrate. Thirty days later, seedlings were transplanted into 8 L polyethylene bags, which contained volcanic rock (locally called tezontle) as a substrate with a granulometry of 1 to 10 mm (Cruz-Crespo, Sandoval-Villa, Volke-Haller, Can-Chulim, & Sánchez-Escudero, 2012).

Treatments and measurement of variables

The plants were irrigated daily for 21 days from transplanting with 0.5-1.0 L of Steiner (1984) nutrient solution, modified to apply five levels of nitrate (0, 4, 8, 12, and 16 mEq·L⁻¹) (Mercado-Luna et al., 2010). Plants were irrigated to achieve a 15 to 20 % leachate volume to avoid salt accumulation. Micronutrients were added to the nutrient solution as chelates at 80 g·m⁻³ of a commercial product (Ultrasol® micro Rexene SQM). The pH of the nutrient solutions was adjusted to 5.6 - 6.0 with sulfuric acid.

The portable equipment of Chl SPAD-502 Plus Minolta, atLEAF Chl Plus, and MC-100 Apogee Instruments Inc. (Figure 1) were used for on-site measurements, according to the methodology suggested by León, Viña, Frezza, Chaves, and Chiesa (2007) and de Souza et al. (2019). Readings were taken between 11:00 AM and 12:00 PM; the average of each reading was obtained from 10 records with six replications. The Chl concentration in the laboratory was determined on the same leaves sampled with the portable meters. Immediately after finishing the measurements *in situ*, fresh matter (FM) was harvested to assess their weight with an OHAUS scale. These samples were then dried in a forced-air oven (model F210 Felisa®, México) at 70 °C for 72 h, ground, and the total N was quantified by the micro Kjeldahl method (Kalra, 1998). Finally, the concentration of Chl (mg·g⁻¹) was determined with the spectrophotometric method described by Mackinney (1941) and Wettstein (1957). All determinations were performed weekly from 7 to 42 days after transplantation *in situ* and laboratory.

Design and statistical analysis

A completely randomized experimental design was used with five treatments (0, 4, 8, 12, and 16 mEq·L⁻¹ of NO₃) and six replications (30 pots per 7 weeks = 210 pots in total). The experimental unit was a pot containing one plant (Figure 2). With the values obtained *in situ* and in the laboratory, correlations and linear regressions were made of the SPAD, atLEAF, and MC-100 readings *versus* Chl, N, and FM with the software SigmaPlot graphs v12.5. The data obtained 42 days after transplanting were subjected to an

charola de poliestireno de 200 cavidades con sustrato comercial para la germinación de semillas BM2 Berger®. Treinta días después de la siembra, las plántulas se trasplantaron en bolsas de polietileno de 8 L que contenían como sustrato piedra volcánica (tezontle), con una granulometría de 1 a 10 mm (Cruz-Crespo, Sandoval-Villa, Volke-Haller, Can-Chulim, & Sánchez-Escudero, 2012).

Tratamientos y medición de variables

A partir del trasplante, las plantas se irrigaron diariamente durante 21 días con 0.5 a 1.0 L de solución nutritiva de Steiner (1984), modificada con el fin de aplicar cinco niveles de nitrato (0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹) (Mercado-Luna et al., 2010). Las plantas se regaron hasta obtener un volumen de lixiviado de entre 15 y 20 % para evitar la acumulación de sales. Se agregaron micronutrientes a la solución como agentes quelantes a razón de 80 g·m⁻³ de un producto comercial (Ultrasol® micro Rexene SQM). El pH de las soluciones nutritivas se ajustó a 5.6 - 6.0 con ácido sulfúrico.

Los equipos portátiles Chl SPAD-502 Plus Minolta, atLEAF Chl Plus y MC-100 Apogee Instruments Inc. (Figura 1) se usaron para medir *in situ*, de acuerdo con la metodología sugerida por León, Viña, Frezza, Chaves, y Chiesa (2007), y de Souza et al. (2019). Las lecturas se tomaron entre las 11:00 am y las 12:00 pm, y el promedio de cada lectura se obtuvo a partir de 10 registros con seis réplicas. La concentración de Chl en el laboratorio se determinó en las mismas hojas muestreadas con los medidores portátiles. Inmediatamente después de terminar las mediciones *in situ*, se cortaron las hojas para obtener su peso con una báscula (Ohaus®). Posteriormente, estas muestras se secaron en un horno de aire forzado (modelo F210 Felisa®, México) a 70 °C durante 72 h y se molieron. El N total se cuantificó por el método micro Kjendahl (Kalra, 1998). Todas las determinaciones, *in situ* y en laboratorio, se condujeron semanalmente entre los 7 y los 42 días después del trasplante.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente aleatorizado con cinco tratamientos (0, 4, 8, 12 y 16 mEq·L⁻¹ de NO₃) y seis repeticiones (30 macetas por 7 semanas = 210 macetas en total). La unidad experimental fue una maceta con una planta (Figura 2). Con los valores obtenidos *in situ* y en el laboratorio, se realizaron las correlaciones y las regresiones lineales a partir de las lecturas del SPAD, atLEAF y MC-100 contra Chl, N y MF con el programa SigmaPlot ver. 12.5. Los datos obtenidos 42 días después del trasplante se sometieron a un análisis de varianza y una comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.01$) con el programa SAS (SAS, 2004).



Figure 1. Use of SPAD 502 Plus (a), atLEAF (b) and MC-100 (c) to measure relative chlorophyll concentration in basil 'Nufar'.

Figura 1. Uso del SPAD 502 Plus (a), atLEAF (b) y MC-100 (c) para medir la concentración relativa de clorofila en albahaca 'Nufar'.



Figure 2. Basil 'Nufar' growth as a function of $\text{NO}_3\text{-N}$ level at 42 days after transplanting.

Figura 2. Crecimiento de albahaca 'Nufar' en cada tratamiento con $\text{NO}_3\text{-N}$ 42 días después del trasplante.

analysis of variance and Tukey's mean comparison test ($P \leq 0.01$) using the SAS program (SAS, 2004).

Results and discussion

Response to N levels

Differences ($P \leq 0.01$) were observed for SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with the concentrations of N and chlorophyll, and fresh matter as a function of N applied to basil 'Nufar' (Table 1).

For the variables, an increase was observed when increasing the nitrogen level in the nutrient solution. Basyouni et al. (2015) reported a similar trend for nitrogen and SPAD readings in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) leaves. Padilla et al. (2018a) reported a statistical difference in nitrogen nutrition levels in

Resultados y discusión

Respuesta a los niveles de N

El análisis de varianza mostró diferencias ($P \leq 0.01$) entre los tratamientos aplicados a la albahaca 'Nufar' con las lecturas de SPAD, atLEAF, MC-100, N, Chl y MF (Cuadro 1).

Los valores de cada variable incrementaron con respecto a la cantidad nitrógeno en la solución nutritiva. Basyouni et al. (2015) reportan una tendencia similar en cuanto al nitrógeno y las lecturas de SPAD en hojas de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*). Padilla et al. (2018a) obtuvieron una diferencia estadística entre los niveles de nutrición de nitrógeno en pimiento dulce; cuanto mayor es la cantidad de N aplicada, mayores son los rendimientos.

Table 1. SPAD, atLEAF, MC-100 readings, fresh matter (FM), concentrations of nitrogen (NO₃-N) and chlorophyll in basil 'Nufar' at 42 days after transplanting.**Cuadro 1. Comparación de medias de SPAD, atLEAF, MC-100, materia fresca (MF), concentraciones de nitrógeno (NO₃-N) y clorofila en albahaca 'Nufar' a los 42 días después del trasplante.**

N Level (mEq·L ⁻¹) / Nivel de N (mEq·L ⁻¹)	SPAD	atLEAF	MC-100	Nitrogen (%) / Nitrógeno (%)	Chlorophyll (mg·g ⁻¹) / Clorofila (mg·g ⁻¹)	FM (g·plant ⁻¹) / MF (g·planta ⁻¹)
0	42.4 d ^z	44.3 d	44.2 c	1.34 d	2.85 c	111.1 d
4	43.6 d	45.3 d	46.1 c	1.41 d	3.01 c	121.6 d
8	47.9 c	50.5 c	48.9 bc	1.85 c	3.21 b	145.3 c
12	52.7 b	55.7 b	52.1 b	2.11 b	3.56 b	185.4 b
16	56.8 a	59.1 a	58.3 a	2.63 a	3.98 a	217.3 a
CV (%)	9.3	11.4	10.3	7.1	6.9	12.2

^zMeans with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.01$). CV = coefficient of variation.

^zMedias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.01$). CV = coeficiente de variación.

sweet pepper; the higher the amount of N applied, the higher the yields.

Correlation between SPAD, atLEAF, and MC-100 readings versus Chl, N, and FM

SPAD, atLEAF, and MC-100 versus Chl

The correlation to the linear regression model between SPAD readings and the concentration of Chl (Table 2) was highly significant and positive ($P = 0.01$, $R^2 = 0.96$). These results are similar to those reported by Fenech-Larios et al. (2009), who found a high correlation between SPAD readings and Chl concentration ($R^2 = 0.98$) in basil seedlings. Similar values ($R^2 = 0.99$) have been reported by Mendoza-Tafolla et al. (2019) in romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). However, the correlations of the present study are superior to those reported by Martín et al., (2007). They, in laurustine (*Viburnum tinus*), tobira (*Pittosporum tobira*) and arbutus (*Arbutus unedo*), found coefficients of determination between 0.13 and 0.27. We suggest that the lower correlation coefficients reported by Martín et al. (2007) reflect the physiological difference between woody and herbaceous species.

The R^2 value for the atLEAF readings with Chl was 0.93. These results indicate a more significant adjustment to the linear regression model when compared to those reported by Zhu, Tremblay, and Liang (2011). They obtained coefficients of determination ranging from 0.72 to 0.88 in corn, wheat, barley (*Hordeum vulgare*), potato (*Solanum tuberosum*), and canola (*Brassica napus*). Hebbbar et al. (2016) reported R^2 between 0.68 to 0.95 in coconut palm leaves (*Cocos nucifera*). For the MC-100 meter, the coefficient of determination was 0.96 for a linear regression model. Padilla et al. (2018a) reported R^2 ranging from 0.76 to 0.94 in sweet pepper. The

Correlación entre las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100 versus Chl, N y MF

SPAD, atLEAF y MC-100 versus Chl

La correlación con el modelo de regresión lineal entre las lecturas de SPAD y la concentración de Chl (Cuadro 2) resultó altamente significativa y positiva ($P = 0.01$, $R^2 = 0.97$). Este resultado es similar al reportado por Fenech-Larios et al. (2009), quienes encontraron una relación alta entre las lecturas de SPAD y la concentración de Chl ($R^2 = 0.98$) en plántulas de albahaca. Mendoza-Tafolla et al. (2019) obtuvieron un valor similar ($R^2 = 0.99$) en lechuga romana (*Lactuca sativa* L.). No obstante, las correlaciones del presente estudio son superiores a las reportadas por Martín et al., (2007), quienes obtuvieron coeficientes de determinación entre 0.13 y 0.27 en laurentino (*Viburnum tinus*), azahar (*Pittosporum tobira*) y madroño (*Arbutus unedo*). Lo anterior pudo deberse a la diferencia fisiológica entre especies leñosas y herbáceas.

El valor de R^2 para las lecturas de atLEAF con Chl fue de 0.93, que es un ajuste mayor a los reportados por Zhu, Tremblay, y Liang (2011), quienes obtuvieron coeficientes de determinación entre 0.72 a 0.88 en maíz, trigo, cebada, papa y canola. Hebbbar et al. (2016) reportaron una R^2 entre 0.68 y 0.95 en hojas de palma cocotera (*Cocos nucifera*). El coeficiente de determinación con MC-100 y Chl fue de 0.96, el cual es mayor al reportado por Padilla et al. (2018a) en pimiento dulce (R^2 de entre 0.76 y 0.94). De acuerdo con los resultados obtenidos con los tres medidores, la concentración de Chl en hojas de albahaca se puede estimar con precisión mediante la ecuación de regresión lineal (Figura 3).

SPAD, atLEAF y MC-100 versus N

Las relaciones entre SPAD, atLEAF y MC-100 resultaron altamente significativas con la concentración de N en las

Table 2. Linear regression equations, coefficients of determination, and mean square error (MSE) values for SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with the chlorophyll (Chl) concentration in basil 'Nufar'.

Cuadro 2. Ecuaciones de regresión lineal, coeficientes de determinación y valores del error cuadrado medio (ECM) de las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100 contra la concentración de clorofila (Chl) en albahaca 'Nufar'.

Correlation/ Correlación	Regression equation/ Ecuación de regresión	R ²	MSE/ECM
SPAD and Chl/ SPAD y Chl	Chl = 0.0079 SPAD + 0.0650	0.97**	0.06
atLEAF and Chl/ atLEAF y Chl	Chl = 0.0086 atLEAF + 0.0036	0.93**	0.03
MC-100 and Chl/ MC-100 y Chl	Chl = 0.0121 MC-100 - 0.0922	0.96**	0.04

** = coefficient of determination (R²) significant $P \leq 0.01$.

** = coeficiente de determinación (R²) significativo $P \leq 0.01$.

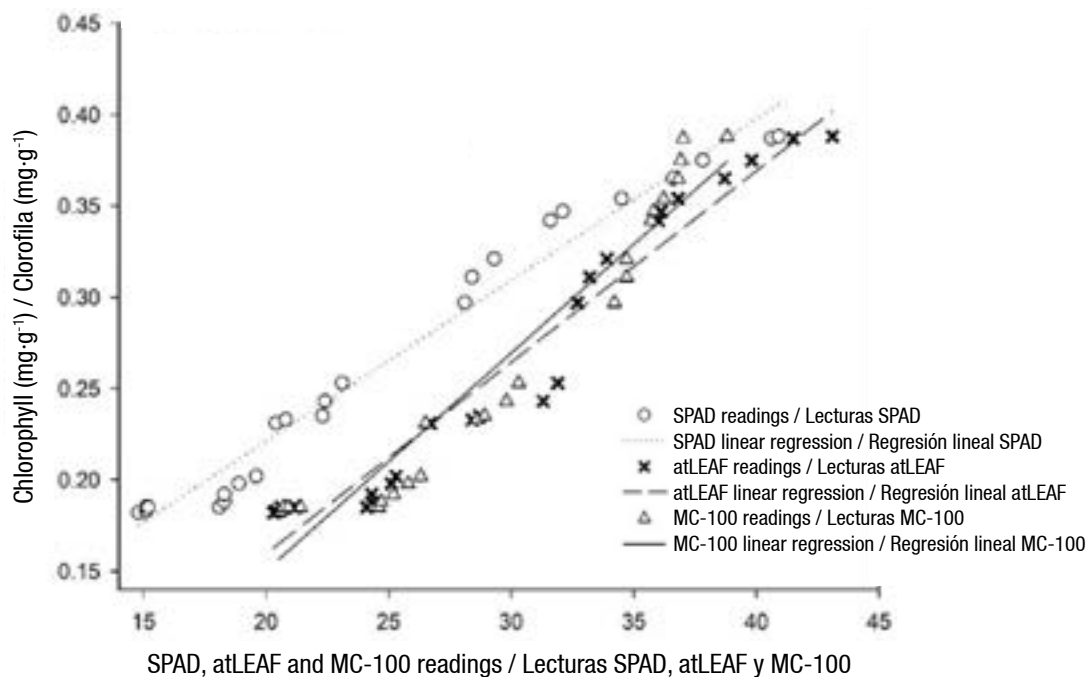


Figure 3. Linear regression between the SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with the concentration of chlorophyll in leaves of basil 'Nufar'.

Figura 3. Regresión lineal entre las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100 con la concentración de clorofila en hojas de albahaca 'Nufar'.

concentration of Chl in basil leaves can be estimated with sufficient accuracy from the SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with the linear regression equation (Figure 3).

SPAD, atLEAF, and MC-100 versus N

The relationship between SPAD, atLEAF, and MC-100 was highly significant with the N concentration in basil 'Nufar' plants (Figure 4). They had an adjustment to the linear regression model with R² values of 0.95, 0.97, and 0.89, respectively (Table 3).

plantas de albahaca 'Nufar' (Figura 4). Los valores de R² fueron de 0.95, 0.97 y 0.89, respectivamente (Cuadro 3).

Ali et al. (2007) obtuvieron valores de R² entre 0.86 y 0.94 para la relación entre el medidor SPAD y la concentración de N en el cultivo de tomate en invernadero. Dunn et al. (2018b) reportan valores de R² de 0.92 para la relación entre atLEAF y N en plántulas de salvia (*Salvia officinalis*), y de Souza et al. (2019) compararon los medidores atLEAF y Mc-100 para determinar la concentración de N en pimiento dulce, y obtuvieron valores de R² entre 0.81 y 0.94 con ambos medidores.

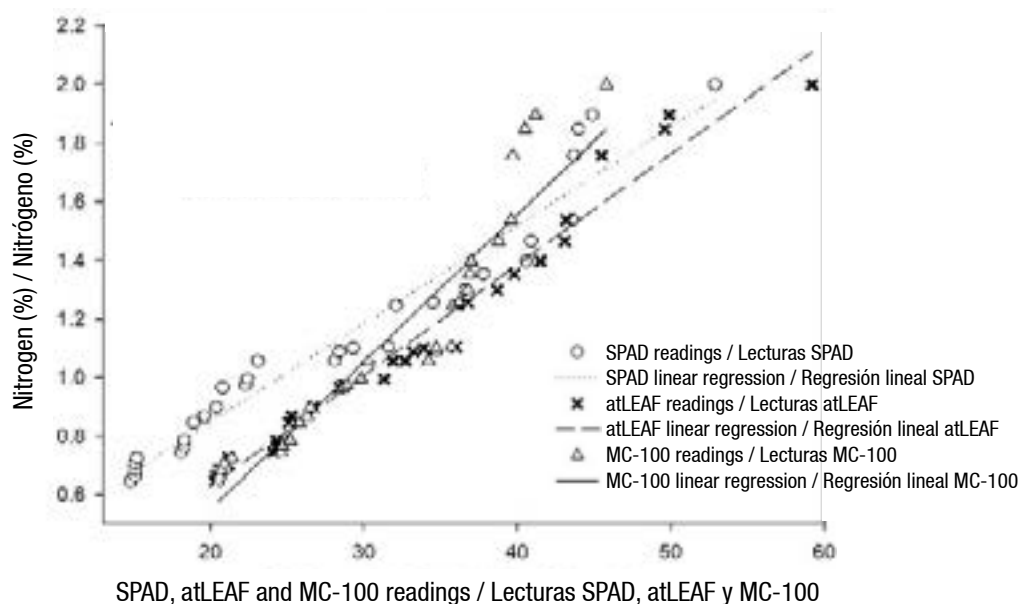


Figure 4. Linear regression between the SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with the nitrogen concentration in basil 'Nufar'.

Figura 4. Regresión lineal entre las lecturas de SPAD, atLEAF, y MC-100 y la concentración de nitrógeno en albahaca 'Nufar'.

Table 3. Linear regression equations, coefficients of determinations, and mean square error (MSE) values for SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with the nitrogen (N) concentration in basil 'Nufar'.

Cuadro 3. Ecuaciones de regresión lineal, coeficientes de determinación y valores del error cuadrado medio (ECM) de las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100 contra la concentración de nitrógeno (N) en albahaca 'Nufar'.

Correlation / Correlación	Regression equation / Ecuación de regresión	R ²	MSE / ECM
SPAD and N / SPAD y N	$N = 0.0336 \text{ SPAD} + 0.1751$	0.95**	0.03
atLEAF and N / atLEAF y N	$N = 0.0378 \text{ atLEAF} - 0.1298$	0.97**	0.03
MC-100 and N / MC-100 y N	$N = 0.0502 \text{ MC-100} - 0.4549$	0.89**	0.05

** = coefficient of determination (R²) significant $P \leq 0.01$.

** = coeficiente de determinación (R²) significativo $P \leq 0.01$.

Ali et al. (2007) found R² values ranging from 0.86 to 0.94 for the relationship between the SPAD meter and nitrogen concentration in the greenhouse tomato crop. Dunn et al. (2018b) reported R² values of 0.92 for the relationship between atLEAF and N in sage (*Salvia officinalis*) seedlings, and de Souza et al. (2019) compared the atLEAF and MC-100 meters to determine the concentration of N in sweet pepper obtaining R² ranging from 0.81 and 0.94 for both meters.

It is important to mention that most of the studies where chlorophyll meter values are reported do not include correlation analysis with chlorophyll

La mayoría de los estudios relacionados con medidores de clorofila no reportan el análisis de correlación con los valores de clorofila y nitrógeno obtenidos en el laboratorio, lo cual limita determinar con precisión la concentración de estas dos variables, ya que las lecturas de los medidores de clorofila son adimensionales. Por lo tanto, las regresiones lineales reportadas en este estudio permiten estimar adecuadamente la concentración de estos parámetros en albahaca. Una vez realizada la calibración con el análisis de correlación en la especie de interés, es posible realizar predicciones del contenido de clorofila y nitrógeno durante el ciclo de crecimiento (Ruiz-Espinoza et al., 2010).

and nitrogen values obtained from the laboratory, which causes limitations to accurately determine the concentration of these two variables, since the readings of the chlorophyll meters are dimensionless. Therefore, the correlations reported in the present study represent the correct procedure for estimating chlorophyll and nitrogen concentration in basil. Once calibration with correlation analysis has been performed on the species of interest, it is possible to make predictions of chlorophyll and nitrogen content during the growing cycle (Ruiz-Espinoza et al., 2010).

SPAD, atLEAF, and MC-100 versus FM

The correlation between the SPAD readings and FM (Figure 5) was significant and positive with a determination coefficient of 0.88 (Table 4). These results

SPAD, atLEAF y MC-100 versus MF

La regresión lineal entre las lecturas de SPAD y MF (Figura 5) fue significativa y positiva, con un coeficiente de determinación de 0.88 (Cuadro 4). Este resultado es similar a los reportados por Cunha et al. (2015), quienes obtuvieron valores de R^2 entre 0.85 y 0.96 en la relación entre SPAD y la MF de arúgula fresca (*Eruca vesicaria*). Cho, Oh, Oh, y Son (2007) sugieren que las lecturas de SPAD se pueden utilizar para estimar el rendimiento de MF y pronosticar el rendimiento del cultivo de pepino (*Cucumis sativus*).

La regresión lineal entre las lecturas de atLEAF y MF (Figura 5) fue significativa y presentó un buen ajuste, con un R^2 de 0.87 (Cuadro 4). Los resultados fueron similares a los reportados por Dey, Sharma, y Meshram

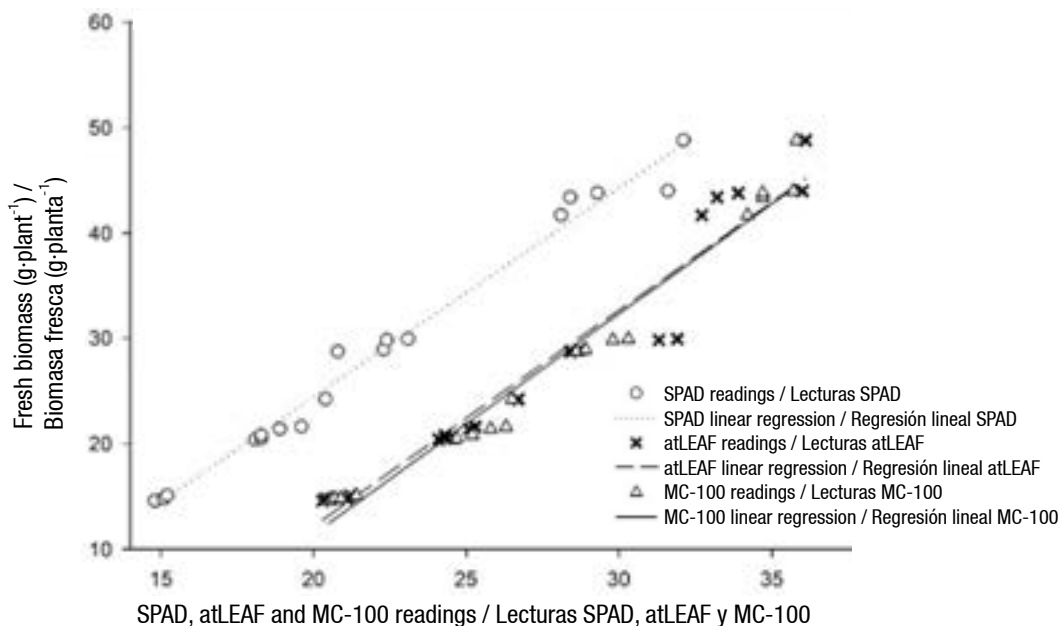


Figure 5. Linear regression between the SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with fresh matter in basil 'Nufar'.

Figura 5. Regresión lineal entre las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100 contra la materia fresca en albahaca 'Nufar'.

Table 4. Linear regression equations, correlation coefficients of determination, and mean square error (MSE) values for SPAD, atLEAF, and MC-100 readings with fresh matter (FM) in basil 'Nufar'.

Cuadro 4. Ecuaciones de regresión lineal, coeficientes de determinación y valores del error cuadrado medio (ECM) para lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100 contra la materia fresca (MF) en albahaca 'Nufar'.

Correlation / Correlación	Regression equation / Ecuación de regresión	R^2	MSE / ECM
SPAD and FM / SPAD y MF	$FM = 4.3016 \text{ SPAD} - 64.9720$	0.88**	0.06
atLEAF and FM / atLEAF y MF	$FM = 6.1576 \text{ atLEAF} - 13.7030$	0.87**	0.02
MC-100 and FM / MC-100 y MF	$FM = 4.9606 \text{ MC-100} - 10.777$	0.94**	0.05

** = Coefficient of determination (R^2) significant $P \leq 0.01$.

** = coeficiente de determinación (R^2) significativo $P \leq 0.01$.

are similar to those of Cunha et al. (2015), who obtained R^2 between 0.85 and 0.96 in the relationship between SPAD and fresh arugula (*Eruca vesicaria*). Cho, Oh, Oh, and Son (2007) suggested that SPAD readings can be used to estimate the performance of FM and predict the yield of cucumber cultivation (*Cucumis sativus*).

The correlation between atLEAF readings and FM (Figure 5) was significant and presented an excellent adjustment to the linear regression, with an R^2 of 0.87 (Table 4). The results were similar to those reported by Dey, Sharma, and Meshram (2016), who obtained R^2 values of 0.95 in betel (*Piper betel*). The values obtained with the MC-100 were highly significant, with R^2 of 0.94 for a linear regression model.

(2016), quienes obtuvieron valores de R^2 de 0.95 en betel (*Piper betel*). Po su parte, los valores obtenidos con MC-100 tuvieron el mayor ajuste, con un R^2 de 0.94 en el modelo de regresión lineal.

Regresión lineal de las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100

La correlación entre las lecturas de SPAD y atLEAF resultó altamente significativa, con un R^2 de 0.94 (Cuadro 5; Figura 6a). Estos resultados son similares a los reportados por Dunn et al. (2018a), quienes obtuvieron valores de R^2 entre 0.64 y 0.90 para las lecturas de SPAD y atLEAF en hojas de nochebuena. Además, Zhu et al. (2011) obtuvieron coeficiente de determinación entre 0.90 y 0.92, en las lecturas de SPAD y atLEAF para maíz, cebada y papa.

Table 5. Linear regression equations, coefficients of determination, and mean square error (MSE) values for the relationship between the SPAD, atLEAF, and MC-100 readings in basil ‘Nufar’.

Cuadro 5. Ecuaciones de regresión lineal, coeficientes de determinación y valores del error cuadrado medio (ECM) para la relación entre las lecturas de SPAD, atLEAF y MC-100 en albahaca ‘Nufar’.

Correlation / Correlación	Regression equation / Ecuación de regresión	R^2	MSE / ECM
SPAD and atLEAF / SPAD y atLEAF	SPAD = 0.8852 atLEAF + 8.1197	0.97**	0.06
SPAD and MC-100 / SPAD y MC-100	SPAD = 0.6286 MC-100 +13.675	0.94**	0.03
atLEAF and MC-100 / atLEAF y MC-100	atLEAF = 0.6982 MC-100 + 8.3040	0.94**	0.04

** = coefficient of determination (R^2) significant $P \leq 0.01$.
** = coeficiente de determinación (R^2) significativo $P \leq 0.01$.

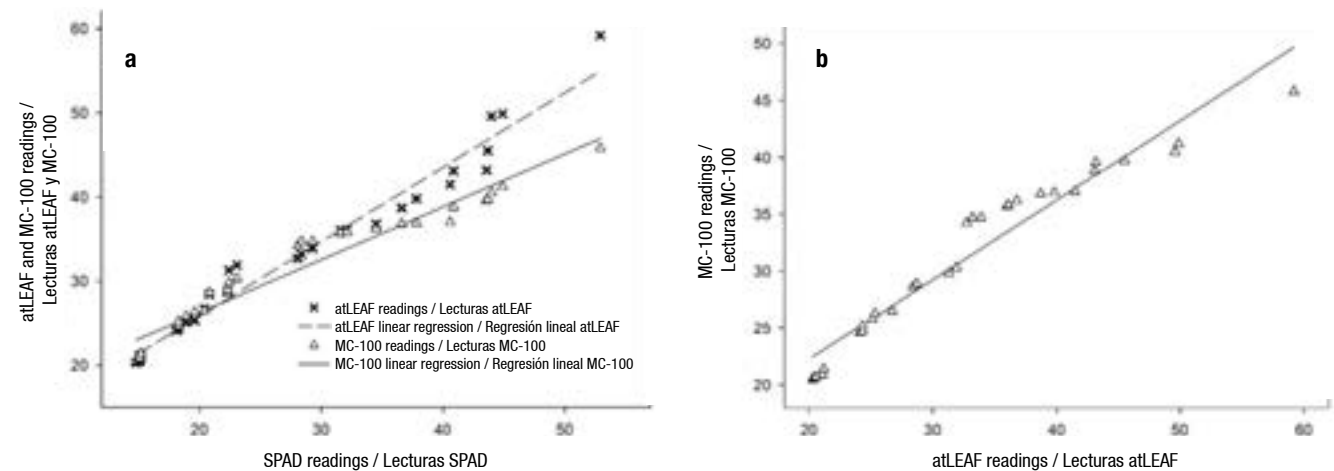


Figure 6. Linear regression between portable meter readings in leaves of basil ‘Nufar’: a) relationship between SPAD readings with atLEAF and MC-100, and b) the relationship between atLEAF and MC-100 readings.

Figura 6. Regresión lineal entre las lecturas de diferentes medidores portátiles en hojas de albahaca ‘Nufar’: a) relación entre las lecturas SPAD contra atLEAF y MC-100, y b) relación de las lecturas atLEAF y MC-100.

Linear regression between SPAD, atLEAF, and MC-100 readings

The correlation between the SPAD and atLEAF readings was highly significant, with an R^2 of 0.94 (Table 5; Figure 6a). These results are similar to those reported by Dunn et al. (2018a), who obtained R^2 ranging from 0.64 to 0.90 between SPAD and atLEAF readings on poinsettia leaves. In addition, Zhu et al. (2011) found significant correlations between the SPAD and atLEAF readings for corn, barley, and potatoes, with intervals for the determination coefficient ranging from 0.90 and 0.92.

In a linear regression model, the R^2 value between the SPAD and MC-100 was 0.94 (Figure 6b). Results were similar to those obtained by Padilla et al. (2018a), who reported R^2 ranging from 0.90 to 0.95 in sweet pepper. The relationship between atLEAF and MC-100 presented values of R^2 equal to 0.94.

The present study demonstrates that handheld portable chlorophyll meters such as SPAD, atLEAF, and MC-100 can estimate N, Chl, and FM accurately and quickly. However, the three meters tested show similar results, so when deciding to use one or the other, it will be essential to consider different parameters such as price since the difference is considerable. In addition, to the best of our knowledge, this is the first report to date using the AtLEAF and MC-100 meters to determine Chl content, N status, and FM production of basil.

Relationship between nitrogen concentration and fresh matter

The relationship between N concentration and FM (Figure 7) was significant ($P < 0.01$) and resembles a linear regression with a slope of 132.78 and intercept of -92.65, where FM is the dependent variable and N the independent variable; the R^2 value was 0.88, and the mean square error (MSE) was 0.03. These results are similar to those obtained by Arabaci and Bayram (2004), and Hordofa et al., (2021), who reported an increase in the amount of leaf production in basil concerning N fertilization since it is an essential primary nutrient that improves yield and is necessary for the construction of amino acids, nucleotides and nucleic acids.

These results confirm that the ratio of fresh biomass versus nitrogen content is of utmost importance in the case of leafy crops such as basil. Both can be estimated quickly and accurately from leaf reflectance characteristics (Ruiz-Espinoza et al., 2010). Furthermore, it reinforces the claim that chlorophyll meters are an effective tool for rapid and non-destructive estimation of FM weight in leafy crops.

El valor de R^2 de la regresión lineal entre SPAD y MC-100, así como entre atLEAF y MC-100, fue de 0.94 (Figura 6b). Estos resultados son similares a los obtenidos por Padilla et al. (2018a), quienes reportan valores de R^2 entre 0.90 y 0.95 en pimiento dulce.

Con base en estos resultados, se puede señalar que los medidores manuales portátiles de clorofila, como el SPAD, atLEAF y MC-100, permiten estimar la concentración de N, Chl y MF con precisión y rapidez. Los tres medidores probados muestran resultados similares; por ello, decidir cuál utilizar dependerá de diferentes parámetros, como el precio, ya que las diferencias son considerables. Además, hasta donde sabemos, este es el primer reporte que emplea los medidores atLEAF y MC-100 para determinar el contenido de Chl, el estatus de N y la producción de MF de albahaca.

Relación entre concentración de nitrógeno y materia fresca

La relación entre la concentración de N y MF (Figura 7) resultó significativa ($P < 0.01$), y corresponde a una regresión lineal con pendiente de 132.78 e intercepto de -92.65, donde la MF es la variable dependiente y el N la independiente. El valor de R^2 en esta relación fue de 0.88, y el error cuadrado medio (ECM) fue de 0.03. Estos resultados son similares a los obtenidos por Arabaci y Bayram (2004), y Hordofa et al., (2021) quienes reportan un incremento en la producción foliar en albahaca con respecto a la cantidad de N añadido, ya que es un nutriente esencial que mejora el rendimiento y es necesario para la construcción de aminoácidos, nucleótidos y ácidos nucleicos.

Los resultados obtenidos confirman que la relación entre biomasa fresca y contenido de N es de suma importancia en el caso de cultivos de hoja como la albahaca. Ambos parámetros pueden ser estimados rápido y con precisión a partir de las características de reflectancia de las hojas (Ruiz-Espinoza et al., 2010). Finalmente, los resultados confirman que los medidores de clorofila son una herramienta eficaz para la estimación rápida y no destructiva de la MF en cultivos de hoja.

Conclusiones

Los medidores SPAD, atLEAF y MC-100 estiman, de manera no destructiva, rápida y acertada, las concentraciones de Chl, N y la producción de MF en albahaca 'Nufar' a partir de ecuaciones de regresión lineal. Las lecturas de SPAD tuvieron correlaciones positivas y significativas con la concentración de Chl ($R^2 = 0.97$), N ($R^2 = 0.95$) y MF ($R^2 = 0.88$). Asimismo, las lecturas de atLEAF tuvieron una correlación lineal

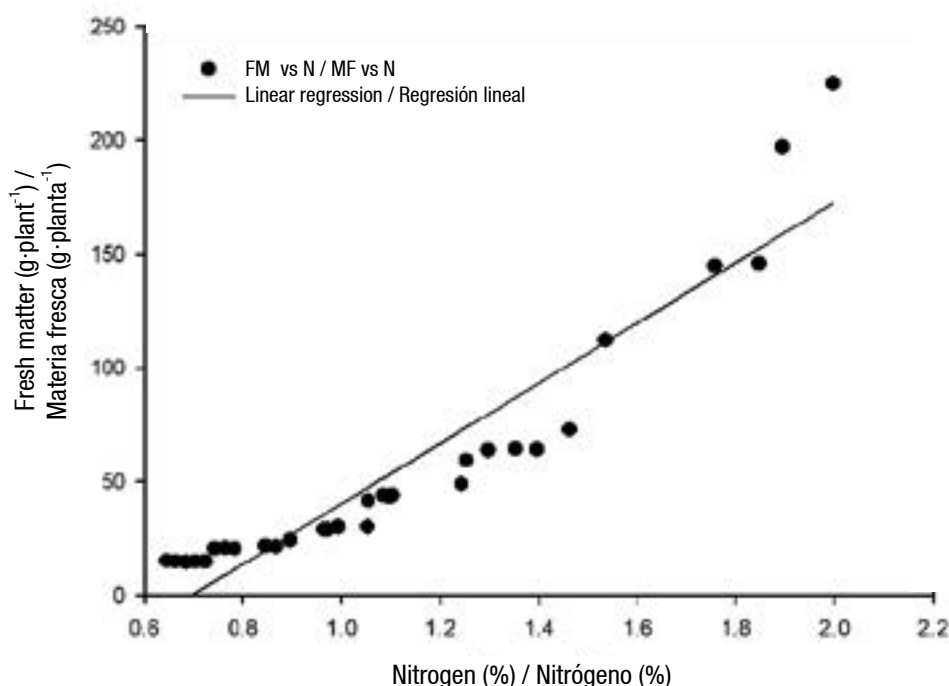


Figure 7. Linear regression between nitrogen concentration (N) and fresh matter (FM) in basil 'Nufar'.

Figura 7. Regresión lineal entre la concentración de nitrógeno (N) y materia fresca (MF) en albahaca 'Nufar'.

Conclusions

The SPAD, atLEAF, and MC-100 meters predict, in a non-destructive, fast, and accurate way, Chl and N concentrations and FM production in basil 'Nufar', based on linear regression equations. The SPAD readings had positive and significant linear correlations, with Chl concentration ($R^2 = 0.97$), N ($R^2 = 0.95$) and FM ($R^2 = 0.88$). Also, atLEAF readings had a linear correlation with Chl concentration ($R^2 = 0.93$), N ($R^2 = 0.97$) and FM ($R^2 = 0.87$), and the MC-100 readings had a similar linear correlation with the concentration of Chl ($R^2 = 0.96$), N ($R^2 = 0.89$) and FM ($R^2 = 0.94$). The relationship between the SPAD readings with atLEAF and MC-100 was also high, positive, and with significant linear correlations ($R^2 = 0.97$ and 0.94 respectively), as was also the case with the correlation between atLEAF and MC-100 ($R^2 = 0.94$). The SPAD, atLEAF, and MC-100 readings allow for the early estimation of the Chl and N status of the plant used to program fertilizer application more efficiently during basil cultivation.

End of English version

References / Referencias

- Ali, M. M., Al-Ani, A., Eamus, D., & Tan, D. K. (2007). Leaf nitrogen determination using handheld meters. *Precision Agriculture*, 16, 1-6. Retrieved from <https://opus.lib.uts.edu.au/bitstream/10453/121159/1/The%20Regional%20Institute%20-%20Leaf%20Nitrogen%20Determination%20using%20Handheld%20Meters.pdf>
- Arabaci, O., & Bayram, E. (2004). The effect of nitrogen fertilization and different plant densities on some agronomic and technologic characteristic of *Ocimum basilicum* L. (basil). *Journal of Agronomy*, 3(4), 255-262. doi: 10.3923/ja.2004.255.262
- Argenta, G., Silva, P. R., Fosthofer, E. L., Strieder, M. L., Suhre, E., & Teichmann, L. L. (2003). Monitoramento do nível de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27(1), 109-119. doi: 10.1590/S0100-06832003000100012
- Basyouni, R., Dunn, B. L., & Goad, C. (2015). Use of non-destructive sensors to assess nitrogen status in potted poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* L. (Willd. ex Klotzsch))

Fin de la versión en español

- production. *Scientia Horticulturae*, 192, 47-53. doi: 10.1016/j.scienta.2015.05.011
- Cho, Y. Y., Oh, S., Oh, M. M., & Son, J. E. (2007). Estimation of individual leaf area, fresh weight, and dry weight of hydroponically grown cucumbers (*Cucumis sativus* L.) using leaf length, width, and SPAD value. *Scientia Horticulturae*, 111(4), 330-334. doi: 10.1016/j.scienta.2006.12.028
- Cruz-Alvarez, O., Hernández-Rodríguez, O. A., Jacobo-Cuellar, J. L., Ávila-Quezada, G., Morales-Maldonado, E., Parra-Quezada, R.A., Robles-Hernandez, L., ... & Ojeda-Barrios D. L. (2020). Nitrogen fertilization in pecan and its effect on leaf nutrient concentration, yield and nut quality. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 26(3), 1-13. doi: 10.5154/r.rchsh.2019.10.021
- Cruz-Crespo, E., Sandoval-Villa, M., Volke-Haller, V. H., Can-Chulim, A., & Sánchez-Escudero, J. (2012). Mixtures of substrates and nutrient solution concentration effect on growth and yield of tomato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1361-1373. doi: 10.29312/remexca.v3i7.1343
- Cunha, A. R., Katz, I., Sousa, A. P., & Martinez-Urbe, R. A. (2015). Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de lisianthus en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido. *Idesia (Arica)*, 33(2), 97-105. doi: 10.4067/S0718-34292015000200012
- 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(13), 2949. doi: 10.3390/s19132949
- Dey, A. K., Sharma, M., & Meshram, M. R. (2016). An analysis of leaf chlorophyll measurement method using chlorophyll meter and image processing technique. *Procedia Computer Science*, 85, 286-292. doi: 10.1016/j.procs.2016.05.235
- Dunn, B. L., Singh, H., & Goad, C. (2018a). Relationship between chlorophyll meter readings and nitrogen in poinsettia leaves. *Journal of Plant Nutrition*, 41(12), 1566-1575. doi: 10.1080/01904167.2018.1459697
- Dunn, B. L., Singh, H., Payton, M., & Kincheloe, S. (2018b). Effects of nitrogen, phosphorus, and potassium on SPAD-502 and atLEAF sensor readings of *Salvia*. *Journal of Plant Nutrition*, 41(13), 1674-1683. doi: 10.1080/01904167.2018.1458874
- Fenech-Larios, L., Troyo-Diéguez, E., Trasviña-Castro, M., Ruiz-Espinoza, F., Beltrán-Morales, A., Murillo-Amador, J., García-Hernández, J., & Zamora-Salgado, S. (2009). Relationship between a Non-destructive Method and a Destructive extraction method, for measuring the chlorophyll content in basil seedling leaves (*Ocimum Basilicum* L.). *Universidad y Ciencia*, 25(1), 99-102. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=15416335008>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019). Value of agricultural production. Retrieved February 03, 2021 from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>
- Hebbbar, K. B., Subramanian, P., Sheena, T. L., Shwetha, K., Sugatha, P., Arivalagan, M., & Varaprasad, P. V. (2016). Chlorophyll and nitrogen determination in coconut using a non-destructive method. *Journal of Plant Nutrition*, 39(11), 1610-1619. doi: 10.1080/01904167.2016.1161781
- Hordofa, S., Lulie, B., Yakob, A., Nigussei, A., Mekuria, R., & Kebede, K. (2021). Fresh herbage and essential oil yield of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by mineral fertilizers. *Medicinal and Aromatic Plants*, 10(6), 1-4. doi: 10.35248/2167-0412.21.10.389
- Hurtado, S. M., Silva, C. A., de Resende, Á. V., Corazza, E. J., Shiratsuchi, L. S., & Higashikawa, F. S. (2010). Sensibilidade do clorofilômetro para diagnóstico nutricional de nitrogênio no milho. *Ciencia e Agrotecnologia*, 34(3), 688-697. doi: 10.1590/S1413-70542010000300023
- Kalaji, H. M., Dąbrowski, P., Cetner, M. D., Samborska, I. A., Łukasik, I., Brestic, M., & Panchal, B. M. (2017). A comparison between different chlorophyll content meters under nutrient deficiency conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 40(7), 1024-1034. doi: 10.1080/01904167.2016.1263323
- Kalra, Y. (1998). *Handbook of reference methods for plant analysis*. Florida: USA. CRC Press. doi: 10.1201/9781420049398
- León, A. P., Viña, S. Z., Frezza, D., Chaves, A., & Chiesa, A. (2007). Estimation of chlorophyll contents by correlations between spad-502 meter and chroma meter in butterhead lettuce. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(19-20), 2877-2885. doi: 10.1080/00103620701663115
- Macedo-Ferreira, M. M., Barbosa-Ferreira, G. B., Rezende-Fontes, P. C., & Pires-Dantas, J. P. (2006). Índice SPAD e teor de clorofila no limbo foliar do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica, em duas épocas de cultivo. *Revista Ceres*, 53(305), 83-92. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=305226787012>
- Mackinney, G. (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 140(2), 315-322. doi: 10.1016/S0021-9258(18)51320-X
- Martín, I., Alonso, N., López, M. C., Prieto, M., Cadahía, C., & Eymar, E. (2007). Estimation of leaf, root, and sap nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter for ornamental shrubs. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(3) 1785-1803. doi: 10.1080/00103620701435555
- Mendoza-Tafolla, R. O., Juárez-López, P., Ontiveros-Capurata, R. E., Sandoval-Villa, M., Alia-Tejagal, I., & Alejo-Santiago, G. (2019). Estimating nitrogen and chlorophyll status of romaine lettuce using SPAD and atLEAF Readings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3) 751-756. doi: 10.15835/nbha47311525
- Mercado-Luna, A., Rico-García, E., Lara-Herrera, A., Soto-Zarazúa, G., Ocampo-Velázquez, R., Guevara-González, R., Herrera-Ruiz, G., & Torres-Pacheco, I. (2010). Nitrogen determination on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings by color image analysis (RGB). *African Journal of Agricultural Research*, 9(33), 5326-5332. doi: 10.5897/AJB10.130

- Padilla, F. M., de Souza, R., Peña-Fleitas, M. T., Gallardo, M., Giménez, C., & Thompson, R. B. (2018a). Different Responses of various chlorophyll meters to increasing nitrogen supply in sweet pepper. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1-14. doi: 10.3389/fpls.2018.01752
- Padilla, F. M., Gallardo, M., Peña-Fleitas, M. T., de Souza, R., & Thompson, R. B. (2018b). Proximal Optical sensors for nitrogen management of vegetable crops: a review. *Sensors*, 18(7), 2083. doi: 10.3390/s18072083
- Ruiz-Espinoza, F. H., Murillo-Amador, B., García-Hernández, J. L., Fenech-Larios, L., Rueda-Puente, E. O., Troyo-Diéguez, E., Kaya, C., & Beltrán-Morales, A. (2010). Field evaluation of the relationship between chlorophyll content in basil leaves and a portable chlorophyll meter (SPAD-502) readings. *Journal of Plant Nutrition*, 33(3), 423-438. doi: 10.1080/01904160903470463
- SAS Institute. (2004). SAS/STAT users guide version 9.1. New York, USA: SAS Institute.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). Anuario estadístico de la producción agrícola. Retrieved May 09, 2021 from <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Steiner, A. A. (1984). *The universal nutrient solution*. Sixth International Congress on Soilless Culture, Wageningen, 633-650.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M., & Murphy, A. (2014). *Plant Physiology & Development*. Massachusetts: USA. Sinauer Associates.
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K., & Pleijel, H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynthesis Research*, 91(1), 37-46. doi: 10.1007/s11120-006-9077-5
- Wettstein, D. (1957). Chlorophyll-letale und submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12(3), 427-506. doi: 10.1016/0014-4827(57)90165-9
- Zebbarth, B. J., Younie, M., Paul, J. W., & Bittman, S. (2002). Evaluation of leaf chlorophyll index for making fertilizer nitrogen recommendations for silage corn in a high fertility environment. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33(5-6), 665-684. doi: 10.1081/CSS-120003058
- Zhu, J., Tremblay, N., & Liang, Y. (2011). A Corn nitrogen status indicator less affected by soil water content. *Agronomy Journal*, 103(3), 890. doi: 10.2134/agronj2010.0351
- Zhu, J., Tremblay, N., & Liang, Y. (2012). Comparing SPAD and atLEAF values for chlorophyll assessment in crop species. *Canadian Journal of Soil Science*, 92(4), 645-648. doi: 10.4141/cjss2011-100