

OPTICAL PROPERTIES OF GRAPEVINE LEAVES: REFLECTANCE, TRANSMITTANCE, ABSORPTANCE AND CHLOROPHYLL CONCENTRATION

PROPIEDADES ÓPTICAS DE LAS HOJAS DE VID: REFLECTANCIA, TRANSMITANCIA, ABSORPTANCIA Y CONCENTRACIÓN DE CLOROFILA

Alejandro Cabello-Pasini, Víctor Macías-Carranza

Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, A.P. 453. 22800. Ensenada, Baja California (acabello@uabc.edu.mx).

ABSTRACT

Leaf absorptance (A), transmittance (T) and reflectance (R) of visible solar radiation strongly correlate with chlorophyll concentration in a number of plant species, however, little is known about the optical properties of grapevine leaves. Consequently, the objective of this study was to evaluate the optical properties of intact leaves for estimating chlorophyll concentration in Cabernet Sauvignon, Merlot and Tempranillo varieties. Leaves from Cabernet Sauvignon, Merlot and Tempranillo vines were collected at San Antonio de las Minas, Baja California, México, in 2009, and A, T and R determined with a spectroradiometer. While leaf age played a significant role on the leaf chlorophyll concentration, the chlorophyll a+b concentration *vs.* R, T and A (evaluated from 400 to 700 nm) in the leaves of the three varieties studied followed an exponential relationship. There was a clear difference in the chlorophyll content, and the R, T, and A spectra among leaves of different ages in all three varieties studied. Reflectance values at wavelengths (λ) >750 nm increased as the age of the leaf increased while λ values at approximately 550 nm remained relatively constant. The mean A values of the Merlot (0.80 ± 0.07), Cabernet (0.82 ± 0.05) and Tempranillo leaves (0.78 ± 0.08) studied were below the assumed A value of 0.84 for vascular plants. Our observations suggest that while the 0.84 A value is acceptable for estimating absolute electron transport rates (ETR) in mature grapevine leaves, relative ETR values must be reported in young leaves. Band ratios were developed to optimize the evaluation of canopy area, canopy water status, canopy chlorophyll concentration and others using R measurements. Optimum band ratios were generated by dividing R at the best fit λ by R at each λ through the 400 to 850 nm range and regressing total chlorophyll concentration *vs.* ratio value.

RESUMEN

La absorptancia (A), transmitancia (T) y reflectancia (R) de la radiación solar visible se correlacionan fuertemente con la concentración de clorofila en numerosas especies de plantas; sin embargo, se sabe poco sobre las propiedades ópticas de las hojas de la vid. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades ópticas de las hojas intactas para estimar la concentración de clorofila en las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Tempranillo. Se recolectaron hojas de Cabernet Sauvignon, Merlot y Tempranillo en San Antonio de las Minas, Baja California, México, en 2009, y se determinó su A, T y R con un espectrorradiómetro. Aunque la edad de la hoja tuvo gran importancia en la concentración de clorofila en las hojas, la concentración de clorofila a + b *vs.* R, T y A (evaluada entre 400 y 700 nm) en las hojas de las tres variedades estudiadas reveló una relación exponencial. Hubo una clara diferencia en el contenido de clorofila, y los espectros de R, T, y A entre las hojas de diferentes edades en las tres variedades. Los valores de reflectancia en longitudes de onda (λ) > 750 nm aumentaron con la edad de las hojas mientras que los valores de λ a aproximadamente 550 nm se mantuvieron relativamente constantes. Los valores medios de A de las hojas de Merlot (0.80 ± 0.07), Cabernet (0.82 ± 0.05) y Tempranillo (0.78 ± 0.08) analizadas fueron menores al valor de A de 0.84 de las plantas vasculares. Estas observaciones sugieren que el valor de A de 0.84 es aceptable para calcular las tasas de transporte de electrones (ETR) absolutas en hojas maduras de vid, pero los valores relativos a ETR se deben reportar en las hojas jóvenes. Se desarrollaron relaciones de banda para optimizar la evaluación del área del dosel de plantas, el estado del agua del dosel, su concentración de clorofila y otros mediante mediciones de reflectancia. Las relaciones de banda óptimas se generaron dividiendo la R del mejor ajuste de λ entre la R en cada λ en el rango de 400 a 850 nm y con una regresión de concentración de clorofila total *vs.* el valor de la relación.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: June, 2011. Approved: November, 2011.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 45: 943-957. 2011.

Key words: absorptance, chlorophyll, reflectance, transmittance, optical properties.

INTRODUCTION

Optical properties of plant leaves such as solar radiation absorptance (A), transmittance (T), and reflectance (R) are strongly dependent on chlorophyll concentration in their tissue. There are differences in chlorophyll concentration among plant species (Carter and Spiering, 2002), among grape varieties (Bica *et al.*, 2000), and as a result of seasonal fluctuations of light and temperature or nutrient stress (Corp *et al.*, 2003; Cabello-Pasini *et al.*, 2004; Cabello-Pasini and Figueroa, 2005). Differences in pigment concentration are often used to evaluate growth, biomass, nitrogen status or physiological stresses in crops or natural vegetation (Blackmer *et al.*, 1996; Peñuelas and Filella, 1998). Furthermore, leaf A, T and R of visible solar radiation show a strong correlation with chlorophyll concentration in several plant species, including *Vitis rotundifolia* (Carter and Spiering, 2002).

There are spectral reflectance indices based on the optical properties to estimate the concentration of chlorophylls and other leaf pigments in crop vegetation. These indices are useful estimates of biomass and physiological status in wheat (*Triticum* spp.), corn (*Zea mays* L.) and other crops, as well as in aquatic vegetation (Augenstein *et al.*, 1991; Blackmer *et al.*, 1996; Barbar *et al.*, 2006). Hyperspectral imagery based on reflectance properties of grapevine leaves is used to discriminate between Cabernet Sauvignon and Shiraz varieties in South Australia (Lacar *et al.*, 2001). However, since reflectance varies as a function of leaf development (Poni *et al.*, 1994), it is critical to understand the effect of leaf age on the leaf optical properties in order to generate reliable hyperspectral indexes for varietal recognition.

Chlorophyll fluorescence is also a useful tool for studying the effects of environmental stress on plants since photosynthesis is often reduced in plants experiencing adverse conditions, such as water deficit, extreme temperature events, nutrient deficiency, polluting agents, attack by pathogens, etc. (Lang *et al.*, 1998). Electron transport rate (ETR) is used as an indicator of plant stress and its computation requires estimates of irradiance, the ratio of

Palabras clave: absorptancia, clorofila, reflectancia, transmitancia, propiedades ópticas.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades ópticas de las hojas de las plantas, como la absorptancia (A), transmitancia (T) y reflectancia (R) de la radiación solar son fuertemente dependientes de la concentración de clorofila. Hay diferencias en la concentración de clorofila entre especies de plantas (Carter y Spiering, 2002) entre variedades de uva (Bica *et al.*, 2000), y como resultado de las fluctuaciones estacionales de la luz y la temperatura o el estrés por nutrientes (Corp *et al.*, 2003, Cabello-Pasini *et al.*, 2004; Cabello-Pasini y Figueroa, 2005). Las diferencias en la concentración de pigmentos se usan con frecuencia para evaluar el crecimiento, la biomasa, el nivel de nitrógeno o el estrés fisiológico de los cultivos o vegetación natural (Blackmer *et al.*, 1996; Peñuelas y Filella, 1998). Además la A de la hoja, su T y la R de la radiación solar visible muestran una correlación alta con la concentración de clorofila en varias especies de plantas, incluyendo *Vitis rotundifolia* (Carter y Spiering, 2002).

Existen índices de reflectancia espectral basados en las propiedades ópticas para estimar la concentración de clorofilas y otros pigmentos en las hojas de los cultivos. Estos índices son útiles para estimar la biomasa y el estado fisiológico de trigo (*Triticum* spp.), maíz (*Zea mays* L.) y otros cultivos, así como en la vegetación acuática (Augenstein *et al.*, 1991; Blackmer *et al.*, 1996.; Barbar *et al.*, 2006). Las imágenes hiperespectrales basadas en las propiedades de reflectancia de las hojas de la vid se han usado para distinguir entre variedades de Cabernet Sauvignon y Shiraz en el sur de Australia (Lacar *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a que la reflectancia varía en función del desarrollo de las hojas (Poni *et al.*, 1994), es fundamental entender el efecto de la edad de la hoja sobre sus propiedades ópticas con el fin de generar índices hiperespectrales confiables para el reconocimiento de las variedades.

La fluorescencia de la clorofila es también una herramienta útil para estudiar los efectos del estrés ambiental sobre las plantas, ya que la fotosíntesis a menudo disminuye en las plantas en condiciones adversas, como déficit de agua, niveles extremos de temperatura, deficiencia de nutrientes, contaminantes, ataque de patógenos, y otras (Lang *et al.*, 1998). La tasa

photosystem II (PSII) to photosystem I (PSI) and leaf-specific photosynthetic absorptance (Krause and Weis, 1991). Leaf irradiance is generally evaluated *in situ* while the ratio of PSII to PSI is considered constant. Consequently, the accurate evaluation of ETR using fluorescence techniques depends of a precise estimation of leaf absorptance. Absorptance varies from 0.805 to 0.916 in several species; however, an average value of 0.84 is generally used in most ETR evaluations (Bjorkman and Demmig-Adams, 1987; Mohammed *et al.*, 1995; Knapp and Carter, 1998). While absorptance varies within and among plant species, there are few studies that relate the effect of chlorophyll concentration and tissue age to leaf absorptance in *Vitis vinifera*. Consequently, the objective of this study was to evaluate the optical properties of intact leaves for estimating chlorophyll concentration in Cabernet Sauvignon, Merlot and Tempranillo varieties.

MATERIALS AND METHODS

Shoots of approximately 1.2-1.5 m in length from Cabernet Sauvignon, Merlot and Tempranillo were tagged at a vineyard in San Antonio de las Minas, Baja California, México (32° 00' N, 116° 38' W). All grapevines were planted on a north-south two-wire trellis system with drip irrigation. Leaves of different age from each variety (n=30) were collected on the same day in August 2009, placed in plastic bags and transported immediately in an ice cooler to a laboratory nearby (Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California). Basal leaves from each shoot were considered senescent, fully developed leaves from the mid section of the shoot were considered mature and apical leaves were considered young. Pigment concentration and optical properties of the leaves did not change for 24 h after collection as verified through a time series; however, all analysis were conducted within 30 min of collection.

Chlorophyll extraction

Chlorophyll a and b were extracted from tissue of the same area of the leaf where optical properties were determined. Tissue samples (1 cm²) were cut from the leaves using a cork borer and were placed in 4 mL of dimethylformamide (DMF) for 24 h at 4 °C. Chlorophyll concentration was determined spectrophotometrically using the equations described by Porra *et al.*, (1989). Chlorophyll content of the extract (mg L⁻¹) and the total one-sided area of the leaf disks were used to compute leaf chlorophyll concentration.

de transporte de electrones (ETR) se usa como un indicador de estrés de la planta y su cálculo requiere estimaciones de la radiación, la relación fotosistema II (PSII) respecto al fotosistema I (PSI) y la absorptancia fotosintética específica de las hojas (Krause y Weis, 1991). La irradiación de las hojas normalmente se mide *in situ*, mientras que la relación PSII a PSI se considera constante. En consecuencia, la evaluación precisa de la ETR mediante técnicas de fluorescencia depende de una estimación exacta de la absorptancia de las hojas. La absorptancia varía de 0.805 a 0.916 en varias especies; sin embargo, generalmente se utiliza un valor promedio de 0.84 en la mayoría de las evaluaciones de ETR (Bjorkman y Demmig-Adams, 1987; Mohammed *et al.*, 1995; Knapp y Carter, 1998). Aun cuando la absorptancia varía dentro y entre las especies de plantas, hay pocos estudios que relacionan el efecto de la concentración de clorofila y la edad del tejido con la absorptancia de las hojas de *Vitis vinifera*. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades ópticas de las hojas intactas para estimar la concentración de clorofila en las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot y Tempranillo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se marcaron brotes de aproximadamente 1.2 a 1.5 m de longitud de Cabernet Sauvignon, Merlot y Tempranillo, en un viñedo en San Antonio de las Minas, Baja California, México (32° 00' N, 116° 38' O). Todas las vides se plantaron en dirección norte-sur, con un sistema de espaldera de dos hilos y riego por goteo. Las hojas de diferentes edades de cada variedad (n=30) fueron recolectadas el mismo día en agosto de 2009, colocadas en bolsas de plástico en una hielera y transportadas de inmediato a un laboratorio cercano (Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California). Las hojas basales de cada brote se consideraron senescentes; las hojas completamente desarrolladas a partir de la sección media del brote se consideraron maduras, y las apicales se consideraron jóvenes. La concentración de pigmentos y las propiedades ópticas de las hojas no cambiaron durante 24 h después de la recolección, como fue comprobado en una serie de tiempo, sin embargo, todos los análisis se realizaron a los 30 min de la recolección.

Extracción de clorofila

La clorofila a y la b fueron extraídas de los tejidos de la misma área de la hoja donde se determinaron las propiedades ópticas. Muestras de tejido (1 cm²) fueron cortadas de las hojas

Optical characteristics

In grapevine leaves, R and T were determined with a Quantum Sensor (LI-190, 400-700 nm, LICOR, Lincon, NE, USA) attached to an integrating sphere (LI-1800-12; LICOR, Lincon, NE, USA). In addition, R and T were determined from 400 to 850 nm using a spectroradiometer (Fieldspec, ASD, Boulder, Colorado, USA) attached via a fiber optic cable to an integrating sphere (LI-1800-12). The spectroradiometer recorded R and T at 1 nm intervals while the adaxial surface of the leaf faced the sphere interior. Reflectance was calculated by subtracting stray spectral radiance from the spectral radiances reflected by the leaf and reference and by dividing leaf reflected radiance by reference reflected radiance. Transmittance was calculated by dividing the transmittance of the sample by the reference transmittance. Absorptance was determined as $1-T-R$ (Krause and Weis, 1991). The linear relationship of chlorophyll concentration *vs.* R, T and A at 1 nm intervals (400 to 700 nm) was used to estimate a regression coefficient of determination (r^2). The optimal electromagnetic wavelength (λ) value obtained from the r^2 *vs.* wavelength for R, T and A was used as numerator when calculating simple band ratios. Reflectance, T and A values from 400 to 850 nm were divided by the optimal λ value and then regressing total chlorophyll concentration *vs.* ratio value. This ensured that values were strongly correlated to chlorophyll concentration (Carter and Spiering, 2002). Best-fit ratios were determined by dividing R or T at each λ by the reflectance or transmittance at 850 nm (R_{850} or T_{850}) or A at each λ by the A at 400 nm (A_{400}). Leaf chlorophyll concentration was then regressed with the resulting ratio values (using the exponential equation), and r^2 was calculated relative to numerator λ .

Statistical analysis

The r^2 values were used to evaluate linear and non-linear relationships of leaf chlorophyll concentration *vs.* R, T or A at 1 nm intervals from 400 to 850 nm. Non-linear relationships were modeled by an exponential curve ($y=a+be^{cx}$). Significant differences of chlorophyll concentration among leaves of different ages and among varieties was determined by a one-way ANOVA after testing for normality and homoscedasticity of the data (Sokal and Rohlf, 1994). All pairwise multiple comparisons were conducted using Tukey's test ($p \leq 0.05$). Best-fit linear and exponential regressions were drawn in the Figures using SigmaPlot (SPSS Inc., USA) and Tablecurve 2D (ver. 5.0, SPSS Inc., USA). All results are shown as mean $\pm$ standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Chlorophyll content in all three varieties fluctuated as a function of leaf age. In general,

con un horador de corchos y se colocaron en 4 mL de dimetilformamida (DMF) durante 24 h a 4 °C. La concentración de clorofila se determinó espectrofotométricamente, utilizando las ecuaciones descritas por Porra *et al.*, (1989). El contenido de clorofila del extracto (mg L^{-1}) y el área (de un solo lado del disco) se utilizaron para calcular la concentración de clorofila en las hojas.

Características ópticas

En las hojas de vid se determinaron R y T con un sensor cuántico (LI-190, 400-700 nm, LICOR, Lincon, Nebraska, EE.UU.), unido a una esfera integradora (LI-1800-12; LICOR, Lincon, Nebraska, EE.UU.). Además, R y T se determinaron desde 400 hasta 850 nm con un espectrorradiómetro (FieldSpec, ASD, Boulder, Colorado, EE.UU.), conectado mediante un cable de fibra óptica a una esfera integradora (LI-1800-12). El espectrorradiómetro registró R y T a intervalos de 1 nm, con la superficie adaxial de la hoja colocada frente a la parte interior de la esfera. La reflectancia se calculó restando la irradiancia espectral perdida de la irradiancia espectral reflejada por las hojas y la referencia, y dividiendo la irradiancia reflejada de las hojas entre la irradiancia reflejada de la referencia. La transmitancia se calculó dividiendo la transmitancia de la muestra entre la transmitancia de referencia. La absorptancia (A) se determinó como $1-T-R$ (Krause y Weis, 1991). La relación lineal de la concentración de clorofila *vs.* R, T y A, a intervalos de 1 nm (400 a 700 nm) se utilizó para calcular un coeficiente de determinación (r^2). El valor óptimo de la longitud de onda electromagnética (λ) obtenido de r^2 *vs.* longitud de onda de R, T y A se usó como numerador en el cálculo de relaciones de banda simples. Los valores de R, T y A de 400 a 850 nm se dividieron por el valor de λ óptimo y luego se realizó una regresión entre la concentración total de clorofila *vs.* el valor de la relación. Esto aseguró que los valores estuvieran fuertemente correlacionados con la concentración de clorofila (Carter y Spiering, 2002). Las tasas con mejor ajuste se determinaron dividiendo R o T a cada λ entre la R o T a 850 nm (R_{850} o T_{850}) o A a cada λ entre la absorptancia a 400 nm (A_{400}). Se generó una regresión entre la concentración de clorofila de las hojas y las tasas obtenidas (usando la ecuación exponencial), y se calculó r^2 en relación al numerador λ .

Análisis estadístico

Los valores de r^2 se usaron para evaluar las relaciones lineales y no lineales de la concentración de clorofila de las hojas *vs.* R, T o A a intervalos de 1 nm desde 400 a 850 nm. Las relaciones no lineales fueron modeladas por una curva exponencial ($y=a+be^{cx}$). Se determinaron diferencias significativas de la concentración de clorofila entre las hojas de diferentes edades y entre

chlorophyll a content in Merlot ($14.6 \pm 4.6 \mu\text{g cm}^{-2}$) and Cabernet Sauvignon ($14.4 \pm 3.1 \mu\text{g cm}^{-2}$) leaves was approximately 20 % greater ($p \leq 0.05$) than in the Tempranillo leaves (Table 1). In contrast, the concentration of chlorophyll b in the leaves of all three varieties was similar (approx. $3.8 \mu\text{g cm}^{-2}$, $p > 0.05$). The chlorophyll a/b ratio was approximately 7 % greater ($p \leq 0.05$) in Merlot and Cabernet Sauvignon (approx. 3.6 ± 0.3) than in Tempranillo (3.3 ± 0.4). Leaf age plays a significant role on the leaf chlorophyll concentration in several species, including grapevines (Poni *et al.*, 1994; Waldhoff *et al.*, 2002). Mature grapevine leaves generally have the greatest chlorophyll concentration while apical, youngest leaves tend to have the lowest levels (Poni *et al.*, 1994). The increase in chlorophyll content in the photosynthetic apparatus is triggered by the exposure of the leaf tissue to light (Aleith and Richter, 1991). Sangiovese grapevines, for example, reach maximum chlorophyll levels approximately 80 d after the leaf is developed and maintain these levels until reaching the harvest period (Poni *et al.*, 1994). Consistent with findings reported by Schultz (1996), the chlorophyll a + b concentration in our study ranged from $0.8 \mu\text{g cm}^{-2}$ in young leaves to more than $30 \mu\text{g cm}^{-2}$ in mature leaves.

In all cases, the chlorophyll a + b concentration *vs.* R, T and A relationship (evaluated from 400 to 700 nm) was better explained by an exponential curve rather than by a linear relationship (Figure 1). The r^2 for these relationships was below 0.90 and as low as 0.59. Pooled A values for Merlot (0.80 ± 0.07), Cabernet (0.82 ± 0.05) and Tempranillo (0.78 ± 0.08) were relatively similar. However, younger leaves in all three varieties had the lowest chlorophyll levels and the lowest A, while mature leaves had the greatest chlorophyll concentration and highest A values. These findings are consistent

las variedades mediante un ANOVA de una vía después de la prueba de normalidad y homocedasticidad de los datos (Sokal y Rohlf, 1994). Todas las comparaciones múltiples por pares se realizaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las regresiones lineales y exponenciales de mejor ajuste fueron dibujadas en las figuras con SigmaPlot (SPSS Inc., EE.UU.) y Tablecurve 2D (ver. 5.0, SPSS Inc., EE.UU.). Todos los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de clorofila en las tres variedades fluctuó en función de la edad de la hoja. En general, el contenido de clorofila a en las hojas de Merlot ($14.6 \pm 4.6 \mu\text{g cm}^{-2}$) y Cabernet Sauvignon ($14.4 \pm 3.1 \mu\text{g cm}^{-2}$) fue aproximadamente 20 % mayor ($p \leq 0.05$) que en las hojas de Tempranillo (Cuadro 1). Por el contrario, la concentración de clorofila b en las hojas de las tres variedades fue similar (aproximadamente $3.8 \mu\text{g cm}^{-2}$, $p > 0.05$). La relación a/b de clorofila fue aproximadamente 7 % mayor ($p \leq 0.05$) en Merlot y Cabernet Sauvignon (aproximadamente 3.6 ± 0.3) que en Tempranillo (3.3 ± 0.4). La edad tiene una función significativa sobre la concentración de clorofila en las hojas de varias especies, incluyendo la vid (Poni *et al.*, 1994; Waldhoff *et al.*, 2002). Específicamente, las hojas maduras de vid suelen tener la mayor concentración de clorofila, mientras que las apicales más jóvenes tienden a tener menores niveles (Poni *et al.*, 1994). El aumento del contenido de clorofila en el aparato fotosintético se desencadena por la exposición de los tejidos de las hojas a la luz (Aleith y Richter, 1991). La vid Sangiovese, por ejemplo, alcanza los niveles máximos de clorofila aproximadamente 80 d después de que la hoja se desarrolla y mantiene estos niveles hasta llegar al período de cosecha (Poni *et al.*, 1994). De manera consistente con los resultados reportados por Schultz (1996), la

Table 1. Chlorophyll a and b concentration in the leaves of Cabernet Sauvignon, Merlot and Tempranillo ($X \pm SD$, $n=30$).
Cuadro 1. Concentración de clorofila a y b en las hojas de Merlot, Cabernet Sauvignon y Tempranillo. ($X \pm DE$, $n=30$).

Varietal	Chlorophyll a $\mu\text{g cm}^{-2}$	Chlorophyll b $\mu\text{g cm}^{-2}$	Chlorophyll a + b $\mu\text{g cm}^{-2}$	Chlorophyll a/b
Merlot	$14.62 \pm 4.63a$	$4.07 \pm 1.45a$	$18.69 \pm 6.05a$	$3.60 \pm 0.35a$
Cabernet Sauvignon	$14.48 \pm 3.13a$	$3.99 \pm 0.90a$	$18.48 \pm 3.98a$	$3.64 \pm 0.27a$
Tempranillo	$11.31 \pm 3.23b$	$3.47 \pm 1.24a$	$14.79 \pm 4.43b$	$3.38 \pm 0.46b$

Different letters in columns indicate statistically significant differences ($p \leq 0.05$) ♦ Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

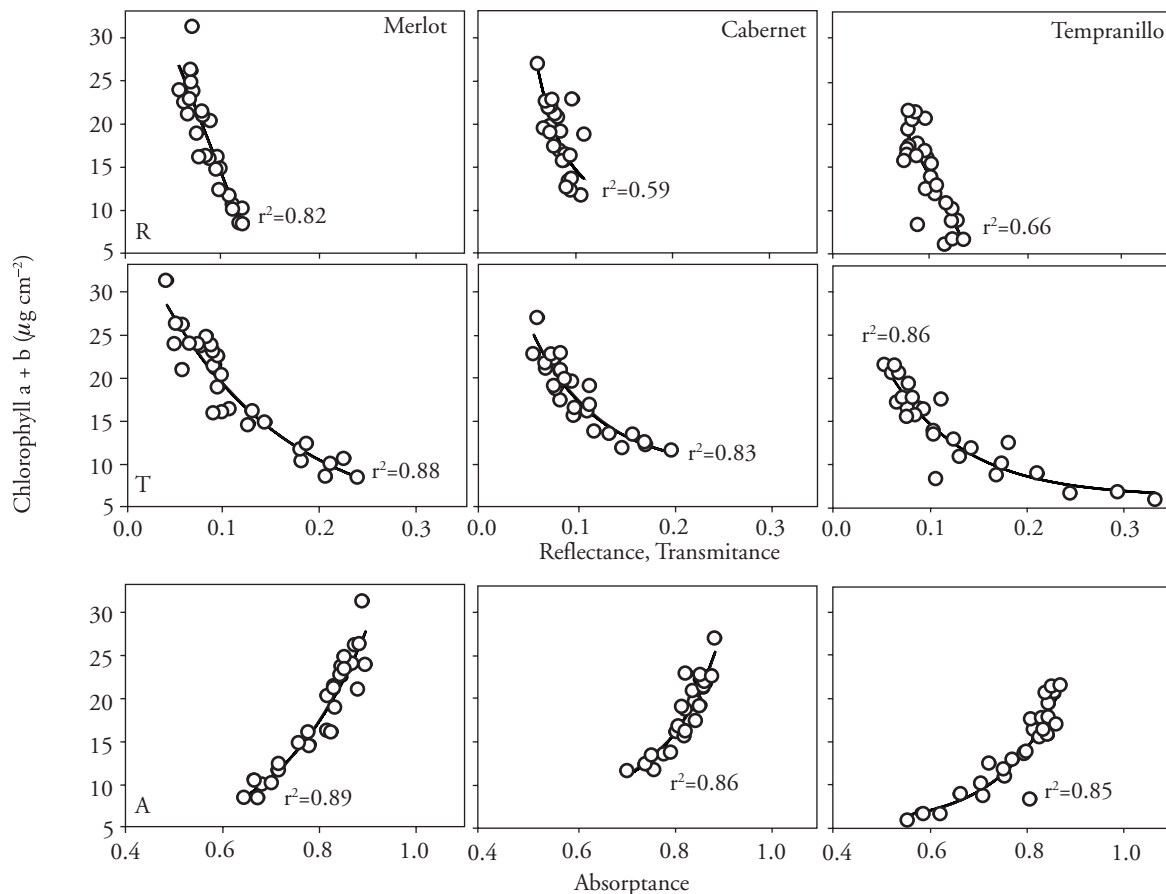


Figure 1. Chlorophyll a + b concentration vs. reflectance, transmittance and absorbance in Merlot, Cabernet Sauvignon and Tempranillo leaves. Data were fitted using an exponential equation.

Figura 1. Concentración de clorofila a + b vs. reflectancia, transmitancia y absorptancia de las hojas de Merlot, Cabernet Sauvignon y Tempranillo. Los datos se ajustaron mediante una ecuación exponencial.

with results from studies where absorption increased in the leaves due to increasing levels of chlorophyll concentration (Carter and Knapp, 2001; Carter and Spiering, 2002). Furthermore, Cabernet had the narrowest A values while Tempranillo had the greatest A range, spanning from approximately 0.5 in young leaves to approximately 0.9 in mature leaves. These differences in chlorophyll content as a function of leaf development suggest that leaf age must be standardized when evaluating physiological characteristics such as photosynthesis, chlorophyll and nitrogen content, as well as optical properties.

Leaf A is a key optical characteristic for evaluation of photosynthetic ETR in vascular and non-vascular plants (Krause and Weis, 1991; Mercado *et al.*, 1996). It is assumed that approximately 84 % of the incident quanta are absorbed by the leaf pigments; however,

concentración de clorofila a+b en el presente estudio varió desde $0.8 \mu\text{g cm}^{-2}$ en las hojas jóvenes hasta más de $30 \mu\text{g cm}^{-2}$ en las maduras.

En todos los casos, la relación entre la concentración de clorofila a+b vs R, T y A (evaluada desde 400 hasta 700 nm) se explicó mejor con una curva exponencial y no con una relación lineal (Figura 1). El r^2 de estas relaciones fue en general inferior a 0.90, llegando hasta 0.59. Los valores de A promedio de las hojas de Merlot (0.80 ± 0.07), Cabernet (0.82 ± 0.05) y Tempranillo (0.78 ± 0.08) fueron relativamente similares. Sin embargo, las hojas más jóvenes en las tres variedades mostraron los niveles menores de clorofila y la menor absorptancia, mientras que las hojas maduras tuvieron la mayor concentración de clorofila y los valores más altos de absorptancia. Estos hallazgos son consistentes con resultados de estudios con otras

A is species specific and can fluctuate as a function of irradiance history of the plant, chlorophyll levels and nitrogen concentration in the tissue (Carter and Spiering, 2002). In our study, when A from young and mature leaves were pooled together, the mean A values of the Merlot (0.80 ± 0.07), Cabernet (0.82 ± 0.05) and Tempranillo (0.78 ± 0.08) were below the assumed A value of 0.84 for vascular plants. While Cabernet leaves had the narrowest A values indicating a relative homogeneity in pigment concentration among leaves, Tempranillo leaves had an A range that spans from approximately 0.5 in young leaves to approximately 0.9 in mature leaves. However, if A of young leaves is not considered, A of the three varieties falls close to the 0.84 value observed in other plant species (Knapp and Carter, 1998). Our observations suggest that while the 0.84 A value is acceptable for estimating absolute ETR in mature grapevine leaves, relative ETR values must be reported in young leaves unless the specific A of the leaf is evaluated.

There was a clear difference in R, T and A (evaluated from 400 to 700 nm) spectra among leaves from different ages in all three varieties studied (Figure 2). Reflectance values at $\lambda > 750$ nm increased as the age of the leaf increased while λ values at approximately 550 nm remained relatively constant. Transmittance values increased slightly at $\lambda > 750$ nm, however, there was a greater increase in T values at approximately 550 nm as the age of the leaf increased. The range of R values was 3- to 6-fold lower than the range of T and A values for all three varieties. In contrast to R values, A in the leaves of Merlot, Cabernet and Tempranillo was very low at $\lambda > 750$ nm; however, there was a great increase in A at approximately 550 nm as the age of the leaf increased. The exponential relationship between chlorophyll a + b concentration *vs.* R, T and A (evaluated from 400 to 700 nm) in the leaves of the three varieties is consistent with the relationship observed in the leaves of *Vitis rotundifolia* and other broad-leaf plants using monochromatic spectra (approx. 700 nm) (Carter and Spiering, 2002). Furthermore, the total chlorophyll concentration *vs.* R had lower r^2 relative to T and A in the three varieties studied. This suggests that T and A are better predictors of total chlorophyll in the leaves of Cabernet, Merlot and Tempranillo relative to R.

Wavelengths > 720 nm have been suggested as having the greatest potential as an aid for the

especies en los que la absorción de las hojas se incrementó debido al aumento en los niveles de la concentración de clorofila (Carter y Knapp, 2001; Carter y Spiering, 2002). Además, las hojas de Cabernet registraron los valores con menos variabilidad de A, mientras que las hojas de Tempranillo mostraron los mayores niveles de variabilidad de A, desde aproximadamente 0.5 en las hojas jóvenes hasta alrededor de 0.9 en las maduras. Estas diferencias en el contenido de clorofila en relación al desarrollo de las hojas indican que su edad debe ser estandarizada al evaluar las características fisiológicas, como la fotosíntesis, los contenidos de clorofila y nitrógeno, así como las propiedades ópticas.

La A de las hojas es una característica óptica clave para la evaluación de la ETR fotosintética de las plantas vasculares y no vasculares (Krause y Weis, 1991; Mercado *et al.*, 1996). Se considera que aproximadamente 84 % de los incidentes es absorbido por los pigmentos de la hoja; sin embargo, la A es específica de la especie y puede variar en función del historial de irradiancia en la planta, los niveles de clorofila y la concentración de nitrógeno en el tejido (Carter y Spiering, 2002). En el presente estudio, cuando los valores de A de las hojas jóvenes y maduras se agruparon, los promedios de A de las hojas de Merlot (0.80 ± 0.07), Cabernet (0.82 ± 0.05) y Tempranillo (0.78 ± 0.08) fueron menores al valor de A para plantas vasculares (0.84). Además, mientras que las hojas de Cabernet tuvieron los valores de A menos variables, indicando una relativa homogeneidad en la concentración de pigmento entre las hojas, las hojas de Tempranillo tuvieron un rango de A aproximado desde 0.5 en las hojas jóvenes hasta 0.9 en las maduras. Sin embargo, si no se considera la A de las hojas jóvenes, la absorptancia de las hojas de las tres variedades se acerca al valor de 0.84 observado en otras especies de plantas vasculares (Knapp y Carter, 1998). Las observaciones del presente estudio sugieren que mientras el valor de A de 0.84 es aceptable para estimar la ETR absoluta en hojas de vid maduras, los valores relativos de ETR en las hojas jóvenes deben ser reportados, a menos que se evalúe la A específica de las hojas.

Hubo una clara diferencia en los espectros de R, T y A (evaluados desde 400 a 700 nm) entre hojas de diferentes edades en las tres variedades estudiadas (Figura 2). Los valores de R a $\lambda > 750$ nm se elevaron a medida que la edad de las hojas aumentó, mientras que los valores de λ a aproximadamente 550 nm se mantuvieron relativamente constantes. Los valores

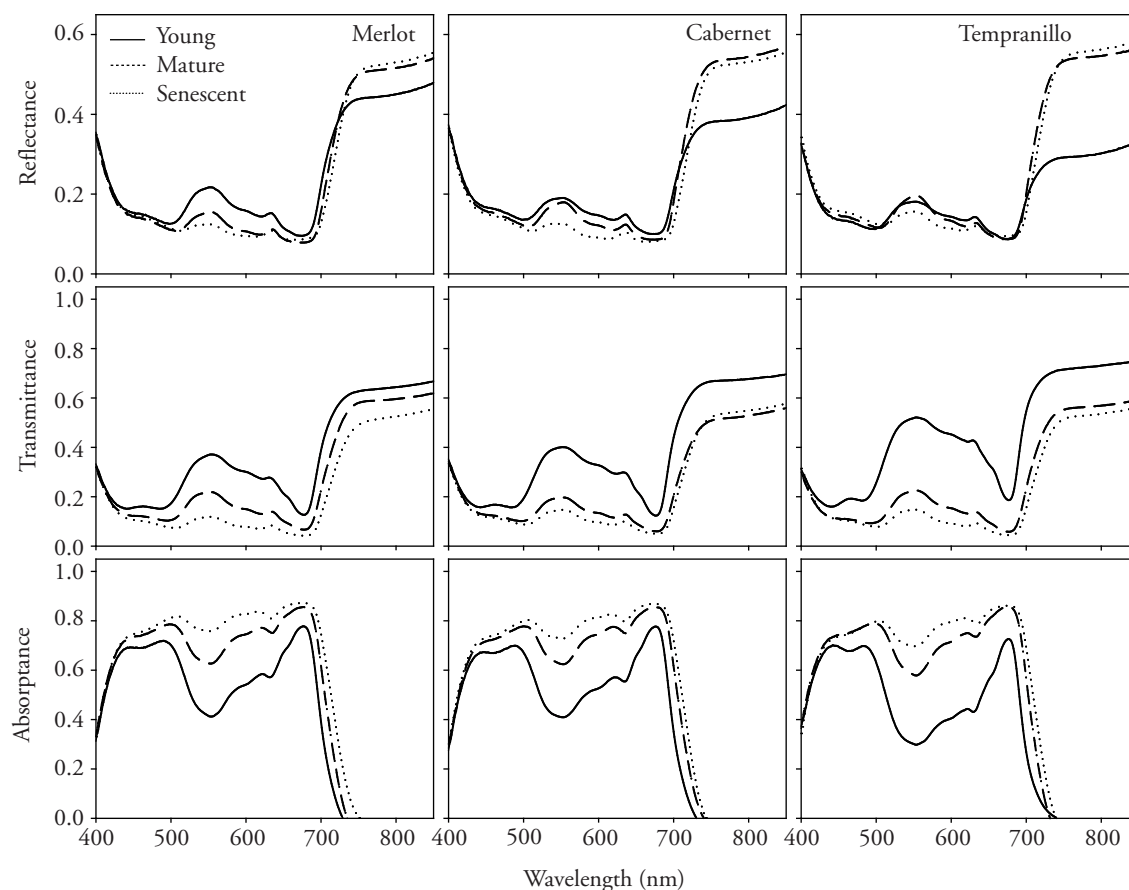


Figure 2. *In vivo* reflectance, transmittance and absorbance at different wavelengths of young, mature and senescent leaves of Merlot, Cabernet Sauvignon and Tempranillo.

Figura 2. Reflectancia, transmitancia y absorptancia *in vivo* a diferentes longitudes de onda de las hojas jóvenes, maduras y senescentes de Merlot, Cabernet Sauvignon y Tempranillo.

discrimination of grapevine varieties (Lacar *et al.*, 2001). However, differences in *R* in mature leaves at wavelengths >720 were not observed among the three varieties studied here. Besides, strong differences in *R* values (wavelengths >720 nm) were observed in young leaves among all three varieties. This suggests that optical properties of young leaves might be a better descriptor of grapevine variety than those observed in mature leaves. Thus, hyperspectral imagery for vineyard varietal mapping might increase their sensitivity at the onset of leaf development.

The r^2 from the total chlorophyll concentration *vs.* *T* and *A* showed similar patterns among varieties, however, the total chlorophyll concentration *vs.* *R* varied significantly among varieties (Figure 3). In general, the exponential model provided an approximately 10 % better fit of the chlorophyll *a + b vs.* wavelength relationship than the linear model. Best

of *T* se aumentaron ligeramente a $\lambda > 750$ nm, sin embargo, hubo un mayor incremento en los valores de *T*, a aproximadamente 550 nm a medida que aumentaba la edad de la hoja. El rango de valores de *R* fue 3 a 6 veces menor que el de *T* y *A* de las tres variedades. En contraste con los valores de *R*, los de *A* en las hojas de Merlot, Cabernet y Tempranillo fueron muy bajos a $\lambda > 750$ nm; sin embargo, hubo un gran aumento de *A* aproximadamente a 550 nm, a medida que la edad de la hoja aumentaba. La relación exponencial entre la concentración de clorofila *a + b vs.* *R*, *T* y *A* (evaluada desde 400 a 700 nm) en las hojas de las tres variedades es congruente con la relación observada en las hojas de *Vitis rotundifolia* y otras plantas de hoja ancha usando espectros monocromáticos (aproximadamente 700 nm) (Carter y Spiering, 2002). Además, la concentración de clorofila total *vs.* *R* tuvo r^2 menores con respecto a *T* y *A*

fit regression for the linear or exponential chlorophyll *vs.* R relationship was found at approximately 695 nm for all varieties. The best fit regression for the linear or exponential chlorophyll *vs.* T and A showed a wide band from 450 to 700 nm, however, there was a slight peak at approximately 700 nm.

In general, the exponential model provided an approximately 10 % better fit of the chlorophyll a+b *vs.* wavelength relationship than the linear model (see Figure 3). This is consistent with the observed exponential relationship between R, T and A *vs.* chlorophyll concentration observed in a number of other species (Carter and Knapp, 2001; Carter and Spiering, 2002). There was a clear peak of the r^2 in the red/far-red spectrum (approx. 700 nm) when

en las tres variedades estudiadas. Esto sugiere que T y A son mejores predictores de la clorofila total en las hojas de Cabernet, Merlot y Tempranillo respecto a las predicciones realizadas con determinaciones de R.

Se ha sugerido que las longitudes de onda >720 nm tienen el mayor potencial para discriminar las variedades de vid (Lacar *et al.*, 2001). Sin embargo, en este estudio no hubo diferencias en la R ($\lambda > 720$ nm) de las hojas maduras de las tres variedades. Además, se observaron grandes diferencias en los valores de R ($\lambda > 720$ nm) en las hojas jóvenes de las tres variedades. Esto sugiere que las propiedades ópticas de las hojas jóvenes pueden ser un mejor descriptor de las variedades de vid que las observadas en las hojas maduras. Por tanto, las imágenes hiperespectrales para el

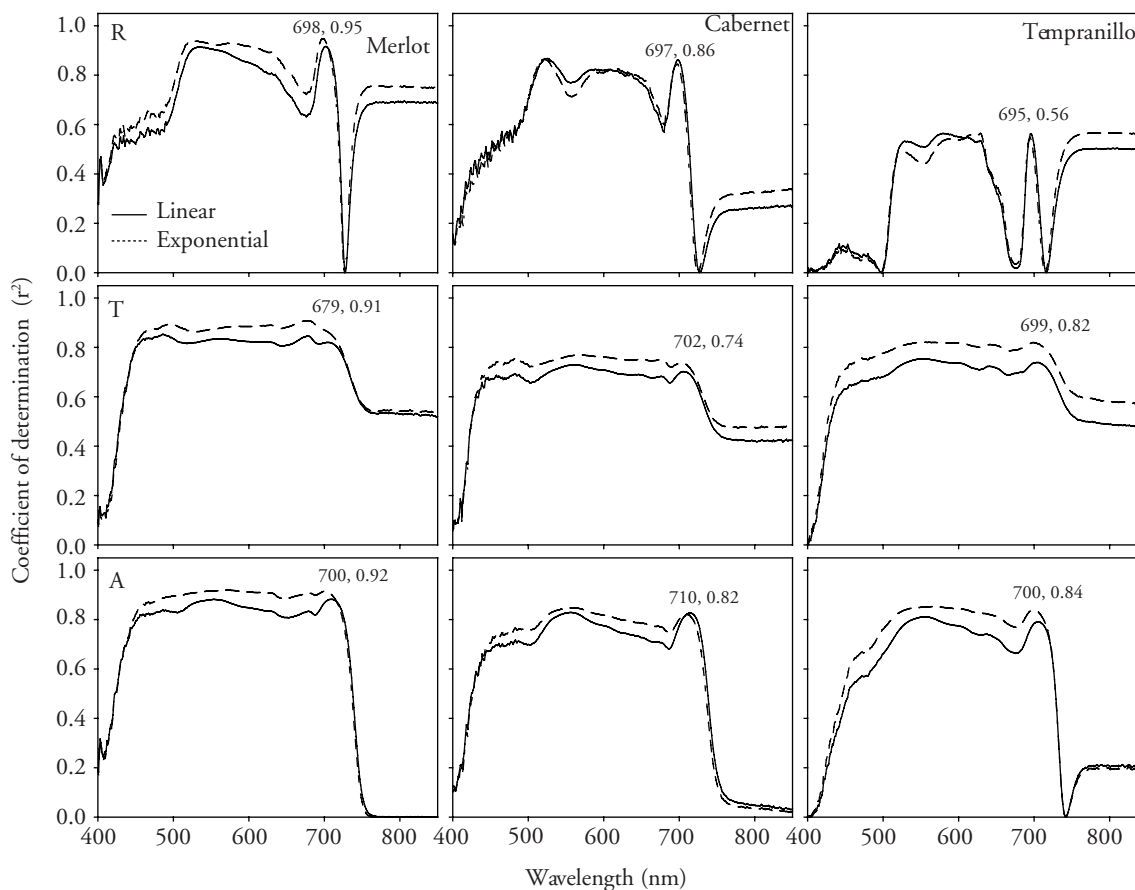


Figure 3. Coefficient of determination (r^2) of the chlorophyll a + b concentration *vs.* wavelength evaluated for reflectance (R), transmittance (T) and absorbance (A) in Cabernet Sauvignon, Merlot and Tempranillo leaves. Solid line represents the linear relationship; dashed line represents the exponential equation. Maximum r^2 and λ value for R, T, and A is indicated on top of each figure.

Figura 3. Coeficiente de determinación (r^2) de la concentración de clorofila a + b *vs.* la longitud de onda evaluada para la reflectancia (R), la transmitancia (T) y la absorbancia (A) de las hojas de Cabernet Sauvignon, Merlot y Tempranillo. La línea continua representa la relación lineal; la línea discontinua representa la ecuación exponencial. El r^2 máximo y el valor de λ para R, T y A aparecen en la parte superior de cada figura.

evaluating the concentration of chlorophyll a + b *vs.* R. This is also consistent with observations by Carter and Spiering (2002) in a number of species. However, the r^2 was relatively stable between 450 and 700 nm when T or A were used to evaluate chlorophyll a+b concentration in the leaves of all three varieties in our study. This suggests that a wide-band sensor in the visible light spectrum (*i.e.* PAR radiometer) might provide similar results as a narrow-band spectroradiometer for the evaluation of chlorophyll in the leaves of grapevines.

The optimum band ratios were generated by dividing R at the best fit λ (indicated in Figure 3) by R at each λ through the 400 to 850 nm range and regressing total chlorophyll concentration *vs.* ratio value (Figure 4). Similar band ratios were generated for T and A. Consistently, maximum values of r^2 from the total chlorophyll content *vs.* R and T maxima ($\lambda \approx 700$ nm) were obtained when these values were divided by λ at 850 nm. In contrast to R and T, values of r^2 were highest for A when maximum values of A were divided by λ at 400 nm and then regressed to total chlorophyll content using the exponential equation of the three varieties studied. Best-fit ratios (r^2) determined by dividing R or T at each λ by R_{850} or T_{850} , or A at each λ by A_{400} and regresses to leaf chlorophyll concentration were approximately 5 to 35 % greater than those obtained the non-normalized λ maxima for R, T, and A.

Absorptance in grapevine leaves, measured with a simple wide-band spectro-radiometer sensor, varieties approximately 0.60 to more than 0.90 as a function of leaf plastochron index (Schultz, 1996). Band ratios have been developed using R measurements to optimize the evaluation of canopy area, canopy water status or canopy chlorophyll concentration (Barbar *et al.*, 2006). Optimum band ratios were generated by dividing R at the best fit λ (indicated in Figure 3) by R at each λ through the 400 to 850 nm range and regressing total chlorophyll concentration *vs.* ratio value (see Figure 4). Similar band ratios were generated for T and A. Consistently, maximum values of r^2 from the total chlorophyll content *vs.* maximum R and T ($\lambda \approx 700$ nm) were obtained when these values were divided by λ at 850 nm. In contrast to R and T, values of r^2 were highest for A when maximum values of A were divided by λ at 400 nm and then regressed to total chlorophyll content using the exponential equation of the three varieties studied.

mapeo de las variedades de viñedos podrían aumentar su sensibilidad al inicio del desarrollo de las hojas.

El r^2 de la concentración de clorofila total *vs.* T y A mostró patrones similares entre las variedades; sin embargo, la concentración de clorofila total *vs.* R varió significativamente entre las variedades (Figura 3). En general, el modelo exponencial proporcionó un ajuste de aproximadamente 10 % mejor de la relación clorofila a + b *vs.* longitud de onda que el modelo lineal. El mejor ajuste de regresión lineal o exponencial para la relación clorofila *vs.* R se encontró aproximadamente a 695 nm para todas las variedades. El mejor ajuste de la regresión lineal o exponencial para la relación clorofila *vs.* T y A mostró una banda ancha desde 450 hasta 700 nm; sin embargo, hubo un ligero pico en aproximadamente 700 nm.

En general, el modelo exponencial proporcionó un mejor ajuste (10 %) de la relación clorofila a+b *vs.* longitud de onda, que el modelo lineal (ver Figura 3). Esto es congruente con la relación exponencial observada entre R, T y A *vs.* la concentración de clorofila observada en varias especies (Carter y Knapp, 2001; Carter y Spiering, 2002). Hubo un punto máximo evidente del r^2 en el espectro rojo/rojo-lejano (aprox. 700 nm) cuando se evaluó la concentración de clorofila a + b *vs.* R. Esto también es congruente con las observaciones de Carter y Spiering (2002) en otras especies. Sin embargo, el r^2 se mantuvo relativamente estable entre 450 y 700 nm cuando T o A se usaron para evaluar la concentración de clorofila a + b en las hojas de las tres variedades de vid en este estudio. Esto sugiere que un sensor de banda ancha en el espectro de luz visible (*i.e.* radiómetro PAR) podría ofrecer resultados similares a un espectrorradiómetro de banda estrecha para la evaluación de la clorofila en las hojas de vid.

Las relaciones de banda óptimas fueron generadas dividiendo R en el mejor ajuste de λ (indicado en la Figura 3) entre R a cada λ en el rango de 400 a 850 nm y generando una regresión de la concentración de clorofila total *vs.* el valor de la relación (Figura 4). Se generaron relaciones de bandas similares para T y A. Consistentemente, los valores máximos de r^2 del contenido total de clorofila *vs.* R y T máximos ($\lambda \approx 700$ nm) se obtuvieron al dividir estos valores entre λ a 850 nm. En contraste con R y T, los valores de r^2 fueron más altos para A cuando los valores máximos de A se dividieron entre λ a 400 nm y luego correlacionados al contenido total de clorofila usando la

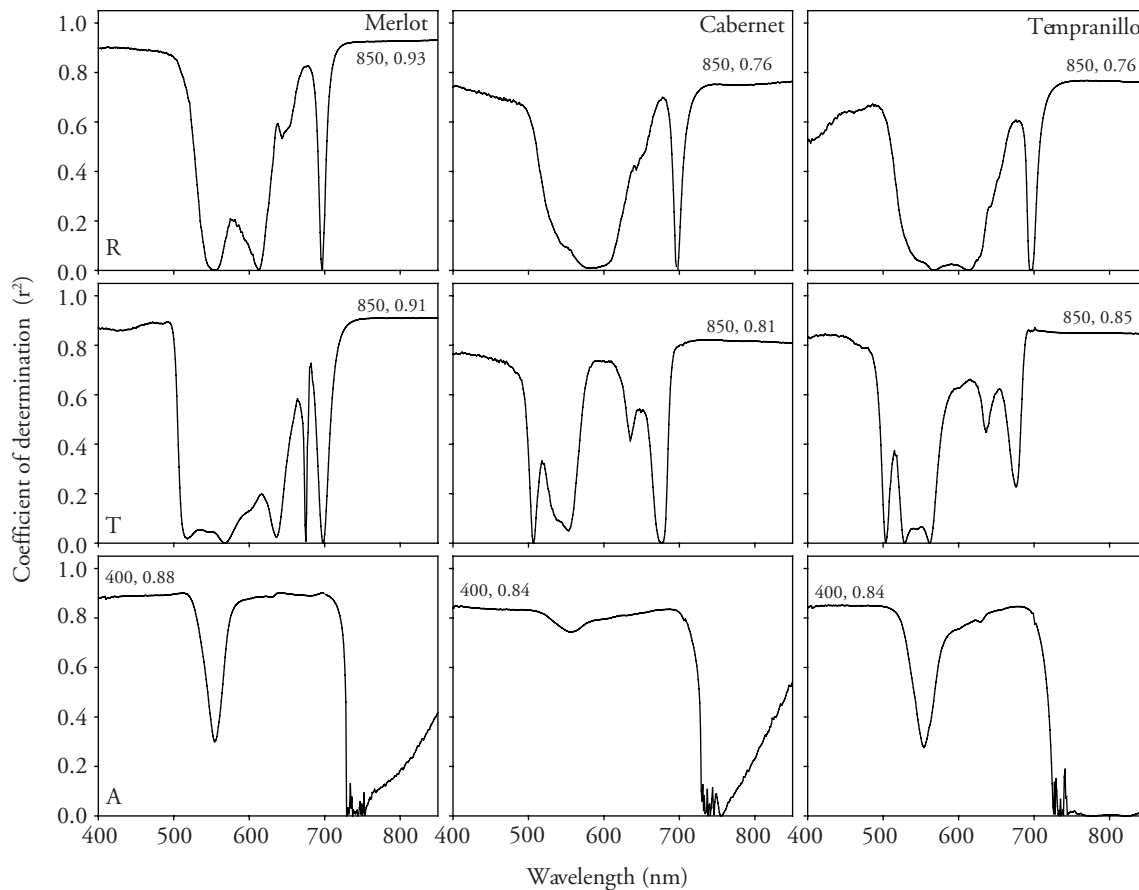


Figure 4. Coefficient of determination (r^2) vs. denominator wavelength for relationships of the chlorophyll a + b concentration with leaf reflectance (R), transmittance (T) and absorbance (A) at 1 nm intervals in Cabernet Sauvignon, Merlot and Tempranillo leaves. Regressions were based on the exponential equation relationship. Maximum r^2 and λ value for R, T, and A is indicated on top of each figure.

Figura 4. Coeficiente de determinación (r^2) vs. denominador de longitud de onda de las relaciones de la concentración de clorofila a + b con la reflectancia (R), transmitancia (T) y absorbancia (A) de las hojas en intervalos de 1 nm en hojas de Cabernet Sauvignon, Merlot y Tempranillo. Las regresiones se basaron en la relación de la ecuación exponencial. El r^2 máximo y el valor de λ para R, T y A aparecen en la parte superior de cada figura.

The chlorophyll a + b concentration vs. R (R_{704} , $R_{704/850}$), T (T_{705} , $T_{705/850}$) and A (A_{707} , $A_{707/400}$) in the leaves of the three varieties studied followed an exponential relationship (Figure 5). In general, there was a similar or better relationship between the chlorophyll content vs. R, T, or A when the normalized values were used. Furthermore, the $R_{705/850}$ vs. total chlorophyll relationship had greater r^2 values than when the $R_{400-700}$ was used to estimate chlorophyll levels. In contrast to R, the relationship of T and A vs. chlorophyll concentration was relatively similar when using the 400-700 nm measurements or the single wavelength or the ratio. Best-fit ratios were determined by dividing R or T at each λ by R_{850} or T_{850} , or A at each λ by A_{400} . Chlorophyll

ecuación exponencial en las tres variedades estudiadas. Las relaciones de mejor ajuste (r^2) determinadas dividiendo R o T en cada λ entre R_{850} o T_{850} , o A en cada λ entre A_{400} y correlacionando a la concentración de clorofila, fueron 5 a 35 % superiores a las obtenidas usando el valor máximo de λ de R, T y A no normalizada.

La absorbancia de las hojas de vid, medida con un sensor de espectroradiómetro de banda ancha, varía desde aproximadamente 0.60 hasta más de 0.90 en función del índice de plastocrono de la hoja (Schultz, 1996). Se han desarrollado relaciones de banda usando las mediciones de reflectancia para optimizar la evaluación del área de dosel, el estado del agua del dosel y su concentración de clorofila, (Barbar *et*

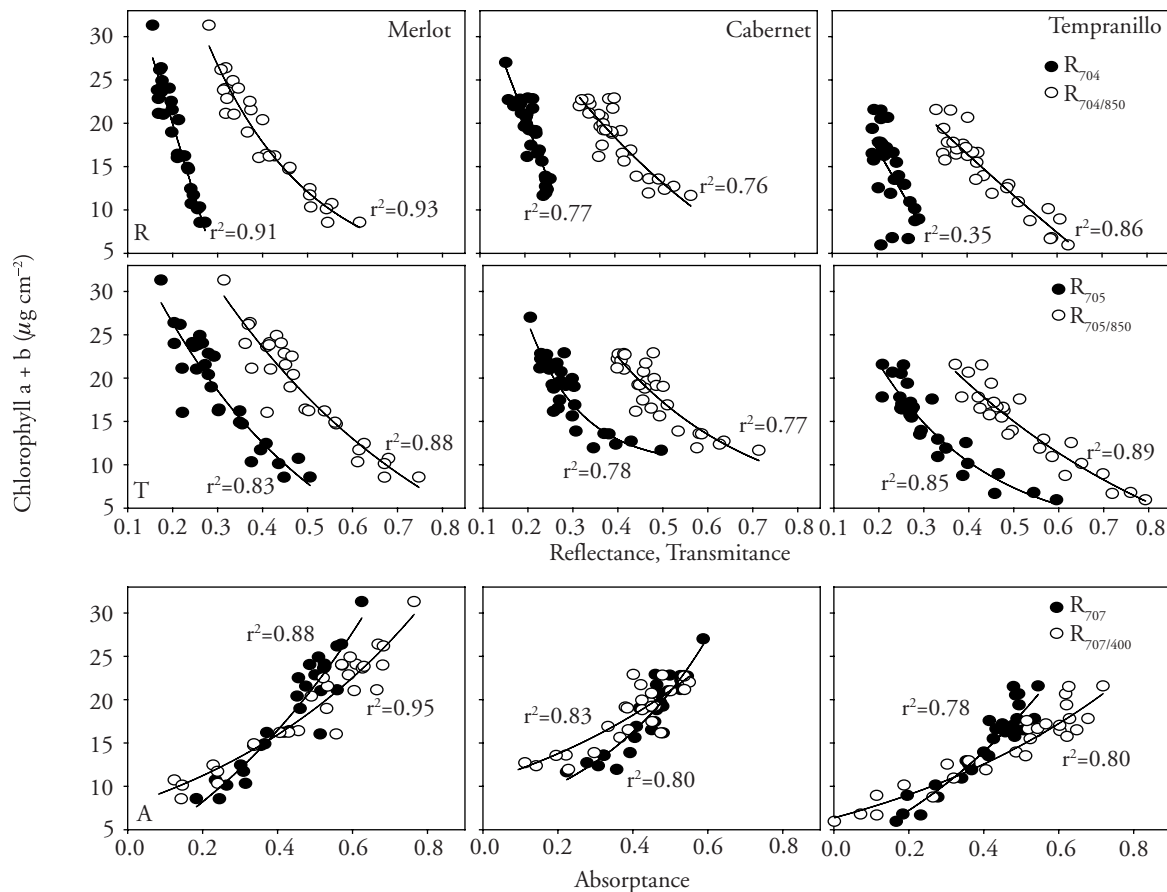


Figure 5. Chlorophyll a + b concentration *vs.* reflectance, transmittance and absorbance and the total chlorophyll concentration *vs.* the reflectance, transmittance and absorbance band ratios in Merlot, Cabernet Sauvignon and Tempranillo leaves. Data were fitted using an exponential equation and the coefficient of determination (r^2) for each relationship is listed.

Figura 5. Concentración de clorofila a + b *vs.* la reflectancia, transmitancia y absorbancia y la concentración de clorofila total *vs.* las relaciones de banda de la reflectancia, transmitancia y absorbancia de las hojas de Merlot, Cabernet Sauvignon y Tempranillo. Los datos se ajustaron mediante una ecuación exponencial y el coeficiente de determinación (r^2) para cada relación es indicada.

concentration was then regressed with the resulting ratio values (using the exponential equation), and r^2 was calculated relative to numerator λ (Figure 6). In general, r^2 values were approximately 5 to 35 % greater than those obtained from the non-normalized λ maxima for R, T, and A. Similar to previous analysis (Figure 3), r^2 minima occurred at approximately λ 680 and 750 nm. This further suggests that the use of a narrow waveband around 700 nm divided by a far red signal (≈ 850 nm) would yield the most accurate estimates of leaf chlorophyll concentration based on R and T.

CONCLUSIONS

The results of this study indicate that the use R, T and A evaluated using broad wavelength sensors

et al., 2006). En este estudio, se generaron relaciones de banda óptimas dividiendo R al mejor ajuste de λ (señalando en Figura 3) entre R para cada λ en el rango de 400 a 850 nm y generando una regresión entre la concentración de clorofila total *vs.* el valor de la relación (ver Figura 4). Se generaron relaciones de banda similares para T y A. Consistentemente, los valores máximos de r^2 del contenido total de clorofila *vs.* R y T máximos ($\lambda \approx 700$ nm) se obtuvieron cuando estos valores se dividieron entre λ a 850 nm. En contraste con R y T, los valores de r^2 fueron más altos para A cuando los valores máximos de A se dividieron entre λ a 400 nm y luego se realizó una regresión con el contenido total de clorofila en las hojas utilizando la ecuación exponencial de las tres variedades estudiadas.

(400-700 nm) can provide a reliable estimate of a wide range of chlorophyll content in the leaves of *Vitis vinifera*. However, the estimation of chlorophyll content in the leaves can be enhanced using monochromatic wavelengths of approximately 700 nm for the evaluation of R, T and A or their ratio. No significant differences in optical properties were observed among the mature Cabernet Sauvignon, Merlot and Tempranillo grapevines studied here. Strong differences in R values (>720 nm), however, were observed in young leaves among all three varieties studied here. This suggests that young leaf reflectance ($\lambda > 720$) might be a better descriptor of grapevine than those observed in mature leaves.

La concentración de la clorofila a + b *vs.* R (R_{704} , $R_{704/850}$), T (T_{705} , $T_{705/850}$) y A (A_{707} , $A_{707/400}$) en las hojas de las tres variedades estudiadas siguió una relación exponencial (Figura 5). En general, hubo una relación similar o mejor entre el contenido de clorofila *vs.* R, T o A al usar los valores normalizados. Además, $R_{705/850}$ *vs.* la relación de clorofila total registró valores de r^2 más altos que cuando se utilizó $R_{400-700}$ para estimar los niveles de clorofila. En contraste con R, la relación de T y A *vs.* concentración de clorofila fue relativamente similar al usar las mediciones 400-700 nm o la longitud de onda o la relación. Las relaciones de mejor ajuste se determinaron dividiendo R o T en cada λ entre R_{850} o T_{850} , o A en cada λ entre

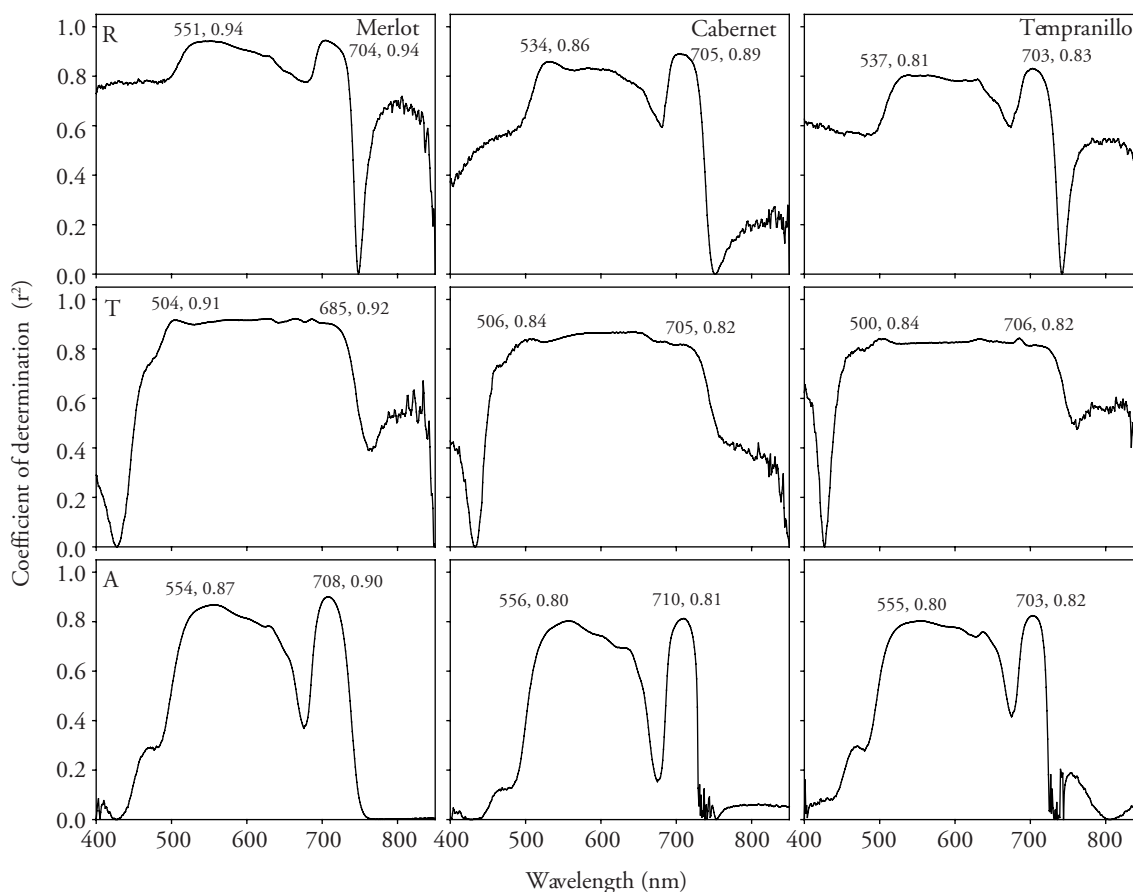


Figure 6. Coefficient of determination (r^2) of the chlorophyll a + b concentration *vs.* numerator wavelength for relationships of leaf total chlorophyll a + b concentration with leaf reflectance (R), transmittance (T) and absorptance (A) at 1 nm intervals in Cabernet Sauvignon, Merlot and Tempranillo leaves. Regressions were based on the exponential equation. Maximum r^2 and λ values for R, T, and A are indicated on top of each figure.

Figura 6. Coeficiente de determinación (r^2) de la concentración de clorofila a + b *vs.* la longitud de onda del numerador para las relaciones de la concentración de clorofila foliar total a + b con la reflectancia de las hojas (R), la transmitancia (T) y la absorptancia (A), a intervalos de 1 nm en hojas de Cabernet Sauvignon, Merlot y Tempranillo. Las regresiones se basaron en la ecuación exponencial. Los valores máximos de r^2 y λ para R, T y A aparecen en la parte superior de cada figura.

LITERATURE CITED

- Aleith, F., and G. Richter. 1991. Chloroplast differentiation in somatic embryos of carrot; Efficiency of blue and red light irradiance on gene expression. *J. Plant Physiol.* 138:304-308.
- Augenstein, E. W., D. A. Stow, and A. S. Hope. 1991. Evaluation of SPOT HRV-XS data for kelp resource inventories. *Photogramm. Eng. Rem. Sens.* 57: 501-509.
- Barbar, M., M. Reynolds, M. Ginkel, A. Klatt, W. Raun, and M. Stone. 2006. Spectral reflectance to estimate genetic variation for in-season biomass, leaf chlorophyll, and canopy temperature in wheat. *Crop Sci.* 46: 1046-1057.
- Bica, D., G. Gay, A. Morando, and E. Soave. 2000. Effects of rootstock and *Vitis vinifera* genotype on photosynthetic parameters. *Acta Hort.* 526: 373-380.
- Bjorkman, O., and B. Demmig-Adams. 1987. Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- Blackmer, T. M., J. S. Schepers, G. E. Varvel, and E. A. Walter-Shea. 1996. Nitrogen deficiency detection using reflected shortwave radiation from irrigated corn canopies. *Agron. J.* 88: 1-5.
- Cabello-Pasini, A., and F. L. Figueroa. 2005. Effect of nitrate concentration on the relationship between photosynthetic oxygen evolution and electron transport rate in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 41: 1169-1177.
- Cabello-Pasini, A., R. Muñoz-Salazar, and D.H. Ward. 2004. Biochemical characterization of the seagrass *Zostera marina* at its southern end of distribution in the North Pacific. *Cien. Mar.* 30: 21-34.
- Carter, A., and B. Spiering. 2002. Optical properties of intact leaves for estimating chlorophyll concentration. *J. Environ. Qual.* 31: 1424-1432.
- Carter, G., and A. Knapp. 2001. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *Am. J. Bot.* 88: 677-684.
- Corp, L., J. McMurtrey, E. Middleton, C. Mulchi, E. Chappelle, and C. Daughtry. 2003. Fluorescence sensing systems: in vivo detection of biophysical variations in field corn due to nitrogen supply. *Rem. Sens. Environ.* 86: 470-479.
- Knapp, A., and G. Carter. 1998. Variability in leaf optical properties among 26 species from a broad range of habitats. *Am. J. Bot.* 85: 940-946.
- Krause, G. H., and E. Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.
- Lacar, F., M. Lewis, and I. Grierson. 2001. Use of hyperspectral reflectance for discrimination between grapevine varieties, Proceedings of the Geoscience and Remote Sensing Symposium, Sydney, Australia. pp: 2878-2880.
- Lang, N. S., R. L. Wample, R. Smithyman, and L. Mills. 1998. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in blackleaf-affected concord leaves. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 367-374.
- Mercado, J. M., C. Jimenez, F. X. Niell, and F. L. Figueroa. 1996. Comparison of methods for measuring light absorption by algae and their applications to the estimation of the package effect. *Sci. Mar.* 60: 39-45.
- A_{400} . La concentración de clorofila se correlacionó con los valores de la relación obtenidos (usando la ecuación exponencial), y r^2 se calculó en relación con el numerador λ (Figura 6). En general, los valores de r^2 fueron aproximadamente de 5 a 35 % mayores que los obtenidos de la máxima de λ no normalizada para R, T y A. Al igual que en el análisis previo (Figura 3), los mínimos de r^2 ocurrieron a λ aproximadas de 680 y 750 nm. Esto sugiere además que el uso de una banda de frecuencias estrecha alrededor de 700 nm, dividida entre una señal roja lejana (≈ 850 nm) daría estimaciones más precisas de la concentración de clorofila de la hoja con base en R y T.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que el uso de R, T y A evaluados utilizando sensores de longitud de onda amplia (400-700 nm) puede proporcionar una estimación confiable del contenido de clorofila en las hojas de *Vitis vinifera*. Sin embargo, la estimación del contenido de clorofila en las hojas se puede mejorar utilizando longitudes de onda monocromática de aproximadamente 700 nm para la evaluación de R, T y A, o su relación. No se observaron diferencias significativas en las propiedades ópticas entre las variedades de vid maduras de Cabernet Sauvignon, Merlot y Tempranillo. Sin embargo, se detectaron grandes diferencias en los valores de R ($\lambda > 720$ nm) en las hojas jóvenes de las tres variedades analizadas en este estudio. Esto sugiere que la reflectancia de las hojas jóvenes ($\lambda > 720$) puede ser un mejor descriptor de las variedades de vid que la observada en las hojas maduras.

—End of the English version—

-----*-----

- Mohammed, G., W. Binder, and S. Gillies. 1995. Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scand. J. Forest. Res.* 10: 383-410.
- Peñuelas, J., and I. Filella. 1998. Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status. *Trends Plant Sci.* 3: 151-156.
- Poni, S., C. Intrieri, and O. Silvestroni. 1994. Interactions of leaf age, fruiting and exogenous cytokinins in Sangiovese grapevines under non-irrigated conditions. II. Chlorophyll and nitrogen content. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 278-284.

- Porra, R. J., W. A. Thomson, and P. E. Kriedemann. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with for different solvents: verification of the concentrations of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-394.
- Schultz, H. 1996. Leaf absorptance of visible radiation in *Vitis vinifera* L.: estimates of age and shade effects with a simple field method. *Sci. Hort.* 66: 93-102.
- Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1994. *Biometry* W. H. Freeman and Company, New York 960 p.
- Waldhoff, D., B. Furch, and W. J. Junk. 2002. Fluorescence parameters, chlorophyll concentration, and anatomical features as indicators for flood adaptation of an abundant tree species in Central Amazonia: *Symmeria paniculata*. *Environ. Exper. Bot.* 48:225-235.