

ECOLOGÍA APLICADA

Ecología Aplicada

ISSN: 1726-2216

ISSN: 1993-9507

ecolapl@lamolina.edu.pe

Universidad Nacional Agraria La Molina

Perú

Loayza, Hildo; Calderón R., Abelardo; Gutiérrez R.,  
Raymundo O.; Céspedes F., Elisabet; Quiroz, Roberto

**ESTIMACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES RELATIVAS DE CLOROFILA EN FOLIOLOS DE  
PAPA (*Solanum tuberosum* L.) UTILIZANDO TÉCNICAS DE REFLECTANCIA DE LA VEGETACIÓN**

Ecología Aplicada, vol. 21, núm. 2, 2022, Julio-Diciembre, pp. 89-99

Universidad Nacional Agraria La Molina

Lima, Perú

DOI: <https://doi.org/10.21704/rea.v21i2.1961>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34174062001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso  
abierto

## ESTIMACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES RELATIVAS DE CLOROFILA EN FOLIOLOS DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.) UTILIZANDO TÉCNICAS DE REFLECTANCIA DE LA VEGETACIÓN

### ESTIMATION OF RELATIVE CHLOROPHYLL CONCENTRATIONS IN POTATO (*Solanum tuberosum* L.) LEAFLET USING VEGETATION REFLECTANCE TECHNIQUES

Hildo Loayza<sup>1</sup>, Abelardo Calderón R.<sup>†2</sup>, Raymundo O. Gutiérrez R.<sup>3</sup>, Elisabet Céspedes F.<sup>4</sup> y Roberto Quiroz<sup>5</sup>

#### Resumen

La cantidad de energía solar absorbida por una hoja es en gran parte función de la concentración foliar de los pigmentos fotosintéticos. Por lo tanto, bajas concentraciones de clorofila pueden limitar el potencial fotosintético y por consiguiente la síntesis de compuestos primarios de una planta. En este trabajo se describe un método no destructivo para estimar las concentraciones de clorofila de foliolos de los cultivares de papa: SA-2563, Pumamaqui y Purranca, basada en la interacción entre la luz y la vegetación, que utiliza la primera derivada de sus respectivos espectros de reflectancia. Como referencia, se utilizaron las unidades SPAD adquiridas por un medidor de clorofila SPAD-502 que fue previamente validado. Correlaciones mayores al 90% entre las amplitudes de las señales obtenidas de derivar los espectros de reflectancia de foliolos en longitudes de onda alrededor de 720 nm y las concentraciones de clorofila medidas con un SPAD-502, evidencian el potencial del método basado en reflectancia de la vegetación como indicador seguro para estimar parámetros bioquímico-fisiológicos de las plantas.

**Palabras clave:** clorofila, reflectancia, *Solanum tuberosum* L.

#### Abstract

The amount of solar energy absorbed by plants is largely a function of the foliar concentration of photosynthetic pigments. Consequently, low concentrations of chlorophyll can directly limit the photosynthetic potential and thus the primary production of plants. This study describes a non-destructive method aiming to estimate the chlorophyll concentrations on potato leaves from the cultivars SA-2563, Pumamaqui and Purranca. This method is based on the interaction between light and vegetation and uses the first derivative of spectral reflectance from the crop canopy. For reference, we used the SPAD units obtained with a previously validated SPAD-502 chlorophyll meter. We found correlations greater than 90% between the amplitudes of signals obtained by deriving the spectral reflectance of leaves at wavelength about 720 nm and the chlorophyll concentrations obtained by the SPAD-502. Overall, this study showed the potential of techniques based on vegetation reflectance as robust indicators for estimating plant biochemical-physiological parameters.

**Key words:** chlorophyll, reflectance, *Solanum tuberosum* L.

#### Introducción

La clorofila es el pigmento fotorreceptor responsable de la primera etapa en la transformación de energía solar en energía química y, consecuentemente, la molécula responsable de la existencia de vida superior en la tierra. La clorofila cumple un rol central en la cosecha de luz y en la transferencia de energía, desde los sistemas periféricos hacia la parte central de los fotosistemas I y II, iniciando la separación de cargas en el centro de reacción de los fotosistemas (Allen *et al.*, 2011). De las cinco clases de clorofila (A, B, C, D y F), la A es la más abundante, y de aquí su importancia en el aparato fotosintético (Bryant *et al.*, 2020). En general, el metabolismo de la clorofila puede ser dividido en cuatro áreas funcionales, siendo las principales: la síntesis de clorofila A, la biosíntesis

tetrapirrólica y la catálisis de la inter-conversión de la clorofila A y la clorofila B, respectivamente (Mochizuki *et al.*, 2010; Tanaka & Tanaka, 2011).

La mayor cantidad de nitrógeno (N) en las hojas está incorporada en la clorofila. Por tal razón, cuantificando el contenido de clorofila obtendremos una medida indirecta del nivel de N en las hojas (Moran *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2018).

Por otro lado, las técnicas más ampliamente utilizadas para la determinación de clorofila en tejidos vegetales se basan en la extracción de clorofila con acetona al 80% (Lichtenthaler & Buschmann, 2001) o con etanol al 95% (Song *et al.*, 2021b). No obstante, aunque precisas, estas técnicas presentan algunas desventajas, como el requerimiento de equipos especializados, elevado número de muestras, reactivos

de alto costo, así como el tiempo que exige implementarlas en sus diferentes etapas. Sin embargo, a través de diversos dispositivos óptico–electrónicos es posible estimar la cantidad de clorofila total en los tejidos foliares.

En años recientes, técnicas de percepción remota aplicadas a la agricultura han realizado progresos para desarrollar métodos que estiman parámetros bioquímicos a nivel de hoja, como las concentraciones de clorofila, el contenido de N, carotenoides, etc. Así, tenemos instrumentos comerciales que estiman los contenidos relativos de clorofila midiendo la absorbancia del tejido foliar en específicas longitudes de onda. El SPAD–502 (Minolta corporation, Ltd., Osaka, Japan) en 656 y 774 nm (Minolta, 1989), Greenseeker Handheld (Trimble Navigation Ltd. Sunnyvale, CA, USA) en 656 y 774 nm (Ali *et al.*, 2015), CCM–200 (Opti–Sciences, Inc., Hudson, NH) y MC–100 (Apogee Instruments, Inc., Logan, UT, USA), estos últimos miden en 653 y 931 nm (Parry *et al.*, 2014; Ali & Imran, 2020).

El desarrollo de nuevos detectores portables de concentraciones relativas de clorofila ha tenido éxito a partir de la integración de sensores espectrales compactos de bajo costo, microcontroladores, programas diseñados a medida con pruebas de validación y calibración en condiciones de laboratorio y campo (Song *et al.*, 2021b). Del mismo modo, cámaras integradas en un celular y una fuente de luz LED (por sus siglas en inglés: “light–emitting diodes”) pueden adquirir imágenes en el rango visible (400–700 nm) que estiman los niveles de clorofila en las hojas (Putra *et al.*, 2022).

Estudios realizados en leguminosas, gramíneas, hortalizas, frutales y especies forestales presentaron una alta correlación entre el contenido de clorofila foliar y las unidades SPAD (por sus siglas en inglés: “Soil Plant Analyzer Device”) que brinda el detector de clorofila SPAD–502 (Murillo–Amador *et al.*, 2004; Uddling *et al.*, 2007; Hawkins *et al.*, 2009; Coste *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2011). Asimismo, diferentes trabajos calibraron el detector SPAD–502 para el cultivo de arroz (Lin *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017), frijol caupí (Murillo–Amador *et al.*, 2004), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Bürling *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2016), papa (Borhan *et al.*, 2017), con el propósito de detectar posibles deficiencias de N y/o clorofila. Sin embargo, si deseamos monitorear a nivel de dosel o extensas áreas de cultivos, el método basado en absorbancia de dichos instrumentos portables no es de fácil escalar. En estas circunstancias, corresponde utilizar técnicas globalizadoras que permitan monitorear extensas áreas de forma rápida y no intrusiva. En tal sentido, Zhang *et al.* (2021) estudiaron el contenido de clorofila a nivel de follaje y su relación con el estado fisiológico en remolacha azucarera utilizando un espectroradiómetro para medir la reflectancia del follaje. Ellos encontraron que el índice

$(R_{710} - R_{780})/R_{780}$  fue el mejor estimador de clorofila en tres estadios vegetativos.

La radiación solar incidente en el rango de 400 a 700 nm es mayormente absorbida por la vegetación, por esta razón, recibe considerable atención en estudios de reflectancia de las plantas. Adicionalmente, el incremento de la reflectancia en el rojo lejano (región espectral entre 690 – 740 nm) es una respuesta genérica que resulta en un indicador temprano y más consistente de estrés que otras regiones del espectro solar incidente (Carter *et al.* 1996). Estos estudios han sugerido que alteraciones de la reflectancia en el espectro visible por condiciones de estrés resultan de la sensibilidad de las concentraciones de clorofila en las hojas (Knippling, 1970; Puangbut *et al.*, 2017). Diversos estudios han mostrado que índices basados en reflectancia en el rojo lejano pueden estimar con precisión las concentraciones de clorofila en hojas (Frankenberg *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2022). De este modo, las propiedades ópticas de la hoja cercanas a los 700 nm son cruciales para la detección de estrés en plantas y la estimación de concentraciones de clorofila en hojas.

Experimentos realizados en las plantas *Ginkgo biloba* y *Zelkova serrata*, relacionaron las concentraciones de clorofila A por unidad de área ( $CL_A$ ) y la primera derivada espectral de los datos de reflectancia en determinadas longitudes de onda ( $DR_\lambda$ ), encontrándose una alta correlación en la vecindad del borde rojo (Endo *et al.*, 2001b). En esta misma línea de investigación, experimentos realizados en almendra (*Prunus dulcis*), álamo (*Populus trichocarpa*) y manzana (*Malus domestica*) relacionaron las concentraciones de clorofila en hojas y la primera derivada de la reflectancia foliar respecto a las longitudes de onda, encontrándose que hay un óptimo en las regiones rojo lejano y verde (Ding *et al.*, 2009). Similarmente, experimentos realizados en hojas de pepino (*Cucumis sativus*), realizados por Endo *et al.* (2001a), encontraron una alta correlación entre los datos de la primera derivada de los espectros de reflectancia y las concentraciones de clorofila A por unidad de área.

El espectroradiómetro es un instrumento diseñado para medir la radiancia espectral. Las variaciones en la concentración de pigmentos en hojas se pueden medir y diferenciar con espectrómetros portátiles de alta sensibilidad en la región espectral correspondiente al visible e infrarrojo cercano (Song *et al.*, 2021a), especialmente en la región del rojo entre 690 y 740 nm. Shi *et al.* (2022) estimaron contenidos de clorofila A y B mediante el análisis de redes neurales convolucionales (CNN: “convolutional neural network” por sus siglas en inglés), a partir de la reflectancia de hojas medidas con un espectroradiómetro. Zhao *et al.* (2022) realizaron un estudio con datos de reflectancia espectral adquiridos de hojas de papa en cuatro etapas fenológicas. Ellos

utilizaron tres métodos: 1) la derivada de primer orden, 2) la transformada continua de Wavelet, y 3) un modelo CNN que mostró mejor precisión para la detección de clorofila en papa.

Song *et al.* (2021a) estimaron el contenido de clorofila en cultivos de maíz mediante la reflectancia espectral utilizando el método de mínimos cuadrados parciales (PLS: “Partial Least Squares”) para optimizar la amplitud del espectro. Luego, aplicando un muestreo competitivo adaptativo ponderado (CARS: “Competitive Adaptive Reweighted Sampling”) y el algoritmo genético (GA: “Genetic Algorithm”) lograron implementar un modelo que estimó el contenido de clorofila.

Este estudio propone utilizar la reflectancia foliar para estimar la concentración de clorofila en el cultivo de tres cultivares de papa (SA-2563, Pumamaqui y Purranca) por ser un indicador de bajo costo con un alto potencial de escalamiento. Para tal fin, se utilizó un espectroradiómetro para implementar un método que permitiera la adquisición de firmas espectrales en hojas de los tres cultivares de papa consiguiendo hallar longitudes de onda sensibles a la concentración de clorofila total. Previamente se implementó un experimento de estrés hídrico por sequía con el propósito de generar una mayor variabilidad en las concentraciones de clorofila de las hojas y así favorecer la validación del método.

## Materiales y métodos

### Validación de las unidades SPAD del medidor de clorofila SPAD-502

Este experimento se realizó en el interior de un invernadero en las instalaciones del Centro Internacional de la Papa (CIP-Lima), entre los meses de abril y junio, con temperaturas de aire promedio de 18 °C la máxima y 13 °C la mínima. Un tubérculo semilla del cultivar Cancán (CIP N°380389.1) (CIP, 2022b) se sembró en cada maceta totalizando cinco macetas. Las macetas de plástico de 10” de diámetro (Kord Products Inc, Ontario, Canada) fueron llenadas con 1.2 Kg de PRO-MIX (Premier Tech Horticulture, Canada), un sustrato de suelo húmico con una alta capacidad de retención de agua (capacidad de campo de 30% en contenido volumétrico). La fertilización en la siembra se realizó en cada maceta, que recibió 7 g de una mezcla de fertilizantes granulados, compuesta de Urea (46% N), (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (18% N y 46% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y KCl (60% K<sub>2</sub>O) con una proporción de 0.5:2:1, respectivamente. Luego, semanalmente y por las cinco primeras semanas, se realizó el riego con 500 ml de una solución (1 g·l<sup>-1</sup>) de fertilizante soluble (Peter fertilizer, Everris International B.V., Geldermalsen, The Netherlands) con 15% de N, 2% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 20% de K<sub>2</sub>O. Los riegos regulares se realizaron cada 48 horas a las 16:00 horas del día, con cantidades de 400 ml las dos primeras semanas, 800 ml la tercera y cuarta semana, y 1 200 ml en las subsiguientes semanas. Cada maceta

tenía un plato que recogía el agua excedente, el cual era reabsorbido el día siguiente.

A las 8 semanas después de la siembra se muestrearon folíolos que presentaban desde clorosis ligera (tercio inferior) hasta un color verde intenso (tercio superior). Con la finalidad de validar las unidades relativas SPAD que arroja el instrumento SPAD-502 se usó la técnica empleada por Zheng *et al.* (2018). Para ello, se agruparon folíolos en intervalos de lectura de unidades SPAD que abarcaron de: 1) 25 a 29, 2) 30 a 34, 3) 35 a 39, y 4) 40 a 45. Se realizaron 3 lecturas por folíolo, de un folíolo cercano al folíolo impar como lo recomiendan Ramírez *et al.* (2014). Se obtuvo el promedio de 3 lecturas por intervalo de unidades SPAD, de acuerdo al procedimiento del fabricante (Minolta, 1989). Con la ayuda de un sacabocado, los folíolos fueron cortados en fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, teniendo en cuenta conservar una relación área y peso aproximadamente constante entre los fragmentos correspondientes a cada intervalo de unidades SPAD.

Finalmente, las muestras fueron conducidas al laboratorio para determinar su contenido de clorofila por extracción en acetona al 80%, de acuerdo con Lichtenthaler & Buschmann (2001).

Los folíolos, agrupados en intervalos de valores SPAD, permitieron abarcar todas las tonalidades del verde y se guardaron en N líquido. La cuantificación de clorofila A y clorofila B se realizó mediante el método de Arnon, publicado por Bruinsma (1963), para la cual se mezcló 0.5 g de folíolos sin nervaduras con 10 ml de acetona fría al 80%. En seguida, se centrifugó y filtró. Una alícuota de 1 ml del sobrenadante se completó con 4 ml de acetona fría. La dilución fue transferida a una cubeta del espectrofotómetro y leída a absorbancias de 645 y 663 nm de longitud de onda. La cuantificación de clorofila A y B se realizó reemplazando las lecturas del espectrofotómetro en las Fórmulas 1 y 2, respectivamente (Lichtenthaler & Buschmann, 2001).

$$\begin{aligned} \text{Clorofila A } (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) \\ = 12.25 \times A_{663} - 2.78 \times A_{645} \end{aligned}$$

#### **Fórmula 1.**

$$\begin{aligned} \text{Clorofila B } (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) \\ = 21.50 \times A_{645} - 5.10 \times A_{663} \end{aligned}$$

#### **Fórmula 2.**

Donde:

A<sub>663</sub> y A<sub>645</sub> corresponden a las absorbancias del extracto de clorofila en las longitudes de onda de 663 y 645 nm, respectivamente.

Para comparar los gramos de clorofila por unidad de masa de hoja, que brinda la técnica de extracción (Lichtenthaler & Buschmann, 2001), con los gramos de clorofila por unidad de área del SPAD-502, se estableció una relación área/peso aproximadamente

constante considerando el mismo número de discos por cada intervalo de valores SPAD.

#### Estimación de concentraciones relativas de clorofila A y B utilizando la reflectancia del tejido vegetal

Para esta prueba, la colecta de datos se llevó a cabo en un cobertor de malla antiáfida en las instalaciones del Centro Internacional de la Papa (CIP – Lima). Utilizando macetas, se sembraron tubérculos semilla de tres cultivares de papas nativas. Los cultivares evaluados fueron los siguientes: SA-2563 (CIP N°700234), Pumamaqui (CIP N°704380) y Purranca (CIP N°705009) (CIP, 2022a). El tipo de maceta, el sustrato, la fertilización y el manejo fue similar a lo descrito anteriormente. Un total de cinco macetas por cultivar, las cuales fueron regadas cada 48 horas las primeras cinco semanas; el mismo procedimiento descrito en la sección anterior. Luego, las plantas fueron sometidas a un tratamiento de estrés hídrico dejándose de regar durante cuatro semanas con el propósito de obtener diferencias en el contenido de clorofila, similar a Van der Mescht *et al.* (1999). Al final de cada semana se realizaron evaluaciones de reflectancia.

Un espectroradiómetro portátil LI-1800 (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) y una esfera integradora modelo LI-1800-12S (LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA) (LI-COR, 1989, 1990) fueron utilizados para adquirir semanalmente datos de reflectancia en condiciones controladas de los folíolos de los 3 cultivares de papa, con 2 lecturas de reflectancia por cada folíolo. Específicamente, los 2 folíolos correspondían a los pares cercanos al folíolo impar de una tercera hoja completamente expandida. La cámara interior de la esfera integradora estuvo recubierta con una superficie altamente reflectante en la región visible e infrarrojo cercano (NIR: “Near Infrared” por sus siglas en inglés). Esto permitió que la luz que ingresó a su interior se refleje sin pérdidas. Dicha esfera posee 3 puertos y en uno de ellos se atrapa al folíolo que es irradiado con una lámpara de halógeno – tungsteno de intensidad constante. Finalmente, la luz reflejada por el folíolo se dispersa al interior de la esfera integradora y luego es recogida por una fibra óptica y transportada al sensor de luz del espectroradiómetro. El procedimiento seguido es similar al descrito por Castro-Esau *et al.* (2006) y Ding *et al.* (2009).

#### Análisis de los espectros de reflectancia

Utilizando la esfera integradora obtuvimos espectros de reflectancia de folíolos por longitud de onda ( $R_\lambda$ ) en condiciones ideales para los 3 cultivares de papas nativas sometidas en este estudio. Mientras, el SPAD-502 proporcionó las concentraciones relativas de clorofila total medidos en los mismos folíolos que fueron usados para obtener las señales de reflectancia. Utilizando esta información, se calculó la correlación entre la primera derivada central de la reflectancia por longitud de onda ( $PDR_\lambda$ ) y las concentraciones relativas

de clorofila proporcionadas por el SPAD-502, similar al procedimiento ensayado por Rao *et al.* (2008).

Las  $PDR_\lambda$  se calcularon según la Fórmula 3.

$$PDR_\lambda = \frac{R_{\lambda+1} - R_{\lambda-1}}{2}$$

#### **Fórmula 3.**

Donde:

$R_{\lambda+1}$  y  $R_{\lambda-1}$ : Reflectancia en la longitud de onda  $\lambda+1$  y  $\lambda-1$ .

Las señales de reflectancia de los folíolos fueron procesadas para resaltar atributos que acentúen su relación con las concentraciones de clorofila. Se aplicó la primera derivada en el dominio de las longitudes de onda y las señales resultantes fueron alisadas utilizando una función B-Spline de tercer grado, de acuerdo con los procedimientos descritos por Lee (1982) y Agoston (2005). La función B-Spline cúbica está compuesta de polinomios cúbicos fragmentarios determinados por una serie de puntos de control ( $s_i, p_i$ ),  $i = 1, 2, \dots, n$ ; que no se ajustan a los puntos tabulados con exactitud pero que tienen el objetivo de generar curvas continuas.

Correlogramas se graficaron a partir de las señales correspondientes a la primera derivada de la reflectancia y los valores SPAD adquiridos de folíolos para cada uno de los cultivares de papa (ítem anterior). Un procedimiento similar fue presentado por Rao *et al.* (2008). La auto correlación cruzada permitió determinar las longitudes de onda correspondientes a la primera derivada de la reflectancia de folíolos con la más alta correlación respecto a los valores SPAD.

Se utilizó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para evaluar el ajuste entre las medidas SPAD y las amplitudes de la primera derivada de la reflectancia foliar.

### **Resultados**

#### Validación de las unidades SPAD para estimar contenido de clorofila A, B y total en hojas de papa del cultivar Cancán

El contenido de clorofila total medidos en folíolos del cultivar Cancán presentaron una correlación lineal significativa  $R^2 = 0.98$  y  $P_{\text{value}} = 0.0095$  con las evaluaciones SPAD realizadas con el SPAD-502 en grupos clasificados en diferentes tonalidades de verde. Estos resultados representan una gran ventaja, ya que permitiría sustituir métodos tradicionales de cuantificación de clorofila en laboratorio por lecturas rápidas y no destructivas representadas en unidades SPAD. Los resultados de la cuantificación de clorofila A, B, y total, realizadas en laboratorio en intervalos de valores SPAD, se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Valores SPAD promedio y concentraciones de clorofila A, B y total, respectivamente, en diferentes intervalos de valores SPAD.

Intervalo de valores SPAD	Valor SPAD (promedio)	Clorofila A (mg·g <sup>-1</sup> )	Clorofila B (mg·g <sup>-1</sup> )	Clorofila total (mg·g <sup>-1</sup> )
25 a 29	26.45	1.100	0.998	2.098
30 a 34	31.95	1.897	0.929	2.826
35 a 39	36.81	2.294	0.973	3.266
40 a 45	41.66	2.969	1.256	4.225

Las regresiones lineales entre las concentraciones de clorofila A, B, y total versus las unidades SPAD se muestran en la Figura 1.

Clorofila A (mg·g<sup>-1</sup>) = 0.1266 x SPAD – 2.303 R<sup>2</sup> = 0.98 (\*\*)

Clorofila B (mg·g<sup>-1</sup>) = 0.0176 x SPAD + 0.4316 R<sup>2</sup> = 0.52 (ns)

Clorofila total (mg·g<sup>-1</sup>) = 0.1438 x SPAD – 1.855 R<sup>2</sup> = 0.98 (\*\*)

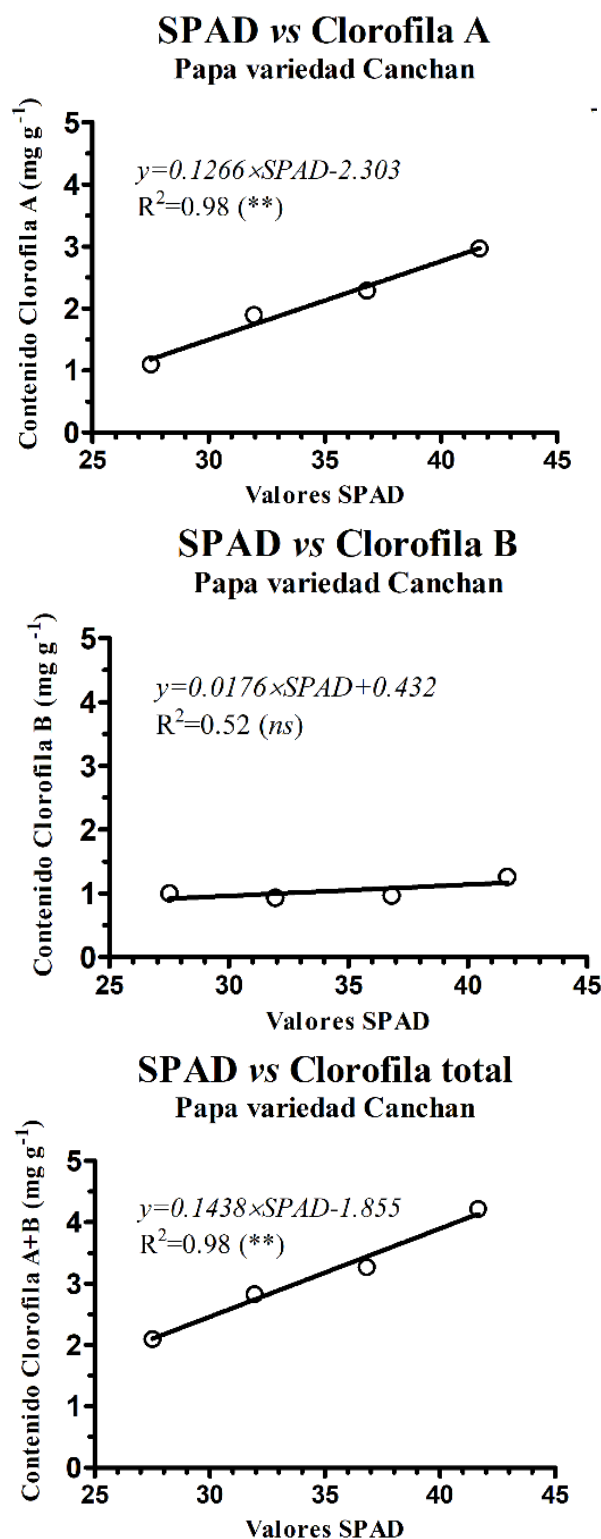
#### Análisis de los espectros de reflectancia

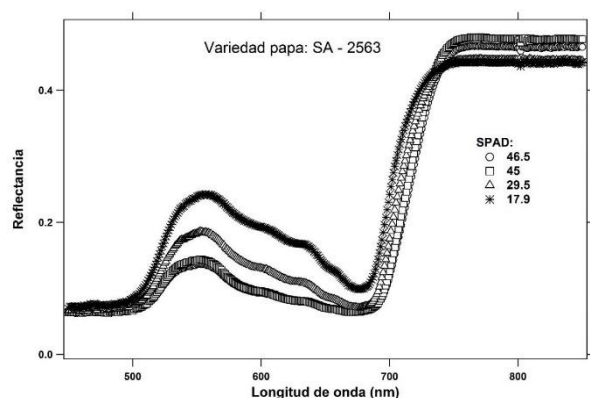
Los espectros de reflectancia correspondiente a los folíolos de los tres cultivares de papa se muestran en las Figuras 2, 4 y 6. Estas señales fueron derivadas con respecto a las longitudes de onda y alisadas mediante una función B-Spline de tercer grado (Lee, 1982; Agoston, 2005), Figuras: 3, 5 y 7.

Para el cultivar de papa SA-2563 se obtuvieron cuatro señales de reflectancia visualmente diferenciadas (Figura 2) y correspondientes a las 4 fechas de evaluación. De manera simultánea se registró para cada fecha un promedio de lecturas de clorofila SPAD que disminuyó de 46.5 a 17.9 unidades SPAD, obteniéndose una amplitud de 28.6 (Figura 2). Para fines de validar el método, resulta ideal contar con un amplio rango de valores SPAD y simultáneamente diferentes espectros de reflectancia. Asimismo, para fines prácticos, se graficó la primera derivada de los espectros de reflectancia por longitud de onda desde 680 nm hasta 760 nm, debido a que dentro de dicho rango se presenta un pico máximo relativo para cada señal de reflectancia procesada (Figura 3).

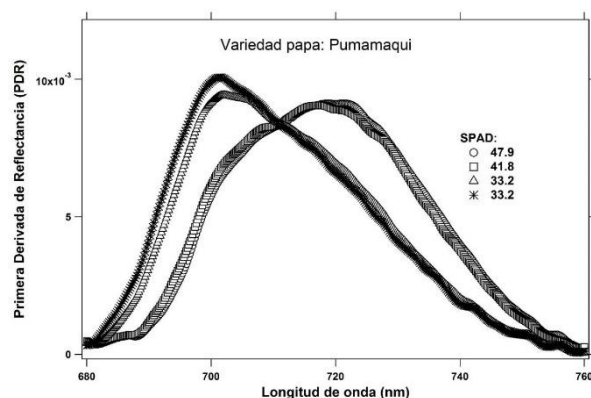
Con el cultivar de papa Pumamaqui, las cuatro señales de reflectancia formaron dos grupos con una escasa diferencia entre ellos (Figura 4). Por otro lado, las lecturas SPAD presentaron un valor máximo de 47.9 y un mínimo de 33.2 unidades SPAD, un rango de 14.7, que representa casi la mitad de amplitud presentada por el cultivar SA-2563. Esta característica es importante tenerla en cuenta para la validación del método. La gráfica, correspondiente a la primera derivada de los espectros de reflectancia, muestra el mismo patrón de agrupamientos que los espectros de

reflectancia, con dos picos que se aprecian en la Figura 5.

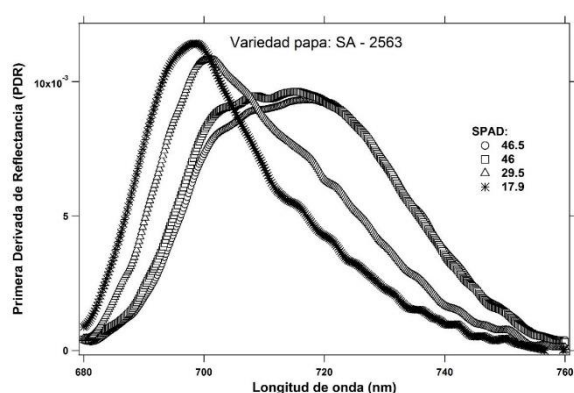
**Figura 1.** Valores SPAD versus Clorofila A, B y total (cultivar: Canchán).



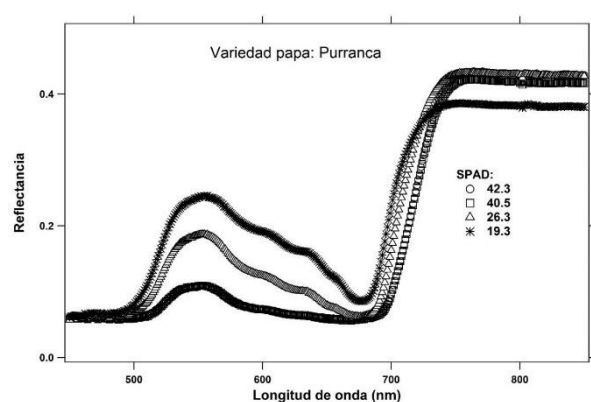
**Figura 2.** Espectros de reflectancia (cultivar de papa: SA - 2563).



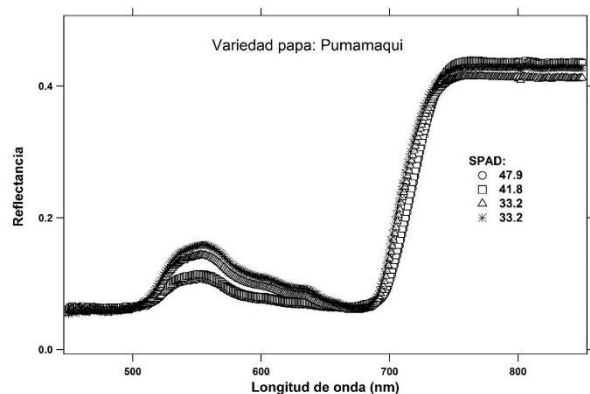
**Figura 5.** Derivada de la reflectancia por longitud de onda (cultivar: Pumamaqui).



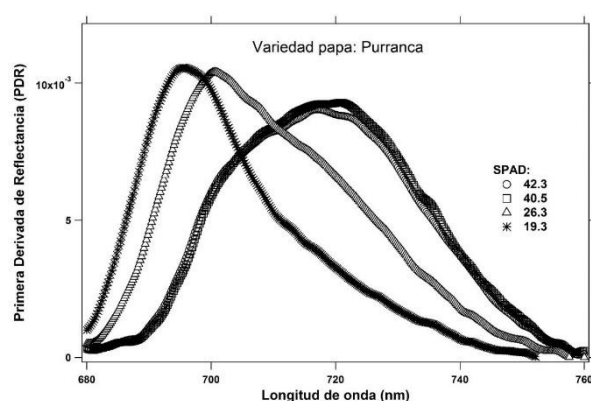
**Figura 3.** Derivada de la reflectancia por longitud de onda (cultivar: SA - 2563).



**Figura 6.** Espectros de reflectancia (cultivar de papa: Purranca).



**Figura 4.** Espectros de reflectancia (cultivar de papa: Pumamaqui).



**Figura 7.** Derivada de la reflectancia por longitud de onda (cultivar: Purranca).

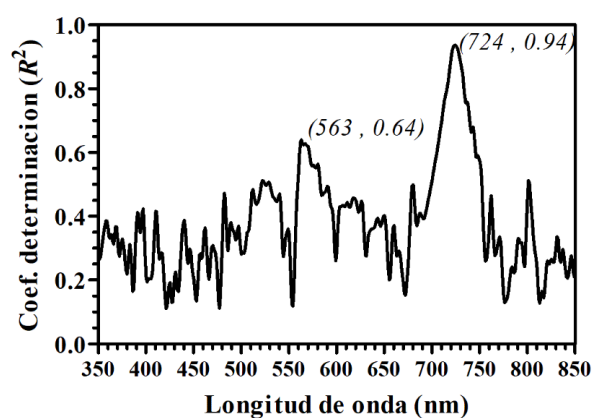
El cultivar de papa Purranca presenta tres señales de reflectancia visualmente diferenciados (Figura 6). Con respecto al promedio de lecturas de clorofila SPAD, los valores disminuyen de 42.3 a 19.3 con una amplitud de 23.0 unidades SPAD. En lo que respecta al gráfico de la primera derivada de los espectros de reflectancia, se presentan hasta tres picos centrados en diferentes longitudes de onda, como se observa en la Figura 7.

Las Figuras 8, 9 y 10 se obtuvieron al comparar las amplitudes por longitud de onda de la  $PDR_{\lambda}$  con los valores relativos de clorofila SPAD obtenidos de los folíolos para cada uno de los 3 cultivares de papa, respectivamente. Se encontró que la primera derivada de la reflectancia de los folíolos de papa presentó una alta sensibilidad en la región espectral correspondiente al rojo y al verde. Estos resultados se resumen en la Tabla 2. Sin embargo, para cada uno de los cultivares de papa se encontró una ligera variación en la longitud



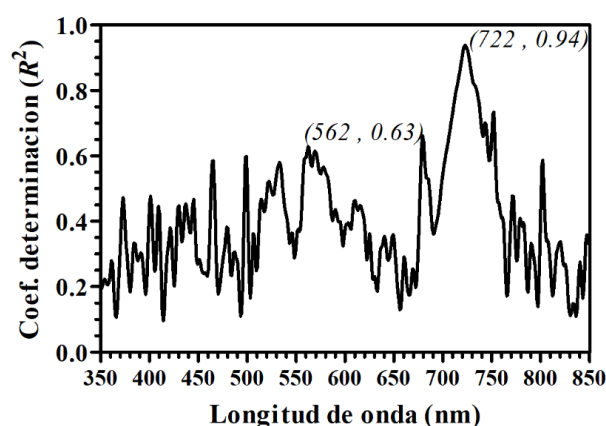
de onda central correspondiente a los picos de mayor amplitud en los coeficientes de determinación. Así, los picos de mayor amplitud corresponden a longitudes de onda centradas en: 716 nm (Purranca), 722 nm (Pumamaqui) y 724 nm (SA-2563). En tanto, los segundos picos de mayor amplitud corresponden a longitudes de onda central aproximadamente en: 561 nm (Purranca), 562 nm (Pumamaqui) y 563 nm (SA-2563). Resultados similares, con dos picos máximos de coeficientes de determinación, fueron presentados en cultivos de arroz y algodón (Rao *et al.*, 2008), en manzana, almendra y álamo (Ding *et al.*, 2009).

#### Variedad SA-2563



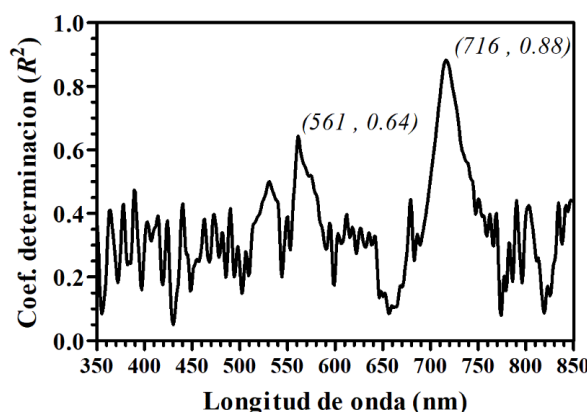
**Figura 8.** Coeficiente de determinación ( $R^2$ ) entre los valores relativos de clorofila SPAD y la primera derivada de los espectros de reflectancia de folíolos de papa ( $PDR_\lambda$ ), cultivar SA-2563.

#### Variedad Pumamaqui



**Figura 9.** Coeficiente de determinación ( $R^2$ ) entre los valores relativos de clorofila SPAD y la primera derivada de los espectros de reflectancia de folíolos de papa ( $PDR_\lambda$ ), cultivar Pumamaqui.

#### Variedad Purranca



**Figura 10.** Coeficiente de determinación ( $R^2$ ) entre los valores relativos de clorofila SPAD y la primera derivada de los espectros de reflectancia de folíolos de papa ( $PDR_\lambda$ ), cultivar Purranca.

**Tabla 2.** Longitudes de onda que presentaron los más altos coeficientes de determinación para estimar concentraciones de clorofila utilizando la primera derivada del espectro de reflectancia de hojas de papa.

Cultivar	1er máximo		2do máximo	
	Longitud de onda (nm)	Coef. De determinación ( $R^2$ )	Longitud de onda (nm)	Coef. de determinación ( $R^2$ )
SA-2563	724	93.68%	563	63.97%
Pumamaqui	722	93.77%	562	62.88%
Purranca	716	88.31%	561	64.40%

#### Discusión

Nuestros resultados confirmaron que el SPAD-502 es un instrumento útil para estimar concentraciones de clorofila total. Este instrumento se validó con datos adquiridos de folíolos de papa del cultivar Canchán, obteniéndose un coeficiente de determinación de 0.98. Resultados similares fueron obtenidos con otras especies como: trigo y papa por Uddling *et al.* (2007), papa por Bindi *et al.* (2002) y frijol caupí por Murillo-Amador *et al.* (2004).

Las altas correlaciones encontradas entre las amplitudes de la primera derivada de los datos de reflectancia evaluadas en determinadas longitudes de onda en la región del eje rojo y las concentraciones relativas de clorofila SPAD para los cultivares de papa SA-2563, Pumamaqui y Purranca, corroboran los trabajos realizados con *Ginkgo biloba* para  $\lambda = 727.5$  nm ( $R^2 = 0.85$ ) y *Zelkova serrata* para  $\lambda = 732.5$  nm ( $R^2 = 0.78$ ) reportados por Endo *et al.* (2001b), así como, también, los estudios realizados con maíz para  $\lambda = 710$  nm ( $R^2 = 0.78$ ) por Schepers *et al.* (1996). En álamo, almendro y manzano se obtuvieron una alta sensibilidad en las regiones correspondientes al rojo



lejano (700 hasta 730 nm) y al verde (550 hasta 580 nm), presentados por Ding *et al.* (2009). Sin embargo, en el caso del cultivo de pepino se reportó una alta sensibilidad para  $\lambda = 678$  nm ( $R^2 = 0.81$ ), según Endo *et al.* (2001a).

Estos resultados se explican a partir de la interacción que existe entre la epidermis de la hoja y la luz incidente en la región correspondiente al infrarrojo cercano desde 700 nm a 740 nm (Ding *et al.* 2009; Kira *et al.*, 2015; Li *et al.* 2017). Los valores SPAD con la más alta correlación con la amplitud de los espectros de reflectancia derivados en el dominio de las longitudes de onda correspondieron al rango entre 716 nm y 724 nm, para los tres cultivares de papa nativa sometidos en este estudio. Resultados similares fueron presentados por Kira *et al.* (2015) en tres especies forestales, y por Zhao *et al.* (2019) en cuatro especies de manglares.

El SPAD-502 permitió realizar medidas rápidas del contenido relativo de clorofila a nivel de hoja. Así, trabajos como los realizados por Ramírez *et al.* (2014) y Rolando *et al.* (2015) relacionaron los contenidos de clorofila como indicadores del rendimiento de tubérculo en condiciones de restricción hídrica, e indicadores de tolerancia al estrés hídrico, respectivamente. Sin embargo, si el objetivo es evaluar extensas zonas de cultivos, sería necesario un gran número de personas e instrumentos incrementando los costos y el tiempo de ejecución. En ese sentido, métodos basados en la reflectancia del tejido vegetal y el procesamiento de señales presentado en este estudio permitirían evaluar el contenido de clorofila de forma rápida, eficiente y no intrusiva. Mejor aún, si utilizamos cámaras con filtros ópticos en las longitudes de ondas de nuestro interés (Rao *et al.*, 2008; Roosjen *et al.*, 2018).

Un método que utilice la información reflejada por la planta en lugar de la absorbancia del tejido foliar, como es el caso del SPAD-502, incrementaría la capacidad de escalamiento de las evaluaciones; más aún, si consideramos el potencial de las cámaras agrícolas multiespectrales, como es el caso de la RedEdge-P (MicaSense Inc., Seattle, WA, USA) o hiperespectrales como el Hyperspec UV-VIS (Headwall Photonics Inc., Bolton, MA, USA), para la adquisición de imágenes de reflectancia de la vegetación desde plataformas aéreas no tripuladas. Estas sinergias resultan potentes herramientas de decisión para los agricultores, permitiendo, por ejemplo, generar mapas de deficiencias o excesos en el uso de fertilizantes en los cultivos.

## Conclusiones

El presente trabajo de investigación presenta un método que analiza y procesa señales de reflectancia a nivel de hoja con el propósito de estimar concentraciones relativas de clorofila en folíolos de plantas de papa de forma rápida y no intrusiva. El método aplicado presenta estimaciones de clorofila

total con coeficientes de determinación mayores al 88% utilizando valores SPAD como referencia. Nuestros resultados reafirman el potencial y la flexibilidad de las técnicas basadas en reflectancia para estimar rasgos de los cultivos en el marco de la agricultura de precisión.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la división: “Crop and Systems Sciences”, del CIP liderada por el Dr. Roberto Quiroz en el periodo 2008 al 2016 en el marco del proyecto de la fundación BMGF: “Remote Sensing as a Monitoring Tool for Smallholder’s Cropping Area Determination in Tanzania and Uganda using Sweet Potato as a Pilot Crop”, con ID: OPP1070785.

## Literatura citada

- Agoston M. K. (Ed.). 2005. Curves in Computer Graphics. In: Computer Graphics and Geometric Modeling: Implementation and Algorithms. 373–471. London: Springer.
- Ali A. & Imran M. 2020. Evaluating the potential of red edge position (REP) of hyperspectral remote sensing data for real time estimation of LAI & chlorophyll content of kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) fruit orchards. Scientia Horticulturae, 267: Art. 109326. DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109326.
- Ali A.M., Thind H.S., Varinderpal-Singh & Bijay-Singh. 2015. A framework for refining nitrogen management in dry direct-seeded rice using GreenSeeker™ optical sensor. Computers and Electronics in Agriculture, 110: 114–120. DOI: 10.1016/j.compag.2014.10.021.
- Allen J.F., de Paula W.B.M., Puthiyaveetil S. & Nield J. 2011. A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. Trends in Plant Science, 16(12): 645–655. DOI: 10.1016/j.tplants.2011.10.004.
- Bindi M., Hacour A., Vandermeiren K., Craigon J., Ojanperä K., Seldén G., Högy P., Finnan J. & Fibbi, L. 2002. Chlorophyll concentration of potatoes grown under elevated carbon dioxide and/or ozone concentrations. European Journal of Agronomy, 17(4): 319–335. DOI: 10.1016/S1161-0301(02)00069-2.
- Borhan M.S., Panigrahi S., Satter M.A. & Gu H. 2017. Evaluation of computer imaging technique for predicting the SPAD readings in potato leaves. Information Processing in Agriculture, 4(4): 275–282. DOI: 10.1016/j.inpa.2017.07.005.
- Bruinsma J. 1963. The quantitative analysis of chlorophylls A and B in plants extracts. Photochemistry and Photobiology, 2(2): 241–249. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1963.tb08220.x.
- Bryant D.A., Hunter C.N. & Warren M.J. 2020. Biosynthesis of the modified tetrapyrroles—the pigments of life. Journal of Biological Chemistry, 295(20): 6888–6925. DOI: 10.1074/jbc.REV120.006194.
- Bürling K., Hunsche M. & Noga G. 2011. Use of blue–green and chlorophyll fluorescence measurements for differentiation between nitrogen deficiency and pathogen infection in winter wheat. Journal of Plant Physiology, 168(14): 1641–1648. DOI: 10.1016/j.jplph.2011.03.016.

- Carter G.A., Cibula W.G. & Miller R.L. 1996. Narrow-band Reflectance Imagery Compared with Thermal Imagery for Early Detection of Plant Stress. *Journal of Plant Physiology*, 148(5): 515–522. DOI: 10.1016/S0176-1617(96)80070-8.
- Castro-Esau K.L., Sánchez-Azofeifa G.A. & Rivard B. 2006. Comparison of spectral indices obtained using multiple spectroradiometers. *Remote Sensing of Environment*, 103(3): 276–288. DOI: 10.1016/j.rse.2005.01.019.
- CIP. 2022a. Base de datos de Banco de Germoplasma. CIP (Centro Internacional de la Papa). Consultado el 03 de mayo de 2022 de: <https://genebank.cipotato.org/gringlobal/search.aspx>.
- CIP. 2022b. Catalogue of potato varieties and advanced clones. CIP (Centro Internacional de la Papa). Consultado el 03 de mayo de 2022 de: [https://research.cip.cgiar.org/cipcatlg\\_ac/Catalogue.php?cipnumber=CIP380389.1](https://research.cip.cgiar.org/cipcatlg_ac/Catalogue.php?cipnumber=CIP380389.1).
- Coste S., Baraloto C., Leroy C., Marcon É., Renaud A., Richardson A.D., Roggy J.-C., Schimann H., Uddling J. & Hérault B. 2010. Assessing foliar chlorophyll contents with the SPAD-502 chlorophyll meter: a calibration test with thirteen tree species of tropical rainforest in French Guiana. *Annals of Forest Science*, 67(6): Art. 607. DOI: 10.1051/forest/2010020.
- Ding P., Fuchigami L.H. & Scagel C.F. 2009. Simple Linear Regression and Reflectance Sensitivity Analysis Used to Determine the Optimum Wavelengths for the Nondestructive Assessment of Chlorophyll in Fresh Leaves Using Spectral Reflectance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(1): 48–57. DOI: 10.21273/JASHS.134.1.48.
- Endo T., Okuda T., Tamura M. & Yasuoka Y. 2001a. Estimation of net photosynthetic rate based on in-situ hyperspectral data. In: Smith W.L. & Yasuoka Y. (Eds) *Hyperspectral Remote Sensing of the Land and Atmosphere*. Second International Asia-Pacific Symposium on Remote Sensing of the Atmosphere, Environment, and Space; 9-12 October 2000; Sendai, Japan. PROCEEDINGS, Vol. 4151: 214–221. SPIE. DOI: 10.1117/12.417010.
- Endo T., Yasuoka Y., Tamura M. & Lab Y. 2001b. Spatial estimation of biochemical parameters of leaves with hyperspectral imager. In: 22nd Asian Conference on Remote Sensing, 5 - 9 November 2001, Singapore. PROCEEDINGS, HSI-02. Center for Remote Imaging, Sensing and Processing (CRISP), National University of Singapore; Singapore Institute of Surveyors and Values (SISV); Asian Association on Remote Sensing (AARS). <https://a-a-r-s.org/proceeding/ACRS2001/Papers/HSI-02.pdf>.
- Frankenberg C., Köhler P., Magney T.S., Geier S., Lawson P., Schwachert M., McDuffie J., Drewry D.T., Pavlick R. & Kuhnert A. 2018. The Chlorophyll Fluorescence Imaging Spectrometer (CFIS), mapping far red fluorescence from aircraft. *Remote Sensing of Environment*, 217: 523–536. DOI: 10.1016/j.rse.2018.08.032.
- Hawkins T.S., Gardiner E.S. & Comer G.S. 2009. Modeling the relationship between extractable chlorophyll and SPAD-502 readings for endangered plant species research. *Journal of Nature Conservation*, 17(2): 123–127. DOI: 10.1016/j.jnc.2008.12.007.
- Kira O., Linker R. & Gitelson A. 2015. Non-destructive estimation of foliar chlorophyll and carotenoid contents: Focus on informative spectral bands. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 38: 251–260. DOI: 10.1016/j.jag.2015.01.003.
- Knipling E.B. 1970. Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-infrared radiation from vegetation. *Remote Sensing of Environment*, 1(3): 155–159. DOI: 10.1016/S0034-4257(70)80021-9.
- Lee E.T.Y. 1982. A simplified B-spline computation routine. *Computing*, 29(4): 365–371. DOI: 10.1007/BF02246763.
- Li D., Cheng T., Zhou K., Zheng H., Yao X., Tian Y., Zhu Y. & Cao W. 2017. WREP: A wavelet-based technique for extracting the red edge position from reflectance spectra for estimating leaf and canopy chlorophyll contents of cereal crops. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 129: 103–117. DOI: 10.1016/j.isprsjprs.2017.04.024.
- Lichtenthaler H.K. & Buschmann C. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1): F4.3.1-F4.3.8. DOI: 10.1002/0471142913.faf0403s01.
- LI-COR. 1989. LI-1800 Portable Spectroradiometer Instruction Manual. LICOR Inc. Lincoln, Nebraska. <https://licor.app.boxenterprise.net/s/k8mr6zd0h6bjndwmqn6h>.
- LI-COR. 1990. LI-1800-02 Optical Radiation Calibrator Instruction Manual. LI-COR Inc. Lincoln, Nebraska. <https://licor.app.boxenterprise.net/s/zx7hyrmk072qqiye1pvl>.
- Lin F.F., Qiu L.F., Deng J.S., Shi Y.Y., Chen L.S. & Wang K. 2010. Investigation of SPAD meter-based indices for estimating rice nitrogen status. *Computers and Electronics in Agriculture*, 71(Supplement 1): S60–S65. DOI: 10.1016/j.compag.2009.09.006.
- Minolta. 1989. Chlorophyll Meter SPAD-502; Instruction Manual. Minolta Co., Ltd., Radiometric Instruments Operations. Osaka, Japan. [https://www.konicaminolta.com.cn/instruments/download/manual/pdf/SPAD-502\\_Manual.pdf](https://www.konicaminolta.com.cn/instruments/download/manual/pdf/SPAD-502_Manual.pdf).
- Mochizuki N., Tanaka R., Grimm B., Masuda T., Moulin M., Smith A.G., Tanaka A. & Terry M.J. 2010. The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends in Plant Science*, 15(9): 488–498. DOI: 10.1016/j.tplants.2010.05.012.
- Moran J.A., Mitchell A.K., Goodman G. & Stockburger K.A. 2000. Differentiation among effects of nitrogen fertilization treatments on conifer seedlings by foliar reflectance: a comparison of methods. *Tree Physiology*, 20(16): 1113–1120. DOI: 10.1093/treephys/20.16.1113.
- Murillo-Amador B., Ávila-Serrano N.Y., García-Hernández J.L., López-Aguilar R., Troyo-Diéguez E. & Kaya C. 2004. Relationship between a nondestructive and an extraction method for measuring chlorophyll contents in cowpea leaves. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 167(3): 363–364. DOI: 10.1002/jpln.200320361.
- Parry C., Blonquist Jr. J.M. & Bugbee B. 2014. In situ measurement of leaf chlorophyll concentration: analysis of the optical/absolute relationship. *Plant, Cell & Environment*, 37(11): 2508–2520. DOI: 10.1111/pce.12324.

- Puangbut D., Jogloy S. & Vorasoot, N. 2017. Association of photosynthetic traits with water use efficiency and SPAD chlorophyll meter reading of Jerusalem artichoke under drought conditions. *Agricultural Water Management*, 188: 29–35. DOI: 10.1016/j.agwat.2017.04.001.
- Putra B.T.W., Wirayuda H.C., Syahputra W.N.H. & Prastowo E. 2022. Evaluating in-situ maize chlorophyll content using an external optical sensing system coupled with conventional statistics and deep neural networks. *Measurement*, 189: Art. 110482. DOI: 10.1016/j.measurement.2021.110482.
- Ramírez D.A., Yactayo W., Gutiérrez R., Mares V., De Mendiburu F., Posadas A. & Quiroz R. 2014. Chlorophyll concentration in leaves is an indicator of potato tuber yield in water-shortage conditions. *Scientia Horticulturae*, 168: 202–209. DOI: 10.1016/j.scienta.2014.01.036.
- Rao N.R., Garg P.K., Ghosh S.K. & Dadhwal V.K. 2008. Estimation of leaf total chlorophyll and nitrogen concentrations using hyperspectral satellite imagery. *The Journal of Agricultural Science*, 146(1): 65–75. DOI: 10.1017/S0021859607007514.
- Rolando J.L., Ramírez D.A., Yactayo W., Monneveux P. & Quiroz R. 2015. Leaf greenness as a drought tolerance related trait in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 110: 27–35. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2014.09.006.
- Roosjen P.P.J., Brede B., Suomalainen J.M., Bartholomeus H.M., Kooistra L. & Clevers J.G.P.W. 2018. Improved estimation of leaf area index and leaf chlorophyll content of a potato crop using multi-angle spectral data – potential of unmanned aerial vehicle imagery. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 66: 14–26. DOI: 10.1016/j.jag.2017.10.012.
- Schepers J.S., Blackmer T. M., Wilhelm W.W. & Resende M. 1996. Transmittance and Reflectance Measurements of Corn Leaves from Plants with Different Nitrogen and Water Supply. *Journal of Plant Physiology*, 148(5): 523–529. DOI: 10.1016/S0176-1617(96)80071-X.
- Shi S., Xu L., Gong W., Chen B., Chen B., Qu F., Tang X., Sun J. & Yang J. 2022. A convolution neural network for forest leaf chlorophyll and carotenoid estimation using hyperspectral reflectance. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 108: Art. 102719. DOI: 10.1016/j.jag.2022.102719.
- Song D., Gao D., Sun H., Qiao L., Zhao R., Tang W. & Li M. 2021a. Chlorophyll content estimation based on cascade spectral optimizations of interval and wavelength characteristics. *Computers and Electronics in Agriculture*, 189: Art. 106413. DOI: 10.1016/j.compag.2021.106413.
- Song D., Qiao L., Gao D., Li S., Li M., Sun H. & Ma J. 2021b. Development of crop chlorophyll detector based on a type of interference filter optical sensor. *Computers and Electronics in Agriculture*, 187: Art. 106260. DOI: 10.1016/j.compag.2021.106260.
- Sui J., Qin Q., Ren H., Sun Y., Yuan H. & Zhang T. 2018. A Modified Ratio Vegetation Index: A Novel Method for Remote Estimation of Leaf Chlorophyll Content for Winter Wheat. *In: IGARSS 2018 - 2018 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium*. 7354–7357. Proceedings of the IEEE. DOI: 10.1109/IGARSS.2018.8517909.
- Tanaka R. & Tanaka A. 2011. Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(8): 968–976. DOI: 10.1016/j.bbabo.2011.01.002.
- 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.
- Van der Mescht A., De Ronde J. & Rossouw F. 1999. Chlorophyll fluorescence and chlorophyll content as a measure of drought tolerance in potato. *South African Journal of Science*, 95(9): 407–412. [https://hdl.handle.net/10520/AJA00382353\\_8045](https://hdl.handle.net/10520/AJA00382353_8045).
- Wang H.-f., Huo Z.-g., Zhou G.-s., Liao Q.-h., Feng H.-k. & Wu L. 2016. Estimating leaf SPAD values of freeze-damaged winter wheat using continuous wavelet analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 98: 39–45. DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.10.032.
- Yuan Z., Ata-Ul-Karim S.T., Cao Q., Lu Z., Cao W., Zhu Y. & Liu X. 2016. Indicators for diagnosing nitrogen status of rice based on chlorophyll meter readings. *Field Crops Research*, 185: 12–20. DOI: 10.1016/j.fcr.2015.10.003.
- Zhang J., Tian H., Wang D., Li H. & Mouazen A.M. 2021. A novel spectral index for estimation of relative chlorophyll content of sugar beet. *Computers and Electronics in Agriculture*, 184: Art. 106088. DOI: 10.1016/j.compag.2021.106088.
- Zhang K., Ge X., Liu X., Zhang Z., Liang Y., Tian Y., Cao Q., Cao W., Zhu Y. & Liu X. 2017. Evaluation of the chlorophyll meter and GreenSeeker for the assessment of rice nitrogen status. *Advances in Animal Biosciences*, 8(2), 359–363. DOI: 10.1017/S2040470017000917.
- Zhang X., Sun H., Qiao X., Yan X., Feng M., Xiao L., Song X., Zhang M., Shafiq F., Yang W. & Wang C. 2022. Hyperspectral estimation of canopy chlorophyll of winter wheat by using the optimized vegetation indices. *Computers and Electronics in Agriculture*, 193: Art. 106654. DOI: 10.1016/j.compag.2021.106654.
- Zhao R., An L., Tang W., Gao D., Qiao L., Li M., Sun H. & Qiao J. 2022. Deep learning assisted continuous wavelet transform-based spectrogram for the detection of chlorophyll content in potato leaves. *Computers and Electronics in Agriculture*, 195: Art. 106802. DOI: 10.1016/j.compag.2022.106802.
- Zhao Y., Yan C., Lu S., Wang P., Qiu G.Y. & Li R. 2019. Estimation of chlorophyll content in intertidal mangrove leaves with different thicknesses using hyperspectral data. *Ecological Indicators*, 106: Art. 105511. DOI: 10.1016/j.ecolind.2019.105511.
- Zheng T., Liu N., Wu L., Li M., Sun H., Zhang Q. & Wu J. 2018. Estimation of Chlorophyll Content in Potato Leaves Based on Spectral Red Edge Position. *IFAC-PapersOnLine*, 51(17): 602–606. DOI: 10.1016/j.ifacol.2018.08.131.
- Zhu Y., Mao H., Li P. & Wu Y. 2011. Measurement of lettuce leaf chlorophyll content by means of VIS-NIR spectroscopy. *In: International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering*. 2250–2253. Proceedings of the IEEE. DOI: 10.1109/RSETE.2011.5964758.

---

<sup>1</sup> International Potato Center (CIP). Crop and Systems Sciences Division. Lima, Perú. ORCID: 0000-0002-4145-5453. Autor de correspondencia: h.loayza@cgiar.org.

<sup>2</sup> Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias, Departamento Académico de Biología. Lima, Perú. ORCID: 0000-0003-1164-1762. acalderon@lamolina.edu.pe.

<sup>3</sup> International Potato Center (CIP). Genetic and Crop Improvement Division. Lima, Perú. (hasta el 2013). ORCID: 0000-0002-9238-5328. raymundo.gutierrez.r@gmail.com.

<sup>4</sup> Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC). Facultad de Ciencias Agrarias. Cusco, Perú. ORCID: 0000-0002-4389-2227. elisabet.cespedes@unsaac.edu.pe.

<sup>5</sup> International Potato Center (CIP). Crop and Systems Sciences Division. Lima, Perú. raquirozguerra@cgiar.org. (hasta el 2018).

Director de Educación y Decano de la Escuela de Posgrado / CATIE-Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba / Cartago / Costa Rica 30501. ORCID: 0000-0001-8401-2700. Roberto.quiroz@catie.ac.cr.