

Técnicas de diagnóstico en campo del estado nutrimental de nitrógeno en maíz

Field diagnostic techniques to determine nitrogen status nutrition in maize

RESUMEN

Existen pocas tecnologías, aparte del análisis foliar clásico de laboratorio, que pueden emplear los productores para dar seguimiento al estado nutrimental que guardan los cultivos a lo largo del ciclo vegetativo. Este es el caso particular del maíz. Sin embargo, se dispone de métodos alternativos, de carácter semicuantitativo para medir la situación del nitrógeno (N) en el maíz en campo, pero para que sean efectivos, deben ser calibrados regionalmente contra el procedimiento estándar de laboratorio. En este ensayo se calibraron cuatro métodos semicuantitativos y dos cuantitativos, para diagnosticar la condición nutrimental del nitrógeno (N) del maíz en el Bajío guanajuatense. Para ello se estableció un experimento en el ciclo agrícola 2019. Los tratamientos fueron dosis crecientes de N (0, 120, 240, 360, 480 kg de N·ha⁻¹). Cada tratamiento se repitió cinco veces. Los métodos semicuantitativos calibrados fueron: concentración de nitrógeno nítrico (N-NO₃) del extracto celular (EC) de la nervadura central (NC) de la hoja recientemente madura (HRM), N-NO₃ del EC en la base del tallo (BT), observación de las unidades SPAD, Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI) y dos métodos cuantitativos de laboratorio: N-NO₃ en la materia seca (MS) de la BT y N total foliar. Estas mediciones se realizaron en las etapas fenológicas V7, V12, R1 del maíz, y en R5 cuando se evaluó el N-NO₃ en la BT. Los resultados de las mediciones realizadas con cada método, fueron correlacionados con el rendimiento relativo de grano (RR). Se aceptaron aquellas asociaciones que tuvieron un coeficiente de correlación (r) superior a 0.70. Para cada método se estimó mediante una combinación de técnicas aritmética y gráfica, una concentración crítica (CC), definida como la concentración suficiente para que el cultivo alcanzase un rendimiento relativo (RR) de 90 %. El trabajo constituye un modelo de cómo abordar el problema del diagnóstico de la nutrición nitrogenada en campo. Las CC propuestas en este trabajo para diferentes estados fenológicos, se deben entender como preliminares y requieren ser validadas a nivel de explotaciones comerciales en campo.

Palabras clave: *Nervadura central, concentración crítica, extracto celular, nitrógeno nítrico, NDVI, SPAD, nitrógeno total.*

SUMMARY

There are few available technologies for quantifying the nutritional status of crops during their vegetative cycle. Such is the case of maize. However, there are semiquantitative alternatives to the classical approach of the lab foliar analysis, which measure the maize's nitrogen (N) on the field, although they require regional calibration against standard lab tests. In this project, we calibrated four of these semiquantitative methods and two quantitative ones for diagnosing the nutritional status of maize in the Bajío region, in the state of Guanajuato. We arranged an experiment during the agricultural cycle 2019, where we tested doses of 0, 120, 240, 360, and 480 Kg of N·ha⁻¹. We repeated each test five times. We worked with the following semiquantitative methods: nitrate concentration (N-NO₃) of the cell extract of the midrib of the recently mature leaf, N-NO₃ of the cell extract in the base stem, SPAD unit record, the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI). Additionally, we utilized the quantitative lab methods of base stem dry-matter (DM) N-NO₃, and total foliar N. We acquired the data at different phenological stages: V7, V12, R1 as well as R5 for the N-NO₃ in the base stem. We then correlated these results with the grain's relative yield (RY) and accepted those above a correlation coefficient (r) greater than 0.7. Later, using an arithmetical-graphic technique, we estimated a critical concentration (CC) for the crop to reach an RY to 90% for each method. The proposed CCs are a preliminary result that require further validation before being used in a commercial application. On synthesis, the project consists of proposing a method for diagnosing the nitrogen nutrition on the field.

Index words: Central vein, midrib, critical concentration, cellular extract, nitrate-nitrogen, NDVI, SPAD, total nitrogen.

INTRODUCCIÓN

Para lograr rendimientos cuantitativa y cualitativamente superiores, sin perjudicar el ecosistema, la práctica agrícola demanda actividades de manejo para controlar la nutrición de las plantas. Entre éstas se encuentra el control de la fertilidad del suelo por métodos químicos, y examinar si la aplicación de la fertilización ha sido la adecuada. Como la demanda de nutrientes varía en función del estado de desarrollo del cultivo, se busca conocer la dinámica de la concentración de uno o varios elementos esenciales en el tejido vegetal en diferentes estados fenológicos. Este conocimiento permite realizar prácticas de manejo para satisfacer la demanda nutrimental de la planta mediante una eficiente fertilización del cultivo y simultáneamente cuidar al ambiente (Dobermann, 2005; IPNI, 2013).

El análisis químico de tejido vegetal para diagnosticar el abasto nutrimental de los cultivos, no obstante su confiabilidad, presenta limitaciones para su uso masivo (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2017) como son: conocimiento impreciso de la época de recolección de muestra, costo alto, demora en la obtención de los resultados y dificultad de interpretación de los resultados, particularmente en el caso del N, que es el elemento mayormente demandado, por ser el suministro del suelo generalmente limitado para el cultivo de maíz.

Para diagnosticar el abasto de N para los cultivos, en la última mitad del siglo pasado, comenzaron a desarrollarse métodos alternos de fácil acceso y económicos (Rauschkolb *et al.*, 1974; Schepers *et al.*, 1992; Withers, 1982). En la actualidad los métodos semicuantitativos disponibles ofrecen resultados rápidos, para realizar ajustes en la dosis del plan de fertilización durante el ciclo agrícola (Justes *et al.*, 1997; Etchevers, 1999), de costo intermedio (Muñoz-Huerta *et al.*, 2013) y fácil interpretación (Rauschkolb *et al.*, 1974). Sin embargo, deben calibrarse previamente para cada cultivo, posiblemente variedad y zona agroecológica específica.

La calibración de un método de diagnóstico nutrimental, consiste en obtener una curva de la biomasa producida o el rendimiento del producto de interés económico, en respuesta a la aplicación de dosis crecientes de un nutriente. La acumulación de biomasa, producto de la aplicación de dosis crecientes de fertilizante, se relaciona con los resultados de mediciones que se hacen en muestras específicas (extracto celular, extracto de materia seca) de un órgano o parte específica de la planta, que se recolectan en un estado fenológico definido y de acuerdo a un protocolo preestablecido. El mayor éxito de la calibración se logra cuando el cultivo experimental se desarrolla en ausencia de condiciones deficitarias de cualquier factor de crecimiento (nutrientes diferentes al estudiado, agua, luz, temperatura, etc.) como lo señalan numerosos investigadores (Mills y Jones, 1996; Smith y Loneragan, 1997; Alcántar-González *et al.*, 1999; Etchevers, 1999).

Varios métodos semicuantitativos, con diversos principios de funcionamiento: electroquímico, colorimetría, óptica, actividad enzimática, fototeledetección, actividad fotoquímica por mencionar algunos (Sánchez-García *et al.*, 2016) se han probado para diagnosticar el estado del N en cultivos. Por ejemplo, Reuter *et al.* (1997) y Mills y Jones, (1996) sugirieron el uso de medidores portátiles de iones específicos de principio electroquímico, para el análisis de N-NO₃ del extracto celular e incluyeron un apartado con rangos de interpretación para diferentes cultivos. Estos autores indicaron, además, la factibilidad de usar lectores ópticos de clorofila, como el SPAD 502® (Minolta, Osaka Japón) para ese propósito. Para el caso del maíz, Reuter *et al.* (1997) presentan los rangos

de N-NO₃ en la materia seca en la BT del maíz, útiles para interpretar los resultados de ese análisis. Los métodos alternativos para el diagnóstico N en cultivos y su funcionamiento, trabajos de calibración de estos en diferentes cultivos, características sobre las relaciones lineares o no lineares de los métodos con otros procedimientos de diagnóstico más robustos, y otros aspectos particulares para su implementación se han compilado en extensas revisiones de literatura (Lemaire *et al.*, 2008; Titolo, 2012; Muñoz-Huerta *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2017; Rhezali y Lahlali, 2017; Colaço y Bramley, 2018).

El objetivo del trabajo consistió en calibrar cinco métodos semicuantitativos de campo y dos cuantitativos de laboratorio, con experimentos de campo, para diagnosticar el estado nutrimental del N en maíz en el Bajío de Guanajuato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se establecieron parcelas experimentales con un cultivo de maíz y se fertilizaron con dosis crecientes de N, en un lote comercial del municipio de Juventino Rosas, Guanajuato (20°35'19.2" N, 100°56'46.8" O). El suelo del sitio se clasificó como Vertisol pélico (WRB, 2015). Un año de antes del establecimiento de la siembra experimental se abatió el N residual del sitio sembrando maíz sin fertilización. El incremento de profundidad 0-0.30 m del suelo tenía las siguientes características: densidad aparente 1.1 g·cm³, conductividad hidráulica de 0.77 cm·h⁻¹, pH = 7.0, capacidad de intercambio catiónico = 34 cmol⁽⁺⁾·kg⁻¹ y contenido de materia orgánica = 2.0 %. Después del blanqueo, el suelo contenía 89 kg·ha⁻¹ de N-NO₃ en los primeros 0.60 metros.

El experimento consistió de 25 unidades experimentales (UE), con un área de 30.4 m² cada una: Cada UE consistió de cinco surcos 0.76 m aparte y 8 m de longitud, que se sembraron el 23 de mayo de 2019 con una densidad que al momento de la cosecha fue de 95,000 plantas por ha⁻¹. Los tratamientos de fertilización fueron cinco dosis de N (0, 120, 240, 360, 480 kg·ha⁻¹). Cada tratamiento se repitió cinco veces. Las UE se acomodaron en función de un diseño de bloques al azar.

La aplicación de N se realizó en tres diferentes oportunidades: (a) al momento de la siembra se aplicó 35% de la dosis correspondiente a cada tratamiento, utilizando como fuentes MAP y sulfato de amonio, excepto en el testigo que recibió superfosfato de calcio triple (0-46-0) en lugar de MAP, para mantenerlo así sin nitrógeno. A los tratamientos con 120 o más kg ha⁻¹ de N, se les fertilizó: (a) inicialmente con 52 kg ha⁻¹ con MAP como fuente de N y el resto de la dosis requerida, según el tratamiento, se completó con sulfato de amonio en las siguientes fechas posteriores; (b) 20 días después de la siembra (dds) se añadió 35% de la correspondiente dosis total de N como urea; y (c) finalmente, 54 dds se aplicó la tercera fertilización, *i.e.*, 35% restante de las dosis de N, como sulfato de amonio. Todo el lote experimental recibió, al momento de la siembra, una fertilización basal de fósforo y potasio con 200 kg·ha⁻¹ de P₂O₅ y 100 kg ha⁻¹ de K₂O aplicados como fosfato monoamónico y KCl, respectivamente. Se adicionaron 100 kg ha⁻¹ de K₂O en la segunda fertilización.

Cuando las plantas alcanzaron los estados fenológicos vegetativos V7, V12, al inicio de la etapa reproductiva o R1 y en el caso de mediciones de BT en R5, se recolectaron muestras de tejido vegetal para analizarse por cuatro métodos semicuantitativos y dos cuantitativos, para diagnosticar la condición nutrimental del nitrógeno (N). Las etapas del cultivo se seleccionaron de acuerdo a información preliminar (Castellanos *et al.*, 2019).

Concentración de N-NO₃ en extractos celulares de nervadura central y base del tallo

En cada UE se recolectaron 12 nervaduras centrales (NC) de hojas recientemente maduras (HRM) en las oportunidades arriba señaladas. En la etapa R1 las muestras se obtuvieron de la hoja que envolvía al jilote (flor femenina de maíz) y la de la base de tallo (BT) (diez secciones de 15 cm tomadas 10 cm arriba de la superficie del suelo) (Binford *et al.*, 1990). Las muestras se recolectaron entre las 8:00 y 10:00 am y se guardaron en bolsas plásticas a ~5 °C para transportarlas al laboratorio. En éste las NC y BT se comprimieron con una prensa manual (Cadahía-López, 2008) y se colectó el extracto celular (EC) que fue diluido en agua destilada (1:10) para disminuir interferencias (Di Gioia *et al.*, 2010). Las muestras se mantuvieron en refrigeración (5 °C) hasta su análisis y previo a este se homogeneizaron con un aparato que genera un vórtice. La concentración de N-NO₃ del EC se determinó con un equipo portátil LAQUAtwin® modelo NO3-11 (Horiba Kyoto, Japón) de principio electroquímico. La determinación N-NO₃ del EC se realizó por triplicado y se verificó que el coeficiente de variación no excediera al 15%; en caso contrario se repitió el análisis. El promedio de cada análisis triplicado se multiplicó por el factor de dilución (x10) antes de reportarlo. El medidor de N-NO₃ se calibró con las soluciones recomendadas por el fabricante (150 y 2000 mg L⁻¹ de NO₃) cada dos series de triplicados.

Concentración de N-NO₃ en la materia seca de la base del tallo

En los muestreos V7, V12, R1 y R5 se colectaron 10 fracciones de BT de plantas, en competencia completa, por cada UE. Las muestras se identificaron y transportaron al laboratorio para su secado con aire forzado a 70 °C, hasta peso constante. El material vegetal se molió y cribó a través de una malla de 0.42 mm para determinarles la concentración N-NO₃ (Cataldo *et al.*, 1975).

Monitoreo en hojas recientemente maduras con unidades SPAD

En la etapa fenológica V7 se eligieron 15 plantas con competencia completa, ubicadas en los surcos centrales de cada unidad experimental y fueron señaladas (etiquetadas). En estas plantas se realizaron mediciones de las unidades SPAD en cada oportunidad de muestreo (V7, V12, R1). Se midió la concentración relativa de la clorofila sobre la lámina media y a un costado de la nervadura de HRM cuando la planta presentó las etapas fenológicas V7 y V12 y en el último muestreo (R1), la medición se realizó en la hoja que envolvía al jilote. Las mediciones se realizaron con un equipo MC-100® (Apoge Instruments USA) configurado para leer unidades SPAD. Se hicieron 15 lecturas por UE, y se calculó el promedio y el coeficiente de variación (CV). Si este resultó mayor a 15 % se repitió la medición.

Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI)

Las unidades NDVI se midieron en las etapas fenológicas V7, V12 y R1 con un dispositivo manual GreenSeeker® (Trimble Agriculture, USA). En cada parcela la lectura se realizó por triplicado sobre el dosel de los surcos centrales de cada UE para evitar el efecto orilla. El dispositivo se desplazó sobre las plantas a 0.60 m de su ápice. El recorrido se hizo en línea recta, a una velocidad constante de 0.5 m s⁻¹. Cada lectura se hizo por triplicado.

Análisis de nitrógeno foliar

En las etapas V7 y V12 se colectaron 12 tercios medios de HRM y en R1 los tercios medios de las hojas que envolvían al jilote, en cada unidad experimental. A las muestras se les determinó el contenido de N total por el método de Dumas (AOAC, 2005), en un analizador elemental (FlashEA 1112 ® Thermo Fisher Scientific, USA).

Cosecha

Cuando el maíz alcanzó la madurez fisiológica (R6) se cosecharon manualmente las mazorcas en 1.52 m², en los surcos centrales de cada UE, evitando las orillas. La mazorcas se desgranaron y se cuantificó el rendimiento ajustado a 155 kg de humedad por tonelada (CIMMYT, 2012).

Análisis estadísticos

A los resultados de rendimiento se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si había diferencias significativas entre los tratamientos de fertilización de N. Adicionalmente se practicó una comparación de medias con la prueba Duncan ($\alpha=0.05$). Los rendimientos de cada UE se expresaron como porcentaje de rendimiento relativo (RR) en (Ecuación 1).

$$RR = \left(\frac{\text{Rendimiento de grano de la parcela experimental}}{\text{Rendimiento de grano promedio del tratamiento con } 480 \text{ kg de N} \cdot \text{ha}^{-1}} \right) 100$$

Los resultados de las mediciones realizadas en los estados fenológicos y con cada uno de los métodos descritos, se relacionaron gráfica y estadísticamente con los respectivos RR obtenidos a la cosecha. Los datos se ajustaron, con un modelo de funciones segmentadas conocido como linear-meseta o linear-plateau (LM) (Sprent, 1961) que permite obtener una relación lineal ascendente y luego una meseta o “plateau” que indica la estabilización de la variable de respuesta en el eje de las “Y” con respecto al incremento de la variable experimental dispuesta en el eje de la “X”. La variable “Y” corresponde al rendimiento relativo y la variable “X” al valor de la medición resultado de aplicar un método de diagnóstico. El punto donde la curva presenta la inflexión y se hace paralela al eje de la X, se levanta una normal, el cruce de dicha normal con la concentración de N-NO₃ se le conoce como concentración crítica (CC) o valor crítico (VC) de la variable en estudio. Los ajustes de datos a los modelos ML se realizaron con significancia ($P<0.05$). En la etapa R5 se realizaron mediciones de N-NO₃ de EC de la BT y N-NO₃ de la MS de BT y se relacionaron con el RR mediante el procedimiento Cate-Nelson; este procedimiento permite estimar una CC en función de la mínima suma de cuadrados (Cate y Nelson, 1971). Este enfoque clasifica a la variable del eje de las “Y” en dos cuadrantes con el mínimo error. Se determinó de forma arbitraria un rango de concentración $\pm 5\%$ alrededor de la concentración crítica estimada. Los coeficientes de correlación y las ecuaciones que se presentan en las Figuras 1 a 6, corresponden a la parte lineal ascendente de la función meseta-lineal.

Todos los análisis estadísticos se gestionaron con el programa estadístico R versión 3.5.1 (The R Foundation for Statistical Computing, 2018).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Rendimiento de grano

El rendimiento de grano de maíz respondió significativamente ($P < 0.001$) a la aplicación de dosis crecientes de fertilización nitrogenada; la aplicación de 0, 120, 240, 360 y 480 kg·ha⁻¹ de nitrógeno produjo 5.8, 11.2, 13.9, 15.7 y 18.3 Mg·ha⁻¹. La relación entre la dosis de N y el rendimiento de grano se ajustó a una función cuadrática ($P < 0.01$) con un coeficiente de ajuste (R^2) de 0.86, es decir que 86 % del rendimiento fue explicada por la dosis de N aplicada.

En el Cuadro 1 se presentan las concentraciones críticas (CC) estimadas con cada método de diagnóstico para tres estados fenológicos (V7, V12, R1) y en el caso de los diagnósticos que emplean base del tallo se incluyó una CC estimada en R5. Adicionalmente, se incluye un porcentaje de desviación de esa media, que se considera un rango arbitrario donde la concentración de N de la planta sería adecuada.

Cuadro 1. Valores críticos en diferentes estadios fenológicos del maíz estimados en la RML por varios métodos de diagnóstico en V7, V12 y R1 usando el procedimiento de meseta lineal propuesto por Sprent (1961) y en R5 usando el procedimiento propuesto por Cate y Nelson (1971) †.

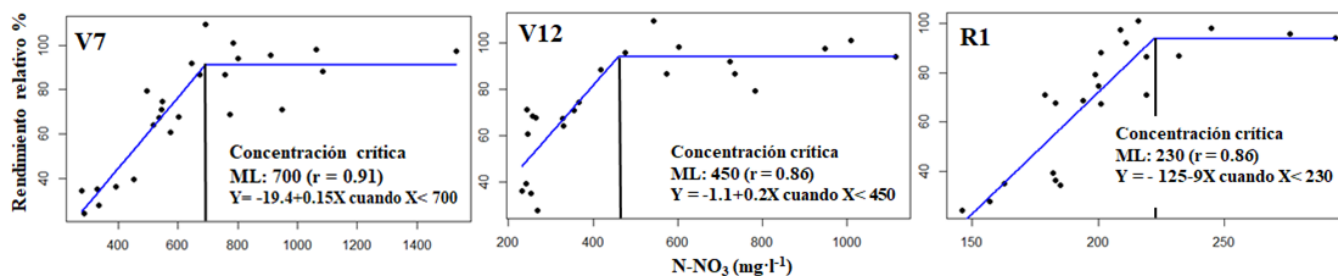
Diagnostic method	Measurement unit	V7		V12		R1		R5	
		CC	±5%‡	CC	±5%‡	CC	±5%‡	CC	±5%‡
N-NO ₃ en la savia de la nervadura central	mg·L ⁻¹	700	35	450	22	230*	11	-	-
N-NO ₃ en la base de la savia del tallo	mg·L ⁻¹	330	16	460	23	370	18	350†	17
N-NO ₃ en la base de materia seca del tallo	mg·kg ⁻¹	8500	425	8300	415	7000	350	2647†	132
Unidades NDVI	NDVI	81	4	83	4.1	80	4	-	-
Unidades SPAD	SPAD	43	2	39	2	47*	2	-	-
N total foliar	% N	3.4	0.17	2.2	0.11	2.6*	0.13	-	-

‡ Los rangos de concentración se establecieron considerando ± 5% de cada concentración crítica estimada. † Muestras de la hoja que envuelve al jilote.

Concentración de N-NO₃ en el extracto celular de la nervadura central

La concentración de N-NO₃ en el EC de la NC de las HRM, medida en las etapas fenológicas V7, V12, R1, se asoció con la componente lineal ascendente de la respuesta expresada en RR del rendimiento de grano. Los coeficientes de correlación (r) de esta asociación fueron mayores a 0.86 (Figura 1).

Figura 1. Modelación de la concentración de N-NO₃ en el EC de la NC de la HRM y su relación con RR por etapas fenológicas V7, V12 y R1*. *Nervadura central de la hoja que envuelve al jilote. ML: concentración crítica estimada con el modelo lineal meseta. estimado con el modelo Lineal-plateau (Sprenst, 1961).



La CC y el rango estimado en V7, se situó en 700 ± 35 mg·L⁻¹ de N-NO₃. Este resultado coincide con la CC propuesta de Withe *et al.*, (1996) para un rendimiento de 15 Mg ha⁻¹ de elote fresco. Reed y Hageman (1980) reportaron que en V7, aproximadamente 20% del total de iones nitrato presentes en la planta se encuentra en la NC de las hojas, en tanto que en V12 la CC de N-NO₃ en el EC de la NC y su respectivo rango fue 450 ± 22 mg·L⁻¹. Al comparar las CC y sus respectivos rangos de concentración adecuada, estimados en V7 y V12, se observa una disminución del segundo, provocado por el efecto de dilución descrito por Plénet y Lemaire (1999). Esto se explica porque la base de expresión de la concentración del N-NO₃, *i. e.*, la materia seca de la hoja incrementa con la edad de la planta. Al inicio de la etapa reproductiva R1, la CC y el rango considerado adecuado, se ubicó entre 230 ± 11 mg·L⁻¹ de N-NO₃. Este resultado contrastó con la CC sugerida por Reisenauer (1978), 500 mg·L⁻¹ para la misma etapa fenológica y hoja de muestreo, esto es, la envolvente del jilote principal, pero en un maíz dulce. Esta diferencia puede deberse a que los maíces dulces acumulan menos biomasa y por ello se presenta menor dilución de la concentración del N, a diferencia de los maíces para producir grano seco, que son de porte alto (el híbrido usado en este experimento es un maíz blanco y tuvo una altura promedio de ~ 2.80 m al inicio de la etapa reproductiva), y las diferencias en la concentración crítica entre maíces dulces y cristalinos es mayor conforme el ciclo avanza.

Concentración de N-NO₃ en el extracto celular de la base del tallo

La concentración de N-NO₃ en el EC de la BT del maíz en diferentes etapas fenológicas (V7, V12, R1) se asoció de forma positiva ($r > 0.83$) con el RR en la parte lineal del modelo meseta-lineal y en R5 lo datos se ajustaron al modelo Cate-Nelson (Figura 2).

Los resultados de CC estimados en las etapas fenológicas (V7, V12, R1 y R5), se ubicaron entre 330 y 480 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{N}\text{-NO}_3$ y, al menos, el límite inferior de este rango, coincidió con la CC reportada por Justes *et al.*, (1997) quienes evaluaron la relación entre el índice de nutrición de nitrógeno (NNI) (valor adimensional de entre 0 y 1.8 que obtiene al dividir una concentración de N total de un cultivo entre la concentración crítica de N total) y las concentraciones de $\text{N}\text{-NO}_3$ de EC de la BT de etapas fenológicas que van de V7 a R1. Ellos propusieron una CC general de 337 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{N}\text{-NO}_3$ y, la estimaron mediante la técnica de Cate – Nelson. Este valor representa la concentración mínima $\text{N}\text{-NO}_3$ en el EC de la BT para obtener un NNI igual o mayor a uno.

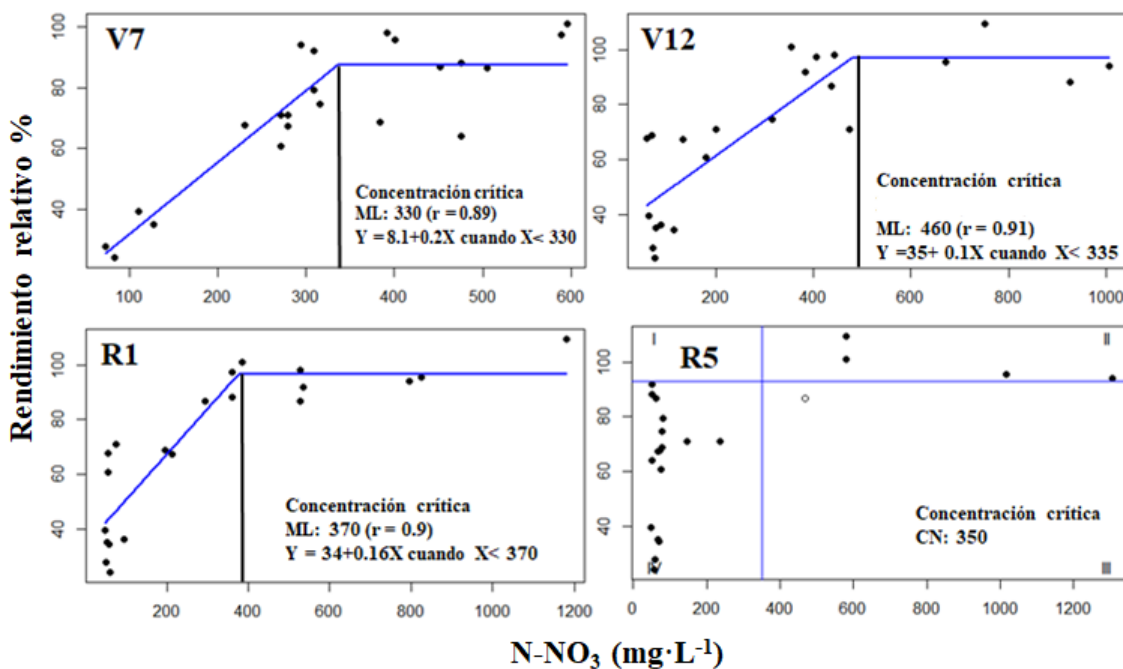


Figura 2. Modelación de la concentración de $\text{N}\text{-NO}_3$ en el EC de la BT y su relación con el RR para las etapas fenológicas V7, V12, R1 y R5. ML: concentración crítica estimada con el modelo lineal meseta. CN: concentración crítica estimada con el modelo Cate-Nelson

Concentración de N-NO₃ en la materia seca de la base de tallo

La concentración de N-NO₃ en MS de la BT medida en las etapas (V7, V12, R1) se asoció con el RR ajustando los datos al modelo lineal-meseta y en R5 se ajustó al modelo Cate-Nelson (Figura 3).

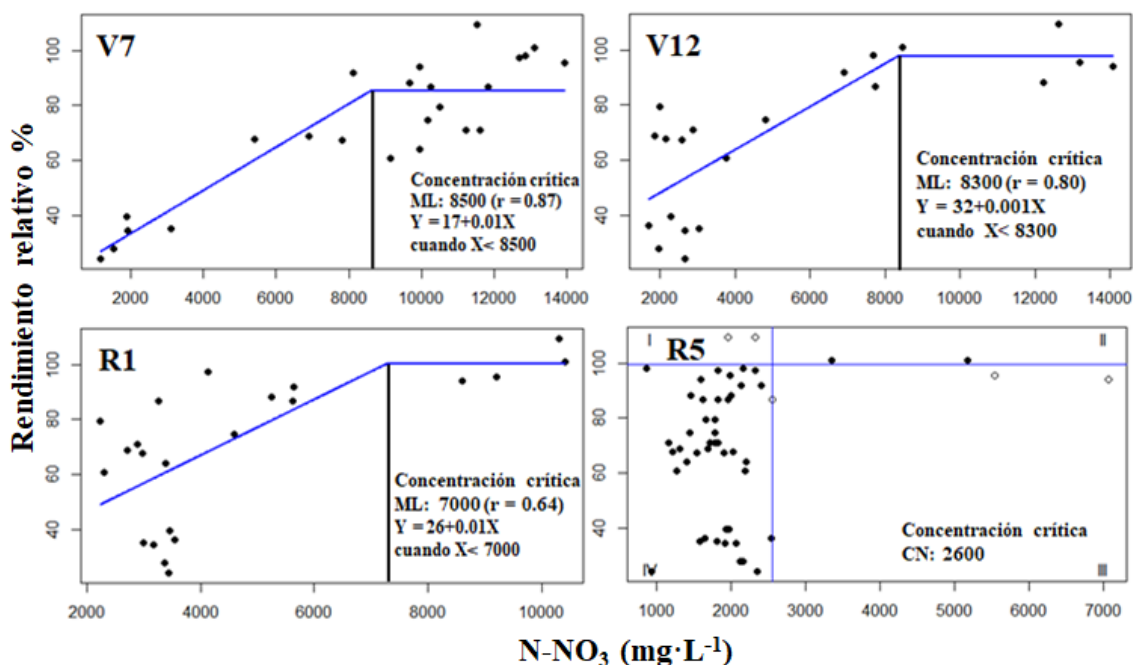


Figura 3. Modelación de la concentración de N-NO₃ de la MS de la BT y su relación con el RR por etapas fenológicas (V7, V12, R1 y R5). ML: concentración crítica, estimada con el modelo lineal meseta; CN: concentración crítica, estimada con el modelo Cate-Nelson.

El coeficiente de correlación de la componente lineal ascendente del modelo en las etapas V7 y V12, fue superior a 0.80, pero en R1 fue menor ($r = 0.64$). La CC en la etapa R5 se estimó mediante el procedimiento de Cate-Nelson, ya que los datos experimentales se ajustaban mejor a este modelo. Según Ta (1991) en esta etapa del periodo vegetativo, 40% del N de la planta de maíz se aloja en el tallo. En V7 la CC de N-NO₃ y el respectivo rango que se consideró como adecuado en la MS de BT, fue 8500 ± 425 mg·kg⁻¹, concentraciones que coinciden con los resultados reportados por Sainz-Rozas *et al.* (2001) para un maíz en etapa V6, que rindió 12 Mg·ha⁻¹. Los resultados de V7 contrastan con el rango de CC reportado por Reuter *et al.* (1997), 9000 a 17800 mg·kg⁻¹ de N-NO₃, valores que se corresponden con 95% del rendimiento relativo. En V12 la CC y su rango resultó ser 8300 ± 415 mg·kg⁻¹ de N-NO₃ y en R1 7000 ± 350 mg·kg⁻¹ de N-NO₃. Estos resultados coinciden con las CC propuestas por Heckman *et al.*, (2002), no obstante esta coincidencia debe tomarse

con cierta reserva pues la estimación de estos autores se realizó en etapas fenológicas de R2 y R3 de un maíz dulce cosechado en fresco. Según Dechorgnat *et al.* (2018) cada híbrido de maíz tiene preferencias particulares en la forma que absorben N (ion NH_4 o NO_3), y estaría influenciado por la condición edafoclimática en la cual se desarrolla. La concentración del nitrato en la materia seca del la base de tallo también es influida por la radiación solar y la humedad del suelo imperantes previo al muestreo (Fox *et al.*, 1989). Por ello es de esperarse que las CC pesenten algunas variaciones entre sitios y años (Sainz-Rozas *et al.*, 2001). Por lo anterior, los resultados del presente experimento deben considerarse preliminares y requieren de varios años de experimentacoin adicional y validación. Por lo que las CC reportadas con este y otros métodos, para las etapas vegetativas y el inicio de la floración, sólo son extrapolables regionalmente, mientras se genera más investigación. La extrapolación a otras condiciones ecosistémicas debe hacerse con reserva.

Con el objetivo de valorar al final del ciclo vegetativo si la aplicación de N que se realizó fue moderada o excesiva, Binford *et al.* (1990), de Iowa, propusieron hacer el análisis de N-NO_3 en la MS de BT, cuando el cultivo estuviese próximo a la etapa R6 (madurez fisiológica). Esta medición de N-NO_3 en la MS de BT se ha calibrado para diferentes regiones pedoclimáticas: norte de China (Huang, 2013); Sureste de Buenos Aires, Argentina (Sainz-Rozas *et al.*, 2001) y en Pennsylvania EUA (Fox *et al.*, 2001).

En el presente experimento se estimó una CC de N-NO_3 en la MS de BT en la etapa R5 de $2647 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ N-NO}_3$, cuando se consideró un RR de 95% para establecer dicho valor. Este valor estaría más próximo al límite superior de la concentración óptima, pues las CC estimadas por otros autores (Blackmer y Mallarino, 1996; Isla y Blackmer, 2007; Beegle y Rotz, 2009) se sitúan en un rango de entre ~ 700 a $\sim 2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de N-NO_3 . Alternativamente, podría especularse que la suma de la dosis de fertilización y el aporte de N que hizo el suelo fueron superiores a la demanda de N para alcanzar un RR del 95%, lo cual no es extraño en la zona.

Índice de vegetación de diferencia normalizada

La medición de unidades NDVI realizada sobre el dosel vegetal de maíz, en las etapas fenológicas (V7, V12, R1) se asociaron con el RR y se ajustaron al modelo lineal-meseta. En la parte lineal de la función el coeficiente de correlación fue superior a 0.70 (Figura 4).

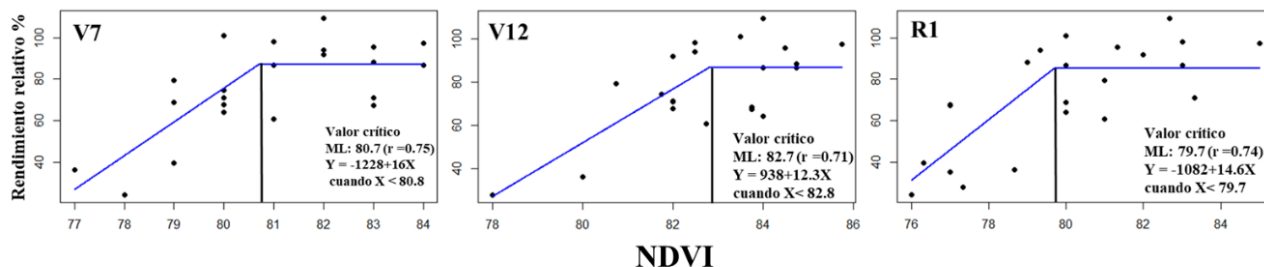


Figura 4. Relación de unidades NDVI con el RR etapas fenológicas V7, V12 y R1. ML: concentración crítica estimada con el modelo lineal meseta.

Como con este método no se mide la concentración de N-NO₃, llamaremos valor crítico (VC) al resultado de la medición. El VC del NDVI estimado en V7 (81) del maíz, fue menor, pero muy cercano al propuesto por Xinhua y McClure (2013) que fue de 83. Estos últimos autores estimaron un VC para V12 de 80 NDVI, valor menor en comparación con el estimado en este trabajo, de 84 unidades para la misma etapa. Cuando el cultivo alcanzó la etapa R1 el VC de NDVI fue de 80 unidades. La discrepancia en los resultados coincide con lo señalado por Inman *et al.* (2007) y por Colaço y Bramley, (2018), quienes reportaron que las mediciones NDVI presentaban variación entre años y sitios repuesta, características propias de cada híbrido (Hatfield *et al.*, 2008), densidad de población y el espacio entre hileras de plantación (Maddoni *et al.*, 2001). Finalmente, nuestros resultados mostraron que los valores NDVI explicaban en promedio solo 53% de la variabilidad del RR, porcentaje que contrasta con los resultados reportados por Raun *et al.*, (2001) y Santillano-Cázares *et al.*, (2013) quienes trabajaron con trigo y sus mediciones de NDVI explicaron el ~ 83 de la variabilidad del rendimiento.

Unidades SPAD en hoja recientemente madura

Las mediciones de unidades SPAD hechas en las HRM en las etapas fenológicas (V7, V12, R1) se asociaron con el RR y se ajustaron al modelo de linear-meseta (figura 5).

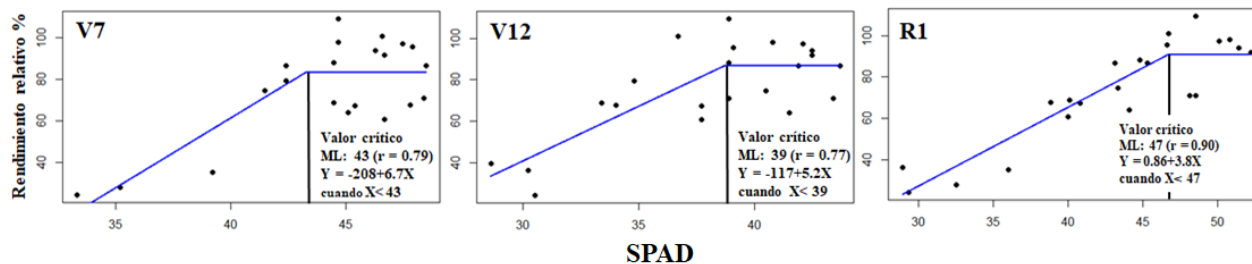


Figura 5. Relación de unidades SPAD con el RR en las etapas fenológicas V7, V12 y R1* (*lectura tomada en la hoja envoltiva del jilote). ML: concentración crítica estimada con el modelo linear meseta.

El coeficiente de correlación (r) fue mayor a 0.78 en todos los casos. En la etapa V7 se estimó un VC de 43 unidades SPAD ligeramente inferior al VC propuesto por Edalat *et al.*, (2019) de 48 unidades SPAD. En el caso de V12 el VC se fijó en 39 unidades SPAD, valor inferior al que definieron esos autores, de 51 unidades SPAD. En la etapa R1 la medición se realizó en la hoja que envolvía al jilote y se estimó un VC de 47 unidades SPAD, valor menor al VC definido por Shapiro *et al.*, (2016) de 57 SPAD. El contraste en los resultados refuerza la conclusión de otros reportes (Schepers *et al.*, 1992; Xiong *et al.*, 2015) donde se documentó, que, las mediciones SPAD son una medida indirecta del abasto del N afectada por factores medio ambientales como: cambios en la intensidad de luz en periodos cortos, las características de verdor específicos de cada híbrido y el régimen de fertilización con nitrógeno. Para que este valor tenga sentido debe de relacionarse con el índice SPAD de una franja bien abastecida de nitrógeno.

Nitrógeno total foliar

La concentración de N total en las HRM recolectadas en las etapas fenológicas V7, V12, R1 de la planta de maíz, se asoció con el RR cuando esas eran menores a la concentración crítica. En todos los casos con un coeficiente de correlación superior a 0.70 (Figura 6).

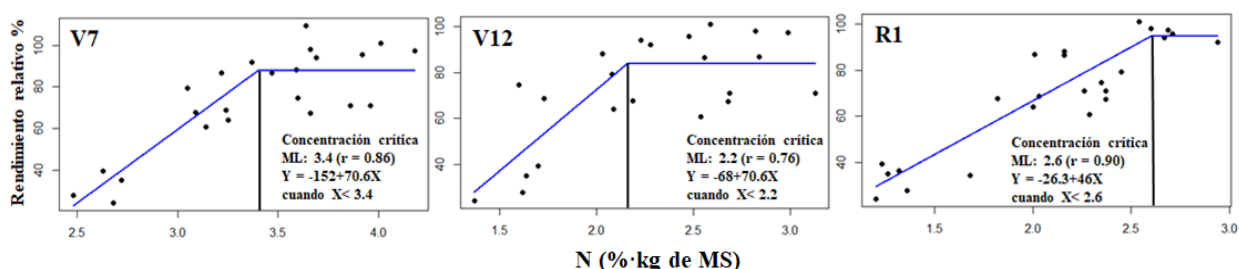


Figura 6. Relación entre Nitrógeno total foliar y el RR, en las etapas fenológicas V7, V12, R1. En R1 la muestra se extrajo de la hoja envoltante de la flor femenina. ML: concentración crítica, estimada con el modelo lineal meseta.

En V7 se estimó una CC de 3.4 ± 0.17 de N por kg de MS. Este resultado, coincide con las CC reportadas por Plénet y Lemaire, (1999), Baker *et al.* (2013), Castellanos *et al.* (2019). En la etapa V12 la CC se fijó en $2.2 \pm 0.11\%$ de N por kg de MS menor a la CC propuesta por Castellanos *et al.* (2019) de 2.5 a 3.5% de N. Esta diferencia se puede atribuir a la habilidad del híbrido para adquirir N, que depende de la competencia (densidad de población, características intrínsecas de desarrollo del sistema radical y las condiciones del suelo en se establecieron) y a la disponibilidad de N en el suelo. En la etapa R1 la CC fue de 2.6 y 0.13% de N por kg de materia seca. Este resultado coincidió con las CC propuestas por Reuter *et al.* (1997), Plénet y Lemaire (1999) y Castellanos *et al.* (2019).

CONCLUSIONES

Los métodos de diagnóstico del estado nutricional del N en maíz cultivado en el Bajío Guanajuatense, México, que se pueden emplear en condiciones de campo, en tres diferentes etapas fenológicas de desarrollo, fueron calibrados con éxito. La concentración crítica de N-NO₃ medida con métodos semicuantitativos en campo y cuantitativos en laboratorio, se asociaron con los rendimientos relativos alcanzados cuando se fertilizó maíz con dosis crecientes de nitrógeno. Las técnicas de diagnóstico de N-NO₃ en el extracto celular de la nervadura central de las hojas, en general la hoja recientemente madura, y en la base del tallo, se asociaron con el rendimiento relativo de grano, con coeficientes de correlación ($r > 0.80$). Los sensores ópticos (SPAD y GreenSeeker), asociación con el RR de grano, con coeficiente de correlación ($r > 0.77$). Las CC de N total de la hoja, medida en las etapas

fenológicas (V7, V12, R1) coincidieron con las sugeridas por otros autores. En consecuencia, los productores de maíz y los técnicos que los asesoran cuentan ahora con referencias establecidas para diferentes técnicas analíticas y etapas de desarrollo del maíz, lo cual les permite verificar el estado nutrimental del nitrógeno que guarda la planta y tomar medidas correctivas para que este elemento no se constituya en un factor limitante para que el cultivo alcance el rendimiento máximo posible que le permita el agroecosistema.

Áreas de oportunidad

Se requieren más estudios para confirmar las CC establecidas e identificar la existencia de variaciones entre años, ambientes e híbridos comerciales de maíz y validar la predicción de rendimiento de grano.

Agradecimientos

Al CONACYT por el financiamiento para realizar estudios de Maestría. A Fertilab® y PROAIN®, empresas mexicanas que apoyaron financieramente esta investigación. A la compañía semillera Aspros®, por las facilidades brindadas para realizar los muestreos de extracto celular en sus lotes comerciales y la donación de la semilla “Samurái” para el establecimiento del experimento. Al M.C. Miguel Peña por realizar el trabajo de blanqueo de nitrógeno del lote en el año anterior.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable

DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los conjuntos de datos utilizados y analizados durante el estudio actual están disponibles del autor correspondiente a solicitud razonable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

FONDOS

Este trabajo se realizó con financiamiento del CONACYT para realizar estudios de Maestría. Los experimentos, análisis y equipamiento fueron cubiertos por Fertilab® y PROAIN®, empresas mexicanas.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

E. E. Roacho concibió y diseñó los experimentos, realizó el experimento, analizó los datos, preparó las figuras y tablas, redactó y aprobó el borrador final.

J. D. Etchevers concibió y diseñó los experimentos, analizó los datos, preparó las figuras y tablas, supervisó, redactó y corrigió y aprobó el borrador final

J. Z. Castellanos concibió, diseñó y supervisó los experimentos, analizó los datos, preparó las figuras y tablas, corrigió los borradores y aprobó el borrador final

LITERATURA CITADA

- Alcántar-González, G., & Sandoval-Villa, M. (1999). Interpretación resultados del análisis. In G. Alcántar-González, & M. Sandoval-Villa (Eds.). *Manual de análisis químico de tejido vegetal* (pp. 107-138). Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México.
- Ali, M. M., Al-Ani, A., Eamus, D., & Tan, D. K. Y. (2017). Leaf nitrogen determination using non-destructive techniques— A review. *Journal of Plant Nutrition*, 40(7), 928-953. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1143954>
- Campbell, C. R. (Ed.). (2013). *Reference Sufficiency Ranges for Plant Analysis in the Southern Region of the United States*. Southern Cooperative Series Bulletin #394 (Vol. 1040). North Carolina. Retrieved from www.ncagr.gov/agronomi/saaesd/scsb394.pdf.
- Beegle, D., & Rotz, J. (2009). Late season cornstalk nitrate test. *Agronomy Facts 70*. Pennsylvania State Univ., University Park. Accessed April 2, 2020, from: http://extension.psu.edu/plants/crops/grains/corn/nutrition/late-season-cornstalk-nitrate-test/extension_publication_file.
- Binford, G. D., Blackmer, A. M., & El-Hout, N. M. (1990). Tissue test for excess nitrogen during corn production. *Agronomy Journal*, 82(1), 124-129. <https://doi.org/10.2134/agronj1990.00021962008200010027x>
- Blackmer, A. M., & Mallarino, A. P. (2000, November). *Cornstalk testing to evaluate nitrogen management*. Proceedings of the Integrated Crop Management Conference. Proceedings of the 14th Annual Integrated Crop Management Conference. <https://lib.dr.iastate.edu/icm/2002/proceedings/11>. Iowa State University - University Extension. Ames, IA, USA.
- Cadahía-López, C. (2008). Procesamiento de muestras. In C. Cadahía-López (Ed.). *La savia como índice de fertilización* (pp. 40-45). Barcelona, España: Mundi-Prensa.
- Castellanos, Z. J., Etchevers-Barra, J. D., Peña-Datoli, M., Huerta-García, S., Ortiz-Monasterio, I., Arango-González, A., Macías-Cervantes, J., & Venegas-Villaroel, C. (2019). *¿Cómo crece y se nutre una planta de maíz?* (1er ed.). Celaya, Gto., México: Fertilab.
- Cataldo, D. A., Maroon, M., Schrader, L. E., & Youngs, V. L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6(1), 71-80. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>
- Cate, R. B., & Nelson, L. A. (1971). A simple statistical procedure for partitioning soil test correlation data into two classes. *Soil Science Society of America Journal*, 35, 658-660.
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). (2012). *Manual de determinación de rendimiento*. México, D. F.: CIMMYT. Retrieved from <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/18249/48867.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Colaço, A. F., & Bramley, R. G. V. (2018). Do crop sensors promote improved nitrogen management in grain crops? *Field Crops Research*, 218, 126-140. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.01.007>
- Dechornat, J., Francis, K. L., Dhugga, K. S., Rafalski, J. A., Tyerman, S. D., & Kaiser, B. N. (2018). Root ideotype influences nitrogen transport and assimilation in maize. *Frontiers in Plant Science*, 9, 531 (1-16). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00531>

- Di Gioia, F., Simonne, E. H., Gonnella, M., Santamaria, P., Gazula, A., & Sheppard, Z. (2010). Assessment of ionic interferences to nitrate and potassium analyses with ion-selective electrodes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41(14), 1750-1768. <https://doi.org/10.1080/00103624.2010.489138>
- Dobermann, A. R. (2005, June). *Nitrogen use efficiency – state of the art*. Paper presented at the IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers. Frankfurt, Germany.
- Edalat, M., Naderi, R., & Egan, T. P. (2019). Corn nitrogen management using NDVI and SPAD sensor-based data under conventional vs. reduced tillage systems. *Journal of Plant Nutrition*, 42(18), 2310-2322. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1648686>
- Etchevers, J.-D. (1999). Técnicas de diagnóstico útiles en la medición de la fertilidad del suelo y el estado nutrimental de los cultivos. *Terra Latinoamericana* 17(3), 209-219.
- Fox, R. H., Roth, G. W., Iversen, K. V., & Piekielek, W. P. (1989). Soil and tissue nitrate tests compared for predicting soil nitrogen availability to corn. *Agronomy Journal*, 81(6), 971-974. <https://doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100060025x>
- Fox, R. H., Piekielek, W. P., & Macneal, K. E. (2001). Comparison of late-season diagnostic tests for predicting nitrogen status of corn. *Agronomy Journal*, 93(3), 590-597. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.933590x>
- Hatfield, J. L., Gitelson, A. A., Schepers, J. S., & Walthall, C. L. (2008). Application of spectral remote sensing for agronomic decisions. *Agronomy Journal*, 100(S3), 117-131. <https://doi.org/10.2134/agronj2006.0370c>
- Heckman, J. R., Samulis, R., & Nitzsche, P. (2002). Sweet corn crop nitrogen status evaluation by stalk testing. *HortScience*, 37(5), 783-786. <https://doi.org/10.21273/hortsci.37.5.783>
- Horwitz, W., & Latimer, G. W. (Eds.). (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. (18th ed.). Gaithersburg, MD, USA: The Association of Official Agricultural Chemists.
- Huang, G. (2013). Validation of late season cornstalk nitrate test under different natural and social environments for better fertilizer management in China. *Oriental Journal of Chemistry*, 29(4), 1381-1389. <https://doi.org/10.13005/ojc/290413>
- Inman, D., Khosla, R., Reich, R. M., & Westfall, D. G. (2007). Active remote sensing and grain yield in irrigated maize. *Precision Agriculture*, 8(4-5), 241-252. <https://doi.org/10.1007/s11119-007-9043-z>
- IPNI (International Plant Nutrition Institute). (2013). *4R - Manual de Nutrición de Plantas: Un Manual Para Mejorar el Manejo de la Nutrición de Plantas*. T. W. Bruulsema, P. E. Fixen, & G. D. Sulewski (Eds.). (1st. ed.) International Plant Nutrition Institute. Peachtree Corners, GA, USA.
- Isla, R., & Blackmer, A. M. (2007). A simplified test of cornstalk nitrate for better N management. *Agronomy for Sustainable Development*, 27(3), 237-241. <https://doi.org/10.1051/agro:2007013>
- Justes, E., Meynard, J. M., Mary, B., & Plénet, D. (1997). Diagnosis using stem base extract: JUBIL method. In G. Lemaire (Ed.). *Diagnosis of the nitrogen status in crops* (pp. 163-187). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-60684-7>
- Lemaire, Gilles, Jeuffroy, M.-H., & Gastal, F. (2008). Diagnosis tool for plant and crop N status in vegetative stage. *European Journal of Agronomy*, 28(4), 614-624. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2008.01.005>
- Maddoni, G. A., Otegui, M. E., & Cirilo, A. G. (2001). Plant population density, row spacing and hybrid effects on maize canopy architecture and light attenuation. *Field Crops Research*, 71(3), 183-193. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(01\)00158-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00158-7)
- Mills, H. A., & Jones Jr., J. B. (1996). *Plant Analysis Handbook II. A Practical Sampling, Preparation, Analysis, and Interpretation Guide*. Athens, Georgia: MicroMacro.
- Muñoz-Huerta, R. F., Guevara-Gonzalez, R. G., Contreras-Medina, L. M., Torres-Pacheco, I., Prado-Olivarez, J., & Ocampo-Velazquez, R. V. (2013). A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: Advantages, disadvantages, and recent advances. *Sensors (Switzerland)*, 13(8), 10823-10843. <https://doi.org/10.3390/s130810823>
- Plénet, D., & Lemaire, G. (1999). Relationships between dynamics of nitrogen uptake and dry matter accumulation in maize crops. Determination of critical N concentration. *Plant and Soil*, 216(1-2), 65-82. <https://doi.org/10.1023/A:1004783431055>
- Raun, W. R., Solie, J. B., Johnson, G. V., Stone, M. L., Lukina, E. V., Thomason, W. E., & Schepers, J. S. (2001). In-season prediction of potential grain yield in winter wheat using canopy reflectance. *Agronomy Journal*, 93(1), 131-138. <https://doi.org/10.2134/agronj2001.931131x>
- Rauschkolb, R. S., Brown, A. L., Prato, J. D., & Kegel, F. R. (1974). Rapid tissue testing for evaluating nitrogen nutritional status of Corn and Sorghum. *California Agriculture*, 28(6), 10-12.

- Reed, A. J., & Hageman, R. H. (1980). Relationship between nitrate uptake, flux, and reduction and the accumulation of reduced nitrogen in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiology*, 66(6), 1184-1189. <https://doi.org/10.1104/pp.66.6.1184>
- Reisenauer, H. M. (1978). *Soil and plant-tissue testing in California*. Bulletin 1879. Berkeley, CA, USA: University of California.
- Reuter, D. J., Edwards, D. G., & Wilhelm, N. S. (1997). Temperate and tropical crops. In D. J. Reuter, & J. B. Robison (Eds.). *Plant analysis: An interpretation manual* (pp. 83-284). Collingwood, Australia: CSIRO Publishing.
- Rhezali, A., & Lahlali, R. (2017). Nitrogen (N) mineral nutrition and imaging sensors for determining N status and requirements of maize. *Journal of Imaging*, 3(4), 51 (1-10). <https://doi.org/10.3390/jimaging3040051>
- Sainz Rozas, H. R., Echeverria, H. E., Herfurth, E., & Studdert, G. A. (2001). Basal stalk nitrate of maize. II diagnosis of nitrogen nutrition. *Ciencia del Suelo*, 19(2), 125-135.
- Sánchez-García, P., Molinos-da-Silva, C., Alcántar-González, G., & Sandoval-Villa, M. (2016). Diagnóstico nutrimental en plantas. In G. Alcantar-González, L. I. Trejo-Téllez, & F. C. Gómez-Marino (Eds.), *Nutrición de cultivos* (pp. 185-216). Texcoco, Estado de México.
- Santillano-Cázares, J., López-López, Á., Ortiz-Monasterio, I., & Raun, W. R. (2013). Uso de sensores ópticos para la fertilización de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Terra Latinoamericana*, 31, 95-103.
- Schepers, J. S., Francis, D. D., Vigil, M., & Below, F. E. (1992). Comparison of corn leaf nitrogen concentration and chlorophyll meter readings. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 23(17-20), 2173-2187. <https://doi.org/10.1080/00103629209368733>
- Shapiro, C., Attia, A., Ulloa, S., & Mainz, M. (2016). Use of five nitrogen source and placement systems for improved nitrogen management of irrigated corn. *Soil Science Society of America Journal*, 80(6), 1663-1674. <https://doi.org/10.2136/sssaj2015.10.0363>
- Smith, F. W., & Loneragan, J. F. (1997). Interpretation of plant analysis: Concepts and principles. In D. J. Reuter, J. B. Robison, & C. Dutkiewicz (Eds.). *Plant analysis: An interpretation manual* (pp. 3-33). Collingwood, VIC, Australia: CSIRO Publishing.
- Sprent, P. (1961). Some hypotheses concerning two phase regression lines. *Biometrics*, 17(4), 634-645. <https://doi.org/10.2307/2527862>
- Ta, C. T. (1991). Nitrogen metabolism in the stalk tissue of maize. *Plant Physiology*, 97(4), 1375-1380. <https://doi.org/10.1104/pp.97.4.1375>
- The R Foundation for Statistical Computing. (2018). R 3.5.1. Accessed April 6, 2020, from <https://www.r-project.org/>.
- Withe, J. M., Tyson, R. V., Hanlon, E. A., Hochmuth, G. J., & Neal, C. A. (1996). Plant petiole sap testing for nitrogen and potassium in sweet corn grown on mineral soil. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 109, 149-151. Retrieved from <http://journals.fcla.edu/fshs/article/view/91847/88042>.
- Withers, N. J. (1982). SAP tests for measuring nitrogen status of cereals. *Proceedings Agronomy Society of N.Z.*, 12, 41-44.
- Xiong, D., Chen, J., Yu, T., Gao, W., Ling, X., Li, Y., ... Huang, J. (2015). SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics. *Scientific Reports*, 5(1), 13389. <https://doi.org/10.1038/srep13389>
- Yin, X., & McClure, A. (2013). Relationship of corn yield, biomass, and leaf nitrogen with normalized difference vegetation index and plant height. *Agronomy Journal*, 105(4), 1005-1016. <https://doi.org/10.2134/agronj2012.0206>