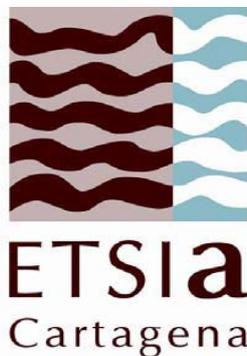


**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA**  
**Departamento de Producción Vegetal**



**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



**PROYECTO FIN DE CARRERA**

“Ensayos sobre la influencia del ratio  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en la producción de *Silene vulgaris* en bandejas flotantes”

**Alumno:**

Daniel José Meira Barreto

**Dirigido por:**

Encarnación Conesa Gallego  
Juan Antonio Fernández Hernández

Cartagena, Julio 2008



## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA COLLEJA</b>   | <b>4</b>  |
| 1.1.1 HISTORIA/ ORIGEN/ HÁBITAT/ DISTRIBUCIÓN  | 4         |
| 1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA   | 5         |
| 1.1.2.1 Caracterización fenotípica y fenológica  | 5         |
| 1.1.3 REPRODUCCIÓN   | 7         |
| 1.1.4 SU UTILIZACIÓN EN LA CADENA ALIMENTARIA  | 7         |
| 1.1.4.1 Utilización de <i>Silene vulgaris</i> como planta comestible   | 8         |
| 1.1.4.2 Utilización de <i>Silene vulgaris</i> en fitorremediación  | 9         |
| 1.1.4.3 Otros usos de <i>Silene vulgaris</i>   | 9         |
| <b>1.2 IMPORTANCIA DE N</b>  | <b>9</b>  |
| 1.2.1 NITRATOS   | 11        |
| 1.2.1.1 Breve historia del peligro de los nitratos   | 11        |
| 1.2.1.2 Ingestión de nitratos  | 13        |
| 1.2.1.3 Límites de nitratos en hortalizas  | 15        |
| 1.2.1.4 Principales causas de la contaminación por nitratos en hortalizas  | 18        |
| 1.2.1.5 Factores que influyen en las concentraciones de nitratos en los productos hortalizas   | 19        |
| <b>1.3 OXALATOS</b>  | <b>20</b> |
| <b>1.4 VITAMINA C</b>  | <b>22</b> |
| <b>1.5 LA PROPORCIÓN NITRATO:AMONIO EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA DEL CULTIVO SIN SUELO. SU IMPORTANCIA EN EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LAS COSECHAS</b>         | <b>23</b> |
| <b>1.6 CULTIVOS HIDROPÓNICOS</b>   | <b>26</b> |
| 1.6.1 VENTAJAS Y DESVENTAJAS   | 28        |
| 1.6.2 CULTIVO EN BANDEJAS FLOTANTES (“FLOATING SYSTEM”)  | 29        |
| <b>1.7 CULTIVOS “BABY LEAF” EN “FLOATING SYSTEM”</b>   | <b>32</b> |
| <b>2. OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>  | <b>33</b> |
| <b>3. ENSAYOS SOBRE LA INFLUENCIA DEL RATIO NO<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> EN LA PRODUCCIÓN DE <i>SILENE VULGARIS</i> EN BANDEJAS FLOTANTES</b> | <b>33</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.1 INTRODUCCIÓN</b>                     | <b>33</b> |
| <b>3.2 MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES</b>     | <b>34</b> |
| 3.2.1 MATERIAL Y MÉTODOS DEL PRIMERO ENSAYO | 40        |
| 3.2.2 MATERIAL Y MÉTODOS DEL SEGUNDO ENSAYO | 42        |
| <b>3.3 RESULTADOS</b>                       | <b>43</b> |
| 3.3.1 RESULTADOS DEL PRIMER EXPERIMENTO     | 43        |
| 3.3.2 RESULTADOS DEL SEGUNDO EXPERIMENTO    | 51        |
| <b>3.4 DISCUSIÓN</b>                        | <b>60</b> |
| <b>3.5 CONCLUSIÓN</b>                       | <b>66</b> |
| <br>  |           |
| <b>4. BIBLIOGRAFIA</b>                      | <b>68</b> |
| <br>  |           |
| <b>5. ANEXOS</b>                            | <b>80</b> |

## RESUMEN

La colleja es un cultivo tradicional, poco extendido en la actualidad, pero que puede servir de alternativa a los principales cultivos foliáceos. El cultivo en bandejas flotantes resulta una técnica sencilla e interesante para la producción de hortalizas de hoja de pequeño tamaño tipo “baby leaf”, ofreciendo una buena posibilidad en el manejo y control de la solución nutritiva, por lo que puede ser usada para producir verduras con bajos contenidos en nitratos y oxalatos.

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de diferentes ratios nitrato/amonio en la calidad y producción de colleja (*Silene vulgaris*) tipo “baby leaf” en bandejas flotantes (floating system), a través de la determinación de concentraciones de nitratos, oxalatos, vitamina C y variables de crecimiento vegetativo.

En este trabajo se realizaron dos ensayos en fechas distintas, en ambos ensayos se utilizó una variedad de colleja de la accesión local 04-404, proveniente del banco de germoplasma de la UPCT. La siembra del primer ensayo se realizó el 29 de Febrero de 2008, en bandejas tipo styrofloat, con una duración de cultivo de 42 días. La siembra del segundo ensayo se realizó el 10 de Abril de 2008, en bandejas tipo styrofloat, con una duración de cultivo de 36 días. Se ensayaron cuatro soluciones nutritivas distintas conteniendo todas ellas 12 mmol/L de N, con los siguientes ratios ( $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ): 100/0, 75/25, 50/50, 25/75.

Los resultados demuestran que disminuyendo la proporción de nitratos en la solución nutritiva se consigue reducir la concentración de nitratos y oxalatos en las hojas.

Se puede concluir que resulta interesante aportar el nitrógeno de la solución nutritiva en una ratio nitrato/amonio de 25:75, ya que se consigue reducir la concentración de nitratos y oxalatos en hojas (que en exceso son perjudiciales para el hombre), sin afectar la calidad y producción de colleja, es decir sin afectar las características agronómicas importantes para el productor, y el contenido en vitamina C importante para la salud humana.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Características generales de la Colleja

### 1.1.1 Historia/ Origen/ Hábitat/ Distribución

La colleja (*Silene vulgaris* (Moench) Garcke) es una especie nativa de origen euro-asiático (Wall y Morrison, 1990). La especie *S. vulgaris* comprende varias subespecies: Subsp. *vulgaris*, Subsp. *conmutata* (Guss), Subsp. *glareosa* (Jordan) y Subsp. *próstata* (Gaudin). La subespecie *S. vulgaris* está presente en todo el continente Europeo, excepto en algunas islas del Norte (Chater y Walters, 1964).

Mientras que en el Norte y Centro de Europa se encuentra exclusivamente en hábitats alterados (bordes de caminos, márgenes de cultivos), en el Sur de Europa y la región Mediterránea las Subsp. *conmutata* y Subsp. *próstata*, aparecen principalmente en hábitat montañosos naturales o seminaturales (Jalas y Souminen, 1986). Probablemente estas poblaciones más septentrionales se hayan extendido siguiendo la expansión de la agricultura (Runyeon y Prentice, 1997).

También, otros estudios indican que *S. vulgaris* está presente en toda Europa, Norte de África y Centro y Oeste de Asia, hallando su ambiente óptimo en los países de clima mediterráneos. Se encuentra además, como planta invasora, en otras regiones del globo, como ocurre en Norteamérica (Shetler y Skog, 1978).

Las collejas (nombre común de esta especie), viven en pastizales algo embravecidos, cunetas, inmediaciones de cortijos y ermitas rurales, y en general terrenos algo compactados y no sometidos a laboreos anuales; no es raro verlas al pie de encinas u otros grandes árboles, donde la presencia de plantas espinosas cercanas, como las esparragueras, ayudan a protegerlas del diente del ganado. Tampoco faltan junto a los muros de las huertas, e incluso en alguna calle del casco urbano. Escasean en los hábitats más evolucionados como jarales, manchas y encinares. Prefieren los suelos arenosos, donde sus raíces crecen con menos impedimentos, aunque aparecen también en los derivados de pizarras y otras rocas compactas. Esta especie está presente en una variedad de hábitats alterados, incluyendo minas de zinc y plomo abandonadas.

### 1.1.2 Descripción botánica

El nombre científico de la colleja es *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. Esta planta pertenece a la familia *Caryophyllaceae*, al género *Silene* y a la subespecie *vulgaris* (Tabla 1)

Tabla 1 – Clasificación científica de *Silene vulgaris* (Moench) Garcke

| Clasificación científica |  |
|--------------------------|--|
| Nombre científico        | <i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke |
| Reino                    | <i>Plantae</i>                         |
| División                 | <i>Magnoliophyta</i>                   |
| Clase                    | <i>Magnoliopsida</i>                   |
| Orden                    | <i>Caryophyllales</i>                  |
| Familia                  | <i>Caryophyllaceae</i>                 |
| Subfamilia               | <i>Caryophylloideae</i>                |
| Género                   | <i>Silene</i>                          |
| Especie                  | <i>S. vulgaris</i>                     |
| Subespecie               | <i>vulgaris</i>                        |

Esta planta es una especie muy polifórmica, con una gran variedad tanto inter como intrapoblacional, por lo que se han descrito multitud de subespecies y de tipos biológicos. Por eso a veces se habla, desde el punto de vista taxonómico, del complejo o grupo *Silene vulgaris* (Wall y Morrison, 1990). Esta gran variabilidad ha sido descrita tanto en estudios llevados a cabo mediante la observación fenotípica de caracteres morfológicos (Willians, 1908; Mariden-jones y Turril, 1957; Aeschiman y Boucket, 1980), como en estudios isoenzimáticos (Prentice y Giles, 1993; Ruyeon y Prentice, 1997) y en evaluaciones agronómicas (Wall y Morrison, 1990). Todo ello pone de manifiesto el potencial de los recursos genéticos de esta especie silvestre.

#### 1.1.2.1 Caracterización fenotípica y fenológica

La colleja (*Silene vulgaris*) es una especie perenne de 35-80 cm, glabra, normalmente lampiña y de base leñosa. Contiene tallos erectos y ramificados y posee hojas coriáceas, opuestas, lanceoladas, las inferiores pecioladas y las medias sésiles, lineares u ovadas, las superiores abrazadoras. Sus flores son hermafroditas con cinco pétalos blancos muy lobulados, muy inflados de tal forma que después sirven de cubierta al fruto. Tiene un cáliz glabro con los sépalos soldados y con 20 nervios y dientes triangulares. Gineceo con tres estilos e inflorescencias con muchas flores agrupadas en dicasio y con bractéolas escariosas. Su fruto es una cápsula con seis dientes erectos o erectopatentes (Jolls y Chenier, 1989).

*S. vulgaris* es una planta vivaz, cuyas partes aéreas se angostan a finales del verano o con la llegada del frío, aunque en años benévolos pueden permanecer sobre el suelo rosetones de hojas, rebrotando la cepa con la llegada de las temperaturas primaverales más cálidas. En otras zonas de España, cerca del litoral, tienden a poseer hojas durante todo el año. Algunas especies pertenecientes a la misma familia y de conocida importancia son los claveles y clavellinas (género *Dianthus*), o al salvadillo (género *Spergularia*).

Esta planta sobrevive y se expande gracias a un denso sistema de estolones o tallos subterráneos que crecen cada año, dando lugar a colonias densas de rosetas de hojas, de las que a mediados de la primavera emergen tallos portadores de flores con pétalos blancos, parcialmente envueltos por un cáliz en forma de saco. A partir de cada flor se forma el fruto (cápsula), que aloja numerosas semillas oscuras y arriñonadas. Las semillas están cubiertas de pequeños tubérculos, que facilitan su dispersión.

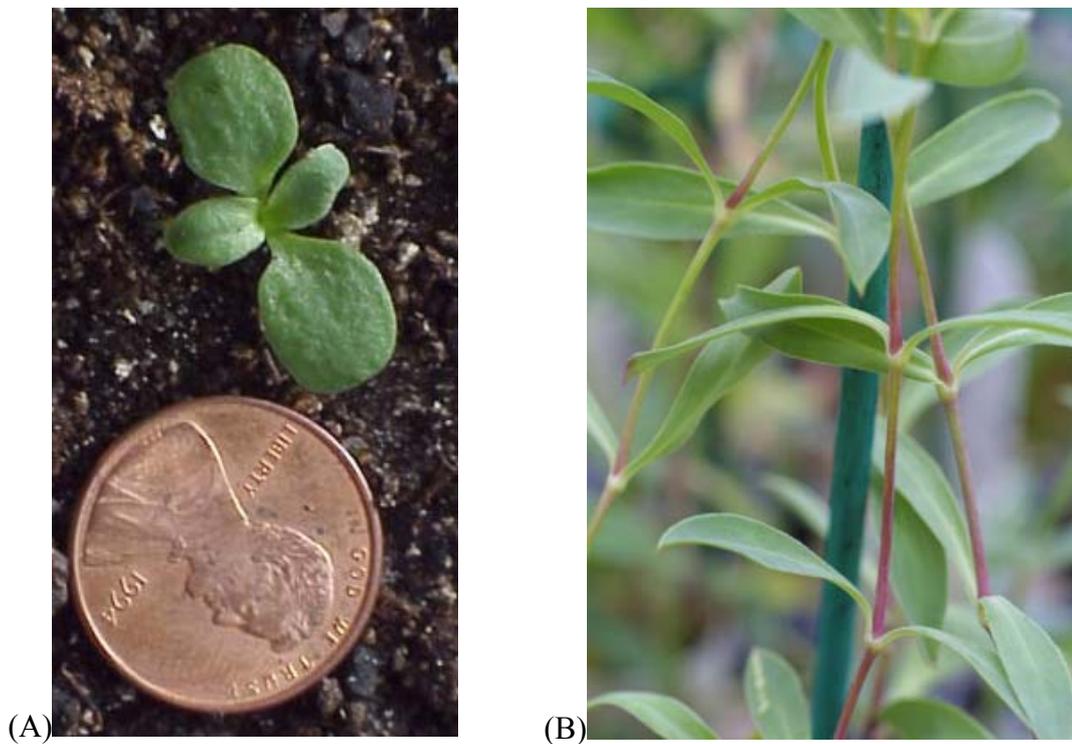


Fig. 1 – (A) Aspecto de la plántula de *Silene vulgaris* con cotiledones; (B) Tallo con hojas de *Silene vulgaris*

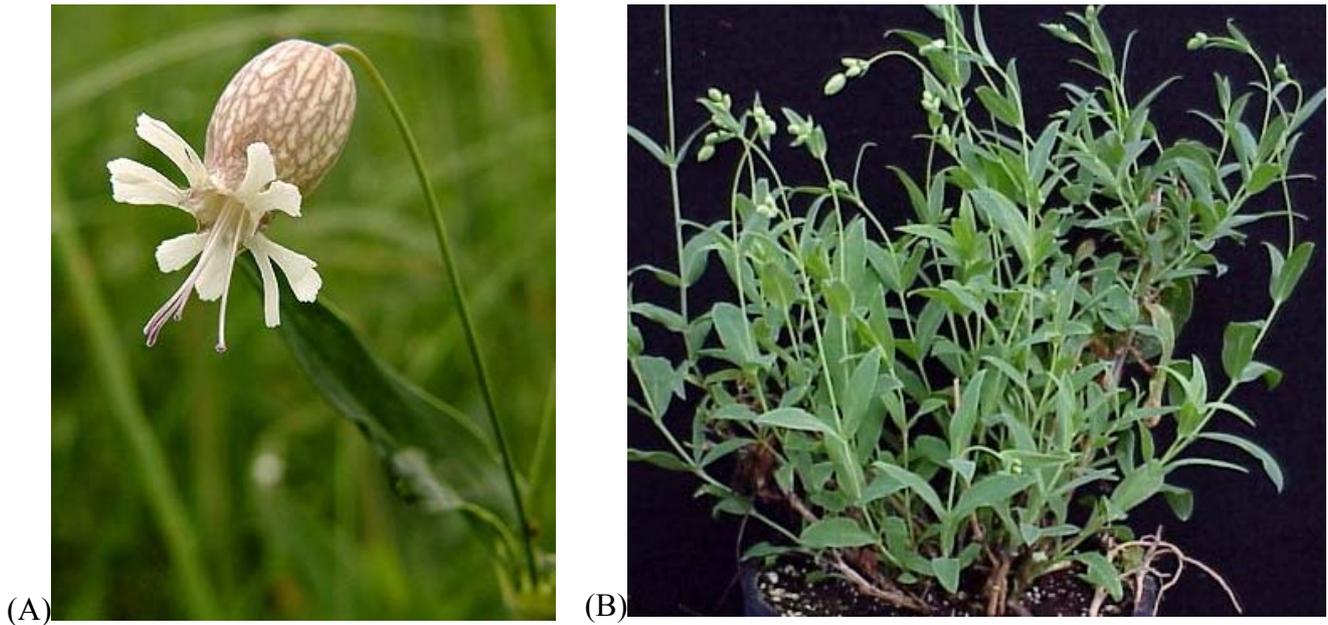


Fig. 2 – (A) Aspecto de la flor de *Silene vulgaris*; (B) Aspecto de la planta *Silene vulgaris*

### 1.1.3 Reproducción

La propagación y reproducción de *Silene vulgaris* ocurre de dos formas distintas, forma sexual (a través de semillas) y forma asexual (a través de la división de rizomas o yemas vegetativas).

Dentro de poblaciones es posible encontrar tres tipos de individuos: plantas femeninas con únicamente flores pistiladas y antenas rudimentarias, plantas hermafroditas con flores perfectas y plantas con ambos tipos de flores (gynodiecia), variando en el grado de la función femenina, aunque no se ha observado cambios de sexo (Jolls y Chenier, 1989).

### 1.1.4 Su utilización en la cadena alimentaria

El número de especies vegetales con alta importancia alimentaria para la población humana o para otro uso es respectivamente bajo. Aunque el número de especies que puede ser utilizado es efectivamente alto, en los últimos años ha ido decreciendo el número de las que se usan de forma significativa (Hammer, 1986). El número exacto de especies vegetales usado por la humanidad es verdaderamente difícil de establecer debido principalmente a la escasa o nula información que existe acerca de tales plantas (Pignatti, 1982).

De todas las plantas silvestres alimentarias, uno de los grupos más importantes es el de las verduras silvestres y entre ellas podríamos destacar algunas cuyo uso tradicional se encuentra más extendido geográficamente, al tiempo que se mantiene relativamente vigente en la actualidad, como es el caso de la colleja, la cual es recolectada y usada tradicionalmente en prácticamente todos los lugares en los que habita e incluso en algunos lugares llega a producirse la comercialización de material procedente de recolección silvestre, a unos precios elevados pues se trata de una producción escasa (Alarcón et al., 2004).

#### 1.1.4.1 Utilización de *Silene vulgaris* como planta comestible

La colleja es una de las plantas comestibles autóctonas por excelencia en toda la región Mediterránea, pudiendo consumirse las hojas y los tallos tiernos, incluso en crudo. Es una verdura muy fina, hasta el punto de que ni siquiera suele ser necesario eliminar el agua de cocción para consumirlas. El hervido previo es recomendable para reblandecer los tejidos de la hoja, aunque no necesario. Puede emplearse en guisos, pero la tradición se inclina más por su consumo en tortilla, bastando sofreír previamente las hojas, con o sin cocción preliminar. Su empleo como verdura tradicional se ha ido abandonando con el tiempo, probablemente por lo laborioso de su preparación, ya que las hojas deben separarse de los tallos una a una.

La parte aprovechable de *S. vulgaris* son sus brotes tiernos antes de que aparezcan los tallos floríferos. Dichos brotes se utilizan como verdura en Italia y en numerosos puntos de España e incluso se comen crudos en ensalada (Arreola, 2006).

En el Norte de Italia *S. vulgaris* ha sido usada por algún tiempo como hortaliza, los brotes apicales son recolectados particularmente en primavera para ser comidos o guisados. Estos brotes son también demandados por los gastrónomos para su uso en sopas. Por otro lado, en el Sur de Italia, las plantas silvestres de *S. vulgaris* son también usadas, sus hojas más tiernas se fríen con aceite de oliva. *S. vulgaris* también es cultivada como planta ornamental y también tiene un papel, aunque menor, en la medicina popular (Laghetti y Perrino, 1994).

De modo que, las hojas tiernas son dulces y verdaderamente agradables en ensalada. Los brotes tiernos cocinados, cosechados cuando tienen 5cm de longitud, presentan un sabor similar al guisante verde, aunque ligeramente algo más amargo (este ligero sabor amargo desaparece con la edad de la planta). Las hojas también pueden ser troceadas y agregadas a la ensalada (Facciola, 1990).

#### 1.1.4.2 Utilización de *Silene vulgaris* en fitorremediación

*S. vulgaris* ha desarrollado poblaciones (ecotipos) con una fuerte tolerancia a metales pesados en sitios con altas concentraciones de éstos en el suelo (Ernst, 1974; Schat et al., 1996). Los mecanismos implicados en la alta tolerancia a metales pesados son en gran parte explicados por factores genéticos (Schat y Vooijs, 1997).

La tolerancia a altos niveles de Cu en *S. vulgaris* se ha sugerido que es causada por un mecanismo de segregación paterna, resultado de los cruces entre poblaciones de plantas sensitivas a Cu y poblaciones de plantas tolerantes a dicho metal. Este mecanismo de segregación puede ser controlado por dos genes tolerantes y algunos modificadores hipostáticos (Schat y Ten Boockum, 1992; Schat et al., 1993, 1996), aunque la naturaleza y fisiología de estos genes no han sido identificadas plenamente todavía.

Por otra parte, se ha demostrado que las raíces de plantas tolerantes acumulan más Zn que las de aquellas plantas sensibles (Mathys, 1975; Harmens et al., 1993).

En diversos estudios se ha comprobado la efectividad de *S. vulgaris* como planta fitorremediadora de metales pesados en el suelo: Zn y Cd (Verkleij y Prast, 1989); Cd (Chardonens et al., 1998); Zn (Harmens et al., 1993); Zn y Cd (Ernst y Nelissen, 2000). En otros estudios también se ha constatado la utilidad de *S. vulgaris* en la fitorremediación de metales pesados (Chaney et al., 1997).

#### 1.1.4.3 Otros usos de *Silene vulgaris*

La planta se ha empleado como emoliente y uso en baños o como fumigante. El jugo de las plantas es usado en tratamientos de oftalmología (Chopra et al., 1986).

Las raíces de la planta son usadas como un jabón sustituto para el lavado de ropa (Uphof, 1959; Usher, 1974). El jabón es obtenido por inmersión de las raíces en agua caliente.

## 1.2 Importancia de N

La nutrición de N desempeña un papel fundamental en la producción y calidad de la cosecha (Sisson et al., 1991; Gastal y Lemaire, 2002; Wang et al., 2002); es muy importante e indispensable para la vida de las plantas dado que participa en la formación de compuestos orgánicos como aminoácidos, proteínas y ácido nucleico.

La cantidad de nitrógeno depende de diferentes factores: tipo de cultivación, estado fenológico, características del suelo, contenido de sustancias orgánicas en el terreno, el clima, las técnicas agronómicas utilizadas (densidad de las plantas, riego), etc. Las principales formas de N como abonos son amonio, nitrato u urea. En la horticultura también son usadas formas orgánicas de N, porque las plantas absorben bien el nitrato y el amonio y, hasta mismo aminoácidos (Maynard y Lorenz, 1979).

Los agricultores tienen aumentado la aplicación de fertilizantes de N a sus tierras, año tras año (Wang et al., 2000), sin considerar la respuesta de las diferentes especies a las formas y dosis de N. Una fuente adecuada de N puede promover el crecimiento vegetal y aumentar la producción vegetal (Collins y McCoy, 1997), pero la excesiva e inadecuada utilización de los fertilizantes químicos de N provoca una acumulación de estos compuestos en los productos comestibles. Esos compuestos pueden ser perjudiciales para los seres humanos y también causar la contaminación ambiental y perjuicios económicos.

La aportación de nitrógeno puede causar también problemas por la baja eficiencia del uso de N, pues no todo el nitrógeno aplicado es utilizado por el cultivo. Una parte, que se comprende entre las 20 a 70% de N distribuido, es lixiviado, inmovilizado, volatilizado o desnitrificado, surgiendo así problemas relacionados con el ambiente, principalmente, la contaminación de los canales acuíferos (Beretta *et al.*, 1990). Por otro lado, dosis excesivas de N pueden determinar la acumulación de nitratos en hortalizas, particularmente en las hojas, reduciendo el valor nutricional.

La concentración de nitrógeno en las hortalizas sube con el aumento de la disponibilidad de nitrógeno en las cultivaciones. Pero ni siempre la elevada disponibilidad de N corresponde a un aumento de producción (McCall y Willumsen, 1998). El contenido de nitrógeno en las hortalizas no depende solo del nitrógeno que llega con el abonado sino también depende de la cantidad total de N que se encuentra en el terreno.

Los efectos de diversas formas de acumulación de N en el crecimiento de las plantas, de los nitratos y de los oxalatos en los productos hortícolas atrajeron una atención considerable en los años recientes debido a los problemas de salud derivados del consumo de estos (Van der Boon et al., 1990; Zhang et al., 1990; Santamaria y Elia, 1997; Elia et al., 1998; Montemurro et al., 1998; Wang y Li, 2003; Chen et al., 2004; Gülser, 2005).

## 1.2.1 Nitratos

### 1.2.1.1 Breve historia del peligro de los nitratos

La ingestión de agua y de legumbres con alta concentración de nitratos tiene siendo siempre considerados como potencialmente peligrosos para la salud humana.

De un punto de vista toxicológico, los nitratos tienen una toxicidad aguda extremadamente baja (Speijers, 1996b). Pero el hombre, en 5-10% de nitrato ingerido lo reduce el en la saliva y en el tracto gastrointestinal, en un producto más tóxico, es decir, en nitritos (Walters y Smith, 1981). Además, los compuestos de N-nitroso surgen a partir de la reacción del nitrito con otras sustancias (como aminos emitidas en la digestión de proteínas), pudiendo dar origen a graves enfermedades transmisibles al hombre. Por esta razón, la evaluación toxicológica de los nitratos no puede ser separada de la de nitritos y de compuestos N-nitroso, bien como de la presencia de nitratos en hortalizas, del agua potable y de los alimentos por regla general, siendo considerados un problema de salud pública.

El nitrato, sin embargo, tiene una extremadamente baja toxicidad en el hombre. Es regularmente usado como  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en dosis de 10g/día para 4-5 días como un diurético sin efectos tóxicos locales (Hill, 1999). Los únicos efectos tóxicos crónicos son los decurrentes de nitrito formado por la reducción de los nitratos a través de bacterias y enzimas.

Los nitratos, nitritos y compuestos N-nitroso tienen origen esencialmente de compuestos exógenos, pero para todos estos compuestos ha sido encontrada una síntesis endógena (Gangolli et al., 1994).

El principal problema del nitrato es la oxidación de la hemoglobina en la sangre, que pasa a la metahemoglobina, causando una disminución en la capacidad de transporte de oxígeno por la sangre y presentando en especial consecuencias en niños hasta a los seis meses de edad. La metahemoglobina presenta lo siguiente síntoma (Santamaria, 1997; Walker, 1990): la indicación clara de este síndrome (también conocido como "síndrome del bebé azul") es la coloración azulada de las extremidades (dedos, nariz), debido a la mala oxigenación de la sangre. En adultos, la transformación de la hemoglobina en metahemoglobina es generalmente temporal, ya que tiene la restauración de forma reducida, en un corto periodo de tiempo; en lactantes hay una incapacidad de rápida transformación metabólica para hemoglobina, con consecuencias físicas más o menos reversible (cianosis, síntomas de asfixia, convulsiones). Los nitratos también son conocidos por causar un bajo almacenamiento de la vitamina A.

Varios autores tienen sugiriendo que el riesgo de desarrollar cáncer del estómago está positivamente correlacionado con tres factores: el nivel de nitratos en el agua potable, la excreción urinaria de nitratos y la presencia de gastritis atrófica (Speijers, 1996b). Durante los últimos 30 años la incidencia de cáncer del estómago tiene disminuyendo, probablemente debido a la reducción significativa de la concentración de nitratos y nitritos en la carne y conservas y por el aumento de la utilización de frigoríficos y congeladores (Speijers, 1996a), mientras que la concentración de nitratos en el agua aumentó. La incidencia del cáncer del estómago es todavía elevada en países con frecuente consumo de pescado salado (Japón, Islandia y Chile) y en países con inviernos largos y, consecuentemente, conservación prolongada de los alimentos (Europa del Este, Rusia y China).

Las hortalizas, además de constituir la principal fuente de nitratos, contienen un número de micronutrientes esenciales y antioxidantes, como vitamina C, tocoferol, carotenoides, ácido fólico y flavonoides, que inhiben la formación de compuestos N-nitroso (Steinmetz y Potter, 1991).

Vermeer et al. (1998), algunos años antes, demostraron inequívocamente la relación positiva entre el aumento del volumen de tiroides en el hombre y los niveles de nitratos en el agua potable arriba de 50 mg / L (Van Maanen et al., 1994).

Más recientemente, otros estudios habían mostrado la asociación entre niveles más elevados de nitrato en el agua potable (superior a 14,85 mg / L) y la incidencia de diabetes mellitus, en 1.797 niños con edad inferior a 16 años, en el Norte de Inglaterra (Parslow et al., 1997).

Paralelamente en Gran Bretaña, otros investigadores, basados en estudios epidemiológicos, criticaron los potenciales riesgos para la salud causados por la absorción de nitrato con la dieta (Duncan et al., 1997). En efecto, las condiciones ácidas en el estómago pueden causar la formación de óxido nítrico (NO), que es considerado crucial para la defensa del cuerpo humano contra las bacterias patogénicas, como la *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y *Escherichia coli* (Dykhuisen et al., 1996; McKnight et al., 1999).

En suma, después de ser acusado de provocar la metahemoglobinemia en niños y el cáncer de estómago en adultos, los resultados recogidos en un reciente volumen de la Royal Society of Chemistry (AA. VV., 1999) sugieren que los nitratos tienen actualmente un papel fundamental en la defensa de nuestro organismo contra gastroenteritis.

Mezclado con un ácido orgánico, el nitrato es eficaz en la lucha contra el "pie de atleta" (*Tinea pedis*), y aislado también puede proteger contra infecciones cutáneas. Esto llevó

Addiscott y Benjamin (2000) la sugerir que quizás por ello es que los hombres instintivamente lamen sus heridas.

El nitrato, o mejor, el producto de su reducción (óxido nítrico), tiene propiedades vasodilatadoras y modula la función y coagulación de las plaquetas, pudiendo así tener un efecto directo sobre la enfermedad cardíaca (Dykhuisen y Benjamin, 1999).

Además, debe resaltarse que una parte importante de la población del mundo (entre aquellas personas que hayan sido sometidos a operación estomacal o entre las de los países económicamente menos desarrollados) es caracterizada por una baja producción de ácido clorhídrico en el estómago, que determina la presencia de una flora rica bacteriana y de alta concentración de nitrito (Hill, 1999). Bajo estas condiciones la exposición a altas concentraciones de nitrato es un riesgo potencial de metahemoglobinaemia para niños, no por causa de los nitratos en sí, sino por su reducción bacteriana a nitritos. Asimismo, se pudiésemos mantener niveles óptimos de acidez en el estómago, entonces el nitrato no presentaría riesgo de cáncer de estómago. No es conocida la dosis necesaria para provocar cáncer de estómago en el hombre, pero se sabe que la velocidad de reacción aumenta con el aumento de la concentración de nitrito (y por lo tanto de nitrato) (Hill, 1999).

El nitrato absorbido por una planta puede ser reducido, almacenado en los vacúolos o transportados en el flujo de la transpiración del xilema a la hoja para su reducción. Sin embargo, la mayor parte, es almacenado en los vacúolos hasta ser utilizado para la reducción en el citosol (Cardenas Navarro et al., 1999). El nitrato no absorbido por una cultura, puede potencialmente contribuir a la contaminación de las aguas subterráneas y superficiales a través de la lixiviación y erosión del suelo (Gastal y Lemaire, 2002; Wang et al., 2002).

#### 1.2.1.2 Ingestión de nitratos

Los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) son ampliamente encontrados en la naturaleza, en el suelo, en las plantas y en el agua. Ellos representan uno constituyente normal y natural de las plantas, que lo absorben a partir del suelo y lo utilizan para la síntesis de proteínas (Trinchera, 2001).

El nitrato entra en la cadena alimentaria de los organismos vivos a través de la alimentación. Para el hombre, las tres principales fuentes de ingestión de los nitratos son hortalizas, agua y carne (Santamaría, 1997).

Los nitratos y sobretodo los nitritos ( $\text{NO}_2$ ) son utilizados como aditivos alimentarios en carnes preparadas y almacenadas por la acción antibacteriana de los mismos, su utilización es reglamentada por ley. En Italia están en vigor los siguientes límites: 150 mg / kg de producto para el nitrito de sodio (E250) y nitrito de potasio (E249), 250 mg / kg de producto para el nitrato de sodio (E251) y nitrato de potasio (E252).

Para los países de la Unión Europea, la directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de Noviembre de 1998 fijó los límites máximos de 50 y 0,5 mg /L, respectivamente, de  $\text{NO}_3$  y  $\text{NO}_2$  para el agua destinada al consumo humano, e impuso a los Estados Miembros la siguiente condición:  $(\text{NO}_3 / 50) + (\text{NO}_2 / 3) \leq 1$  (mg / L).

Entre los diversos productos alimentarios, los productos hortícolas son aquellos que más contribuyen a la ingestión diaria de nitratos, porque ellos contienen cerca de 70 a 94% (ANEXO 1), mientras que su contribución a la ingestión de nitrito es menor, y menos del previsto por los productos a base de carne (Santamaria, 1997), cuando las hortalizas están damnificadas, mal conservados o almacenados durante largos períodos pueden contener hasta 400 mg / kg de  $\text{NO}_2$  (OMS, 1995). En algunas zonas con agua potable con elevado valor en nitratos ( $> 50$  mg / L) la contribución del agua en la ingestión diaria de nitratos puede exceder el 50% (Speijers, 1998).

En el último informe sobre la evaluación toxicológica de nitrito y nitrato, la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO) redujo a menos de la mitad la dosis diaria aceptable (Acceptable Daily Intake, ADI) para nitritos ( $\text{NO}_2$ ) cerca de 0,06 mg / kg de peso corporal (Speijers, 1996b), a la vez que confirmó ADI para nitratos (3,65 mg / kg de peso corporal, expresada como  $\text{NO}_3^-$ ) (Speijers, 1996a).

El concepto absorción diaria aceptable fue definido por el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (Joint Experto Committee on Food Additives, JECFA) para las sustancias intencionalmente añadidas a los alimentos o contaminantes (pesticidas, herbicidas y fertilizantes).

Sin embargo, el Comité Científico de la Alimentación de la Comisión Europea (European Commission's Scientific Committee for Food, SCF), en virtud del hecho de que las hortalizas suministren la mayor contribución a la ingestión de nitrato, propuso la introducción de límites máximos para el contenido de nitratos y de adopción de técnicas culturales destinadas a reducir el contenido de nitratos en hortícolas (EC, 1995).

En el último informe sobre la evaluación de la ingestión de nitratos teniendo como resultado el consumo de hortalizas por la población de la Unión Europea, la SCF (European Commission's Scientific Committee for Food) verificó que la ingestión media de nitratos en los Estados Miembros es menor que la ADI establecida por los organismos mundiales de protección de la salud pública. El mismo informe verificó que las principales fuentes de ingestión de nitratos son las patatas y la lechuga. La primera, porque representa el vegetal más consumido (55-283 g / día), y la segunda por el alto contenido de nitratos (971-2.971 mg / kg de producto fresco). Las principales fuentes de nitrato se encuentran en la lechuga y remolacha azucarera, que representan 47% de la absorción diaria de nitratos resultantes de consumo de productos hortícolas (Santamaria et al., 1999).

Los vegetarianos (de acuerdo con un estudio en Reino Unido) poseen una tasa de absorción de nitratos bastante elevada. La ingestión media de  $\text{NO}_3$  de este grupo llega a los 70,5 mg / día, siendo el más elevado de 163 mg / día (MAFF, 1998b). En cualquier de los casos, estos valores son inferiores al ADI y son semejantes a los estimados en 1997 para la población de todo Reino Unido (en media 88 mg / día, con un valor de 136 mg / día al percentil 97,5 - MAFF, 1998a).

#### 1.2.1.3 Límites de nitratos en hortícolas

A partir de consideraciones de la SCF (European Commission's Scientific Committee for Food) sobre los efectos de nitratos presentes en los alimentos (EC, 1995), y con el objetivo de proteger la salud pública, el 15 de febrero de 1997 entró en vigor en la Comisión Europea Reglamento n. 194/97 un documento sobre los niveles máximos de nitrato admisibles en la lechuga y espinacas en todos los países de la Unión Europea (ANEXO 2). El principal objetivo de este reglamento fue estandarizar los límites en vigor en algunos Estados Miembros, que habían sido debidos a las dificultades comerciales en la Unión Europea. Por ejemplo, antes del 15 de febrero de 1997, una lechuga producida en verano, en Italia, con contenido de  $\text{NO}_3$  de 3100 mg / kg de producto fresco, no podría ser exportada a Alemania, pero puede ser aceptada en Bélgica (o Francia).

El 2 de Abril de 2002 la Comisión de las Comunidades Europeas substituye el Reglamento n.194/97 - ya modificado por algunos Reglamentos n. 864/1999 y 466/2001 - con el Reglamento n. ° 563 (tab.6). Las principales novedades introducidas con el nuevo reglamento, en vigor desde 22 de abril de lechuga dicen respecto:

- 1) la cosecha de abril a septiembre (meses que hay más radiación solar) y, para el recogimiento octubre a marzo, fue establecido un periodo máximo admisible de nitrato menor en aire libre que en ambiente protegido;
- 2) por primera vez, lechuga tipo "iceberg", fue separada de las otras, suministrando límites más bajos;

Comentando la primera noticia, es obvio que no es la prueba científica sobre el peligro de nitrato de imponer diversos límites a lo largo del año, pero sólo la constatación de que, cuando la radiación solar es menor el contenido de nitratos en hortalizas es mayor. Por ejemplo, los niveles de nitratos en lechuga producida en Dinamarca, Bélgica, Alemania, Gran Bretaña y los Países Bajos son semejantes, pero como poseen peores condiciones de luminosidad, son significativamente superiores a los de la lechuga cultivada en Italia y en España (MAFF, 1992 ).

Los bebés son los más vulnerables a la metahemoglobinemia: consumen muchos productos hortícolas y una gran cantidad del agua (la más importante fuente de nitrato en la formación de metahemoglobina). En algunos países, como en Austria y en Bélgica, para los productos hortícolas destinados a los niños, hay un límite de 250 mg / kg de producto (Schuddeboom, 1993). Además, en los documentos de preparación del Reglamento N.194/97 fue indicado el máximo nivel de NO<sub>3</sub> de 250 mg / kg de producto fresco para la comercialización de productos vegetales para lactentes y niños jóvenes (Doc. VI/3080 // 93 - rev 3), de acuerdo con las alegaciones hechas en 1981 por la Sociedad Europea de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica.

La comisión Europea tiene la intención de avanzar "de tres en tres años" para "una revisión de los contenidos máximos de nitratos en lechuga y espinacas, con el objetivo global de reducir esos niveles". Eso será posible sobre todo si los Estados Miembros se aplican códigos de buenas prácticas agrícolas para reducir los niveles de nitratos.

Actualmente, en Reino Unido y en Irlanda, para la lechuga, y en Reino Unido, Irlanda, Finlandia, Dinamarca y Países Bajos, para espinacas, una vez que los agricultores siguen el código de buenas prácticas agrícolas, es posible comercializar productos con valores máximos de nitratos superiores a los fijados por el Reglamento (CE) n. 563/2002, pero sólo si se cultiva en el mismo país; no es posible comercializar lechuga y / o espinacas con concentraciones superiores de nitratos a las suministradas por el mismo reglamento, en el caso de que sean provenientes de otros estados.

Para todos los contaminantes en alimentos, la Comisión Europea pide a los Estados Miembros que comuniquen los resultados de sus inspecciones y, por lo que respecta a los nitratos, de elaborar un informe sobre las medidas tomadas y los progresos realizados en la aplicación de códigos de buenas prácticas agrícolas para reducir las concentraciones.

Desde el 1996, el Ministerio de la Agricultura de Reino Unido hace cada año un control de nitratos en lechuga y espinacas. En 2001, sólo el 4,7% de la lechuga analizada sobrepasaba los límites permitidos

Espinacas y lechuga están entre los productos hortícolas que acumulan más nitratos (Tabla 3) y son dos de las principales fuentes de nitratos en la dieta. Es destacable el caso de la patata, que sólo por sí representa una tercera ingestión diaria de nitratos en Reino Unido. Por esta razón, en los países del centro y norte de Europa, los contratos de venta, para esta Solanácea posee una concentración máxima de nitrato de 200 mg / kg de producto fresco.

La necesidad de imponer límites máximos de nitrato, es tanto para la salud humana como para la comercialización de productos hortícolas (Santamaria et al., 2002). Los productos hortícolas producidos en el sur de Italia tiene un valor más bajo de nitrato que la región Norte, en especial cuando que racionaliza el uso de abonos nitrogenados o se utilizan estrategias para reducir o sustituir con amonio el nitrógeno nítrico (en especial en cultivos sin suelo) (Santamaria, 2001). La disminución del valor de nitratos puede representar un valor añadido para la producción hortícola (ya caracterizada por el alto contenido de micronutrientes esenciales y antioxidantes) y también porque el consumidor está dispuesto a pagar más 17% por un producto con menos nitratos (Auerswald et al., 1999).

Tabla 3 – Tendencia de las hortalizas y verduras a acumular nitratos

| <b>Elevada</b>   | <b>Media</b> | <b>Baja</b>       |
|------------------|--------------|-------------------|
| Espinaca         | Col roja     | Coles de Bruselas |
| Acelga           | Coliflor     | Endivia           |
| Repollo blanco   | Apio         | Cebollas tiernas  |
| Lechuga          | Col y nabo   | Cebollas tiernas  |
| Hinojo           | Calabacín    | Judías verdes     |
| Remolacha        | Berenjena    | Pepino            |
| Rábano, rabanito | Zanahoria    | Pimiento          |
| Nabo             | Tomate       | Eapárrago         |
| Rucola           | Patata       | Haba              |

#### 1.2.1.4 Principales causas de la contaminación por nitratos en hortalizas

Las principales causas de la contaminación por nitratos en hortalizas y verduras (Scientific Panel on Biological Hazard, 2003; OMS, 2001; Archerd, 2002) son:

- Las prácticas agrícolas inadecuadas, la mezcla de líquidos de orina y excremento de los animales domésticos por malas prácticas ganaderas o agrícolas, los residuos industriales y el pésimo manejo de la basura contribuyen en gran medida al enriquecimiento de las aguas con nitratos, causando desequilibrios con presencia de contaminantes y empobrecimiento del medio en oxígeno;
- El desarrollo de una agricultura intensiva y centrada en el monocultivo (sin rotación del tipo de cultivo) lleva a un abuso de fertilizantes inorgánicos. El agricultor, para obtener el máximo rendimiento de sus cosechas hace un uso indiscriminado y sistemático de abonos nitrogenados de origen química, que al hinchar los cultivos con gran cantidad de agua, aumentan su peso y con ello la producción, pero en detrimento de su calidad e inocuidad;
- Un factor decisivo del acumulo de nitratos en verduras y hortalizas lo constituye el invernadero. Con este sistema para obtener productos fuera de su estación hasta en invierno, la acumulación de nitratos en los vegetales es mucho más alta en dicha estación del año. La razón es que por falta directa de luz solar los cultivos en el invernadero no metabolizan correctamente el abonado en nitratos. Por lo general, el uso de invernadero dobla o triplica la acumulación de nitrato;

No obstante, sobre el contenido de nitratos, no sólo afecta la época de cultivo sino también la hora del día en que se cosechan las hortalizas y verduras de temporada. Así, cosechas efectuadas temprano en la mañana cuando las plantas han sido expuestas a horas de restricción de luz, presentan un mayor contenido de nitratos con respecto aquellas cosechadas por la tarde.

- Otro factor a tener en cuenta es la especie de hortaliza. Por ejemplo las frutas, las coliflores o las judías verdes acumulan de por sí muy poco nitrato en su masa vegetal, mientras que con las espinacas, la remolacha roja, las acelgas o las lechugas sucede lo contrario.

#### 1.2.1.5 Factores que influyen en las concentraciones de nitratos en los productos hortícolas

El contenido de nitrato en el suelo varía a lo largo del periodo vegetativo, o sea, disminuye a lo largo de la estación de crecimiento como una función de la lixiviación y absorción de los cultivos. La absorción de nitratos por las raíces es regulada por la transpiración (flujo de masa), humedad del suelo y temperatura del suelo (difusión).

La disminución de nitratos es acelerada por las condiciones que promueven la fotosíntesis, tales como: favorables temperaturas, altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y elevados niveles luz. La acumulación de nitrato se duplica para cada 5°C de aumento de temperatura, esto para temperaturas comprendidas entre 5 y 20 ° C (cit. por Breimer et al., 1979).

Los niveles de nitratos varían entre las partes de la planta. Por ejemplo, en la espinaca, los pecíolos contienen 4-9 veces más nitratos por unidad de materia seca, que las láminas foliares (Breimer et al., 1979). Santamaria et al (1999) midió las concentraciones de nitratos en la espinaca, donde verificó que varía de 925 ppm en la lámina a más de 4000 ppm, en el pecíolo.

Factores ambientales tales como la intensidad luminosa, temperatura del aire, temperatura del suelo, fertilidad y humedad también influyen los valores de nitratos en hortícolas. Hortalizas cultivadas en otoño en latitudes elevadas, conteniendo nitratos como fertilizante, bajas temperaturas del aire, heladas y bajas intensidades de luz, generalmente provocan un aumento de los niveles de nitratos. Un estudio en invernadero, revela que los valores de nitratos en hortalizas cultivadas, aumentó de octubre a enero (Stopes et al, 1988 ref. Por Hortideas, 1989). En un estudio semejante de Santamaria et al. (1999), las concentraciones de nitrato en espinaca fueron de 1622 ppm en primavera para 2580 ppm de un cultivo de invierno.

La fertilidad del nitrógeno tiene que ser utilizada para producir el mejor crecimiento de los cultivos sin que conduzca a una acumulación excesiva de nitratos en los tejidos.

Deficiencias de Mo, Mn, Cu y B pueden aumentar los niveles de nitratos (Breimer et al., 1979) debido a la disminución de la actividad NR (nitrato-reductasa) perjudicada (Foyer y Noctor, 2002).

Las heladas del campo aumentan perceptiblemente las concentraciones del nitratos de la hoja, mientras que las raíces se protegen inicialmente contra helada, la captación del nitrato continúa después del acontecimiento de la helada, pero como los sistemas fotosintéticos son dañados por la helada, los nitratos se acumulan en las hojas. Un período de tiempo suave,

soleado que sigue a una helada puede permitir que los sistemas fotosintéticos se recuperen, resultando una caída en la concentración de nitratos en la hoja.

### **1.3 Oxalatos**

Los oxalatos están presentes en muchas familias de plantas, pudiendo ser encontrados en una vasta gama de productos hortícolas, frutas, frutos de cáscara y plantas silvestres comestibles. El oxalato no tiene ninguna utilización metabólica en el organismo ya que, desde que es absorbido, será transportado a los riñones para ser excretado en la orina como un producto de desecho. La cantidad de oxalato excretada en la orina es un factor de peligro importante en el desarrollo de los cristales de oxalato cálcico, el componente más común de las piedras del riñón. Los oxalatos también disminuyen la absorción intestinal de calcio y magnesio (Libert y Franceschi, 1987).

Se ha podido reducir el contenido de oxalatos en ciertas especies realizando las aportaciones del N en forma amoniacal, se ha incrementado por el contrario, el contenido de ácidos grasos, concretamente el ácido  $\alpha$ -linoleico (Palasniswamy et al., 2002). Compuesto que el organismo humano no puede sintetizar y que por lo tanto tiene que obtenerse a través de la dieta.

Los oxalatos disminuyen la disponibilidad de una serie de oligoelementos, debido a la formación de complejos insolubles (Heaney et al., 1988; Bohn et al., 2004). Pueden ser encontrados como formas solubles e insolubles en plantas. Las sales solubles se forman cuando el oxalato se liga con el potasio, sodio y magnesio (el oxalato de magnesio es menos soluble que las sales de sodio y potasio), mientras que las sales insolubles son producidos cuando el oxalato se liga con el calcio y el hierro. Por último, el oxalato también puede ser encontrado libre como ácido oxálico.

El contenido de oxalatos depende, entre otros factores, de la especie y del cultivar, de los fertilizantes (sobre todo aquellos nítricos), y de fases del crecimiento vegetal (Kabaskalis et al., 1995; Makus y Hettiarachchy, 1999; Takebe y Yoneyama, 1997).

Cuando son consumidos estos oxalatos se pueden unir al calcio y otros minerales. La media del contenido de oxalato en las hortalizas comúnmente consumidas en Nueva Zelanda muestran que cocidos se reduce el contenido de oxalatos, por pérdidas de lixiviación en el agua en que estos habían sido cocinados.

El ácido oxálico forma sales solubles en agua con los iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ , también se liga con  $\text{Ca}_2^+$ ,  $\text{Fe}_2^+$  y  $\text{Mg}_2^+$  volviendo estos minerales indisponibles. Los oxalatos pueden ser encontrados en cantidades relativamente pequeñas en muchas plantas. Los alimentos ricos en oxalatos son generalmente componentes de menor importancia en dietas humanas pero por veces son importantes en dietas estacionales en ciertas zonas del mundo. Plantas como espinaca y remolacha son bien conocidas porque contienen mayores concentraciones de oxalatos que otras plantas.

La técnica cromatográfica gaseosa (Ohkawa, 1985) y de métodos HPLC (Holloway et al., 1989) realizan determinaciones exactas y fiables del ácido oxálico en plantas. El ácido oxálico tiene un contenido variable dentro de algunas especies, algunos cultivos de espinaca (Universal, Inverno Giant) contienen de 400 a 600 mg/100g de peso fresco, mientras otros llegan a alcanzar valores de 700 a 900 mg/100g de peso fresco (Gontzea y Sutzescu, 1968). El ácido oxálico se acumula en las plantas en especial durante el tiempo seco (Bressani, 1993).

La distribución del oxalato dentro de las plantas es también desigual. En general, el contenido de oxalato es más alto en las hojas intermedias y en las semillas, y más bajo en el tallo (Osweiler et al., 1985; Lilbert y Franceschi, 1987). Los informes demuestran que el pecíolo de algunas plantas como el amaranto (Bressani, 1993), espinaca y remolacha (Fassett, 1973; Concon, 1988) contienen niveles significativos más bajos de oxalatos que las hojas.

Los altos niveles de oxalatos en plantas tropicales son de alguna forma preocupante. El taro (*Colocasia esculenta*) y la patata dulce (*Ipomoea patatas*) pueden contener de 278 a 574 mg/100g peso fresco (Holloway et al., 1989) y 470 mg/100g de (Mosha et al., 1995), respectivamente. Los niveles totales del oxalato en tubérculos tropicales del inhame (*Dioscorea alata*) habían sido divulgados en la gama 486 a 781 mg/100 g DW, pero puede ser de poca preocupación nutricional ya que 50 a 75% de los oxalatos están presentes en forma soluble en agua y de modo que, se pueden lixiviar durante el cocinado (Wanasundera y Ravindran, 1994). Es importante resaltar, que algunos alimentos son tradicionalmente asados y esta forma de cocinar no da oportunidad para ocurrir pérdidas de oxalatos, a través de la lixiviación.

En vegetales de transformación, el blanqueo, congelación, o conservas, pueden contribuir para cambios en el valor nutricional, incluyendo el nivel de compuestos indeseables (Bednar et al., 1995). El tratamiento con el uso de agua (lavado, blanqueo) normalmente reduce el contenido de nitratos y nitritos y oxalatos.

## 1.4 Vitamina C

Entre los alimentos que forman parte de nuestra dieta habitual, se encuentran las hortalizas y verduras, vegetales de enorme interés por su composición y riqueza en micronutrientes y fibra. Entre los vegetales que consumimos cada día, y que no se caracterizan, en general, por el aporte energético, las hortalizas son un grupo de enorme interés y nadie duda de los resultados beneficiosos de su ingesta; su riqueza en vitaminas, elementos minerales y fibra hace que su consumo sea imprescindible para conseguir una alimentación sana y equilibrada.

De los nutrientes que nos proporcionan los alimentos, existen los denominados macronutrientes y los micronutrientes, los primeros se requieren en mayor proporción y son: proteínas, carbohidratos y lípidos; entre los segundos se incluyen otros componentes que se necesitan en menor proporción, aunque son fundamentales para el organismo, por intervenir en los más variados procesos; son las vitaminas y los elementos minerales, ácidos grasos y aminoácidos esenciales. Cada uno de los nutrientes se caracteriza por las funciones que realiza en el organismo. Las proteínas tienen principalmente función plástica, esto es, aportan los materiales necesarios para la formación de tejidos y órganos; además, también proporcionan energía y aminoácidos esenciales. Los carbohidratos y las grasas tienen función, fundamentalmente, energética, aunque las grasas proporcionan además ácidos grasos esenciales y son vehículo de vitaminas liposolubles. Las vitaminas y los elementos minerales, tienen función reguladora.

La más importante vitamina de las frutas y legumbres para la alimentación humana es vitamina C. Más de 90% de la vitamina C en la dieta humana son suministrados por los frutos y productos hortícolas (incluyendo patatas). La vitamina C es definida como el término genérico para todos los compuestos exhiben la actividad biológica del ácido L-ascórbico (AA).

La vitamina C es necesaria para la prevención del escorbuto y mantenimiento de una piel saludable, encías y vasos sanguíneos. La vitamina C es igualmente conocida por tener muchas funciones biológicas en la formación colágeno, absorción de hierro inorgánico, en la reducción del nivel de colesterol plasmático, inhibición en la formación de nitrosomina y el refuerzo del sistema inmunitario. La vitamina C como antioxidante, declaradamente reduce el riesgo de aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cancer (Harris, 1996).

Cítricos y patatas son conocidas por ser la más importante fuente de vitamina C en la dieta occidental, debido a la gran cantidad consumida (Ball, 1998). La recomendación de consumo de esta vitamina deberá ser de 100-200 mg al día, una vez que estrés es conocido en la vida moderna por aumentar la exigencia de vitamina C.

La vitamina C es más sensible a la destrucción cuando las plantas son sometidas las condiciones adversas de almacenamiento y manipulación. Las pérdidas son mayores a través de un almacenamiento prolongado, altas temperaturas, baja humedad relativa, daños físicos y de refrigeración.

Muchos factores de pre y post-cosecha influyen en valor de la vitamina C en los cultivos hortícolas. Grandes variaciones genotípicas en el contenido vitamínico habían sido examinadas por Stevens (1974) y Harris (1975). Otros factores incluyen pre-condiciones climáticas y prácticas culturales (Somers y Beeson, 1948; Lee, 1974; Harris, 1975; Mozafar, 1994; Weston y Barth, 1997). Todos estos factores son responsables de la gran variación en el valor de vitamina C en el momento de la cosecha de los frutos y productos hortícolas. Madurez de momento de la cosecha, método de cosecha, post-cosecha y manipulación también afectar el valor de vitamina C de los frutos y productos hortícolas (Kader, 1988). Métodos y procesos de transformación cuando se cocina, pueden resultar en pérdidas significativas de vitamina C (Fennema, 1977).

A pesar de varias investigaciones realizadas en el área de la nutrición, los conocimientos sobre pre y post-cosecha en la modificación del contenido de vitamina C de los frutos y productos hortícolas son insuficientes.

### **1.5 La proporción nitrato:amonio en la solución nutritiva del cultivo sin suelo. Su importancia en el rendimiento y calidad de las cosechas**

Muchos estudios (Moustafa y Morgan, 1982; Elliot y Nelson, 1983; Woodson y Boodley, 1983; Fleming et al., 1987; Kasten y Sommer, 1990; Stensvand y Gislerod, 1992) revelan la importancia que reviste la nutrición nitrogenada y la forma iónica en que el N es suministrado ( $N-NH_4^+$  o  $N-NO_3^-$ ) en el crecimiento, desarrollo y calidad de cosechas obtenidas en cultivos sin suelo; aunque, como señala Kafraki (1990), esto no ha tenido mucho impacto en sistemas agrícolas donde el suelo constituye el soporte de las plantas, puesto que la tasa de nitrificación

en condiciones normales es muy rápida y consecuentemente la forma nitrogenada predominante es  $\text{NO}_3^-$ .

La mayoría de las especies vegetales prefieren la forma  $\text{N-NO}_3^-$ , en cambio  $\text{NH}_4^+$  en alta concentración resulta tóxico para su metabolismo (Barker y Mills, 1980), por lo que se ha sugerido no adicionar a la solución nutritiva más del 10% del contenido de N-total en la forma de  $\text{NH}_4^+$  (Steiner, 1984) y el resto como  $\text{N-NO}_3^-$ . No obstante, se ha demostrado que el ion amonio es preferentemente absorbido por la planta, en lugar de nitrato, cuando su concentración es mayor de 10% del nitrógeno total presente en la solución (Kafraki, 1990) y que la adición de amonio a la solución nutritiva en concentraciones menores que 30% del N-total permite incrementar las tasas de crecimiento (Elliot y Nelson, 1983) y permite tener un efecto favorable en el número de inflorescencias/tallo, longitud de tallo y color verde de las hojas (Kasten y Sommer, 1990; Stensvand y Gislerod, 1992).

Se han llevado a cabo muchos estudios para observar el efecto de la relación  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  en cultivos sin suelo. Al parecer, la relación óptima varía considerablemente entre cultivos, por lo que los resultados de los estudios realizados sólo se aplican a los cultivos estudiados y difícilmente se aplican a otros cultivos diferentes.

Como en muchos cultivos, si el amonio es usado en combinación con nitrato en la solución nutritiva, esta relación debe variar de acuerdo a los niveles de radiación (luz) que recibe el cultivo. Soluciones nutritivas con pequeñas cantidades de amonio bajo condiciones de alta luminosidad provocan un reducido crecimiento y rendimiento. Por otro lado, en condiciones de baja luminosidad, la presencia de bajas concentraciones de amonio ha provocado un incremento en la producción biológica comparado con el crecimiento con sólo nitrato. La conclusión fue que a mayor luminosidad la relación nitrato:amonio debe aumentar, incrementando el nitrato (Morgan, 2001). Por lo tanto es preferible que la nutrición con nitrato sólo sea en plantas cultivadas bajo condiciones de alta luminosidad. Bajo condiciones de luminosidad, el suministro de amonio a bajas concentraciones (20% del nitrógeno total) estimularía el crecimiento ya que el amonio es incorporado directamente al sistema metabólico. Este hecho sugiere una economía de energía que podría incrementar la producción. Sin embargo, si la tasa de amonio es muy alta se podrían detectar síntomas de toxicidad bajo condiciones de alta luminosidad (Zornoza et al., 1987).

Está demostrado por numerosos estudios que el incremento en la concentración de nitrato en la solución no da como resultado mayores rendimientos del fruto o tamaño de fruto, pero sí

incrementa con toda seguridad el crecimiento vegetativo, es decir, peso fresco y seco del tallo. Esto se debe a que el nitrógeno tiene un gran efecto en el crecimiento vegetativo, mientras que otros elementos como potasio y calcio tienen mayor influencia en el rendimiento y calidad del fruto (Morgan, 2001).

Tal como ocurre en la producción apical en tomate, para el caso del cultivo de la lechuga la quemadura de puntas (tip-burn) puede agravarse en presencia de amonio en la solución nutritiva. La absorción de calcio es estimulada por el nitrato y deprimida por iones amonio. En un experimento realizado para observar los efectos del amonio en rabanito y lechuga, se encontró un mayor crecimiento en plantas de lechuga con un incremento de la concentración de nitrógeno amoniacal mayor a 24 ppm pero en un rango de pH de 6 – 7. Fuera de este rango el crecimiento fue reducido (Weir et al., 1972).

Para observar más de cerca la relación de nitrato:amonio en sistemas NFT, fue probado el efecto de diferentes de tasa de amonio (10-30%) en plantas de espinaca cultivadas en condiciones de baja luminosidad. Las plantas fueron sembradas en pumita o piedra pómez y en vasos pequeños y trasplantadas a cuatro sistemas NFT cuando se daba la emisión de la segunda hoja. Los tratamientos consistieron en las siguientes relaciones de nitrato:amonio 0% amonio (sólo nitrato); 10% amonio; 20% amonio y 30% amonio. Se encontró que un porcentaje de amonio afectó varios aspectos del crecimiento de la planta, así como el pH y la capacidad buffer de la solución nutritiva. El efecto del porcentaje de amonio en la elongación del tallo y floración, peso fresco del cultivo y la longitud de la raíz a la cosecha fue significativo. La elongación del tallo y la floración prematura tiende a incrementarse con el porcentaje de amonio, siendo el más alto en 30% y el más bajo en los tratamientos con 0% y 10% de amonio. El nivel más alto de amonio puede promover la síntesis de giberelina induciendo enzimas y ARN (ácido ribonucleico), causando la elongación celular y del tallo.

Los tratamientos con solo nitrato y 30% de amonio presentaron el peso fresco bajo. Hubo un incremento de 10% del peso fresco a la cosecha en el tratamiento de amonio al 30% comparado con los tratamientos de 10%y 20%, y un incremento del 15% comparado con el tratamiento de sólo nitrato. La longitud de la raíz tiende a disminuir con la concentración de amonio (Morgan, 2001).

En un estudio realizado por Martínez-Sanchez *et al.* (2004) en el que evaluaron de la fertilización nitrogenada en campo sobre la acumulación de nitratos en dos especies silvestres de interés hortícola: *Moricandia arvensis* (L.) y *Silene vulgaris* (Moench), encontraron que,

para el caso de la primera, al aumentar la dosis la de fertilización se incrementó la concentración de nitratos en las tres accesiones estudiadas. En *S. vulgaris* obtuvieron resultados muy similares, ya que al aumentar la dosis de fertilización se incrementó la concentración de nitratos. Ambas especies tuvieron una concentración de nitratos en planta por debajo de los valores máximos aceptados por la legislación vigente en productos similares como lechuga y espinacas.

Es sabido que altas concentraciones de amonio en la solución nutritiva reducen el crecimiento y pueden dañar severamente el follaje de los cultivos (Fleming et al., 1987); también, el daño es intensificado cuando se disminuyen los niveles de  $K^+$  en la solución nutritiva y los iones  $NH_4^+$  son más tóxicos cuando se aplican como única fuente de N que si se suministra en combinación con iones  $NO_3^-$  (Lips et al., 1990).

Palaniswamy et al. (2000) realizaron un estudio en el que evaluaron cuatro relaciones nitrato:amonio (1:0; 0,75:0,25; 0,5:0,5; 0,25:0,75) en la solución nutritiva sobre el cultivo de *Portulaca oleracea*. De las variables estudiadas el número de ramas, el peso fresco de parte aérea y los pesos secos de parte aérea y hojas no tuvieron diferencias significativas por efecto de tratamientos, mientras que la altura de planta fue estadísticamente mayor en los tratamientos con altas concentraciones de nitrato (1:0 y 0,75:0,25) en la solución nutritiva que los tratamientos con bajas concentraciones (0,25:0,75).

Este amplio panorama sugiere que la relación óptima de la relación nitrato:amonio, para cualquier especie, varía con los niveles de luz recibida, aunque es casi una constante que el porcentaje óptimo de nitrato aumenta cuando incrementa la radiación solar.

## 1.6 Cultivos hidropónicos

El cultivo de las plantas sin suelo, o sea, el cultivo hidropónico se ha desarrollado a partir de los descubrimientos hechos en las experiencias llevadas a cabo para determinar qué sustancias contienen las plantas y la composición de las mismas (Resh, 2001). A continuación se expone una breve historia sobre la evolución de los cultivos hidropónicos.

- 372-287 a.de C. - Theophrasto : llevó a cabo varios ensayos en nutrición vegetal;
- 1600 - Jan Van Helmont (belga): mostró en su ya clásica experiencia que las plantas obtienen sustancias a partir del agua, pero le faltó comprobar que ellas también

necesitan dióxido de carbono y oxígeno del aire. Con esta experiencia sale la primera noticia científica escrita sobre los constituyentes de la planta;

- 1699 - John Woodward (inglés) : sacó la conclusión de que el crecimiento de las plantas era resultado de ciertas sustancias en el agua, obtenidas del suelo, y no simplemente del agua misma;
- 1804 - De Saussure : expuso el principio de que las plantas están compuestas por elementos químicos obtenidos del agua, suelo y aire;
- 1851 - Boussingault (químico francés) : comprueba la teoría de De Saussure, constatando también que las plantas contienen hidrogeno y otros elementos naturales;
- 1860 – Sachs / 1861 – Knop (científicos alemanes) : eliminaron completamente el medio y cultivaron las plantas en la solución que contenía dichos minerales, est fue el origen de la “nutriculture”;
- 1882 – Tollens / 1914 – Tottinghan / 1915 – Shive / 1919 – Hoagland / 1933 – Trelease / 1938 – Arnon / 1946 – Robbins : fueron algunos que desarrollaron diversas fórmulas básicas para el estudio de la nutrición vegetal, donde estas son utilizadas en el día de hoy en trabajos de laboratorio sobre a fisiología y nutrición vegetal;
- 1925 - La industria de invernaderos demostró interés en su uso, debido a la necesidad de cambiar de suelo con frecuencia para evitar los problemas de estructura y enfermedades;
- Entre 1925 y 1935 - Tuvo lugar un desarrollo extensivo, modificándose las técnicas de laboratorio para el cultivo en nutrientes hacia una producción a gran escala;
- Comienzos de los años 30 - W. F. Gericke (Universidad de California): puso los ensayos de laboratorio de nutrición vegetal a gran escala comercial, denominando a este sistema de cultivo hidroponico.

Hidroponía es una técnica bastante difundida en todo el mundo y su uso está creciendo en muchos países. Su importancia no es solamente por el hecho de ser una técnica para investigación hortícola y producción de vegetales, también está siendo empleada como una herramienta para resolver un amplio abanico de problemas, que incluyen tratamientos que reducen la contaminación del suelo y del agua subterránea, y manipulación de los niveles de nutrientes en el producto.

La hidroponía, es un término que deriva de los radicales griegos (*hydor*, que significa agua y *ponos*, que significa trabajo), se está desarrollando rápidamente como medio de producción vegetal, sobre todo de hortalizas de bajo cultivo protegido. Esta es una técnica alternativa de cultivo protegido, en la cual el suelo es sustituido por una solución acuosa conteniendo sólo los elementos minerales indispensables a los vegetales.

Por esto, los cultivos hidropónicos pueden ser definidos como la ciencia del crecimiento de las plantas sin utilizar el suelo, aunque usando un medio inerte, como la grava, arena, turba, vermiculita, pumita o serrín, a los cuales se añade una solución de nutrientes que contiene todos los elementos esenciales necesitados por la planta para su normal crecimiento y desarrollo (Resh, 2001).

### **1.6.1 Ventajas y desventajas**

Esta técnica es un medio excelente para cultivos de hortalizas no solamente en los países que tengan poca tierra cultivable, sino también en aquellos que, teniendo pequeña superficie, tengan, no obstante, una gran población. Esto podría también ser particularmente útil en algunos pequeños países cuya principal industria es el turismo (Resh, 2001).

El aumento de la producción con cultivo hidropónico se debe a las diversas ventajas que presenta en relación al cultivo tradicional (Oliver y Soria, 2002):

- a) Se consigue una óptima relación aire/agua en el sistema radicular de la planta.
- b) La nutrición está mucho más controlada que en los sistemas de cultivo en suelo. Se aplica una solución nutritiva directamente en el sustrato totalmente inerte, sin actividad química, o sobre sustratos con una débil capacidad de intercambio catiónico.
- c) En sistemas cerrados, donde el drenaje es reutilizado, se puede ahorrar agua y fertilizantes. El hecho de tener los drenajes controlados, evita la contaminación de suelos y acuíferos.
- d) Se puede utilizar distintos sustratos como la paja de cereales, fibra de coco, fibra de madera, residuo de la industria de corcho, lana de vidrio, etc.
- e) Al utilizar en la mayor parte de los casos sustratos totalmente inertes, con ausencia de enfermedades intrínsecas del suelo, convierten el sistema de cultivo sin suelo, como una buena alternativa al empleo de desinfectantes, entre ellos el bromuro de metilo, en la cual se encuentra en fase de desaparición.

f) Generalmente se obtienen en los cultivos una buena uniformidad que facilitando las operaciones culturales, como podas, entutorado, etc. Se suprimen los trabajos de incorporación de abonos de fondo, preparaciones de suelo y eliminación de malas hierbas, mejorando las condiciones de trabajo.

g) Permite una mayor precocidad y mayor potencial productivo, debido a la planta consumir menos energía para su desarrollo que en sistemas de cultivo con suelo.

Los beneficios sobrepasan en ancha escala las desventajas de la hidroponía, sin embargo, es conveniente tener presente las limitaciones y desventajas (Olivert y Soria, 2002):

a) En las instalaciones donde la solución nutritiva es drenada al suelo, puede contaminar la capa freática.

b) El abandono de sustratos y plásticos de forma incontrolada es también contaminante.

c) Puede aparecer enfermedades de la raíz, por ausencia de mecanismos de defensa de los sustratos. Un ejemplo es *Phytium* que actúa en sistemas de cultivo sin suelo sobre plantas adultas, produce enanismo y llega a matar las plantas.

d) El sistema requiere mayor precisión en el control del riego y en la nutrición. En cultivos sin suelo se trabaja con bajos volúmenes de sustrato, con poca reserva de agua y un error puede traer consecuencias fatales.

f) El establecimiento de cultivo sin suelo, supone un mayor coste de instalación, tanto por los elementos de riego, como de la adquisición de contenedores y sustratos.

g) Por ser una técnica nueva para el agricultor, requiere de un acompañamiento técnico, aunque muchas de las veces pasa a ser una ventaja, pues este servicio acaba ser un acompañamiento integral del cultivo.

### **1.6.2 Cultivo en bandejas flotantes (“floating system”)**

En un cultivo el sistema de riego es un factor fundamental a tener en cuenta, una vez que va a influir sobre el desarrollo del cultivo. Los sistemas de riego tradicionalmente usados en los invernaderos en toda Europa y en el Mundo son el riego por aspersión. Sin embargo, este tipo de riego puede dar origen a una mala uniformidad de distribución del agua en las plantas,

dando lugar a plantas no uniformes en el crecimiento y a su vez, con desequilibrios entre la parte aérea y radical.

De modo que, en Italia por lo que respecta a la horticultura ya existen sistemas de riego innovadores, siendo estos el riego de flujo y reflujo del agua (Ebb-and-Flow) y riego de bandejas flotantes permanentes (Floating System). Estos sistemas de riego presentan muchas ventajas en los cultivos protegidos (Cros et al., 2003).



Fig. 3 – Aplicación de floating system

Este cultivo constituye una técnica económica y rápida de producción en hidroponía, alternativa al monocultivo sobre terreno desinfectado, fundamentalmente ante la prohibición de uso del bromuro de metilo (Sportelli, 2003). Este cultivo se basa en el crecimiento de las plantas con soluciones nutritivas constituidas por agua y fertilizantes. Algunos métodos emplean sustratos orgánicos, turbas, o inorgánicos, vermiculita, arena, grava, lana de roca, etc., permitiendo el anclaje de las raíces, a diferencia de los que no prevén un soporte para tal fin (Castagnino et al., 2005).

Siendo así, el empleo de semillas para el inicio del cultivo presenta ventajas sobre el método tradicional: optimización de la germinación, menor empleo de mano de obra, posibilidades de anticipar la entrada al mercado en casi un mes, mejor control de malashierbas y una mayor calidad del producto final (Ramponi, 2000).

Este cultivo sin suelo permite optimizar la producción y el crecimiento ya que controla ciertos factores decisivos (solución nutritiva, contenido en humedad, temperatura, etc.). Esta es una

técnica en la cual las bandejas que contienen las plantas flotan de forma continua en una cama de agua o solución nutritiva. La técnica de cultivo en bandejas flotantes es la más fácil y ventajosa para producir hortalizas pequeñas, con elevada eficiencia hídrica y nutritiva (Niñirola, 2008).

La aireación de la solución nutritiva en cultivos en Floating system es indispensable para la producción de cultivos de hoja. La concentración de oxígeno en la solución nutritiva disminuye al aumentar la temperatura. Por este motivo, durante los periodos más cálidos, a fin de evitar la asfixia radical, es conveniente emplear oxigenadores (Castagnino et al., 2005).

Respetando los sistemas tradicionales de cultivo, aquellos cultivos sin suelo y en particular los de bandejas flotantes, ofrecen interesantes perspectivas y garantizan mayores posibilidades de reducir el contenido de nitratos (Sportelli, 2003) al remplazar, en los últimos días del ciclo de producción, la solución nutritiva utilizada por agua. De esta manera, se evitan los riesgos de metahemoglobiemia causados por los cultivos de invernadero que acumulan en exceso nitratos, que una vez consumidos, en la boca se transforman en nitritos cuyo consumo puede resultar tóxico para la salud humana (Castagnino et al., 2005).

En este tipo de cultivo existen elementos fundamentales a tener en cuenta, entre ellos las bandejas de poliestireno expandido u otro material de bajo peso volumétrico hidrófugo, bien como las bancadas de cultivo cerradas para contener el agua y los fertilizantes, con una profundidad de 10-25 cm (Niñirola, 2008).

En el “Floating system” el tipo de bandeja muy utilizado es el “styrofloat”, donde los comunes alvéolos han sido sustituidos por fisuras tronco-cónicas de muy poco volumen, que limitan al máximo la utilización del sustrato, únicamente necesario para soportar la semilla (Niñirola, 2008).

Es una técnica de cultivo donde las plantas en bandejas de poliestireno expandido se encuentran flotando de manera permanente sobre una lámina de 5-10 cm de agua o solución nutritiva. Esta técnica de cultivo permite reducir los ciclos de cultivo con respecto al cultivo en suelo, siendo una técnica muy interesante por su bajo coste de instalación y mano de obra, ausencia de malas hierbas y rapidez en el momento de la recolección. Permite también un cultivo de gran densidad de plantas y la obtención de una abundante cosecha, así como el control de parámetros importantes como los nitratos que tienden a acumularse en algunas especies como *Eruca vesicaria* (Santamaria et al., 1997) y que mediante esta técnica es

posible reducirlos con éxito. Este método de cultivo presenta un uso muy eficiente del agua dentro del invernadero (Galloway et al., 1996).

Además, la difusión de enfermedades fúngicas de las hojas son prácticamente nulas por falta total de humedad de las hojas y el producto terminado (hortalizas de hojas) resulta limpio y listo para el embolsado y la venta (Niñirola, 2008).

### **1.7 Cultivos “baby leaf” en “floating system”**

Este sistema permite la obtención de hojas de vegetales de pequeño tamaño “Baby leaf” listas para consumir (IV Gama), cuyo consumo a nivel mundial muestra una tendencia creciente (Castagnino et al, 2005). Dicha categoría de producto ha podido desarrollarse gracias a los espacios de exposición brindados por la gran distribución organizada (GDO) (Castagnino et al, 2005).

La elaboración de hortalizas de IV Gama como lechuga, rúcula y otras especies requiere la puesta a punto de sistemas de cultivo que permitan rapidez de los ciclos, uniformidad de crecimiento, automatización de algunas operaciones, higiene y control de la calidad del producto (Castagnino, 2005). Por otro lado, el aprovechamiento de especies de hoja pequeña “baby leaf” para productos mínimamente procesados en fresco (MPF) ha aumentado en los últimos años, tanto por el hecho del incremento del consumo de dichos productos, como por el tipo de aprovechamiento, en forma de hojas enteras de entre 8 y 12 cm., lo cual supone una escasa sección expuesta a la oxidación, la de su pecíolo, aumentando las posibilidades de conservación tras su proceso mínimo (González et al., 2004).

Para la obtención de hortalizas IV Gama en Floating System la selección del sustrato a utilizar y el valor de pH son factores claves. Por razones fisiológicas y químicas los valores óptimos de pH se sitúan entre 5,5 y 6,5, si bien desde un punto de vista práctico el rango aceptable es de 5 a 7 valores inferiores o superiores a este intervalo provocan desequilibrios nutritivos seguidos por un empeoramiento de la funcionalidad radical (un valor bajo de pH reduce la absorción de calcio) y el hecho de que puedan ocurrir fenómenos de precipitación química con la consiguiente deficiencia nutritiva, sobretodo en lo referido a micronutrientes (Malorgio y Padosi, 2000).

## 2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Estudiar el efecto de diferentes ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (100:0; 75:25; 50:50; 25:75) en la calidad y producción de colleja (*Silene vulgaris*) tipo "baby leaf" en bandejas flotantes (floating system), a través de la determinación de concentraciones de nitratos, oxalatos, vitamina C y variables de crecimiento vegetativo: altura de las plantas, número de hojas por planta, rendimiento (densidad de plantas/m<sup>2</sup>), área foliar, clorofila (SPAD), peso seco y longitud, volumen y número de bifurcaciones de las raíces.

## 3. ENSAYOS SOBRE LA INFLUENCIA DEL RATIO $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ EN LA PRODUCCIÓN DE *SILENE VULGARIS* EN BANDEJAS FLOTANTES

### 3.1 Introducción

En los últimos años ha aumentado el interés en la horticultura de productos ya listos para uso consumo conocidos como "cuarta gama", los cuales están en fase avanzada de estudio tecnológico para la preparación y utilización segura (Nguyen-The y Prunier, 1989; Pratella y Tonini, 1995; Caponigro y Piro, 1998; Senesi, 1998). Esta categoría de productos hortícolas está muy difundida en los países del norte de Europa y tuvo una rápida propagación en Italia, sobre todo por lo que respecta a las especies de hoja "pequeña" empaquetado para ensaladas mixtas.

Para la obtención de estos productos es necesario desarrollar sistema agrícolas que favorezcan la uniformidad de crecimiento, un rápido ciclo de crecimiento, automatización de algunas operaciones, de control de la calidad del producto y higiene. Los sistemas de cultivo sin suelo, comparado con los sistemas de cultivo tradicional responden a esas pretensiones y, en concreto, ofrece un mayor potencial en la reducción del valor de nitratos y oxalatos en los vegetales. Incrocci et al. (2001) constató que el contenido de nitratos en las hojas que son cultivadas en floating system fue de 37% menor que en hojas cultivado en sistema tradicionales.

La técnica utilizada para esa finalidad proporciona, en alternativa, la sustitución de  $\text{N-NO}_3$  con  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  o  $\text{NH}_4^+$ , reduciendo la cantidad de  $\text{N-NO}_3$  en la solución o la sustitución de solución nutritiva (SN) por agua algunos días antes de la primera cosecha del producto (van der Boon et al., 1990). El sistema de bandejas flotantes suscita interés en cultivo de hortalizas

de hoja de ciclo corto para ser atribuidos a la IV gama, permitiendo también una buena aplicación de las técnicas sugeridas para reducir el tenor de nitratos.

### **3.2 Material y métodos generales**

Se realizaron dos experimentos idénticos y consecutivos en la Estación Experimental Agroalimentaria Tomás Ferro (ESEA) de la UPCT ubicado en la palma (Cartagena). El primero se realizó la siembra el 29 de Febrero de 2008, se realizaron tres muestreos de las plantas enteras, a los 35, 38, y 42 días (este corresponde al fin de la duración del cultivo), el segundo se realizó la siembra el 10 de Abril de 2008 y los muestreos fueron a los 28, 32 y 36 días (este corresponde al fin de la duración del cultivo). En ambos experimentos se utilizó una variedad de colleja de la accesión local 04-404, proveniente del banco de germoplasma de la UPCT.

En este punto se procederá a la descripción de la metodología general utilizada en el presente experimento refiriéndose simultáneamente el material utilizado.

#### **1. Preparación de las instalaciones**

Antes de iniciar la experiencia se procedió al acondicionamiento de las instalaciones, o sea, se procedió a la limpieza y preparación de los materiales a utilizar en la misma.

En primer lugar se realizó la limpieza y desinfección de los materiales fundamentales, tales como, las bandejas flotantes (tipo styrofloat), los bidones que irán a contener la solución nutritiva y finalmente, las mesas de cultivo.

Luego se comprobaron todos los dispositivos de bombeo, así como los datalogger utilizados para el registro de datos ambientales. Los aparatos utilizados para el bombeo tanto de aire como de agua son Air pump 400 (EHEIM) y Decor 12 (ESPA), respectivamente, y el datalogger es CR10X (Campbell Scientific), con las sondas que miden la temperatura del aire, la temperatura del agua, humedad relativa, la radiación solar y el oxígeno disuelto en agua. También se utilizan pequeñas sondas Escort Junior para la medida de la temperatura de agua.

## 2. Siembra y conducción del cultivo

Después, de terminada la limpieza y desinfección de los materiales a usar en la experiencia, efectuamos la siembra. La siembra de *Silene vulgaris* se realizó a mano, estimando el número de 20 semillas por fisura. Los materiales utilizados para la siembra fueron las bandejas styrofloat, turba y vermiculita.

Las bandejas styrofloat son bandejas de poliestireno expandido producidas por Europak s.p.a., que poseen unas fisuras de 17,1x2,5 cm de forma troncocónica con unas dimensiones de 96x60x3,5 cm y el número de fisuras por bandeja es de 34x3 filas, que se adaptan a las mesas de flotación dividiéndolas en dos para dar lugar a dos bandejas de 60x41 cm y un trozo sobrante.

A su vez, el sustrato utilizado es una mezcla equilibrada de turba negra y rubia de la marca Floragard designada Sustrato comercial tipo S, que se introduce en las fisuras de forma manual presionando y se distribuye bien por toda la superficie.

Seguidamente se utilizan unos utensilios redondos y planos para comprimir la turba. Finalmente la vermiculita utilizada es la marca Projar del tipo S y cuyo calibre es de 0,5 a 3 mm, se coloca sobre la fisura una vez sembrada y este proceso se lleva a cabo bien mano o bien mediante el uso de recipientes cilíndricos de abertura ancha.

Después de efectuada la siembra, se humedece y las bandejas se introducen en una cámara climática (SANYO-Fitotron) con condiciones ambientales controladas (temperatura constante a 21°C, una humedad de 90% y oscuridad durante 5 días) para facilitar la germinación. Posteriormente, las bandejas se transportan a un invernadero de policarbonato, donde serán colocadas en las mesas de flotación de dimensiones 2,7x1,25x0,2 m que contienen agua y se dejan en esas condiciones aproximadamente 7 días hasta que las plantas tengan un leve desarrollo.



Fig. 4 – (A) Bandeja flotantes utilizada en la experiencia; (B) Distribución de la turba en las bandejas; (C) Aspecto de las semillas de colleja utilizadas en el experimento

### 3. Composición de la solución nutritiva y el diseño experimental

Con el desarrollo de la raíz se aplica la solución nutritiva, que está formada por fertilizantes comerciales, anteriormente estudiados y calculados y que se pesan y añaden al agua en el mismo invernadero (Tabla 4). Se utilizaron cuatro soluciones distintas conteniendo todas ellas 12 mmol/L, con los siguientes ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ : 100:0, 25:75, 50:50 y 25:75.

Tabla 4 – Concentraciones (g/L) por solución nutritiva e los diferentes elementos nutritivos

| Elementos nutritiva  | Concentraciones (g/l) |           |           |           |
|----------------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|
|                      | 100/0 (1)             | 75/25 (2) | 50/50 (3) | 25/75 (4) |
| Nitrato Magnesio     | 1,52                  | 0,385     | 0,385     | 0,3846    |
| Nitrato Calcio       | -                     | 0,579     | 0,287     | -         |
| Sulfato Amonio       | -                     | 0,036     | 0,251     | 0,4666    |
| Sulfato Potasico     | 0,3636                | 0,545     | 0,545     | 0,545     |
| Fosfato Monoamónico  | -                     | 0,2325    | 0,2325    | 0,2325    |
| Fosfato Monopotasico | 0,28                  | -         | -         | -         |
| Sulfato Magnesico    | -                     | 1,105     | 1,105     | 1,105     |

En esta solución también se añadió una mezcla comercial de microelementos a una concentración de 0,02 g/l y un quelato de hierro a una concentración de 0,02 g/l.

El diseño del experimento estuvo formado por parcelas divididas, siendo el tratamiento principal las cuatro ratios con tres repeticiones y dos bandejas por repetición. La unidad experimental estuvo formada por una bandeja de 0,60m x 0,41m. La disposición de las mesas de flotación fue realizada al azar dentro del invernadero, como se puede ver en la figura 5.

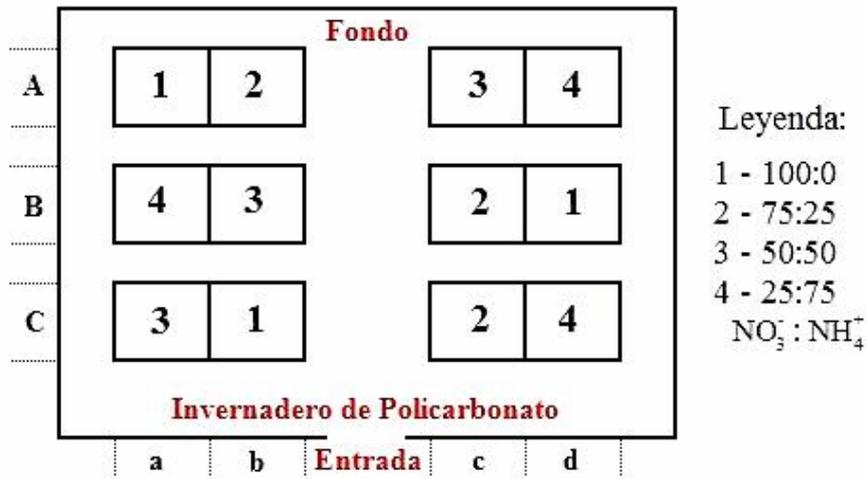


Figura 5 – Diseño experimental de las mesas de flotación

Además, cuando añadimos la solución nutritiva es necesario medir la salinidad a través de un conductímetro modelo 524 y el pH a través un phmetro modelo 507 ambos de la marca (CRISON). El pH se corrige con ácido sulfúrico, que se va añadiendo a la solución nutritiva a la vez que se remueve con una bomba y se mide el pH para ajustarlo al deseado.

Una vez que la solución nutritiva responde a las necesidades del cultivo se juntan los sistemas de bombeo de aire, para la oxigenación de la solución y se cubren los espacios en los que la dilución recibe la luz con trozos sobrantes de bandejas para limitar el desarrollo de algas.



Fig.6 – (A) Aspecto de las plántulas antes de añadir la solución nutritiva; (B) Adición de la solución nutritiva; (C) Medición del pH de la solución

#### 4. Muestreo y tomas de datos

Una vez que las plantas de colleja tuvieron dos hojas verdaderas se realizó el primer muestreo. El muestreo se llevó a cabo sacando la planta entera de las filas seleccionadas al azar de cada bandeja, los saques se hacen con cuchillos y las repeticiones se separan en bolsas o cartuchos de papel secante, bien rotulados y diferenciados.

Las muestras se llevan al el laboratorio donde se efectúa la toma de los diferentes datos como el peso fresco (la medida se toma con una balanza con precisión de miligramos), la altura de la planta (la medida se toma desde el pecíolo hasta la hoja más alta de cada planta con una regla con precisión de cm), número de plantas por fisura (se realiza el conteo por repetición), número de hojas (se cuentan la cantidad de hojas mayores de 1cm por plantas), área foliar (medida tomada con un medidor de área foliar modelo LI-3100C “LICOR”, hoja por hoja de cada repetición), clorofila (SPAD) (se toman tres hojas al azar por muestras y el aparato realiza la media, el aparato utilizado es SPAD-505 “Konica-Minolta”), peso seco (tras la toma de los demás datos las muestras se introducen en una estufa a 60°C hasta peso constante y tras estos se efectúan un nuevo pesado). La densidad de las raíces se mide con el scanner EPSON-Expression 836XL, (programa Winrhizo). Cuando tenemos todos estos datos los procesamos en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel.



Fig. 7 – (A) Medición de la altura de la planta de colleja; (B) Medidor de clorofila (SPAD); (C) Medidor de las raíces de las plantas

#### 5. Determinación del contenido de nitratos, oxalatos y vitamina C

Después de efectuado el último muestreo, se procede a la recolecta de material vegetal para posterior análisis del contenido de nitratos, oxalatos y vitamina C en las hojas de las plantas. Para el análisis de los nitratos y los oxalatos se recogen 100 g de material vegetal por cada tratamiento, que se coloca en una estufa a 60°C hasta que esté totalmente seco. Una vez que el

material esté seco, se procede a su trituración (el aparato utilizado es una trituradora Moulinex) hasta que las hojas queden en polvo. La extracción de los nitratos y oxalatos se realizó a partir de 0,2 g de hojas secas en polvo, tres repeticiones por cada tratamiento, bien rotuladas y diferenciadas. Posteriormente, se añadió 50 ml de agua destilada, siendo después agitadas por un agitador (Orbital Shaker – Modelo 481) durante 40 minutos, a una temperatura de 50°C y a 117 rpm. A continuación, los extractos fueron filtrados utilizando embudos y filtros DP 145 110 y llevados para analizar a un Cromatógrafo Iónico, (Metron HM columna 838-861) en el laboratorio SAIT de la Universidad Politécnica de Cartagena.

La determinación del contenido de vitamina C se realizó de la manera siguiente: una vez cogidos los 50 g de material vegetal del invernadero, lo ponemos en un congelador (SANYO, Modelo MDF-U52V) a una temperatura de -84°C, para que el contenido de vitamina C no sea alterado. Luego, las hojas congeladas fueron trituradas (sin pecíolo) con nitrógeno líquido en morteros, dejándolas lo más en polvo posible. Después de terminada esta tarea, pesamos 0,5 g de las hojas trituradas y se hicieron tres repeticiones bien identificadas y rotuladas por cada tratamiento, poniéndolas en un eppendorf, a los que se, añadió 2 ml de ácido metafosfórico al 14% con una micropipeta (High tech lab). El ácido metafosfórico se prepara anticipadamente, donde se colocan 7,14 g ácido metafosfórico (que se encuentra en cristales) en 50 ml de agua destilada, agitando hasta que se disuelva. .

Terminado esta labor, todas las muestras entraron en un período de incubación, colocadas en una caja con hielo triturado, durante una hora y con una temperatura de aproximadamente de 0°C. Una vez terminada la incubación, las muestras se colocan en una centrifugadora (Eppendorf, Centrifuge 5810 R), por un período de 20 minutos, con una temperatura de 5°C y 4000 rpm.

Por último, se coge el extracto limpio de las muestras colocándolo en un eppendorf de 2,5 ml. Una vez concluida toda la extracción del material, transportamos las muestras para el laboratorio de universidad, SAIT, que procederá a análisis de los extractos por HPLC (Water. Columna 2695-2996).

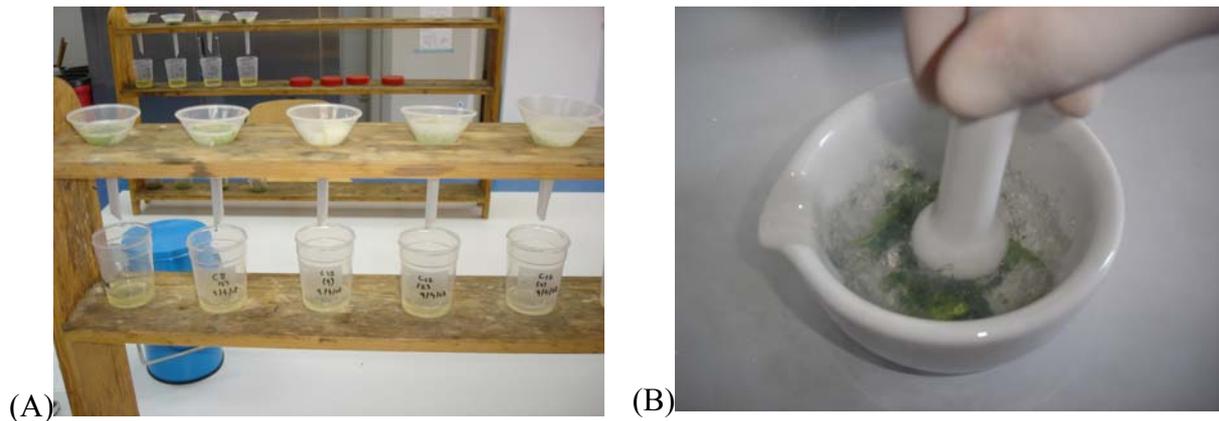


Fig. 8 – (A) Filtración para determinar el contenido de nitratos y oxalatos; (B) Trituración de hojas con el auxilio del mortero y nitrógeno líquido para evaluar la vitamina C

## 6. Tratamiento de datos

A los datos se les realizó el análisis estadístico mediante el programa Statgraphics Plus para Windows, a los que se le realizó un ANOVA simple. Para la separación de medidas se utilizó el test de Duncan ( $P < 0,05$ )

### 3.2.1 Material y métodos del primero ensayo

El presente ensayo se realizó en la Estación Experimental Agroalimentaria Tomás Ferro (ESEA) de la UPCT ubicado en la palma (Cartagena). En el experimento se utilizó una variedad de colleja de la accesión local 04-404, proveniente del banco de germoplasma de la UPCT. La siembra se efectuó a 29 de Febrero de 2008 en bandejas “styrofloat” de poliestireno expandido, alternando fisuras. Una vez sembradas, las bandejas fueron colocadas en una cámara de temperatura constante a  $21^{\circ}\text{C}$ , una humedad de  $90\%$  y oscuridad 5 días para facilitar la germinación. A continuación, las bandejas se pasaron a unas mesas de cultivo, ubicadas en el interior de un invernadero de policarbonato sin calefacción. La solución nutritiva estuvo compuesta por agua fresca los primeros siete días desde la colocación de las bandejas en las mesas de cultivo. A partir de esta fecha, que corresponde a 12 días después de la siembra (dds) se adicionó los primeros 100 litros de a solución nutritiva, mientras que, los segundos 100 litros se adicionaron 17 dds. Se utilizaron cuatro soluciones distintas conteniendo todas ellas  $12 \text{ mmol/L}$  de N, con los siguientes ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ : 100:0, 25:75, 50:50 y 25:75, con un pH: 5,6 y una CE:  $2,7 \text{ dS/m}$ . A esta solución también se añadió

una mezcla comercial de microelementos a una concentración de 0,02 g/l y un quelato de hierro a una concentración de 0,02 g/l. La solución nutritiva fue recirculada 15 minutos por cada hora al día por medio de una bomba colocada en los tanques que contenían la solución nutritiva.

Con el desarrollar del experimento se realizaron tres muestreos de las plantas enteras, el primero 35 dds, el segundo 38 dds y el ultimo 42 dds (este corresponde al fin de la duración del cultivo). Con estos muestreos se analizó el número de hojas, su altura, el área foliar, medida con un medidor de área foliar, el peso fresco y seco, el contenido relativo en clorofila en unidades SPAD, medido con un medidor de clorofila y por ultimo las raíces.

Además en el día 11 de Abril (42 dds), se recolectaron dos muestras de material vegetal de la colleja, una para la extracción de contenidos nitratos y oxalatos, y la otra para la extracción de vitamina C.

Se debe resaltar que 39 dds fue necesario realizar un tratamiento con Confidor de BAYER diluyendo, el compuesto en la proporción de 0,5 ml por litro de agua. El tratamiento se realizó pulverizando la disolución a unos 30 cm de las plantas mojándolas bien. Tuvimos que hacer este tratamiento debido a la presencia de pulgones en las plantas, que estaban perjudicando el desarrollo normal de las mismas.



Fig. 9 – Tratamiento contra los pulgones con Confidor (BAYER)

### 3.2.2 Material y métodos del segundo ensayo

El presente ensayo se realizó en la Estación Experimental Agroalimentaria Tomás Ferro de la UPCT ubicado en la palma (Cartagena). En el experimento se utilizó una variedad de colleja de la accesión local 04-404, proveniente del banco de germoplasma de la UPCT. La siembra se efectuó a 10 de Abril de 2008 en bandejas “styrofloat” de poliestireno expandido, alternando fisuras. Una vez sembradas, las bandejas fueron colocadas en una cámara de temperatura constante a 21°C, una humedad de 90% y oscuridad 5 días para facilitar la germinación. A continuación, las bandejas se pasaron a unas mesas de cultivo, ubicadas en el interior de un invernadero de policarbonato sin calefacción. La solución nutritiva estuvo compuesta por agua fresca los primeros siete días desde la colocación de las bandejas en las mesas de cultivo. A partir de esta fecha, que corresponde a 8 días después de la siembra (dds) se adicionó los primeros 100 litros de la solución nutritiva, mientras que, los segundos 100 litros se adicionaron 12 dds. Se utilizaron cuatro soluciones distintas conteniendo todas ellas 12 mmol/L de N, con los siguientes ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ : 100:0, 25:75, 50:50 y 25:75, con un pH: 5,6 y una CE: 2,7 dS/m. A esta solución también se añadió una mezcla comercial de microelementos a una concentración de 0,02 g/l y un quelato de hierro a una concentración de 0,02 g/l. La solución nutritiva fue recirculada 15 minutos por cada hora al día por medio de una bomba colocada en los tanques que contenían la solución nutritiva.

Fue necesario llevar a cabo la realización de un aclareo de plántulas 26 dds, dejando entre 12-15 plantas por fisura, lo que supuso una densidad de plantación entre 691-863 plantas/bandeja.

Con el desarrollo del experimento se realizaron tres muestreos de las plantas enteras, el primero 28 dds, el segundo 32 dds y el último 36 dds (este corresponde al fin de la duración del cultivo). Con estos muestreos se analizó el número de hojas, su altura, el área foliar, medida con un medidor de área foliar, el peso fresco y seco, el contenido relativo en clorofila en unidades SPAD, medido con un medidor de clorofila y por último las raíces. La duración del ciclo de cultivo fue de 36 días.

Además en el día 16 de Mayo (36 dds), se cogió dos muestras de material vegetal de la colleja, una para la extracción de contenidos nitratos y oxalatos, y la otra para la extracción de vitamina C.



Fig. 10 – Aspecto de las plántulas de *Silene vulgaris*

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Resultados del primer experimento

Las características agronómicas de la colleja en el momento de recolección (42 dds) con los distintos ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ : están presentados en la tabla 5. Podemos afirmar que la altura de las plantas para los diferentes ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  presenta diferencias significativas, oscilando entre 5,94 (tratamiento 50:50) y 10,33 cm (tratamiento 75:25). El numero de hojas presenta diferencias significativas, sobretodo cuando comparamos el tratamiento 75:25 con los demás. El paramentro de área foliar no presenta diferencias entre los distintos tratamientos. En relación al contenido relativo de clorofila (SPAD) cabe destacar diferencias significativas entre el tratamiento 1 (100:0) y el 3 (50:50). La mayor diferencia significativa, en referencia al peso seco y al rendimiento, la encontramos en los tratamientos 1 y 2 al compararlos con el tratamiento 3.

Tabla 5 - Características agronómicas de la colleja en distintos ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en el momento de recolección, 42 dds. La presencia de letras diferentes en las columnas indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

| Tratamiento | Altura (cm) | Nº hojas | Área foliar <sup>(1)</sup> (cm <sup>2</sup> ) | SPAD    | Peso seco <sup>(1)</sup> (g) | Rendimiento (Kg/m <sup>2</sup> ) |
|-------------|-------------|----------|---|---------|------------------------------|----------------------------------|
| 100:0 (1)   | 7,38 ab     | 12,32 a  | 220,44 a                                      | 41,5 a  | 1,19 b                       | 1,17 bc                          |
| 75:25 (2)   | 10,33 c     | 22,47 b  | 246,45 a                                      | 50,6 b  | 1,29 b                       | 1,5 c                            |
| 50:50 (3)   | 5,94 a      | 12,78 a  | 196,12 a                                      | 50,56 b | 0,63 a                       | 0,66 a                           |
| 25:75 (4)   | 7,77 b      | 16,9 a   | 149,57 a                                      | 52,43 b | 0,9 ab                       | 0,88 ab                          |

(1) – Características agronómicas tomadas por fisura

La evolución de la altura en colleja de los 4 tratamientos se representa en la figura 11. Durante la evolución del cultivo los tratamientos mantienen las diferencias significativas entre sí, sin embargo esas diferencias se acentúan en el fin del cultivo.

En lo que se refiere al primer muestreo, podemos ya verificar diferencias significativas entre el tratamiento 4, con los tratamientos 1 y 3, con los respectivos valores de 4,25, 4,99 y 5,08 cm de altura. En relación al segundo muestreo también podemos analizar diferencias entre el tratamiento 4 con 4,99 cm de altura, comparado con los restantes, que presentan resultados superiores, sin diferencias significativas entre ellos. Al final del cultivo, el tratamiento 3 presenta el valor más bajo, los tratamientos 1 y 4 presentan valores próximos entre sí y, el tratamiento que se destacó relativamente a la altura fue el 75:25, con una altura de 10,33 cm.

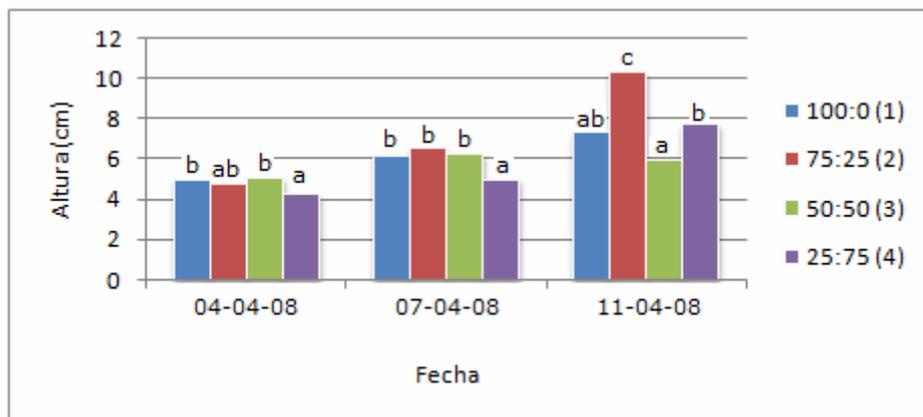


Figura 11 – Evolución de la altura de las hojas de colleja en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

En la figura 12 podemos ver la evolución del número de hojas por planta en *Silene vulgaris*, que fue incrementando de distinta forma en los diferentes tratamientos ensayados. Al inicio del cultivo, entre los diferentes tratamientos, no se aprecian diferencias significativas, pero el tratamiento 3 es con el que se obtiene mayor número de hojas con 8,04. Con la evolución del mismo a lo largo del tiempo se observan diferencias en el segundo muestreo, claramente entre el tratamiento 1 y 2 con los respectivos valores de 10,95 y 15,09 hojas. Con los restantes tratamientos se obtienen resultados idénticos entre sí. Al final del cultivo los tratamientos 1, 3 y 4 contienen grandes diferencias significativas, ya que poseen valores muy inferiores comparativamente con el tratamiento 2 (con 22,47 hojas).

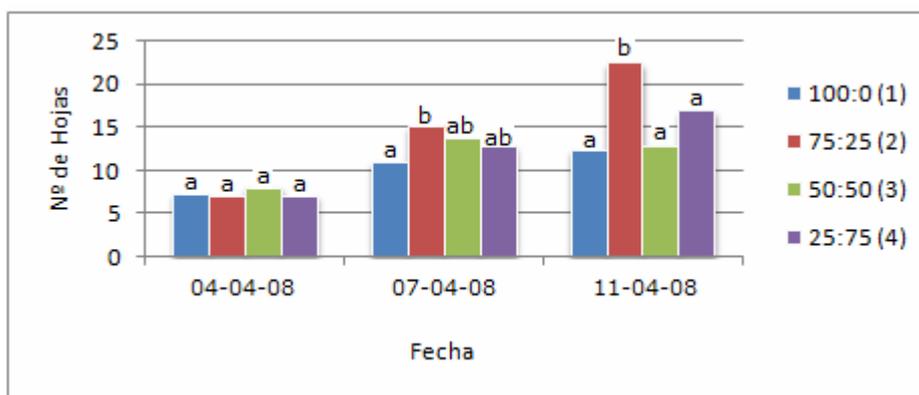


Figura 12 – Evolución del número de hojas en colleja en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P<0,05$ )

La evolución del área foliar de colleja en los diferentes ratios se presenta en la figura 13, y muestra que sólo hay diferencias significativas en el medio del cultivo. A través de la figura abajo presentada podemos constatar que en el primer muestreo no hay diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo podemos referir que el tratamiento 1 es el que más se destaca con un valor absoluto de  $166,57 \text{ cm}^2$ . En lo que respecta al segundo muestreo, podemos observar que existe diferencias significativas entre los tratamientos 4 y 3, con los respectivos valores de  $134,05 \text{ cm}^2$  y  $256,33 \text{ cm}^2$ . Los restantes tratamientos (1 y 2) poseen valores muy similares sin diferencias significativas entre sí. Finalmente, en el ultimo muestreo no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos; a pesar de esto podemos resaltar que el tratamiento 2 es el que más se destaca con un valor de  $246,45 \text{ cm}^2$ , y que el tratamiento 4 fue el que obtuvo peor resultado desde el inicio hasta al final del cultivo.

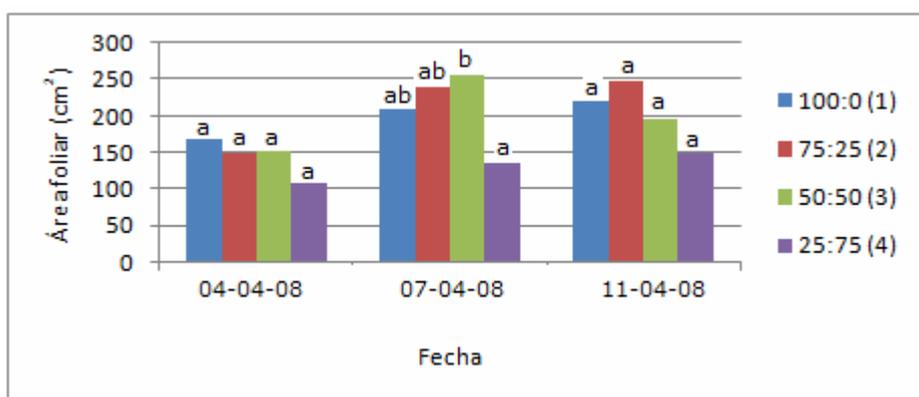


Figura 13 – Evolución del área foliar por fisura de colleja en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P<0,05$ ).

El contenido en clorofila (SPAD) está presentado en la figura 14, y muestra que sólo hay diferencias significativas al final del cultivo. En el primero muestreo podemos verificar que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, a pesar de esto quien se destacó fue el tratamiento 50:50 con un valor de 47,83. También en el segundo muestreo podemos observar que no existen diferencias entre los tratamientos, pero el que se distancia más en valor absoluto es el 25:75 con 51,1. Al final del cultivo existió diferencias entre el tratamiento 1 en comparación con los restantes, contiendo un valor de 41,5, se debe resaltar que desde el inicio hasta al final del cultivo este tratamiento presentó siempre valores inferiores. Los restantes tratamientos obtuvieron valores similares entre sí, sin embargo el que tuvo mayor contenido de clorofila fue el tratamiento 25:75 con 52,43.

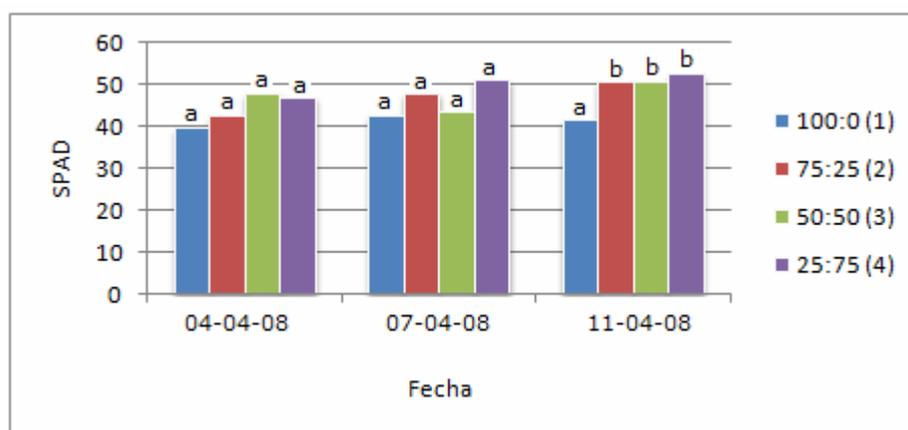


Figura 14 – Evolución del contenido en clorofila (SPAD) de colleja en distintos ratios NO<sub>3</sub>-/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas (P<0,05)

La evolución del rendimiento de colleja en los diferentes ratios se presenta en la figura 15. Durante la evolución del cultivo los tratamientos mantienen las diferencias significativas entre sí. En lo que se refiere al primer muestreo, podemos verificar que existen diferencias significativas entre los tratamientos, el tratamiento 4 es el que posee menor rendimiento con 0,57 kg/m<sup>2</sup>, mientras que el tratamiento 1 fue lo que presentó mayor rendimiento con 0,85 kg/m<sup>2</sup>. En relación al segundo muestreo, podemos verificar que no existen diferencias entre los tratamientos, sin embargo, el tratamiento 4 es lo que presenta menor rendimiento con 0,72 kg/m<sup>2</sup>, mientras que el 2 y 3 presentan un rendimiento de 1,37 kg/m<sup>2</sup> y 1,38 kg/m<sup>2</sup> respectivamente. Finalmente, en el último muestreo verificamos que existen diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2, respecto al tratamiento 3, siendo el tratamiento 3

(50:50) el que no presenta diferencias con el resto. Podemos afirmar que el tratamiento 75:25 fue el que obtuvo mayor rendimiento, siendo él de 1,5 kg/m<sup>2</sup>.

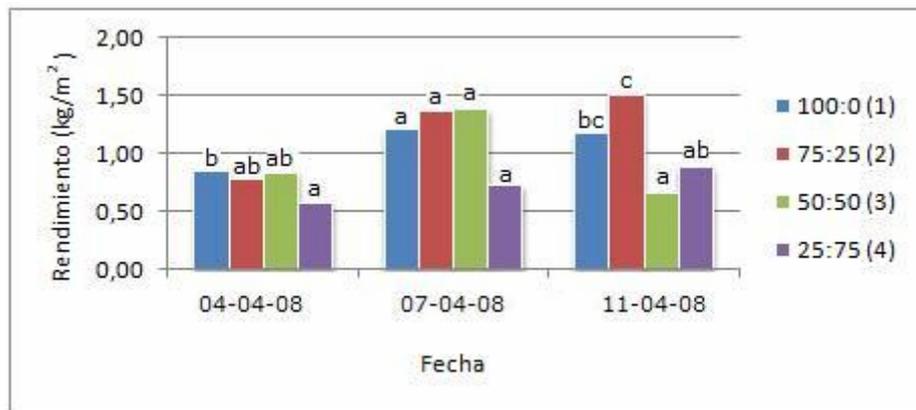


Figura 15 - Evolución del rendimiento de colleja en distintos ratios NO<sub>3</sub>-/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas (P<0,05)

El peso seco representado en la figura 16, presenta una evolución semejante a la del rendimiento. En una primera fase no analizamos diferencias significativas entre los tratamientos, pero el tratamiento 50:50 obtuvo el mayor peso seco de 0,75 g. En una segunda fase, así como el rendimiento, podemos verificar que existen diferencias entre los tratamientos 4 respecto al 2 y 3. El tratamiento 4 presenta un peso seco de 0,74 g, mientras que el 2 y 3 presentan un peso seco de 1,22 g y 1,28 g. Finalmente, en el último muestreo verificamos que se acentúan las diferencias entre los tratamientos 100:0 y 75:25, comparados con el tratamiento 50:50. Podemos afirmar que el valor del peso seco osciló entre 0,9 g y 2,29 g, correspondiendo al tratamiento 3 y 2.

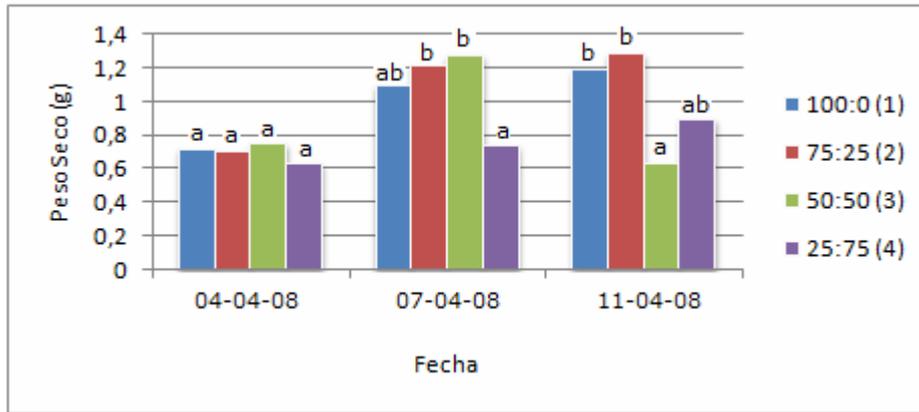


Figura 16 – Evolución del peso seco por fisura de colleja en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

La evolución de la longitud de raíces en centímetros, por distintos diámetros en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  están presentes en la tabla 6. En los dos primeros muestreos efectuados a lo largo del ciclo de cultivo, fue posible verificar que para los diferentes diámetros en los distintos tratamientos, no existieron diferencias significativas entre sí, a excepción de la primera fase. Las raíces con un diámetro comprendido entre 1,5-2 mm presentaron diferencias, siendo el tratamiento 25:75 el que presentó mayor longitud (55,55 cm), comparado con los restantes tratamientos que poseían una longitud semejante. También en el primer muestreo se verificaron diferencias significativas para las raíces con diámetro 2-100 mm, en este parámetro el tratamiento que obtuvo mayor longitud fue el 75:25 con 50,68 cm, mientras que el tratamiento 25:75 no obtuvo ningún valor con este diámetro. En relación al último muestreo del cultivo se verificó diferencias significativas por lo que respecta a la longitud de las raíces para los distintos tratamientos. La longitud de las raíces con diámetro de 0-0,5 mm presentan valores diferentes relativamente a los diámetros comprendidos 0,5-100 mm. Para las raíces con diámetro entre 0-0,5 mm el tratamiento 25:75 fue el que presentó mayor longitud con 843,54 cm y la menor longitud corresponde al tratamiento 75:25 con 474,58 cm. Las raíces con diámetros entre 0,5-1,0 mm presentan el mismo comportamiento en relación a los distintos tratamientos. En este diámetro de raíces el tratamiento 25:75 es el que tiene mayor longitud radicular, mientras que con la ratio 75:25 se obtuvo el menor valor de longitud radicular. Se debe resaltar que los tratamientos 100:0 y 50:50 contienen valores de longitud radicular similares. Para el resto de diámetros se mantiene la misma pauta de

comportamiento, el tratamiento con el que se obtienen raíces de mayor longitud es con 25:75 y el tratamiento con el que se consiguen raíces de menor longitud es el de 75:25

Tabla 6 - Evolución de la longitud de raíces por fisura, en centímetros, por distintos diámetro en distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La presencia de letras diferentes en las columnas indica diferencias significativas (P<0,05).

|                     | Tratamiento | 04-04-08 | 07-04-08 | 11-04-08  |
|---------------------|-------------|----------|----------|-----------|
| <b>Ø 0-0,5 mm</b>   | 100:0 (1)   | 725,39 a | 545,98 a | 579,25 ab |
|                     | 75:25 (2)   | 862,05 a | 542,28 a | 474,58 a  |
|                     | 50:50 (3)   | 641,36 a | 684,09 a | 522,78 a  |
|                     | 25:75 (4)   | 585,88 a | 814,99 a | 843,54 b  |
| <b>Ø 0,5-1,0 mm</b> | 100:0 (1)   | 140,08 a | 284,29 a | 267,34 ab |
|                     | 75:25 (2)   | 186,49 a | 250,89 a | 232,72 a  |
|                     | 50:50 (3)   | 136,98 a | 326,92 a | 249,91 ab |
|                     | 25:75 (4)   | 61,97 a  | 286,33 a | 392,21 b  |
| <b>Ø 1,0-1,5 mm</b> | 100:0 (1)   | 48,18 a  | 177,47 a | 162,48 ab |
|                     | 75:25 (2)   | 63,99 a  | 187,35 a | 135,16 a  |
|                     | 50:50 (3)   | 40,71 a  | 132,15 a | 155,11 ab |
|                     | 25:75 (4)   | 25,85 a  | 253,23 a | 284,24 b  |
| <b>Ø 1,5-2,0 mm</b> | 100:0 (1)   | 20,48 a  | 60,21 a  | 50,99 ab  |
|                     | 75:25 (2)   | 26,12 a  | 76,84 a  | 39,25 a   |
|                     | 50:50 (3)   | 15,58 a  | 91,77 a  | 48,52 ab  |
|                     | 25:75 (4)   | 55,55 b  | 82,09 a  | 98,33 b   |
| <b>Ø 2,0-100 mm</b> | 100:0 (1)   | 39,86 b  | 26,41 a  | 19,78 ab  |
|                     | 75:25 (2)   | 50,68 b  | 35,75 a  | 14,47 a   |
|                     | 50:50 (3)   | 32,88 ab | 40,03 a  | 17,03 ab  |
|                     | 25:75 (4)   | 0 a      | 25,71 a  | 40,75 b   |

La evolución de longitud total, del volumen y del número de bifurcaciones de las raíces, en los distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> están expresos en la tabla 7.

Por lo que respecta a la longitud total, relativo al primer y segundo muestreo se observó que no existieron diferencias significativas entre los diversos tratamientos. Esas diferencias sólo se hicieron notar en el tercer muestreo, donde el tratamiento 25:75 presentó mayor valor de longitud total con 1735,17 cm y el menor valor de longitud total corresponde al tratamiento 75:25 con 919,13 cm. En relación al volumen de las raíces, analizamos diferencias significativas entre los diversos tratamientos en el primer y tercer muestreo, mientras que en el segundo no se verificó esas diferencias. En el primer muestreo, el mayor volumen correspondió al tratamiento 25:75 con 0,43 cm<sup>3</sup>, y el menor volumen fue de 0,12 cm<sup>3</sup> en el tratamiento 50:50. Como fue antedicho, en el segundo muestreo no se verificó diferencias

significativas, sin embargo el mayor volumen en valor absoluto correspondió al tratamiento 50:50 con 0,43 cm<sup>3</sup>. Finalmente en el último muestreo, el tratamiento 25:75 obtuvo el mayor volumen con 0,33 cm<sup>3</sup>, mientras que el menor volumen fue obtenido por el tratamiento 75:25 con un valor de 0,097 cm<sup>3</sup>. El parámetro relativo al número de bifurcaciones sólo presenta diferencias significativas en el último muestreo. En el primer y segundo muestreo no existen diferencias significativas, sin embargo, el valor más elevado de bifurcaciones en el primero muestreo en valor absoluto correspondió al tratamiento 75:25 con 7789,33, y en el segundo el tratamiento que obtuvo mayor valor fue el tratamiento 50:50 con 11112,7. En el último muestreo el tratamiento 25:75 fue el que obtuvo mayor número de bifurcaciones con 12425, el mismo no se verificó con el tratamiento 75:25 que presentó el menor número de bifurcaciones con 5130,33.

Tabla 7 – Evolución de longitud total, volumen y bifurcación de las raíces por fisura, en distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La presencia de letras diferentes en las columnas indica diferencias significativas (P<0,05)

|   | Tratamiento | 04-04-08  | 07-04-08  | 11-04-08   |
|---|-------------|-----------|-----------|------------|
| <b>Longitud total (cm)</b>                | 100:0 (1)   | 973,98 a  | 1153,20 a | 1106,37 ab |
|   | 75:25 (2)   | 1189,32 a | 1181,07 a | 919,13 a   |
|   | 50:50 (3)   | 867,52 a  | 815,34 a  | 1022,65 a  |
|   | 25:75 (4)   | 731,25 a  | 1656,13 a | 1735,17 b  |
| <b>Volumen de raíces (cm<sup>3</sup>)</b> | 100:0 (1)   | 0,156 a   | 0,25 a    | 0,12 ab    |
|   | 75:25 (2)   | 0,18 ab   | 0,39 a    | 0,097 a    |
|   | 50:50 (3)   | 0,12 a    | 0,43 a    | 0,12 ab    |
|   | 25:75 (4)   | 0,43 b    | 0,31 a    | 0,33 b     |
| <b>Nº de bifurcaciones</b>                | 100:0 (1)   | 6406,67 a | 8090 a    | 6423 ab    |
|   | 75:25 (2)   | 7789,33 a | 9699 a    | 5130,33 a  |
|   | 50:50 (3)   | 4702 a    | 11112,7 a | 6169,33 ab |
|   | 25:75 (4)   | 3183,33 a | 10836 a   | 12425 b    |

El contenido de nitratos, oxalatos y vitamina C en las hojas de colleja en el momento de recolección (42 dds) con los distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> están expresos en la tabla 8. Podemos constatar que existen diferencias significativas para los diversos tratamientos en relación al contenido de NO<sub>3</sub> y C<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulados en las hojas de colleja, ya que, cuanto mayor sea la concentración de nitratos en la solución nutritiva mayor irá a ser la acumulación de los mismos en las hojas de colleja. Así, el tratamiento 100:0 es el que contiene valores más altos de nitratos y oxalatos acumulados en las hojas, siendo ellos de 3078,50 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco y

1651,5 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco respectivamente, frente a los menores valores obtenidos con la ratio 25:75. El contenido de nitratos y oxalatos de las ratios 75:25 y 50:50 no mostraron diferencias significativas entre ellos.

El contenido de vitamina C en los distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> contiene diferencias significativas. El tratamiento 100:0 posee una menor cantidad en vitamina C (11,99 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco), el tratamiento 25:75 presenta un valor intermedio de 15,99 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco, mientras que, la concentración 50:50 es aquella que contiene los mejores resultados con 21,94 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco de vitamina C.

Tabla 8 – Contenido de nitratos, oxalatos y vitamina C en las hojas de colleja en el momento de recolección, 42 dds, en distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La presencia de letras diferentes en las columnas indica diferencias significativas (P<0,05).

| <b>Ratio<br/>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> | <b>NO<sub>3</sub><br/>(mg kg<sup>-1</sup> p.f.)</b> | <b>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub><br/>(mg kg<sup>-1</sup> p.f.)</b> | <b>Vitamina C<br/>(mg kg<sup>-1</sup> p.f.)</b> |
|--|---|---|---|
| <b>100/0</b>   | 3078,50 b   | 1651,5 c  | 11,99 a   |
| <b>75/25</b>   | 2632,51 b   | 1009,16 b   | 20,76 c   |
| <b>50/50</b>   | 2611,49 b   | 664,51 ab   | 21,94 c   |
| <b>25/75</b>   | 895,29 a  | 311,01 a  | 15,99 b   |

### 3.3.2 Resultados del segundo experimento

Las características agronómicas de la colleja en el momento de recolección (36 dds) con los distintos ratios de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: están presentados en la tabla 9. La altura de las plantas para los diferentes ratios de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no presenta diferencias significativas a lo largo del ciclo del cultivo. El numero de hojas presenta diferencias significativas, oscilando entre 8,35 (tratamiento 100:0) y 11,22 hojas (tratamiento 25:75). En lo que respecta al área foliar y al contenido de clorofila (SPAD) se puede ver que no hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos, pero para el área foliar el tratamiento 100:0 presenta el mejor resultado de 147,62 cm<sup>2</sup> y el tratamiento 25:75 contiene el valor más alto de contenido en clorofila con 41,63 . El paramentro de rendimiento y peso seco no presentan diferencias significativos entre los distintos tratamientos. En lo que respecta al rendimiento el tratamiento 50:50 fue aquel con el que se obtuvo el mejor resultado de 0,66 kg/m<sup>2</sup>, y en el peso seco fue el tratamiento 100:0 con 0,53 g.

Tabla 9 – Características agronómicas de la colleja en el momento de recolección, 36 dds, en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las columnas indica diferencias significativas ( $P<0,05$ )

| Tratamiento | Altura (cm) | Nº hojas | Área foliar <sup>(1)</sup> (cm <sup>2</sup> ) | SPAD    | Peso seco <sup>(1)</sup> (g) | Rendimiento (Kg/m <sup>2</sup> ) |
|-------------|-------------|----------|---|---------|------------------------------|----------------------------------|
| 100:0 (1)   | 6,09 a      | 8,35 a   | 147,62 a                                      | 34,7 a  | 0,53 a                       | 0,62 a                           |
| 75:25 (2)   | 6,55 a      | 10,26 ab | 105,71 a                                      | 36,5 a  | 0,46 a                       | 0,59 a                           |
| 50:50 (3)   | 6,41 a      | 9,82 ab  | 126,04 a                                      | 39,6 a  | 0,46 a                       | 0,66 a                           |
| 25:75 (4)   | 6,04 a      | 11,22 b  | 95,63 a                                       | 41,63 a | 0,46 a                       | 0,52 a                           |

(1) – Características agronómicas tomadas por fisura

La evolución de la altura de colleja en los diferentes ratios se presenta en la figura 17. Durante la evolución del cultivo los tratamientos mantienen las diferencias significativas entre sí, estabilizando esas diferencias en el último muestreo. En lo que se refiere al primer muestreo, podemos ya verificar diferencias significativas entre el tratamiento 1 respecto al 2 y 3, con 2,92 cm para el tratamiento 1 y 3,52 cm de altura en el tratamiento 3, sin embargo, se debe resaltar que el tratamiento 2 presenta una altura similar al tratamiento 3. En relación al segundo muestreo también existen diferencias, entre el tratamiento 3 con el que se obtiene el valor más alto con 6,21 cm de altura y el tratamiento 2 que presenta el valor más bajo en términos de altura con 4,5 cm. Los tratamientos 1 y 4 poseen una altura similar entre sí, sin diferencias significativas. En el último muestreo analizamos que la altura en centímetros entre los tratamientos es muy similar, no presentando diferencias. Se debe resaltar que el tratamiento 75:25 fue el que obtuvo una mayor altura con 6,55cm.

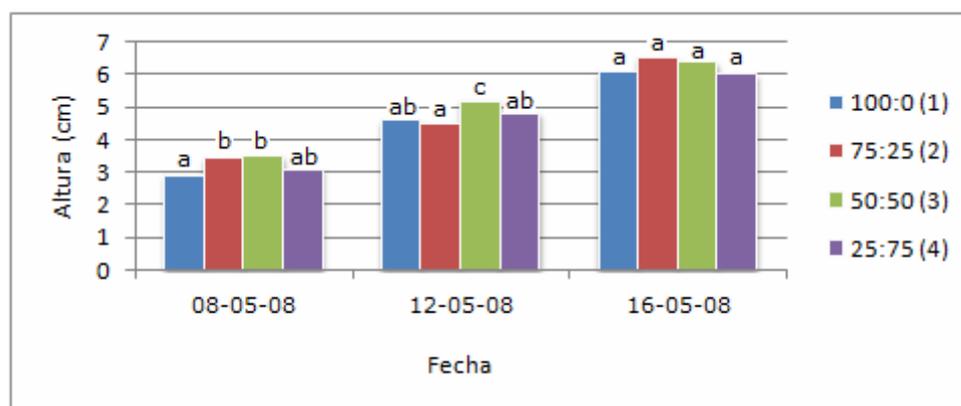


Figura 17 – Evolución de la altura de las hojas de colleja en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P<0,05$ )

El número de hojas por planta está presentada en la figura 18, y muestra que a lo largo del cultivo hay diferencias significativas, exceptuando en el segundo muestreo. En el primer muestreo constatamos que el tratamiento 2 presenta un elevado número de hojas comparado con los restantes, con 5,9 hojas. El tratamiento que obtuvo el resultado más bajo fue el 4 (25:75) con 4,73 hojas en valor absoluto pero sin diferencias significativas con el 1 y 3. Sin embargo, en el segundo muestreo es posible verificar que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.. Al final del cultivo existen diferencias entre los tratamientos, siendo el tratamiento 1 el que posee el valor más bajo de 8,35 hojas y el tratamiento 4 (25:75) con 11,22 hojas fue el que obtuvo mayor valor. Se debe tener en cuenta que los tratamientos 2 y 3 poseen un valor semejante en relación al número de hojas.

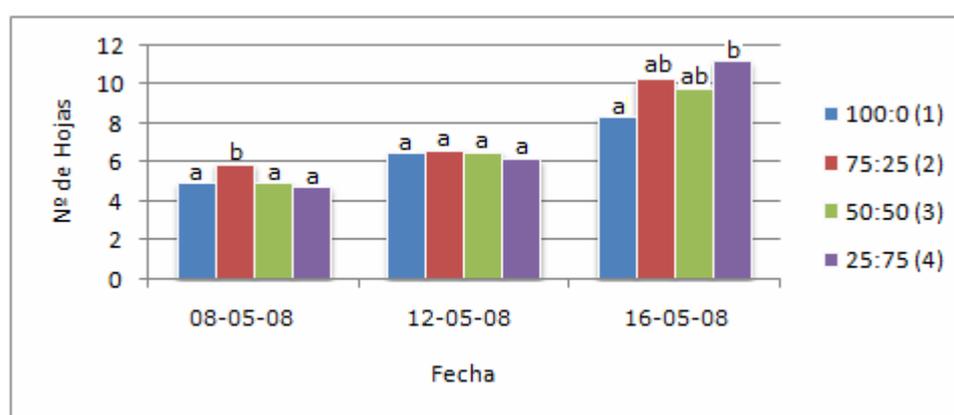


Figura 18 – Evolución del número de hojas en espinaca en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

La evolución del área foliar de colleja en los diferentes ratios se presenta en la figura 19, y muestra que no hay diferencias significativas en el primer muestreo, pero en el segundo ya se observan esas diferencias, desapareciendo estas en el último muestreo. A través de esta figura podemos constatar que en el primer muestreo no existen diferencias significativas, entre los tratamientos, sin embargo el tratamiento 2 es el que contiene mayor área foliar, en valor absoluto de  $56,86 \text{ cm}^2$ . Por lo que respecta al segundo muestreo existen diferencias entre los tratamientos, destacando los tratamientos 1 y 3 con  $92,25 \text{ cm}^2$  y  $81,37 \text{ cm}^2$ , respectivamente. El valor de área foliar más bajo corresponde al tratamiento 4 con  $58,47 \text{ cm}^2$ . Como ya fue referido anteriormente, en el último muestreo podemos observar a partir de la figura que los tratamientos presentan un área foliar idéntica, sin embargo el tratamiento que se destaca es el 100:0 con  $147,62 \text{ cm}^2$ .

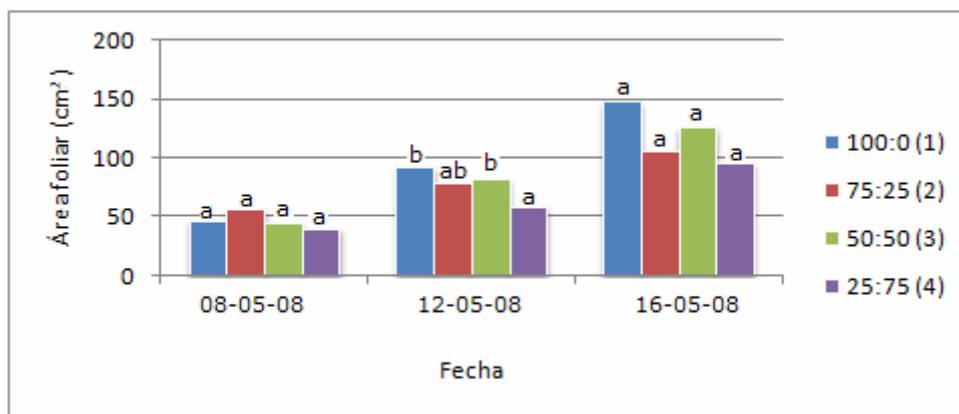


Figura 19 – Evolución del área foliar por fisura en colleja en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

El contenido relativo en clorofila (SPAD) está presentado en la figura 20, y se puede ver que al principio y en el final del cultivo no hay diferencias significativas, pero en el muestreo intermedio esas diferencias existen. En el primer muestreo podemos verificar que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo el tratamiento 3 es el que presenta mayor contenido en clorofila con 41,33. Por lo que respecta al segundo muestreo constatamos que el tratamiento 100:0 contiene el contenido de clorofila más bajo con 20,2, presentando así diferencias con los restantes tratamientos que se encuentran con valores semejantes. A pesar de que los tratamientos 2, 3 y 4 presenten valores semejantes, aquel que obtuvo mayor contenido en clorofila en valor absoluto fue el 3 con 39,23. En el tercer muestreo podemos observar que las diferencias significativas anteriormente observadas desaparecieron, sin embargo, el tratamiento que más se destacó fue el 25:75 con 41,63.

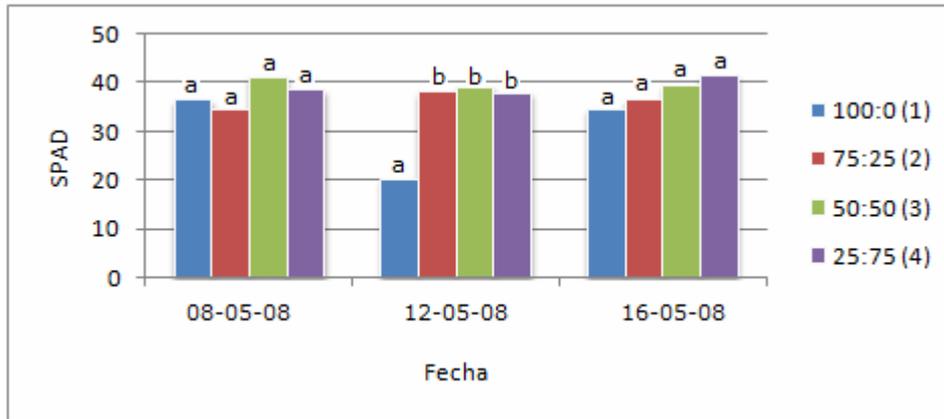


Figura 20 – Evolución del contenido en clorofila (SPAD) en colleja en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

La evolución del rendimiento de colleja en los diferentes ratios se presenta en la figura 21. Durante la evolución del cultivo los tratamientos no existen las diferencias significativas entre si. En lo que se refiere al primer muestreo, podemos verificar que, a pesar de que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, el tratamiento 100:0 posee el rendimiento más elevado con  $0,28 \text{ kg/m}^2$  en valor absoluto. En relación al segundo muestreo podemos verificar que tampoco existen diferencias entre los tratamientos, a pesar de esto los valores del rendimiento oscilaron entre  $0,54 \text{ kg/m}^2$  (tratamiento 100:0) y  $0,38 \text{ kg/m}^2$  (tratamiento 25:75). Tampoco existieron diferencias estadísticas en el último muestreo, sin embargo, debemos resaltar que la obtención de los mejores rendimientos fueron en los tratamientos 1 y 3, con  $0,62 \text{ kg/m}^2$  y  $0,66 \text{ kg/m}^2$ .

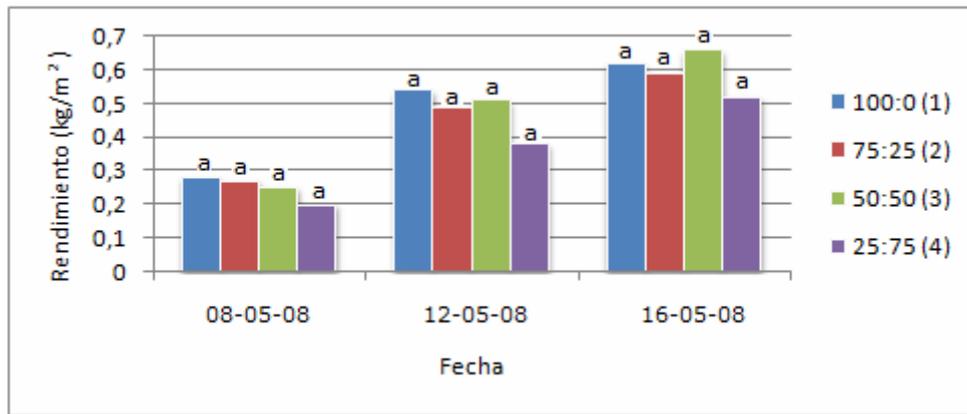


Figura 21 – Evolución del rendimiento en espinaca en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

El peso seco representado en la figura 22, presenta una evolución semejante a la del rendimiento. En la primera fase no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, fue el tratamiento 100:0 que obtuvo el mayor resultado de 0,2 g. En una segunda fase, así como el rendimiento, podemos verificar que no existen diferencias entre los tratamientos, a pesar de esto quien se destacó fue una vez más el tratamiento 100:0 con un valor de 0,43 g. También en esta ultima fase (correspondiente al ultimo día de cultivo) se observa que no existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento 100:0 obtuvo un valor de 0,53 g, mientras que los restantes tratamientos obtuvieron el mismo valor con 0,46 g.

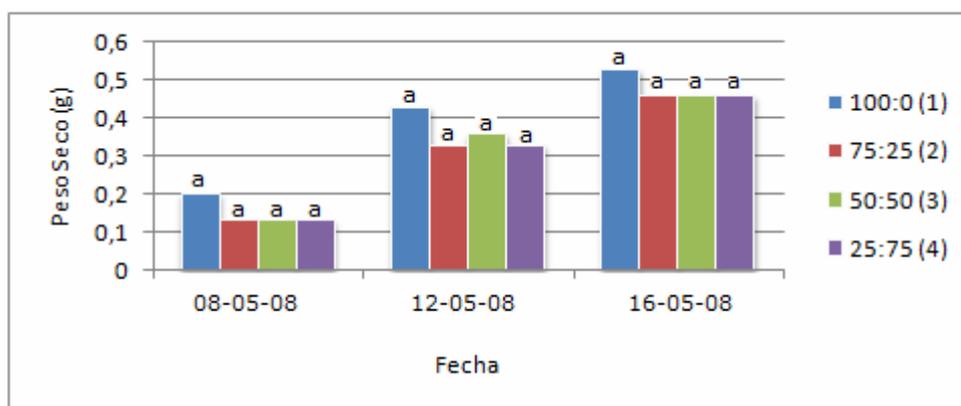


Figura 22 – Evolución del peso seco por fisura de colleja en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las barras verticales indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

La evolución de la longitud de raíces en centímetros, por distintos diámetros en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  están presentes en la tabla 10.

En el primer y último muestreo efectuados, fue posible verificar que para los diferentes diámetros en los distintos tratamientos se obtuvo una longitud semejante, sin embargo, en el segundo muestreo se verifica diferencias significativas a lo largo de los diferentes diámetros. En el primer muestreo las raíces con un diámetro de 0-0,5 mm y 2-100 mm obtuvieron mayor longitud en el tratamiento 100:0, a su vez, los restantes diámetros comprendidos entre 0,5-2 mm poseyeron mejores resultados en el tratamiento 25:75. En relación al último muestreo del cultivo tampoco existieron diferencias a lo largo del diámetro de las raíces, pero se debe referir que el tratamiento 50:50 fue el que obtuvo mayor longitud en los diferentes diámetros, con excepción del diámetro 0,5-1 mm que presentó mayor longitud en el tratamiento 75:25.

En lo que se refiere al segundo muestreo podemos analizar diferencias significativas a lo largo de los diferentes diámetros para los distintos tratamientos. De una forma general, se verificó diferencias por lo que respecta a la longitud de las raíces, principalmente, cuanto mayor era la concentración de nitrato, mayor era la longitud de las raíces. En este muestreo, para los diferentes diámetros en los distintos tratamientos, el tratamiento 100:0 fue el que presentó siempre mejores resultados, por el contrario el tratamiento 25:75 fue el que obtuvo siempre una menor longitud radicular.

Tabla 10 - Evolución de la longitud de raíces por fisura, en centímetros, por distintos diámetro en distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La presencia de letras diferentes en las columnas indica diferencias significativas (P<0,05).

|                     | Tratamiento | 08-05-08 | 12-05-08 | 16-05-08 |
|---------------------|-------------|----------|----------|----------|
| <b>Ø 0-0,5 mm</b>   | 100:0 (1)   | 43,39 a  | 128,66 b | 80,01 a  |
|                     | 75:25 (2)   | 24,37 a  | 89,74 ab | 82,69 a  |
|                     | 50:50 (3)   | 25,03 a  | 93,87 ab | 112,98 a |
|                     | 25:75 (4)   | 42,83 a  | 48,02 a  | 71,57 a  |
| <b>Ø 0,5-1,0 mm</b> | 100:0 (1)   | 55,38 a  | 98,98 b  | 151,11 a |
|                     | 75:25 (2)   | 33,89 a  | 71,42 ab | 191,21 a |
|                     | 50:50 (3)   | 37,76 a  | 86,03 ab | 184,02 a |
|                     | 25:75 (4)   | 56,29 a  | 50,79 a  | 165,05 a |
| <b>Ø 1,0-1,5 mm</b> | 100:0 (1)   | 14,19 a  | 41,18 b  | 41,31 a  |
|                     | 75:25 (2)   | 7,69 a   | 30,32 ab | 43,79 a  |
|                     | 50:50 (3)   | 11,02 a  | 28,04 ab | 49,89 a  |
|                     | 25:75 (4)   | 16,04 a  | 18,37 a  | 40,48 a  |
| <b>Ø 1,5-2,0 mm</b> | 100:0 (1)   | 5,92 a   | 22,91 b  | 17,97 a  |
|                     | 75:25 (2)   | 4,95 a   | 17,69 ab | 19,15 a  |
|                     | 50:50 (3)   | 5,25 a   | 16,40 ab | 22,68 a  |
|                     | 25:75 (4)   | 8,99 a   | 12,01 a  | 16,89 a  |
| <b>Ø 2,0-100 mm</b> | 100:0 (1)   | 22,96 a  | 3,66 b   | 42,28 a  |
|                     | 75:25 (2)   | 13,94 a  | 1,72 ab  | 39,81 a  |
|                     | 50:50 (3)   | 15,44 a  | 1,14 ab  | 48,07 a  |
|                     | 25:75 (4)   | 17,30 a  | 0,87 a   | 36,25 a  |

La evolución de longitud total, del volumen y del número de bifurcaciones de las raíces, en los distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> están expresos en la tabla 11. Por lo que respecta a la longitud total, relativamente al primer y al tercer muestreo se observó que no existieron diferencias significativas entre los diversos tratamientos, esas diferencias sólo se hicieron notar en el segundo muestreo. En el primer muestreo el tratamiento 100:0 fue el que obtuvo mayor longitud total, el mismo no se verificó con el tratamiento 75:25 que presentó la menor longitud total. En relación al segundo muestreo se verificó diferencias significativas, respectivamente entre el tratamiento 100:0 que obtuvo mayor longitud, y el tratamiento 25:75 que presentó la menor. Se debe resaltar que los tratamientos 50:50 y 75:25 presentaron valores próximos. Finalmente, en el ultimo muestreo no se verificó diferencias entre los tratamientos, pero el que registró mayor longitud total fue el 50:50.

En relación al volumen de las raíces podemos afirmar que presentó el mismo comportamiento, analizado anteriormente para la longitud radicular total.

En el parámetro relativo al número de bifurcaciones, podemos afirmar que en el primer y en el tercer muestreo se observó que no existieron diferencias significativas entre los diversos tratamientos, esas diferencias sólo se hicieron notar en el segundo muestreo. En el primer muestreo el tratamiento 25:75 fue el que obtuvo mayor número de bifurcaciones, en valor absoluto y sin diferencias significativas con el resto. En relación al segundo muestreo se verificó diferencias significativas, respectivamente entre el tratamiento 100:0 que obtuvo mayor número de bifurcaciones, y el tratamiento 25:75 que presentó el menor. Se debe resaltar que los tratamientos 50:50 y 75:25 presentaron valores próximos. Finalmente, en el último muestreo no se verificó diferencias entre los tratamientos, pero el que obtuvo mayor número de bifurcaciones fue el 50:50.

Tabla 11 – Evolución de longitud total, volumen y bifurcación de las raíces, en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . La presencia de letras diferentes en las columnas indica diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

|   | Tratamiento | 08-05-08 | 12-05-08   | 16-05-08  |
|---|-------------|----------|------------|-----------|
| <b>Longitud total (cm)</b>                | 100:0 (1)   | 141,85 a | 296,08 b   | 332,69 a  |
|   | 75:25 (2)   | 84,85 a  | 212,01 ab  | 376,66 a  |
|   | 50:50 (3)   | 94,51 a  | 226,52 ab  | 417,65 a  |
|   | 25:75 (4)   | 141,44 a | 130,97 a   | 330,25 a  |
| <b>Volumen de raíces (cm<sup>3</sup>)</b> | 100:0 (1)   | 0,19 a   | 0,19 b     | 0,37 a    |
|   | 75:25 (2)   | 0,15 a   | 0,14 ab    | 0,32 a    |
|   | 50:50 (3)   | 0,12 a   | 0,12 ab    | 0,38 a    |
|   | 25:75 (4)   | 0,15 a   | 0,05 a     | 0,28 a    |
| <b>Nº de bifurcaciones</b>                | 100:0 (1)   | 567,67 a | 1664,67 b  | 1595 a    |
|   | 75:25 (2)   | 453,67 a | 1202 ab    | 1569,67 a |
|   | 50:50 (3)   | 479 a    | 1137,33 ab | 1828,67 a |
|   | 25:75 (4)   | 580,33 a | 678 a      | 1322,33 a |

El contenido de nitratos, oxalatos y vitamina C en las hojas de colleja en el momento de recolección (36 dds) con los distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  están expresos en la tabla 12.

Podemos constatar que existen diferencias significativas para los diversos tratamientos en relación al contenido de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  acumulados en las hojas de colleja. La mayor concentración de nitratos, como se puede ver en la tabla 12, corresponde al tratamiento 100:0 con 3341,8 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco. A su vez, el tratamiento 25:75 presenta el menor valor con 2369,1 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco, mientras que los tratamientos intermedios (75:25 y 50:50) presentan valores próximos entre sí 2958,4 mg kg<sup>-1</sup> y 2671,9 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco respectivamente, aunque existen diferencias significativas entre ellos.

El contenido de oxalatos como se puede ver en la tabla adjunta, muestra diferencias significativas en todos los tratamientos ensayados. Cuanto mayor sea la concentración de nitratos en la solución nutritiva mayor será la acumulación de estos en las hojas de colleja. Siendo así, el tratamiento 100:0 presenta el mayor valor con 3267,5 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco, y el menor se encuentra en el tratamiento 25:75 con 996,4 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco.

El contenido de vitamina C en los distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> también contiene diferencias significativas. El tratamiento 100:0 posee una menor cantidad en vitamina C (7,08 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco), mientras que, la concentración 25:75 es aquella que contiene los mejores resultados con 28,76 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco de vitamina C.

Tabla 12 – Contenido de nitratos, oxalatos y vitamina C en las hojas de colleja en el momento de recolección, 36 dds, en distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La presencia de letras diferentes en las columnas indica diferencias significativas (P<0,05).

| <b>Ratio<br/>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> | <b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup><br/>(mg kg<sup>-1</sup> p.f.)</b> | <b>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub><br/>(mg kg<sup>-1</sup> p.f.)</b> | <b>Vitamina C<br/>(mg kg<sup>-1</sup> p.f.)</b> |
|--|---|---|---|
| <b>100/0</b>   | 3341,8d   | 3267,5d   | 7,08 a  |
| <b>75/25</b>   | 2958,4c   | 2418,6c   | 11,31 a   |
| <b>50/50</b>   | 2671,9b   | 1552,2b   | 24,29 b   |
| <b>25/75</b>   | 2369,1a   | 996,4a  | 28,76 b   |

### 3.4 Discusión

En el momento de la cosecha se verificó que en todos los parámetros analizados relativos al comportamiento agronómico, en el primer experimento (Tabla 5) se obtuvieron valores superiores que en el segundo (Tabla 9), esto es debido a que el ciclo de cultivo del primero fue de 42 dds y el según presentó un ciclo de cultivo inferior de 36 dds.

En el parámetro relativo a la altura de las plantas por fisura para el primer experimento en los distintos tratamientos con diferentes ratios de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fue posible observar diferencias significativas entre sí. En este punto las plantas presentaron mayor altura en el tratamiento 75:25, mientras que el tratamiento 50:50 la menor (siendo este un resultado no esperado). Los resultados obtenidos por Kim et al. (2006) en rúcola, al contrario que se verificó en este experimento, demostraron que el empleo de soluciones con distintos ratios nitrato/amonio no afectaba a la altura de la planta, a excepción de aquella en que todo el nitrógeno fue aportado

de forma amoniacal. También en un estudio realizado por Arreola (2006) con *Silene vulgaris* utilizando relaciones de nitrato/amonio de 60:40, 40:60 y 10:90 se verificó que para los distintos tratamientos no existieron diferencias significativas relativas a la altura. Sin embargo en el segundo experimento podemos verificar que no existieron diferencias significativas en relación a la altura para los distintos tratamientos. Estos resultados van al encuentro del estudio efectuado por Arreola (2006) en que se verificó el mismo comportamiento. En el segundo experimento la altura de las plantas fue más reducida, ya que su ciclo fue también más reducido. En este experimento la altura de las plantas fue estadísticamente mayor en los tratamientos 75:25 y 50:50 y menor en el tratamiento 25:75. También Palaniswamy et al. (2000) realizaron un estudio en que evaluaron las mismas relaciones nitrato/amonio (100:0, 75:25, 50:50 y 25:75) sobre el cultivo de *Portulaca oleracea*, donde se verificó el mismo comportamiento relativo al parámetro de la altura.

El número de hojas por planta en ambos experimentos fue influenciado por los distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ . En el primer experimento existieron diferencias significativas entre los tratamientos, presentando un elevado número de hojas el tratamiento 75:25, respecto a los restantes tratamientos, esto se debe al hecho, de que las plantas en este tratamiento poseen un buen crecimiento y una buena ramificación. Sin embargo el número de hojas obtenido por este tratamiento fue elevado, siendo así, debía procederse al corte de las plantas antes de que las mismas alcancen este punto. Se debe resaltar que el tratamiento 25:75 fue el que presentó un menor número de hojas por planta. En un trabajo realizado por Fernández et al. (2007a) en rúcola con relaciones de nitrato/amonio de 70:30, 50:50 y 30:70, verificaron que existieron diferencias en el número de hojas para los distintos tratamientos y que fue mayor para el ratio 70:30 y peor para los ratios que contenían mayores concentraciones de amonio. En un estudio realizado por Arreola (2006) con *Silene vulgaris* utilizando relaciones de nitrato/amonio de 60:40, 40:60 y 10:90 se verificó que para los distintos tratamientos no existieron diferencias significativas en relación al número de hojas. En el segundo experimento también se pueden verificar diferencias significativas para los distintos tratamientos, presentando el tratamiento 25:75 un valor superior de número de hojas en relación a los restantes tratamientos. En este caso debemos resaltar que la presencia de amonio en diferentes concentraciones no afecta el crecimiento normal de las hojas. Por lo contrario, Fontana et al. (2006) constataron que en la producción de *Portulaca oleracea* L. con relaciones de nitrato/amonio de 60:40, 40:60 y 0:100 que el número de hojas en el momento de la cosecha fue más reducido por las soluciones que poseían más amonio en la solución.

En relación al área foliar de las plantas contenidas en una fisura fue posible verificar que en ambos experimentos con distintos ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , no existieron diferencias significativas entre sí. A pesar de los distintos ratios no afectaron los resultados del área foliar, se puede decir que los mejores resultados habían sido obtenidos en el tratamiento 75:25 para el primer experimento y para el segundo los mejores valores se habían encontrado en el tratamiento 100:0. En un trabajo realizado por Fernández et al. (2007a) en rúcola con relaciones de nitrato/amonio de 70:30, 50:50 y 30:70, se verificó que existieron diferencias en el área foliar para los distintos tratamientos, donde el área foliar de las plantas contenidas en una fisura fue mayor para el ratio 70:30 y peor para los ratios que contenían mayores concentraciones de amonio. Estos resultados obtenidos no corresponden a los resultados efectuados por Santamaría et al. (1998) en *Eruca vesicaria* L., que utilizó tres relaciones nitrato/amonio (100:0, 50:50 y 0:100) y el valor del área foliar más alto fue conseguido con el ratio 50:50 y el más bajo con 100:0.

Las medidas del contenido relativo en clorofila medidas en unidades SPAD por fisura, no presentaron diferencias significativas en el segundo experimento para los distintos ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , sin embargo esas diferencias se verifican en el primer experimento. Esta medida es importante debido a que la intensidad del color de las hojas verdes puede representar un parámetro de calidad visual en la comercialización de la colleja. Como fue antedicho, en el primer experimento existieron diferencias significativas entre los distintos ratios de nitrato/amonio, siendo así, en los tratamientos con mayores concentraciones se puede verificar mejor calidad visual (contenido en clorofila). En el mismo sentido, Fernández et al. (2007a) en un estudio realizado con rúcola con ratios de nitrato/amonio de 70:30, 50:50 y 30:70, verificaron que existieron diferencias para los diferentes ratios en el mismo sentido en relación al SPAD. Tampoco existieron diferencias significativas en el segundo experimento entre los distintos ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , se verificó que a medida que se aumenta la concentración de amonio en la solución aumentaba el contenido de clorofila en las hojas, así como se verificó en estudios realizados por Fernández et al. (2007a) con rúcola.

En relación al peso seco y al rendimiento en el primer experimento, ambos tienen el mismo comportamiento, es decir, ambos son afectados por la mayor proporción de amonio en la solución nutritiva y se obtienen mejores resultados en los ratios 100:0 y 75:25. En el mismo sentido, Fernández et al. (2007a) obtuvieron resultados semejantes en un cultivo de rúcola con ratios de nitrato/amonio de 70:30, 50:50 y 30:70, siendo que los ratios 70:30 y 50:50 presentaron un rendimiento más elevado, mientras que el ratio 30:70 tuvo un rendimiento

bajo. Los resultados obtenidos en el peso seco y rendimiento relativos al primer experimento fueron aproximadamente el doble de los resultados obtenidos en el segundo experimento. En el segundo experimento, el peso seco y el rendimiento no presentan diferencias significativas entre los diferentes ratios de nitrato/amonio, esto se puede explicar, ya que el segundo experimento tuvo un ciclo de cultivo más corto y estuvo expuesto a temperaturas más elevadas, pudiendo estos factores influenciar el rendimiento y el peso seco.

En cuanto al rendimiento a pesar de que no se verifiquen diferencias significativas en los distintos tratamientos, el tratamiento 50:50 fue aquel que obtuvo el mejor resultado con 0,66 kg/m<sup>2</sup>. Este resultado fue muy similar a una experiencia realizada por Fernández (2006c) et al. con la misma variedad de colleja con una relación NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 80:20 donde se obtuvo un resultado idéntico de 0,7 kg/m<sup>2</sup>. En un estudio realizado por Arreola (2006) con *Silene vulgaris* utilizando relaciones de nitrato/amonio de 60:40, 40:60 y 10:90 se verificó que para los distintos tratamientos no existieron diferencias significativas relativas al rendimiento. En relación al peso seco se puede afirmar que el tratamiento 100:0 fue el que obtuvo mejor resultado, mientras que los restantes tratamientos presentaron valores idénticos. Palaniswamy et al. (2000) realizaron un estudio en el cual evaluaron cuatro proporciones nitrato/amonio (100:0, 75:25, 50:50 y 25:75) en la solución nutritiva de *Portulaca oleracea* y no encontraron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea de la planta, lo mismo fue verificado en este experimento.

Las raíces de la colleja son muy finas, así cuando se procedía a la cosecha de material vegetal para posterior muestreo, se rompían con mucha facilidad dando origen a la pérdida de datos para el posterior análisis estadístico. Por lo que respecta a la longitud de las raíces en centímetros por distintos diámetros en distintos ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, se verificó que el primer experimento obtuvo mejores resultados que el segundo, una vez que el segundo experimento tuvo un ciclo de cultivo más reducido. En el primer experimento fue posible verificar que en los distintos ratios de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> existieron diferencias significativas entre sí, presentando el tratamiento 25:75 mayor longitud en los distintos diámetros, mientras que el tratamiento 75:25 presentó la menor longitud en los distintos diámetros considerados. En este caso, fue posible verificar que una mayor concentración de amonio en la solución nutritiva promovió el crecimiento radicular. Un estudio realizado por Morgan (2001), revela que la longitud de las raíces tiende a disminuir con la concentración de amonio, lo que no se verificó en este caso. En el segundo experimento fue posible verificar que en los distintos ratios de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no existieron diferencias significativas en la longitud de las raíces en centímetros por distintos

diámetros, así como la parte aérea de la colleja no tuvo diferencias entre los distintos tratamientos. En este experimento, se puede verificar que en el segundo muestreo los nitratos promovieron el desarrollo de las raíces, originando diferencias significativas entre los demás tratamientos, pero al final del ciclo de cultivo esas diferencias se habían estabilizado. En un estudio realizado por Arreola (2006) con *Silene vulgaris* utilizando relaciones de nitrato/amonio de 60:40, 40:60 y 10:90 se verificó que para los distintos tratamientos no existieron diferencias significativas relativamente a la longitud de las raíces, lo que corresponde a los resultados en este experimento. Se debe resaltar que la longitud de las raíces, en centímetros, por distintos diámetros en distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  fue superior en el primer experimento en relación al segundo. Esto se debe al hecho del primer experimento posee un ciclo de cultivo superior al segundo, pero también se debe resaltar que en el segundo experimento con el transcurrir del ciclo de cultivo las raíces podían haber sido dañadas debido a la temperatura.

El volumen de las raíces en los distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  para el primer experimento presenta diferencias significativas entre los distintos tratamientos, presentando el tratamiento 25:75 un mayor valor de volumen de raíces, mientras que el tratamiento 75:25 presenta el menor valor. Lo mismo no se verificó, en un experimento realizado por Arreola (2006), en que este efectuó un estudio con *Silene vulgaris* con tres ratios de nitrato/amonio (60:40, 40:60 y 10:90), donde se constató que no existieron diferencias significativas en los distintos tratamientos en relación al volumen. En el segundo experimento el volumen de las raíces en los distintos ratios  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  no presenta diferencias significativas entre los distintos tratamientos, presentando la ratio 50:50 el mayor volumen de raíces.

En relación al número de bifurcaciones el primer experimento presenta un mayor número de bifurcaciones comparativamente al segundo, una vez que presentó una duración del ciclo de cultivo superior. Tal como sucede con el volumen de las raíces en el primer experimento, el número de bifurcaciones presenta diferencias significativas entre los distintos tratamientos, presentando un mayor valor en el tratamiento 25:75 mientras que el tratamiento 75:25 presenta el menor valor. Para el segundo experimento el número de bifurcaciones no presenta diferencias significativas entre los distintos tratamientos, sin embargo el tratamiento 50:50 es lo que presenta el mayor número de bifurcaciones.

Según Paschold (1989), el contenido de nitratos en la planta viene determinado por un conjunto de factores ambientales (luz, temperatura, entre otros), nutricionales (nitrógeno, fósforo, potasio, entre otros) y propios del cultivo (genotipo, órgano vegetativo, edad, entre

otros) que interactúan entre sí. En el primer experimento se verificó menor cantidad de nitratos por peso fresco, comparado con el segundo. La acumulación de nitratos en vegetales es más alta con bajas condiciones de intensidad luminosa (Steingröver et al., 1986a; 1986b; Blom-Zandsta, 1989), así los resultados obtenidos en este trabajo son contradictorios, una vez que el primer experimento fue realizado en períodos con menos intensidad luminosa (durante el mes de Marzo/principios de Abril) comparado con el segundo (principios de Abril/principios de Mayo). Estos resultados pueden ser explicados por el hecho de que el segundo experimento fue realizado en un periodo de más temperatura, luego la temperatura a nivel de las raíces fue superior en el segundo experimento en relación al primero, y generalmente cuando se aumenta la temperatura a nivel radical la absorción de nitratos por la planta también aumenta (Behr y Wiebe, 1992; Lainé et al., 1993). En ambos experimentos cuanto mayor es la concentración de nitratos en la solución nutritiva, mayor será su acumulación en las hojas de colleja. Así siendo, en ambos experimentos la mayor acumulación de nitratos en las hojas se verificó en el tratamiento 100:0, con los respectivos valores de 3078,50 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco y 3341,8 mg kg<sup>-1</sup> peso fresco correspondientes al primero y segundo experimento. En un ensayo realizado por Fernández et al. (2007a) con rúcola con tres ratios de nitrato/amonio (70:30, 50:50 y 30:70) se verificó el mismo comportamiento anteriormente analizado, quiere esto decir que la mayor acumulación de nitratos en las hojas de rúcola estuvo presente en la solución 70:30. Esta disminución del contenido de nitratos en hojas al sustituir la proporción de nitrato por amonio en la solución nutritiva ha sido previamente demostrada por otros autores (Kim et al. 2006; Santamaría et al., 1998) y se puede considerar una estrategia productiva para reducir la tendencia que tiene la rúcola en la acumulación de este compuesto en sus hojas (Santamaría et al., 2001).

El contenido de oxalatos en las hojas se presenta como un factor peligroso para la salud humana. En los dos experimentos realizados en períodos distintos se verifica el mismo comportamiento ocurrido en la acumulación del contenido de nitratos en las hojas, es decir que la acumulación de oxalatos en las hojas tiende a aumentar con el aumento de nitrato en la solución nutritiva. Según Palaniswamy et al. (2004), utilizando *Portulaca oleracea* L. con cuatro ratios NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (100:0, 75:25, 50:50 y 25:75) verificaron que la acumulación de oxalatos en las hojas tiende a aumentar con el aumento de nitrato en la solución nutritiva, así el ratio 100:0 fue aquel que obtuvo una mayor acumulación de oxalatos en las hojas de *Portulaca oleracea* L.

En lo que respecta al contenido de vitamina C el primer experimento presenta diferencias significativas entre los distintos ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , presentando valores máximos en los tratamientos 75:25 y 50:50, por el contrario el valor más bajo de vitamina C corresponde al tratamiento 100:0. También el segundo cultivo presenta diferencias significativas entre los distintos ratios de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , pero en este caso, los tratamientos que contienen mayores valores de vitamina C son los que se corresponden con las ratios 50:50 y 25:75, lo que concuerda con los datos aportados por Lee et al. (2000) que la fertilización con altos valores de nitrógeno tiende a decrecer el contenido de vitamina C en algunas frutas y hortalizas. Comparando el primer y segundo ciclo de cultivo se observó una mayor cantidad de vitamina C en el segundo cultivo respecto al primero en las ratios 50:50 y 25:75, sin embargo los valores de vitamina C disminuyeron en las ratios con mayor concentración de nitratos en la solución (100:0 y 75:25) en el segundo cultivo respecto al primero. También Takebe (2005) en un estudio efectuado en espinaca verificó que el contenido de vitamina C aumentaba, con el incremento de amonio en la solución nutritiva. Hasta ahora no hay estudios de la calidad nutritiva de la colleja (Alarcón et al., 2007), aunque es sabido que el contenido de vitamina C en frutas y hortalizas puede estar influenciado por varios factores como los diferentes genotipos, condiciones climáticas de la precosecha, técnicas de cultivo, madurez y métodos de cosecha (Lee et al., 2000). También es conocido que la intensidad luminosa y las temperaturas tienen una fuerte influencia en el contenido de vitamina C (Lee et al., 2002). Reuther y Nauer (unpublished report, 1972) mostraron que algunas variedades de mandarinas contenían mas vitamina C cuando crecían a bajas temperaturas (20-22°C por el día y 11-13°C por la noche) que a temperaturas altas de 30-35°C por el día y 20-25°C por la noche.

### 3.5 Conclusión

A la vista de los resultados expuestos anteriormente podemos extraer las siguientes conclusiones sobre el estudio realizado en dos ciclos de cultivo de colleja con cuatro ratios distintas de nitrato/amonio (100:0, 75:25, 50:50 y 25:75)

1. La solución nutritiva con una ratio de 75:25 mostró el mejor comportamiento agronómico considerando los dos ensayos efectuados, sin embargo desde el punto de vista sanitario no resulta aceptable debido a su elevado contenido de nitratos en las hojas de colleja.
2. Desde el punto de vista sanitario, para ambos ensayos, se concluye que el ratio de nitrato/amonio 25:75 es aquel que reúne las características más apropiadas, ya que el contenido de oxalatos y nitratos es bastante bajo.
3. 5. La colleja cultivada en bandejas flotantes y a un ratio  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  50/50 y 25/75, podría ser apta para el mercado como producto fresco “baby leaf” dadas sus características nutricionales y comerciales.
4. El incremento de la concentración de amonio en la solución nutritiva no afectó negativamente el crecimiento radicular, llegando incluso a promoverlo en la primera plantación.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- AA.VV., 1999 – Managing the risks of nitrates to humans and environment. Wilson W.S., Ball A.S., Hinton R.H. (eds), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 347p.
- Addiscott T., Benjamin N., 2000 – Are you taking your nitrate? Food Sci. Techn. Today, 14 (2), 59-61.
- Aeschiman D. y Bocket G. 1980. Les types biologiques des *Silene vulgaris*. (Caryophyllaceae). Candollea, 35 : 451-495.
- Alarcón, V., P., García Gonzalo P. y Tardío. J. 2004. Adaptación al cultivo de dos especies silvestres de uso tradicional (*Silene vulgaris* y *Scolymus hispanicus*). Recolección, caracterización y evaluación agronómica. Actas del IV Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Córdoba.
- Alarcón, R. González, A. García, P. 2007. Composición nutricional y evaluación agromorfológica en *Silene vulgaris*. Actas de Horticultura. 48. 689-692.
- Archer. D.L. 2002. Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. Journal of Food Protection, 65: 872-875.
- Arreola, J. 2006. Estudio biológico y agronómico de *Silene vulgaris*. Tesis doctoral, Cartagena.
- Auerswald H., Peters P., Brückner, B., Krumbien A., Kutschenbuch R., 1999 – Sensory analysis and instrumental measurements of short-term stored tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Postharvest Biology Technology, 15, 323-334.
- Ball, G.F.M., 1998. Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods. Chapman and Hall, London Chap. 15 vitamin C.
- Barker, A.V. y Mills, H.A., 1980 – Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. HortScience Reviews, 2: 395-414.
- Bednar, C. M., Kies, C., & Carlson, M. (1991). Nitrate–nitrite levels in commercially processed and home processed beets and spinach. Plant Foods for Human Nutrition, 41, 261–268.
- Behr, U. y Wiebe, H.J. 1992. Relation between photosynthesis and nitrate content of lettuce cultivars. Scientia Horticulturae, 49: 175-179.

- Beretta G.P., Bonomo C., Nurizzo C., 1990. Contaminazione da ione nitrico delle acque di falda. *Inquinamento*, 1, 54-61.
- Blom-Zandstra, M. 1989. Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Annals of Applied Biology*, 115: 553-561.
- Bohn, T., Davidsson, L., Walczyk, T., Hurrell, R.F., 2004. Fractional magnesium absorption is significantly lower in human subjects from a meal served with an oxalate-rich vegetable, spinach, as compared with a meal served with kale, a vegetable with low oxalate content. *Br. J. Nutr.* 91, 601–606.
- Bressani, R. (1993). Amaranth. In *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, pp. 135-140. Academic Press, London.
- Caponigro V. Piro F., (1998). Requisiti della material prima per la IV gamma. *Inftore agrario*, 5 (19), 39-42.
- Cardenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P., 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. *J. Exp. Bot.* 50, 613–624.
- Castagnino, A.M., Sastre Vásquez, P., Sasale, S., Boubeé, C., Menet, A. y Cardozo, J., 2005. Evaluación de la eficacia de la técnica de floating system para la producción de *Radicchio rosso* var. di Verona en condiciones controladas. Trabajo de investigación. Facultad de Ciencias Agrarias-UCA, Buenos Aires.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Angle, J.S. y Baker, A.J.M. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 279-284.
- Chater, A.O. y Walters S.M. 1964. Silene. In: *Flora Europaea* (eds., Tutin et al.), vol. I. Cambridge. p. 158-181.
- Chen, B.-M., Wang, Z.-H., Li, S.-X., Wang, G.-X., Song, H.-X., Wang, X.-N., 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Sci.* 167, 635–643.
- Chopra, R.N., Nayar, S.L. y Chopra, I.C. 1986. *Glossary of Indian Medical Plants (including the Supplement)*. Council of Scientific and Industrial Research, New Dehli.
- Collins, M., McCoy, J.E., 1997. Chicory production, forage quality, and response to nitrogen fertilization. *Agron. J.* 89, 232–238.

- Concon, J. M. (1988). *Food Toxicology - Principles and Concepts*, pp. 416-419. Marcel Dekker, New York.
- Corre W.T. and Breimer, T. 1979. Nitrate and nitrite in vegetables. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, the Netherlands.
- Duncan C., Li, H. Dykhuizen e altri 12, 1997 – Protection against oral and gastrointestinal diseases: importance of dietary nitrate in-take, oral nitrate reduction and entrosalivary nitrate circulation. *Comp. Biochem Physiol*, 118A, 939-948.
- Dykhuizen R.S., Frazer R., Duncan C., Smith C.C., Golden M., Benjamin N., Leifert C., 1996 – Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: Importance of dietary nitrate in host defence. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 40, 1422-1425.
- EC, 1995 – Opinion on nitrate and nitrite, espresso il 22 Settembre 1995. Allegato 4 al Documento III/5611/95.
- Elia, A., Santamaria, P., Serio, F., 1998. Nitrogen nutrition, yield and quality of spinach. *J. Sci. Food. Agric.* 76, 341–346.
- Elliot, C.G. y Nelson, P.V., 1983 – Relationships among nitrogen accumulation, nitrogen assimilation and plant growth in chrysanthemums. *Plant Physiology*, 57: 250-259.
- Ernest W.H.O. 1974. *Schwemetallvegetation de Erde*. Fischer-Verlag, Stuttgart, Germany.
- Ernest W.H.O. y Nelissen, H.J.M. 2000. Life –cycle phases of a zinc- and cadmium- resistant ecotype of *Silene vulgaris* in risk assessment of polymetallic mine soils. *Environmental Pollution*, 107: 329-338.
- Ezeagu, I. E., y Fafunso, M. A. (1995). Effect of wilting and processing on the nitrate and nitrite contents of some Nigerian leaf vegetables. *Nutrition and Health*, 10(3), 269–275.
- Facciola, S. 1990. *Cornucopia- A source Book of Edible Plants*. Kampong Publications. Ed. London, UK.
- Fassett, D. W. (1973). Oxalates. In *Toxicants Occurring Naturally in Foods*, 2nd edn, pp. 346-362. National Academy of Sciences, Washington, D.C., USA.
- Fennema, O., 1977. Loss of vitamins in fresh and frozen foods. *Food Technol.* 31 (12), 32–38.

- Fernández, J.A., Peñapareja, D., Conesa, E., Martínez J.J., Franco, J.A 2006c. Producción de colleja (*Silene vulgaris* (Moench) Garcke) en bandejas flotantes para su adaptación como producto “baby leaf”. *Actas de Horticultura* 46: 62-65
- Fernández, J.A., Peñapareja, D., Niñirola, D., Esteban, A., Conesa, E., Rodríguez, S., Artes-Hernández, F. y Artes, F. 2007a. Influencia de la relación nitrato/amonio en la calidad de la producción y contenido de nitratos de rúcola 'baby leaf' cultivada en bandejas flotantes. *Actas de Horticultura*, 49: 132-138.
- Fernández, J.A., Peñapareja, D., Signore, A., López, J., González, A 2006b. Producción de rúcola “baby leaf” en bandejas flotantes. *Actas de Horticultura* 46: 58-61.
- Fleming, L.A., Krizek, D.T. y Mirecki, R.M., 1987 – Influence of ammonium nutrition on the growth and mineral composition of two chrysanthemum cultivars differing in drought tolerance. *Journal of plant nutrition*, 10: 1869-1881.
- Fontana, E., Hoeberechts, J., Nicola, S., Cros, V., Palmegiano, G.B. y Peiretti, P.G., 2006. Nitrogen concentration and nitrate/ammonium ratio effect yield and change the oxalic acid concentration and fatty acid profile of purslane (*Portulaca oleracea* L.) grown in soilless culture system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Foyer, C.H and Noctor, G. 2002. Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism. *Kluwer Academic Publishers*. 12: 1- 22.
- Gangolli S.D., Van Den Brandt P.A., Feron e altri 6, 1994 – Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European J. Pharmacol. Envir. Toxicol. Pharmacol. Section*, 292, 1-38.
- Gastal, F., Lemaire, G., 2002. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *J. Exp. Bot.* 53, 789–799.
- Gontzea, I., and Sutzescu, P. (1968). *Natural Antinutritive Substances in Foodstuffs and Forages*. pp. 84}108. S. Karger, Basel.
- Gülser, F., 2005. Effects of ammonium sulphate and urea on  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$  accumulation, nutrient contents and yield criteria in spinach. *Sci. Hortic.* 106, 330–340.
- Hammer, K. 1986. Caryophyllaceae. In: Rudolf Mansfelds, *Ultrurpzenverzeichnis*. Schultze-Motel (ed.), Berlin. 1:141.
- Harris, J.R., 1996. *Subcellular Biochemistry, Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology*, vol. 25, Plenum, New York.

Harris, R.S., 1975. Effects of agricultural practices on the composition of foods. In: Harris, R.S., Karmas, E. (Eds.), *Nutritional Evaluation of Food Processing*, 2nd edn. AVI, Westport, CT, pp. 33–57.

Heaney, R.P., Weaver, C.M., Recker, R.R., 1988. Calcium absorbability from spinach. *Am. J. Clin. Nutr.* 47, 707–709.

Hill M.J., 1999 – Nitrate toxicity: myth or reality? *British J. Nutr.*, 81, 343-344.

Hodgkinson, A., 1978. Evidence of increased oxalate absorption in patients with calcium-containing renal stones. *Clin. Sci. Mol. Med.* 45, 291–294.

Holloway, W. D., Argall, M. E., Jealous, W. T., Lee, J. A., and Bradbury, J. H. (1989). Organic acids and calcium oxalate in tropical root crops. *J. Agric. Food Chem.* 37, 337-341.

Incrocci, L., Lorenzini, O., Malorgio, F., Pardossi, A. and Tognoni, F. 2001. Valutazione quanti-qualitativa della produzione di rucola (*Eruca vesicaria* L. Cav.) e basilico (*Ocimum basilicum* L.) ottenuta in suolo e floating system utilizzando acque irrigue con differenti contenuti di NaCl. *Italus Hortus* 8(6):92-97.

Jalas, J. y Suominen J. 1986. Caryophyllaceae (Silenoideae) In: *Atlas Florae Europaeae*. Vol. 7. Helsinki.

Jolls, C.L. y Chenier T.C. 1989. Gynodioecy in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae) : progeny success, experimental design, and maternal effects. *American Journal of Botany*, 76: 1360-1367.

Kabaskalis, V., Tsitouridou, R., y Niarchos, M. (1995). Study of oxalic acid content in vegetables and its implication on health. *Fresenius Environmental Bulletin*, 4, 445–448.

Kader, A.A., 1988. Influence of preharvest and postharvest environment on nutritional composition of fruits and vegetables. In: Quebedeaux, B., Bliss, F.A. (Eds.), *Horticulture and Human Health: Contributions of Fruits and Vegetables*. Proceedings of the 1st International Symposium on Horticulture and Human Health. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 18–32.

Kafkafi, U. 1990. Root temperature, concentration and the ratio  $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$  effect on plant development. *Journal of Plant Nutrition*, 13: 1291-1306.

Kaiser, M, Man, H and Stoimenova, M. 2002. What limits nitrate reduction in leaves?

Edited by Foyer, C.H and Noctor, G. Kluwer Academic Publishers. 12: 63- 70.

- Kasten, P. y K. Sommer, 1990 – Cultivation of cut flowers with ammonium as nitrogen source. Pp. 533-537. In: M.L. Van Beusichem (ed.) Plant Nutrition, Physiology and Application. Kluwer Acad. Pub.
- Kim, S.J., Kawaharada, C., Ishii, G. 2006. Effect of ammonium: nitrate ratio on nitrate and glucosinolate contents of hydroponically-grown rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) Soil Sci Plant Nutr. 52: 387-393.
- Laghetta, G. y Perrino, P. 1994. Utilization of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke in Italy. Economic Botany, 48: 337.
- Lainé, P., Ourry, A., Macduff, J., Boucaud, J., y Salette, J. 1993. Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation. Journal of Plant physiology, 88: 85-92.
- Lee, C.Y., 1974. Effect of cultural practices on chemical composition of processing vegetables. A review. J. Food Sci. 39, 1075–1079.
- Lee, S.K. Kader, A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest-Biology-and-Technology. 20(3): 207-220.
- Lilbert, B., and Franceschi, V. R. (1987). Oxalate in crop plants. J. Agric. Food Chem. 35, 926-938.
- Lips, H.S., Leidi, E.O, Silberbush, M, Soares, M.I.M. y Lewis, O.E.M., 1990 – Physiological aspects of ammonium and nitrate fertilization. Journal of Plant Nutrition, 13: 1271-1289.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), 1992 - Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in food: second report. Food surveillance N. 32, Londra, MAFF.
- MAFF, 1998a . 1997/98 UK monitoring programme for nitrate in lettuce and spinach. Food surveillance information sheet N. 154, Londra, MAFF.
- MAFF, 1998b – Nitrate in vegetables. Food surveillance information sheet N. 158, Londra, MAFF.
- Makus, D. J., y Hettiarachchy, N. S. (1999). Effect of nitrogen source and rate on vegetable amaranth leaf blade mineral nutrients, pigments and oxalates. Subtropical Plant Science, 51, 10–15.
- Marsden-Jones, E.M. y Turrill, W.B. 1957. The bladder champions (*Silene maritima* and *Silene vulgaris*). Ray Society, Bartholomev Press, London.

- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Martínez-Sánchez, A., Cros, V., EGEA, C., Fernandez, J. Franco, J.A. y Martínez –Sánchez, J.J. 2004. Fertilización nitrogenada y acumulación de nitratos en dos especies de interés hortícola: *Moricandia arvenses* (L.) (Cruciferae) y *Silene vulgaris* (Moench) (Caryophyllaceae). *Grícola Vergel*, Marzo: 163-157.
- Maynard D.N., Lorenz O.A., 1979. Controlled-release fertilizers for horticultural crops. *Hort. Rev.*, 1, 79-140.
- McCall D., Willumsen J., 1998. Effect of nitrate, ammonium and chloride application on the yield and nitrate content of soil-grown lettuce. *J. Hort. Sci. Biotechn.*, 73, 698-703.
- McKnight G.M., Duncan C.W., Leifert C., Golden M.H., 1999. Dietary nitrate in man: friend or foe? *British J. Nutr.*, 81, 349-358.
- McKinney P.A., Paslow R., Bodansky H. J., 1999 – Nitrate exposure and childhood diabetes. In: Wilson W.S., Ball A.S., Hinton R.H (eds), *Managing the risks of nitrates to humans and the environment*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 327-339.
- Montemurro, F., Capotorti, G., Lacertosa, G., Palazzo, D., 1998. Effects of urease and nitrification inhibitors application on urea fate in soil and nitrate accumulation in lettuce. *J. Plant. Nutr.* 21 (2), 245–252.
- Morgan, L., 2001 – El gran debate: amonio vs. nitrato ¿Cómo quieren las plantas el nitrógeno?. *Practical Hidroponics & Greenhouse No. 50*. In: RED Hidroponia, 2001 – Boletín Informativo No. 10. Edit. Alfredo Rodríguez Delfin. Centro de Investigación de Hidroponia y Nutrición Mineral. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.
- Moustafa, A.T. y Morgan, J.V., 1982 – Influence of solution concentration on growth, flower quality and nutrient uptake in spray chrysanthemum. *Acta Horticulture*, 133: 13-24.
- Mozafar, A., 1994. *Plant Vitamins: Agronomic, Physiological and Nutritional Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- National Research Council Committee on Nitrate Accumulation. 1972. *Accumulation of nitrate*. Washington, National Academy of Sciences.
- Niñirola, D.C., 2008. Adaptación de diferentes especies hortícolas producidas en bandejas flotantes para su comercialización como “baby leaf”. Proyecto fin de carrera. Universidad Politécnica de Cartagena.

- Nguyen-The C., Prunier J.P., (1989). Involvement of *Pseudomonas* in deterioration of “ready-to-use” salads. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 24, 47-58.
- Ohkawa, H. (1985). Gas chromatographic determination of oxalic acid in foods. *J. Assoc. O.c. Anal. Chem.* 68, 108-111.
- OMS. 2001. WHO. Surveillance Programme of Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. Ed. OMS.
- Osweiler, G. D., Carson, T. L., Buck, W. B., and Van Gelder, G. A. (1985). *Clinical and Diagnostic veterinary Toxicology*. 3rd edn. pp. 471-475. Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa.
- Palaniswamy, U.R., Mcavoy, R.J. y Bible, B.B., 2000 – Omega-3 fatty acid concentration in *Portulaca oleracea* is altered by nitrogen source in hydroponic solution. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125: 190-4.
- Palaniswamy, U.R., Mcavoy, R.J. y Bible, B.B., 2002. Effect of nitrate:ammonium nitrogen ratio and oxalate levels of purslane. In: *Trends in new crops and new uses*. (Janick, J. and Whipkey, A., Eds.). ASHS Press, Alexandria, VA. 453-455.
- Palaniswamy, U.R., Mcavoy, R.J. y Bible, B.B., 2004. Oxalic acid concentrations in Purslane (*Portulaca oleracea* L.) is altered by the stage of harvest and the nitrate to ammonium ratios in hydroponics. *Scientia Horticulturae*.
- Parslow R.C., McKinney P.A., Law G.R., Staines A., Williams R., Bodansky H.J., 1997– Incidence of childhood diabetes mellitus in Yorkshire, Northern England, is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis. *Diabetologia*, 40, 550-556.
- Paschold, P.J., 1989. The effect of selected cultural measures on the nitrate content of spinach. II. Effect of crop density, irrigation, cultivar and other factors. *Archiv fur Gartenbau*, 37: 291-300.
- Pignatti, S. 1982. *Flora d'Italia*. Edagricole. Bologna, 1: 246-247.
- Prentice, H.C. y Giles, B.E. 1993. Genetic determination of isoenzyme variation in the Bladder Campions, *Silene uniflora* and *S. vulgaris*. *Hereditas*, 118: 217-227.
- Pratella G.C., Tonini G., (1995). L'innovazione nell'offerta mercantile degli ortofrutticoli: la IV gamma. *Il freddo*, 10, 151-160.
- Resh, H. M., 2001 – *Cultivos Hidropónicos, Nuevas técnicas de producción*. Madrid, Mundi-Prensa, 5ª Edición rev. y ampl.

- Runyeon, H. Y. Prentine, H.C. 1997. Genetic differentiation in the Bladder campion, *Silene vulgaris* and *S. uniflora* (Caryophyllaceae) in Sweden. *Biological Journal of the Linnean Society*, 61: 559-584.
- Santamaria P., 1997. Contributo degli ortaggi all'assunzione giornaliera di nitrato, nitrito e nitrosammine. *Industrie Alimentari*, 36, 1329-1334.
- Santamaria P., 1997 – Nitrato e salute umana. *Infocore agrario*, 53 (49), 119.
- Santamaria P., 2001. Tecniche per ridurre il contenuto di nitrati negli ortaggi. *Bollettino SISS*, 50, 897-908.
- Santamaria P., 2002. Breve storia della pericolosità del nitrato. *Colture Protette*, 31 (12, supplemento), 4-6.
- Santamaria, P., Elia, A., 1997. Producing nitrate-free endive heads: effects of nitrogen form on growth, yield, and ion composition of endive. *J. Am. Hortic. Sci.* 122 (1), 140–145.
- Santamaria P., Elia A., Papa, G. y Serio f., 1998a. Nitrate and ammonium nutrition in chicory and rocket salad plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21: 1779-1789.
- Santamaria P., Elia A., Serio F., Todaro E., 1999. A survey of nitrate and oxalate content in retail fresh vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 79, 1882-1888.
- Schat, H., Kuiper E., Ten-Bookum, W.M. y Vooijs, R. 1993. A general model for the genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*: evidence from crosses between plants from different tolerance populations. *Heredity*, 70: 142-147.
- Schat, H. y Ten Bookum, W.M. 1992. Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. *Heredity*, 68: 219-229.
- Schat, H. y Vooijs, R. 1997. Multiple tolerance and cotolerance to heavy metals in *Silene vulgaris*: a cosegregation analysis. *New Phytology*, 136: 489-496.
- Schuddeboom L.J., 1993. Nitrates and nitrites in foodstuffs. Council of Europe Press, 125 p.
- Scientific Panel on Biological Hazard. 2003. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. *The EFSA Journal*, 14: 1-31.
- Senesi E., (1998). Tecnologia degli ortofrutticoli di IV gamma. *Infocore agrario*, 54 (19), 31-37.

- Sisson, V.A., Rufty, T.W., Williamson, R.E., 1991. Nitrogen-use efficiency among flue-cured tobacco genotypes. *Crop Sci.* 31, 1615–1620.
- Somers, G.F., Beeson, K.C., 1948. The influence of climate and fertilizer practices upon the vitamin and mineral content of vegetables. *Adv. Food Res.* 1, 291–324.
- Speijers G.J.A., 1996a – Nitrite (and potencial endogenous formation of N-nitroso compounds). In: *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food.* WHO Food Additives Series, Ginevra, 35, 269-323.
- Speijers G.J.A., 1996b – Nitrite. In: *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food.* WHO Food Additives Series, Ginevra, 35, 325-360.
- Speijers G.J.A., 1998. Nitrate and nitrite. In: *Guidelines for drinking-water quality, 2<sup>nd</sup>,* Ginevra, Word Health Organization, 64-80.
- Steiner, A.A., 1984 – The universal nutrient solution. Pp. 633-649. In: *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Congress on Soiless Culture.* ISOSC. Wageningen, The Netherlands.
- Steingröver, E., Ratering, P. y Siesling, J. 1986a. Daily changes in uptake, reduction and storage of nitrate in spinach grown at low light intensity, *Plant Physiology*, 66: 550-556.
- Steinmetz K.A., Potter J.D., 1991. Vegetables, fruit and cancer. I. *Epidemiology, Cancer Causes Control*, 2, 325-357.
- Stensvand, A. y Gislerod, H.R., 1992 – The effect of  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  ratio of the nutrient solution on growt and mineral uptake in *Chrysanthemum morifolium*, *Passiflora caerulea* and *Cordyline fructicosa*. *Gartenbauwissenschaft*, 57: 193-198.
- Stevens, M.A., 1974. Varietal influence on nutritional value. In: White, P.L., Selvey, N. (Eds.), *Nutritional Qualities of Fresh Fruits and Vegetables.* Futura, Mt. Kisco, NY, pp. 87–110.
- Stopes, C., Woodward, L., Forde, G. and Vogtmann, H. 1988. The nitrate content of vegetable and salad crops offered to the consumer as from ‘organic’ or ‘conventional’ production systems. *Biological Agriculture and Horticulture* 5(3). 215-221. Referenced by HortIdeas, March 1989 : 6(3).
- Takebe, M, Ishihara, T, Ishii, K, Yonema, T, 1995. Effect of nitrogen forms and Ca/K ratio in the culture solution on the contents of nitrate, ascorbic acid and oxalic acid in spinach

(*Spinacia oleracea* L.) and komatsuna (*Brassica campestris* L.). *Japanese-Journal-of-Soil-Science-and-Plant-Nutrition*. 66(5): 535-543.

Takebe, M., y Yoneyama, T. (1997). Effect of ammonium–nitrogen supply on oxalic acid content in spinach grown in hydroponics and fields. In T. Ando et al. (Eds.), *Plant nutrition – for sustainable food production and environment* (pp. 957–958). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Trinchera A., 2001. I nitrati nel metabolismo degli organismi viventi. *Bollettino SISS*, 50, 875-884.

Uphof, J.C. TH. 1959. *Dictionary of Economic Plants*. Weinheim. Ed. London, UK.

Usher, G. 1974. *A Dictionary of Plants Used by Man*. Constable, Ed. London, UK.

Van der Boon, J., Steenhuizen, J.W., Steingrover, E.G., 1990. Growth and nitrate concentration of lettuce as affected by total nitrogen and chloride concentration  $\text{NH}_4/\text{NO}_3$  ratio and temperature of the re-circulating nutrient solution. *J. Hortic. Sci.* 65 (3), 309–321.

Van Maanen J.M.S., Van Dijk A., Mulder K. e altri 5, 1994 – Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid. *Toxicol. Lett.*, 72, 365-374.

Vermeer I.T.M., Pachen D.M.F.A., Dallinga J.W. e altri 2, 1998. Volatile N-nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADi level in combination with an amine-rich diet. *Environ. Health Perspect.*, 106, 450-463.

Verkleij, J.A.C. y Prast, J.E. 1989. Cadmium tolerance and co-tolerance in *Silene vulgaris* (Moench.) Garcke [=*S.cucubalus* (L.) Wib.]. *The New Phytologist*, 111: 637.

Walker R., 1990. Nitrates, nitrites and N-compounds : a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Add. Contam.*, 7, 717-768.

Wall, D.A. y Morrison, I.N. 1990. Competition between *Silene vulgaris* (Moench) Garcke and alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Weed Research*, 30:145.

Walters C.L., Smith P.L.R., 1981. The effect of water-borne nitrate on salivary nitrite. *Food Chem. Toxicol.*, 19, 297-302.

Wang, Z.-H., Li, S.-X., 2003. Effects of N forms and rates on vegetable growth and nitrate accumulation. *Pedosphere* 13 (4), 309–316.

- Wang, Z.-H., Wang, L., He, C.Y., Wang, H., Kui, X.L., Jiang, Z.X., 2000. Studies on effect of over N fertilization on nitrate accumulation in different vegetables and its regulation. *Agro-environ. Protect.* 19 (1), 46–49.
- Wang, Z.-H., Zong, Z.-Q., Li, S.-X., Chen, B.-M., 2002. Nitrate accumulation in vegetables and its residual in vegetable fields. *Environ. Sci.* 23, 79–83.
- WHO, 1995. Evaluation of certain food additives and contaminants. Ginevra, World Health Organization, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, pp. 29-35 (WHO Technical Report Series N. 859).
- Weir, B.L., Paulson, K.N. y Lorenz, O.A., 1972 – The effect of ammoniacal nitrogen on lettuce and radish plants. *Soil Science Society American Procedure*, 36: 462-465.
- Weston, L.A., Barth, M.M., 1997. Preharvest factors affecting postharvest quality of vegetables. *HortScience* 32, 812–816.
- Williams, F.N. 1908. European varieties of *Silene inflata*. *Bulletin de l'Herbier Boissier*, 8: 403-409.
- Woodson, W.R. y Boodley, J.W., 1983 – Accumulation and partitioning of nitrogen dry matter during the growth of *crysanthemum*. *HortScience*, 18: 196-197.
- Zhang, C.L., Gao, Z.M., Zhao, Y.D., Thang, W.M., 1990. The effects of different nitrogen forms and their concentration combinations on the growth and quality of spinach. *J. Nanjing Agric. Univ.* 13 (3), 70–74 (in Chinese).
- Zornoza, P., Carpena, O., Najera, A. y Peñalosa, J., 1987 – Effect of light intensity on  $\text{NH}_4^+$  tolerance in tomato plants. *Plant and Soil*, 102: 93-97.

## 5. ANEXOS

ANEXO 1 - Estimativa diaria de ingestión de nitratos en algunos países (el agua no está incluida) y contribución de las legumbres

| Pais                  | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/persona) | Contribución legumbres (%) | Referencias bibliográficas          |
|-----------------------|---|----------------------------|-------------------------------------|
| <b>Italia</b>         | 149                                       | 90                         | CSS, 1980                           |
|                       | 160                                       |                            | Cocchioni <i>et al.</i> , 1986      |
| <b>Bélgica</b>        | 148 (1)                                   | 93                         | Dejoncheere <i>et al.</i> , 1994    |
| <b>Dinamarca</b>      | 50  |                            | Statens Levnedsmiddelinstitut, 1981 |
| <b>Finlandia</b>      | 54  | 86                         | Laitinen <i>et al.</i> , 1993       |
|                       | 77  | 92                         | Dich <i>et al.</i> , 1996           |
| <b>Francia</b>        | 121                                       | 85                         | Cornée <i>et al.</i> , 1992         |
|                       | 150                                       |                            | Causeret, 1984                      |
| <b>Alemania</b>       | 68  | 72                         | Selenka e Brand-Grimm, 1976         |
| <b>Holanda</b>        | 110                                       |                            | Stephany e Schuller, 1980           |
|                       | 52  |                            | Ellen <i>et al.</i> , 1990          |
| <b>Polonia</b>        | 127                                       |                            | Nabrzyski y Gajewska, 1989          |
|                       | 65-85                                     |                            | Borawska <i>et al.</i> , 1998       |
| <b>Reino Unido</b>    | 52  | 70                         | Ysart <i>et al.</i> , 1999          |
|                       | 95  | 94                         | Knight <i>et al.</i> , 1987         |
| <b>Estados Unidos</b> | 73  | 90                         | NRC, 1981                           |
|                       | 300                                       |                            | Pennington, 1998                    |
| <b>España</b>         | 60  |                            | ACAPV, 1997                         |
| <b>Suecia</b>         | 50  |                            | Jagerstad y Nilsson, 1976           |
| <b>Suiza</b>          | 72  | 88                         | Trem, 1980                          |
| <b>Unión Europea</b>  | 18-131 (2)                                |                            | EC, 1997                            |

(1) Comprende sólo legumbres y fruta; (2) Comprende sólo legumbres

ANEXO 2 - Contenidos de nitratos máximos permitidos para la comercialización de lechuga y de espinacas con el Reglamento de la Comisión de la Comunidad Europea N. 563/2002, actualmente en vigor.

| <b>Producto</b>                        | <b>Periodo de la cosecha</b> | <b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(mg/kg peso fresco)</b> |
|--|------------------------------|--|
| <b>Espinaca fresco</b>                 | De 1º noviembre al 31 marzo  | 3000   |
|  | De 1º abril al 31 octubre    | 2500   |
| <b>Espinaca conservada o congelada</b> | Para todo el año             | 2000   |
| <b>Lechuga excepto la “Iceberg”</b>    | De 1º octubre al 31 marzo:   |  |
|  | Cultura en invernadero       | 4500 <sup>(*)</sup>                                  |
|  | Cultura al aire libre        | 4000 <sup>(*)</sup>                                  |
|  | De 1º abril al 31 octubre    |  |
|  | Cultura en invernadero       | 3500 <sup>(*)</sup>                                  |
|  | Cultura al aire libre        | 2500 <sup>(*)</sup>                                  |
| <b>Lechuga del tipo “Iceberg”</b>      | Para todo el año:            |  |
|  | Cultura en invernadero       | 2500 <sup>(*)</sup>                                  |
|  | Cultura al aire libre        | 2000 <sup>(*)</sup>                                  |

(\*)-en la ausencia de rotulación adecuada indicadora del método de producción, aplica el nivel establecido para cultura de aire libre