

## CRECIMIENTO Y ACUMULACIÓN DE $\text{NO}_3^-$ EN LECHUGA HIDROPÓNICA CON RELACIONES NITRATO/AMONIO EN DOS ESTACIONES DE CULTIVO

### GROWTH AND $\text{NO}_3^-$ ACCUMULATION IN HYDROPONIC LETTUCE WITH NITRATE/AMMONIUM RATIOS IN TWO CULTIVATION SEASONS

Ana Y. Lara-Izaguirre<sup>1</sup>, Angel N. Rojas-Velázquez<sup>1\*</sup>, Mauricio J. Romero-Méndez<sup>1</sup>, Hugo M. Ramírez-Tobías<sup>1</sup>, Elia Cruz-Crespo<sup>2</sup>, Jorge A. Alcalá-Jáuregui<sup>1</sup> y Catarina Loredó-Ostí<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Agronomía, Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, Xalisco, Nayarit, México.

\*Autor para correspondencia (angel.rojas@uaslp.mx)

#### RESUMEN

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una hortaliza de hoja que en México genera un importante ingreso económico; sin embargo, los altos niveles de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) pueden ocasionar problemas de salud, ya que generan compuestos carcinogénicos. Una alternativa para disminuir el  $\text{NO}_3^-$  en hojas es sustituyéndolo por amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), lo que podría beneficiar la salud humana reduciendo la ingesta de  $\text{NO}_3^-$ . El objetivo del presente estudio fue evaluar el crecimiento y acumulación de  $\text{NO}_3^-$  en lechuga con diferentes relaciones de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en la solución nutritiva en dos estaciones de cultivo. Las lechugas se cultivaron en un sistema hidropónico de raíz flotante. El diseño experimental fue completamente al azar en arreglo factorial  $4 \times 2$ , cuatro relaciones de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (100/0, 80/20, 65/35 y 50/50) y dos estaciones de cultivo (verano y otoño), con un total de 8 tratamientos. Las variables evaluadas fueron peso seco de raíz (PSR), de hojas (PSH) y total (PST), área foliar (AF) y concentración de  $\text{NO}_3^-$  en peciolo. No se encontraron diferencias significativas entre estaciones para PSH, PST y AF. En otoño el PSR aumentó 11 % en comparación con el de verano. En verano el contenido de  $\text{NO}_3^-$  en peciolo aumentó 55 % comparado con el de otoño. La relación 100/0 aumentó 25 % el PSH, PST y AF, y 15 % más de  $\text{NO}_3^-$  en peciolo. Durante el verano, utilizando una relación 100/0 se presentó un aumento de 4 % en el PSH, PST y AF. Al usar  $\text{NH}_4^+$  en las relaciones 65/35 y 50/50 se redujo 25 % el crecimiento y 15 % la acumulación de  $\text{NO}_3^-$  en peciolo. En la estación de verano la aplicación de 100/0 en plantas de lechuga aumentó el crecimiento. En la estación de verano el contenido de  $\text{NO}_3^-$  en peciolo aumentó el doble.

**Palabras clave:** *Lactuca sativa*, amonio, crecimiento, estación de cultivo, nitrato.

#### SUMMARY

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is a leafy vegetable that generates important economic income in Mexico; however, high levels of nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) can cause health problems because they generate carcinogenic compounds. An alternative to reduce the  $\text{NO}_3^-$  in leaves is replacing it with ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), which could benefit human health by lowering intake of  $\text{NO}_3^-$ . The objective of this study was to evaluate the growth and accumulation of  $\text{NO}_3^-$  in lettuce with different ratios of  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  in the nutrient solution in two growing seasons. The lettuces were grown in a floating root hydroponic system. The experimental design was completely randomized, under a  $4 \times 2$  factorial arrangement, four ratios of  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  (100/0, 80/20, 65/35 and 50/50) and two seasons (Summer and Autumn), with a total of 8 treatments. The evaluated traits were dry weight of roots (DWR), of leaves (DWL) and total (DWT), leaf area (LA) and  $\text{NO}_3^-$  concentration in petiole. No significant differences were found between

seasons in DWL, DWT and LA. In Autumn DWR increased 11 % compared to that of Summer. In Summer the  $\text{NO}_3^-$  content in petioles increased by 55 % compared to that of Autumn. The 100/0 ratio increased 25 % DWL, DW and LA, and 15 %  $\text{NO}_3^-$  in petiole. During the Summer, there was an increase of 4 % in DWL, DWT and LA by using the 100/0 ratio. When  $\text{NH}_4^+$  was used in the 65/35 and 50/50 ratios, growth was reduced by 25 % and  $\text{NO}_3^-$  accumulation in petiole by 15 %. In the Summer growing season, the application of 100/0 in lettuce plants increased growth. In the summer season the  $\text{NO}_3^-$  content in petiole increased twofold.

**Index words:** *Lactuca sativa*, ammonium, growth, growing season, nitrate.

#### INTRODUCCIÓN

El cultivo de hortalizas en México es una importante fuente de recursos económicos y de alto consumo en fresco por su beneficio en la salud humana (Baslam *et al.*, 2013), ya que contribuye en la reducción de enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zeballos, 2009). La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es uno de los principales cultivos en México, en 2017 tuvo una superficie de 21,149 ha, con rendimiento promedio de 22.9 t ha<sup>-1</sup> y con valor económico de 1,843 millones de pesos mexicanos (SIAP, 2018). La lechuga se cultiva en suelo a campo abierto, bajo régimen de temporal o riego (SIAP, 2018). En estos sistemas agrícolas convencionales los problemas generados por el uso excesivo de plaguicidas y fertilizantes y el cambio climático, entre otros, han obligado a la búsqueda de nuevas alternativas para la producción hortícola, tal como la producción hidropónica (Velasco *et al.*, 2016), la cual disminuye el impacto ambiental ocasionado por fertilizantes (Croitoru *et al.*, 2015). La producción en invernaderos conduce a mejores rendimientos, calidad e inocuidad, lográndose con ello mayor oportunidad de mercado.

La producción de lechuga hidropónica en sistema de raíz flotante no utiliza sustrato y las plantas crecen directamente en la solución nutritiva (Moreno-Pérez *et al.*, 2015), con

lo que se logra una mayor eficiencia en el suministro de agua, nutrición mineral, menor presencia de plagas y enfermedades (Raviv y Lieth, 2008).

En la nutrición de cultivos, el nitrógeno es uno de los elementos que influye en el crecimiento y desarrollo (Chowdhury y Das, 2015). Las principales formas aprovechables para las plantas son el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Britto y Kronzucker, 2002), siendo la forma nítrica la preferida por la mayoría de las plantas (Miller y Cramer, 2005), incluyendo la lechuga (Santamaria, 2006). La ingestión de  $\text{NO}_3^-$  puede resultar tóxica para la salud en humanos, debido a que se reduce a nitrito y compuestos de N-nitroso, los cuales son carcinogénicos (EC, 2011); cerca del 80 % de los  $\text{NO}_3^-$  son incorporados en la dieta típica por verduras de hojas (ATSDR, 2015).

La lechuga es de los cultivos de hoja que más acumula  $\text{NO}_3^-$  (Bahadoran *et al.*, 2016), lo cual varía entre genotipos (Campos *et al.*, 2016), la estación de cultivo (Konstantopoulou *et al.*, 2010) y el uso de fertilizantes (Escalona *et al.*, 2009). El contenido de N en forma amoniacoal puede variar entre especies y condiciones ambientales (Britto y Kronzucker, 2002), aunque para las plantas puede resultar tóxico por la disminución del pH, desbalance iónico o al consumir energía en la salida de iones (Miller y Cramer, 2005; sin embargo, muchos estudios han mostrado que las plantas se benefician con una mezcla de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  (Britto y Kronzucker, 2002), con las que se obtienen mayores tasas de crecimiento (Campos-García *et al.*, 2016).

La adición de  $\text{NH}_4^+$  reduce la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en la planta (Wang *et al.*, 2009), lo cual puede beneficiar la salud humana debido a una menor ingesta de  $\text{NO}_3^-$ ; sin embargo, el  $\text{NH}_4^+$  en exceso también puede ser perjudicial, ya que se ha reportado que el  $\text{NH}_4^+$  en una proporción de 30 % reduce el crecimiento, aunque no afecta el rendimiento de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Parra *et al.*, 2012). Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el crecimiento y la acumulación de  $\text{NO}_3^-$  en lechuga hidropónica bajo diferentes relaciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  en la solución nutritiva durante dos estaciones de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio experimental

El experimento se realizó en 2017 en el Centro de Hidroponía de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, ubicado en San Luis Potosí, México. Se utilizó un invernadero tipo túnel de dimensiones 5 × 9 m. Para la estación de crecimiento de verano (65 días, julio a septiembre), la temperatura media

fue de 23.5 °C y la luminosidad media de 17,417 lux. Para la estación de otoño (70 días, octubre a diciembre), la temperatura media fue de 15.1 °C y la luminosidad media de 10,004 lux.

### Material genético y manejo del experimento

Se utilizaron semillas de lechuga de la variedad Montemar, las cuales se sembraron en charolas de poliestireno con 220 cavidades, con un sustrato a base de turba ácida. A los 20 días después de la siembra, cuando las plantas tenían cuatro hojas verdaderas, se transplantaron en placas de uncel con 25 cavidades, distribuidas en tresbolillo y se cultivaron durante 45 días (verano) y 50 días (otoño) en un sistema hidropónico de raíz flotante. La aireación de la solución fue manual, con agitación durante 15 minutos por mesa (mañana y tarde), con una aportación de oxígeno entre 3 y 4 mg L<sup>-1</sup>. Se utilizaron 12 mesas con 25 plantas cada una. Las mesas de madera tenían las siguientes dimensiones: 1 m de altura × 1 m de ancho × 1 m de largo. En la parte superior se formó un contenedor con la misma madera de 1 m de ancho × 1 m de largo × 0.10 m de profundidad, lo cual generó un volumen de 100 L de capacidad. El interior del contenedor fue cubierto con plástico de color negro calibre 600.

### Diseño y unidad experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones, bajo arreglo factorial 4 × 2. El Factor A consistió de relaciones de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , con cuatro niveles: 100/0, 80/20, 65/35 y 50/50 y el factor B fueron estaciones de cultivo, con dos niveles: verano y otoño. La unidad experimental fue una mesa con 25 plantas, de lo que resultó un total 12 unidades experimentales por cada estación de cultivo.

### Aplicación de los tratamientos

Se utilizó la solución universal de Steiner (1984) conteniendo (en meq L<sup>-1</sup>): 12  $\text{NO}_3^-$ , 7  $\text{SO}_4^{2-}$ , 1  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 9  $\text{Ca}^{+2}$ , 7  $\text{K}^+$  y 4  $\text{Mg}^{+2}$ . La solución se modificó utilizando como base 12 meq L<sup>-1</sup> de N total para obtener las cuatro relaciones de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ : 100/0 (12/0 meq L<sup>-1</sup>), 80/20 (9.6/2.4 meq L<sup>-1</sup>), 65/35 (8.5/4.2 meq L<sup>-1</sup>) y 50/50 (6/6 meq L<sup>-1</sup>). La solución de Steiner no incluyó el  $\text{NH}_4^+$  como fuente de N, por lo que la modificación consistió en la adición de una determinada concentración de  $\text{NH}_4^+$ , lo que reduce una cantidad equivalente a la concentración total de  $\text{NO}_3^-$  (12 meq L<sup>-1</sup>). Al disminuir la cantidad de  $\text{NO}_3^-$  disminuyó la concentración relativa de los aniones ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ ), estos aniones deben mantener la concentración total de 20 meq L<sup>-1</sup>, por lo que se incrementaron las concentraciones de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  hasta igualar la concentración de  $\text{NH}_4^+$ ,

mantiéndose la relación mutua de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ .

La adición de  $\text{NH}_4^+$  en la solución nutritiva incrementó la concentración de los cationes ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{NH}_4^+$ ); de este modo, la cantidad de  $\text{NH}_4^+$  añadido se restó de las concentraciones de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , lo que permitió mantener la concentración total de los cationes en 20 meq  $\text{L}^{-1}$ , siempre manteniendo la relación mutua entre  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Se ajustaron las concentraciones de los iones mediante un factor de corrección (0.024), propuesto por Steiner (1984), debido a que las modificaciones provocaron un cambio en la presión osmótica de la solución nutritiva. Las soluciones tenían una presión osmótica -0.072 MPa y una CE de 2  $\text{dSm}^{-1}$ .

En la preparación de las soluciones nutritivas se consideró el análisis de agua que contaba con un pH de 7.5 y una CE 0.6  $\text{dSm}^{-1}$ . Los fertilizantes utilizados fueron  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Los micronutrientes se añadieron con Carboxy Micro, el cual aporta Fe 5 %, Zn 2.5 %, Mn 1 % y B 0.5 % en forma quelatada EDDHA. En el sistema hidropónico de raíz flotante las plantas transplantadas se establecieron para su adaptación durante 15 días (verano) y 20 días (otoño) en una solución Steiner completa. Después de la adaptación se cambió la solución nutritiva y se aplicaron los tratamientos de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , estas soluciones nutritivas no se cambiaron durante los 30 días que duró el estudio. El pH de la solución inicial se ajustó con ácido sulfúrico a 5.5, se monitoreó diariamente y los valores de los tratamientos se mantuvieron durante el estudio entre 5.5 y 6.5, por lo que no fue necesario realizar más ajustes con ácido sulfúrico. Se restableció diariamente el agua transpirada con agua sin modificar.

### Variables evaluadas

Las variables evaluadas al final de cada estación de cultivo fueron peso fresco de la cabeza de lechuga (balanza digital, Ohaus® PAJ4102N Gold series, Parsippany, New Jersey, USA) en g, peso seco de raíz, hojas y total (con estufa de secado de aire forzado Omron, Kyoto, Japón) a 70 °C durante 72 h hasta obtener peso constante en g y se registró el área foliar en  $\text{cm}^2$  (medidor laser de área foliar CI-202 CID Bio-Science, Camas, Washington, USA). En hojas intermedias de la parte externa de la cabeza se midieron también las unidades SPAD (Soil Plant Analysis Development, SPAD-502 Plus Chlorophyll Meter 2900P, Spectrum Technologies, Aurora, Illinois, USA) así como el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI, GreenSeeker Trimble handheld crop sensor, Sunnyvale, California, USA). Además, se midió la conductividad eléctrica (medidor combo pH y CE, Hanna, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA) y la

concentración de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución nutritiva y en peciolo de la hoja; para esto, se muestrearon tres hojas intermedias a las cuales se les eliminó el peciolo y en un mortero se les extrajo la savia y las mediciones se hicieron con un ionómetro (Laqua Twin Compact Ion Meter, Horiba, Kyoto, Japón) para comparar los valores de  $\text{NO}_3^-$  con la norma Europea 1258/2011 (EC, 2011), los datos fueron transformados a  $\text{mg kg}^{-1}$  y ajustados a los valores de peso fresco y seco.

### Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ), por medio del programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Peso Seco de Raíz (PSR)

En el Cuadro 1 se observa que la raíz acumuló 11 % más peso seco en el otoño que en el verano. En plantas de *Antirrhinum majus* L. se reportaron diferencias entre estaciones, ya que el peso radical fue mayor en el invierno, lo cual se atribuyó a que en condiciones de baja temperatura hay una menor demanda de fotosintatos en las hojas (Rojas-Velázquez *et al.*, 2013). En cuanto a la relación  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , el balance 50/50 causó un 16 % menos PSR que en el resto de los tratamientos. Este efecto de disminución del peso de raíz puede ser debido a la sensibilidad inherente de las plantas a la relación  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , como en el caso de tomate, cuyo peso seco de raíz fue disminuido con una relación 70/30 (Parra *et al.*, 2012). En contraste, Cao *et al.* (2010) mencionan que en pasto ryegrass (*Lolium multiflorum*) la materia seca de raíz fue más alta cuando se utilizó una relación de  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  de 75/25. La interacción entre estaciones y relaciones  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  no mostró efecto significativo sobre esta variable.

### Peso seco de hojas (PSH)

No se detectaron efectos significativos por la estación de cultivo (Cuadro 1). Las relaciones  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  80/20, 65/35 y 50/50 disminuyeron en 25 % el PSH comparado con las plantas control sin la aplicación de  $\text{NH}_4^+$  (100/0). La interacción entre ambos factores muestra que al aumentar la proporción de  $\text{NH}_4^+$  se disminuye el PSH; sin embargo, esta disminución fue más acentuada durante el verano, pues al elevarse el  $\text{NH}_4^+$  de 0 % a un 20 % hubo una reducción del 31 %, mientras que en el otoño la reducción fue del 27 % al elevarse el  $\text{NH}_4^+$  de 0 % a 35 % (Figura 1 A). Se ha reportado que en lechuga una baja radiación disminuye el peso de las hojas (De Grazia *et al.*, 2001),

**Cuadro 1. Medias y significancia estadística de peso seco de raíz (PSR), peso seco de hojas (PSH), peso seco total (PST) y peso fresco (PF) en lechuga Montemar en respuesta al efecto de la relación de nitrato/amonio ( $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ) en las estaciones de cultivo verano y otoño.**

Factores y niveles de variación		(g)			
		PSR	PSH	PST	PF
Estaciones (E)	Verano	3.00 b	21.42 a	24.43 a	281.08 a
	Otoño	3.36 a	20.37 a	23.73 a	293.11 a
	DSH (0.05)	0.28	1.65	1.71	22.46
Relaciones $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (N)	100/0	3.53 a	27.42 a	30.95 a	383.68 a
	80/20	3.17 ab	20.34 b	23.52 b	268.87 b
	65/35	3.11 ab	18.42 b	21.53 bc	255.38 b
	50/50	2.90 b	17.40 b	20.31 c	240.44 b
	DSH (0.05)	0.53	3.08	3.2	41.87
	CV (%)	22.3	19.48	17.54	19.29
E		*	ns	ns	ns
N		*	**	**	**
E × N		ns	**	**	**

Medias con letras iguales en las columnas dentro de cada factor de variación no son estadísticamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ). \*: significancia estadística al 5 %; \*\*: significancia estadística al 1 %; ns: no significativo; CV: coeficiente de variación; DSH: diferencia significativa honesta.

debido a que reduce la capacidad de fotosíntesis (Kataria y Guruprasad, 2012), lo que puede explicar el mayor PSH observado durante el verano ya que, en el presente estudio, la radiación fue mayor en verano que en otoño (luminosidad media de 17,417 vs. 10,004 lux).

### Peso seco total (PST)

En esta variable no se detectó efecto significativo de la estación del año (Cuadro 1). La relación  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  disminuyó en 24 % el PST con la aplicación de 80/20, 65/35 y 30 % con 50/50, comparado con las plantas control sin la aplicación de  $\text{NH}_4^+$  (100/0). En este sentido, el  $\text{NH}_4^+$  es tóxico para la planta, por lo que su absorción requiere de inmediata asimilación, consumiendo energía, la cual depende de la fotosíntesis, lo que reduce el crecimiento y con esto el peso seco (Britto y Kronzucker, 2002). En contraste, se ha reportado en plantas de fresa (*Fragaria × ananassa*) que la aplicación de  $\text{NH}_4^+$  aumenta un 20 % el peso seco comparado con la sola aplicación de  $\text{NO}_3^-$  (Campos-García *et al.*, 2016). La interacción entre ambos factores muestra que al aumentar la proporción de  $\text{NH}_4^+$  disminuye el PST; sin embargo, esta disminución fue más acentuada durante el verano, pues al elevarse el  $\text{NH}_4^+$  de 0 a 20 % hubo una reducción del 28.8 %, mientras que en el otoño la reducción fue del 18.3 % al elevarse el  $\text{NH}_4^+$  de 0 a 35 % (Figura 1 B). En plantas de arroz (*Oryza sativa*),

Ta y Ohira (1981) reportaron efectos similares, ya que los efectos dañinos del  $\text{NH}_4^+$  fueron más severos en verano que en otoño; esto se atribuyó a la alta temperatura y luminosidad, los cuales afectan el crecimiento, siendo éste mayor con  $\text{NO}_3^-$  que con  $\text{NH}_4^+$ .

### Peso fresco (PF)

No se detectaron efectos significativos en esta variable por la estación de cultivo (Cuadro 1). La relación  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  disminuyó 29 % el PF con la aplicación de 80/20, 65/35 y 50/50 comparado con las plantas control sin la aplicación de  $\text{NH}_4^+$  (100/0). En lechuga, Urlic *et al.* (2017) reportaron tendencias similares, ya que que el peso fresco disminuyó con la aplicación de  $\text{NH}_4^+$  y aumentó con la aplicación de  $\text{NO}_3^-$ ; en contraste, en plantas de fresa, las relaciones altas en  $\text{NH}_4^+$  aumentaron 28 % el peso fresco (Campos-García *et al.*, 2016). La interacción entre ambos factores muestra que al aumentar la proporción de  $\text{NH}_4^+$  disminuye el PF; sin embargo, esta disminución fue más acentuada durante el verano, pues al elevarse el  $\text{NH}_4^+$  de 0 a 20 % hubo una reducción del 31 %, mientras que en el otoño la reducción fue del 27 % al elevarse el  $\text{NH}_4^+$  de 0 a 35 % (Figura 1 C). La reducción en el PF en plantas de lechuga con la aplicación de  $\text{NH}_4^+$ , también reportada por Urlic *et al.* (2017), se atribuye a un mayor suministro de carbohidratos en las raíces para la asimilación y desintoxicación del  $\text{NH}_4^+$  (White, 2012).

### Área foliar (AF)

No se detectaron efectos significativos por la estación de cultivo (Cuadro 2), aunque la relación  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  sí afectó significativamente el AF. En general, el AF disminuyó conforme aumentó la aplicación de  $\text{NH}_4^+$  en la solución nutritiva, lo que llegó a ser hasta 36 % en plantas tratadas con 50 % de este catión. Similar a otras variables, la interacción entre ambos factores de variación mostró efectos significativos, observándose que independientemente de la estación del año, al aumentar el  $\text{NH}_4^+$  disminuyó el AF, aunque la relación fue más marcada en las plantas cultivadas en verano, pues al elevarse el  $\text{NH}_4^+$  de 0 a 20 % hubo una reducción del 21 % (Figura 1 D). En fresa se ha reportado que a medida que aumenta la concentración de  $\text{NH}_4^+$ , el área foliar se incrementa en 27 % (Campos-García *et al.*, 2016). Las plantas de lechuga producen más hojas en otoño que en primavera, además de que a mayor proporción de  $\text{NO}_3^-$  se obtiene un mayor número de hojas (Urlic *et al.*, 2017).

### Unidades SPAD

La estación de cultivo influyó más en otoño al mostrar un incremento significativo del 25 % en unidades SPAD que

en verano (Cuadro 2). En cuanto a la relación  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , no se encontraron diferencias significativas. En este sentido, Cunha *et al.* (2015) mencionan que a mayores dosis de N, mayor es la eficiencia fotosintética de la planta, y mayores las unidades SPAD, lo cual no se mostró en el presente experimento, ya que los tratamientos tuvieron la misma cantidad de N. La interacción entre ambos factores de estudio (Figura 2 A) mostró efectos significativos, ya que al elevarse el  $\text{NH}_4^+$  de 0 a 35 % en el otoño hubo un aumento de 18 % en unidades SPAD; sin embargo, durante el verano la relación 50/50 es igual estadísticamente a las relaciones 100/0 y 80/20 de otoño.

### Índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI)

No se detectaron efectos significativos entre las estaciones de cultivo (Cuadro 2); sin embargo, la aplicación del 50 % de  $\text{NH}_4^+$  disminuyó en 9 % el NDVI, lo cual refleja que estas plantas tienen mayores problemas fisiológicos ocasionados por el  $\text{NH}_4^+$ . La interacción entre ambos factores de estudio (Figura 2 B) siguió con la misma tendencia, ya que con la aplicación de 50 % de  $\text{NH}_4^+$  se observó que durante el verano el efecto fue más acentuado con una disminución del 10 %. El NDVI refleja el estado fisiológico de los cultivos, los

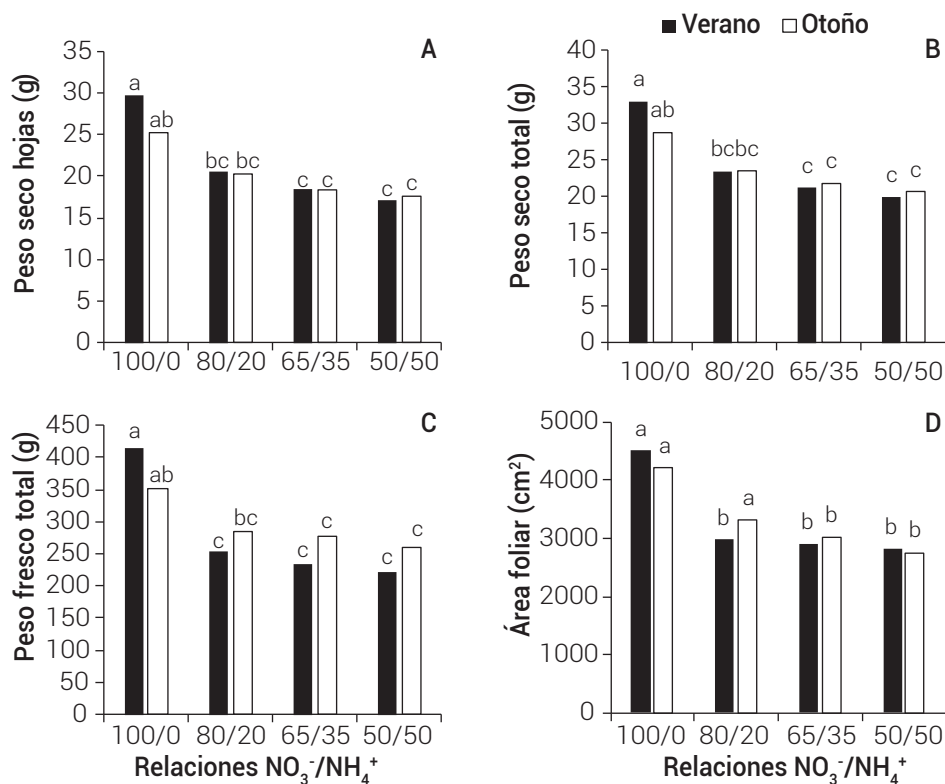
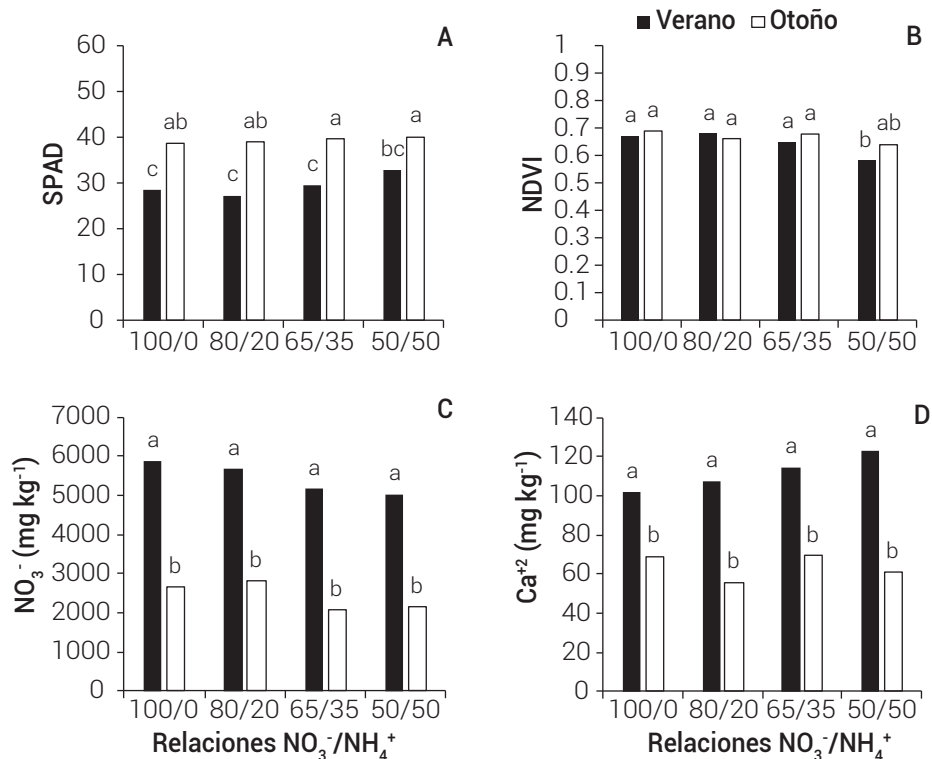


Figura 1. Interacción entre estaciones de cultivo y relaciones  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en A: peso seco de hojas, B: peso seco total, C: peso fresco total y D: área foliar del estudio en lechuga Montemar. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ).

**Cuadro 2. Medias y significancia estadística de área foliar (AF), unidades SPAD, índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) y conductividad eléctrica (CE) de la solución nutritiva en lechuga Montemar en respuesta a relaciones de nitrato/amonio ( $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ) en las estaciones de cultivo, verano y otoño.**

Factores y niveles de variación		AF ( $\text{cm}^2$ )	SPAD	NDVI	CE ( $\text{dS/m}$ )
Estaciones (E)	Verano	3299.87 a	29.58 b	0.65 a	1.07 a
	Otoño	3328.18 a	39.38 a	0.66 a	1.12 a
	DSH (0.05)	182	1.97	0.02	0.23
Relaciones $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (N)	100/0	4360.0 a	33.59 a	0.68 a	0.98 a
	80/20	3147.4 b	33.14 a	0.67 a	1.15 a
	65/35	2956.8 bc	34.63 a	0.67 a	1.13 a
	50/50	2791.8 c	36.56 a	0.61 b	1.13 a
	DSH (0.05)	339.34	3.67	0.04	0.46
	CV (%)	13.52	14.09	9.29	23.25
E		ns	**	ns	ns
N		**	ns	**	ns
E × N		**	**	**	ns

Medias con letras iguales en las columnas dentro de cada factor de variación no son estadísticamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ). \*: significancia estadística al 5 %; \*\*: significancia estadística al 1 %; ns: no significativo; CV: coeficiente de variación; DSH: diferencia significativa honesta.



**Figura 2. Interacción entre estaciones de cultivo y relaciones  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en A) unidades SPAD, B) NDVI, C)  $\text{NO}_3^-$  en peciolo y D)  $\text{Ca}^{+2}$  en peciolo del estudio en lechuga Montemar. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ).**

valores más cercanos a 1 indican que las plantas están en mejores condiciones debido a que absorben más luz roja y reflejan más luz infrarroja que aquellas con problemas fisiológicos (Gutiérrez-Soto et al., 2011).

### Conductividad eléctrica (CE)

En los factores estudiados y su interacción no se encontraron diferencias en la CE (Cuadro 2). En este sentido, Moreno-Pérez et al. (2015) reportaron tendencias similares en un cultivo de lechuga en raíz flotante, donde los valores iniciales de pH y CE se mantuvieron hasta el final del estudio, lo que se atribuyó a que el agua perdida por evapotranspiración se reponía diariamente y esto disminuía la salinización al consumirse más agua que sales.

### Concentración de $\text{NO}_3^-$

Se detectaron efectos significativos entre estaciones de cultivo, con una concentración de  $\text{NO}_3^-$  55 % mayor en verano (Cuadro 3). Esto se atribuye a que la temperatura en verano aumenta la transpiración, lo que provoca un flujo ascendente de  $\text{NO}_3^-$  de la raíz hacia la parte aérea (Muro et al., 1998). La relación  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  disminuyó 15 % la concentración de  $\text{NO}_3^-$  con la aplicación de 65/35 y 50/50 comparado con las plantas con la aplicación de 100/0 y 80/20. En plantas de lechuga se han reportado tendencias

similares (Urlic et al., 2017), con una disminución en el contenido de  $\text{NO}_3^-$  en hojas con aplicaciones de  $\text{NH}_4^+$  de 25 a 100 %, lo que coincide con lo mencionado por Xing et al. (2015) en el cultivo de espinaca (*Spinacia oleracea*), ya que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en hojas disminuyó 38 % con aplicación de 25 % de  $\text{NH}_4^+$ . En contraste, se reporta que el  $\text{NH}_4^+$  aumentó en varios cultivos el contenido de N en la hoja, como es en fresa (Campos-García et al., 20016) y lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) (Hernández-Pérez et al., 2015).

La interacción entre los dos factores de estudio siguió con la misma tendencia en ambas estaciones, en el verano la concentración de  $\text{NO}_3^-$  fue 55 % mayor que en otoño (Figura 2 C). En plantas de espinaca la concentración de  $\text{NO}_3^-$  puede variar hasta 37 % según el mes que se coseche (Jaworska, 2005). La norma Europea 1258/2011 (EC, 2011) menciona que la concentración permitida de  $\text{NO}_3^-$  en lechuga en invernadero cultivada de octubre a marzo es de 5000  $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$ ; en el presente estudio la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en estos meses (otoño) estuvo por debajo de la norma con una concentración de 2416  $\text{mg kg}^{-1}$ . En lechugas hidropónicas cultivadas en otoño se reportaron tendencias similares, ya que las concentraciones obtenidas de entre 1561 y 1780  $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  estuvieron por debajo de la norma (Croitoru et al., 2015); sin embargo, en los meses de abril a septiembre, concentraciones de 4000  $\text{mg NO}_3^- \text{ kg}^{-1}$  son adecuadas según la norma, por lo que la

**Cuadro 3. Medias y significancia estadística del contenido de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{Ca}^{+2}$  en peciolo y en solución nutritiva del estudio en lechuga Montemar en respuesta al efecto de relaciones  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en dos estaciones de cultivo, verano y otoño.**

Factores y niveles de estudio	Peciolo		Solución nutritiva		
	$\text{NO}_3^-$	$\text{Ca}^{+2}$	$\text{NO}_3^-$	$\text{Ca}^{+2}$	
	(mg L <sup>-1</sup> )		(mg L <sup>-1</sup> )		
Estaciones (E)	Verano	5431.13 a	111.56 a	261.75 a	322.50 a
	Otoño	2416.92 b	63.81 b	315.83 a	261.67 b
	DSH	341.56	8.51	81.06	56.98
Relaciones $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (N)	100/0	4254.85 a	85.44 a	296.33 ab	311.67 a
	80/20	4236.67 ab	81.63 a	360.00 a	286.67 a
	65/35	3615.22 bc	91.88 a	311.67 ab	300.00 a
	50/50	3589.36 c	91.81 a	187.17 b	270.00 a
	DSH	636.55	15.91	158.21	111.22
	CV	21.46	19.39	30.39	21.12
E	**	**	ns	*	
N	**	ns	*	ns	
E × N	*	*	ns	ns	

Medias con letras iguales en las columnas dentro de cada factor de variación no son estadísticamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ). \*: significancia estadística al 5 %; \*\*: significancia estadística al 1 %; ns: no significativo; CV: coeficiente de variación; DSH: diferencia significativa honesta.

concentración obtenida en el presente estudio durante el verano fue superior a dicha norma, ya que el promedio fue de 5431 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kg<sup>-1</sup>.

A pesar de que con las proporciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> utilizadas en el presente estudio se rebasaron los niveles permitidos por la norma europea, es importante señalar que al aumentarse la proporción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> hasta 50 % hubo una reducción en la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en las lechugas (Figura 2 C), lo que se aproxima a los niveles permitidos; lo anterior sugiere que si la proporción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se hubiese elevado por arriba del 50 %, probablemente se hubiesen alcanzado los niveles permitidos. En contraste con los resultados observados en este estudio, Croitoru *et al.* (2015) reportaron valores menores en lechugas en hidroponía cultivadas en verano (entre 1603 y 2083 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kg<sup>-1</sup>); sin embargo, tuvieron 3 % más concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en hojas que en las de otoño. La mayor acumulación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede deberse a que la mayor temperatura en el verano favorece la demanda de azúcares, por lo que disminuye la síntesis de proteínas, lo que aumenta la acumulación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en las vacuolas (Muro *et al.*, 1998).

En las concentraciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en solución nutritiva no se detectaron efectos significativos de las estaciones de cultivo ni en la interacción de éstas con las relaciones NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Cuadro 3). En el factor relaciones NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se encontraron diferencias significativas con la aplicación del 20 % de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> la cual aumentó 48 % la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la solución comparado con 50 % de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Esto puede ser atribuido a que el sistema de raíz flotante proporciona mejores condiciones para la raíz, lo que favorece la absorción de agua y nutrientes en cualquier estación del año (Moreno-Pérez *et al.*, 2015).

### Concentración de Ca<sup>+2</sup>

En el contenido de Ca<sup>+2</sup> en peciolo se detectaron efectos por la estación de cultivo, donde el verano fue significativamente mayor en 42 % (Cuadro 3). Los niveles de la relación NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no mostraron significancia. En contraste, en plantas de *Lisianthus* la aplicación de 50 % de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la solución nutritiva aumentó la concentración de Ca<sup>+2</sup> en las hojas y con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ésta disminuyó (Hernández-Pérez *et al.*, 2015). En cuanto a la interacción entre ambos factores en la concentración de Ca<sup>+2</sup>, ésta sólo se vio aumentada significativamente en verano en una proporción de 42 % (Figura 2 D).

En la concentración de Ca<sup>+2</sup> en la solución nutritiva se detectaron efectos significativos por la estación de cultivo, siendo mayor en verano en 18 % (Cuadro 3). El factor relaciones de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y la interacción entre ambos factores de estudio no mostraron significancia en

la concentración de Ca<sup>+2</sup>. En contraste, en plántulas en tomate al utilizar 30 % de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la solución nutritiva la concentración de Ca<sup>+2</sup> disminuyó, esto debido a que el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se absorbe más rápidamente que el Ca<sup>+2</sup> y el Mg<sup>+2</sup> (Parra *et al.*, 2012).

### CONCLUSIONES

La estación de cultivo no afectó el crecimiento de las plantas de lechuga, aunque la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue menor en otoño comparado con la concentración en verano. La aplicación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en concentraciones mayores a 20 % afectó negativamente el crecimiento de las plantas; sin embargo, estas concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pueden reducir hasta 15 % la acumulación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en las hojas.

### BIBLIOGRAFÍA

- ATSDR, Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (2015) Resumen de salud pública. Nitrato y nitrito. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos. Atlanta, Georgia, USA. [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs204.pdf](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs204.pdf) (Enero 2018).
- Baslam M., F. Morales, I. Garmendia and N. Goicoechea (2013) Nutritional quality of outer and inner leaves of green and red pigmented lettuces (*Lactuca sativa* L.) consumed as salads. *Scientia Horticulturae* 151:103-111, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.023>
- Bahadoran Z., P. Mirmiran, S. Jeddi, F. Azizi, A. Ghasemi and F. Hadaegh (2016) Nitrate and nitrite content of vegetables, fruits, grains, legumes, dairy products, meats and processed meats. *Journal of Food Composition and Analysis* 51:93-105, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.06.006>
- Britto D. T. and H. J. Kronzucker (2002) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology* 159:567-584, <https://doi.org/10.1078/0176-1617-0774>
- Campos C. N. S., R. M. Prado, G. Caione, A. J. L. Neto and F. L. C. Mingotte (2016) Silicon and excess ammonium and nitrate in cucumber plants. *African Journal of Agricultural Research* 11:276-283, <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10221>
- Campos-García T., P. Sánchez-García, G. Alcántar-González y G. Calderón-Zavala (2016) Respuesta agronómica y nutrimental de fresa a soluciones nutritivas con diferente relación NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7:509-606, <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i3.319>
- Cao H., Y. Ge, D. Liu, Q. Cao, S. X. Chang, J. Chang, X. Song and X. Lin (2010) Nitrate/ammonium ratios affect ryegrass growth and nitrogen accumulation in a hydroponic system. *Journal of Plant Nutrition* 34:206-216, <http://dx.doi.org/10.1080/01904167.2011.533322>
- Chowdhury A. and A. Das (2015) Nitrate accumulation and vegetable quality. *International Journal of Science and Research* 4:1668-1672.
- Croitoru M. D., D. L. Muntean, I. Fülöp and A. Modroiu (2015) Growing patterns to produce 'nitrate-free' lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Additives & Contaminants: Part A* 32:80-86, <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.979887>
- Cunha A. R. da, I. Katz, A. P. Sousa y R. A. Martínez U. (2015) Índice SPAD en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Lisianthus* en función de diferentes dosis de nitrógeno en ambiente protegido. *Idesia (Arica)* 33:97-105, <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292015000200012>
- De Grazia J., P. A. Tittone y Á. Chiesa (2001) Efecto de la época de siembra, radiación y nutrición nitrogenada sobre el patrón de crecimiento y el rendimiento del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetal* 16:355-365.



- EC, The European Commission (2011) Amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for nitrates in foodstuffs. Commission regulation (EC) No 1258/2011 of 2 December 2011. *Official Journal of the European Union* 320:15-17.
- Escalona A., M. Santana, I. Acevedo, V. Rodríguez y L. M. Marcó (2009) Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre el contenido de nitratos y lecturas "spad" en el cultivo de lechuga. *Agronomía Tropical* 59:99-105.
- Gutiérrez-Soto M. V., E. Cadet-Piedra, W. Rodríguez-Montero y J. M. Araya-Alfaro (2011) El GreenSeeker™ y el diagnóstico del estado de salud de los cultivos. *Agronomía Mesoamericana* 22:397-403.
- Hernández-Pérez A., O. G. Villegas-Torres, L. A. Valdez-Aguilar, I. Alía-Tejacal, V. López-Martínez y M. L. Domínguez-Patiño (2015) Tolerancia de *lisanthus* (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) a elevadas concentraciones de amonio en la solución nutritiva. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:467-482.
- Jacobo-Velázquez D. A. and L. Cisneros-Zevallos (2009) Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. *Journal of Food Science* 74:R107-R113, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01352.x>
- Jaworska G. (2005) Content of nitrates, nitrites, and oxalates in New Zealand spinach. *Food Chemistry* 89:235-242, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.030>
- Kataria S. and K. N. Guruprasad (2012) Intraspecific variations in growth, yield and photosynthesis of sorghum varieties to ambient UV (280-400 nm) radiation. *Plant Science* 196:85-92, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.011>
- Konstantopoulou E., G. Kaptis, G. Salachas, S. A. Petropoulos, I. C. Karapanos and H. C. Passam (2010) Nutritional quality of greenhouse lettuce at harvest and after storage in relation to N application and cultivation season. *Scientia Horticulturae* 125:93.e1-93.e5, <https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.003>
- Miller A. J. and M. D. Cramer (2005) Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 274:1-36, <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0965-1>
- Moreno-Pérez E. C., F. Sánchez-Del Castillo, J. Gutiérrez-Tlaque, L. González-Molina and J. Pineda-Pineda (2015) Greenhouse lettuce production with and without nutrient solution recycling. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 21:43-55, <http://dx.doi.org/10.5154/rchsh.2013.12.047>
- Muro J., H. I. Irigoyen y C. Lamsfus A. (1998) Acumulación de nitratos en hortalizas de hojas. In: Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: de la Fisiología a la Biología Molecular. IV Reunión Nacional, Marbella, 1997. J. M. Vega, P. J. Aparicio, F. Castillo y J. M. Maldonado (eds.). Universidad de Sevilla, España. pp:453-463.
- Parra T. S., M. Lara M., M. Villareal R. y S. Hernández V. (2012) Crecimiento de plantas y rendimiento de tomate en diversas relaciones nitrato/amonio y concentraciones de bicarbonato. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35:143-153.
- Raviv M. and J. H. Lieth (2008) Significance of soilless culture in agriculture. In: *Soilless Culture. Theory and Practice*. M. Raviv and J. H. Lieth (eds.). Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. pp:1-11.
- Rojas-Velázquez A. N., L. A. Valdez-Aguilar, L. M. Ruiz-Posadas, M. Sandoval-Villa y V. Bertolini (2013) Respuestas de *Antirrhinum majus* (L.) para flor de corte al potencial osmótico de la solución nutritiva en dos estaciones de crecimiento. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4:1151-1160.
- Santamaria P. (2006) Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86:10-17, <https://doi.org/10.1002/jsfa.2351>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2016) Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Diciembre 2018).
- Steiner A. A. (1984) The universal nutrient solution. Sixth International Congress on Soilless Culture. Wageningen, The Netherlands. pp:633-650.
- Ta T. C. and K. Ohira (1981) Effects of various environmental and medium conditions on the response of Indica and Japonica rice plants to ammonium and nitrate nitrogen. *Soil Science and Plant Nutrition* 27:347-355, <https://doi.org/10.1080/00380768.1981.10431289>
- Urlić B., M. J. Špika, C. Becker, H. P. Kläring, A. Krumbein, S. G. Ban and D. Schwarz (2017) Effect of NO<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub> concentrations in nutrient solution on yield and nitrate concentration in seasonally grown leaf lettuce. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science* 67:748-757, <https://doi.org/10.1080/09064710.2017.1347704>
- Velasco J., G. Aguirre y N. Ortuño (2016) Humus líquido y microorganismos para favorecer la producción de lechuga (*Lactuca sativa* var. Crespa) en cultivo de hidroponía. *Journal of the Selva Andina Biosphere* 4:71-83.
- Wang J., Y. Zhou, C. Dong, Q. Shen and R. Putheti (2009) Effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N ratios on growth, nitrate uptake and organic acid levels of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *African Journal of Biotechnology* 8:3597-3602.
- White P. J. (2012) Ion uptake mechanisms of individual cells and roots: short-distance transport: In: *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. P. Marschner (ed.). Third edition. Academic Press. London, UK. pp:7-47.
- Xing S., J. Wang, Y. Zhou, S. A. Bloszies, C. Tu and S. Hu (2015) Effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N ratios on photosynthetic characteristics, dry matter yield and nitrate concentration of spinach. *Experimental Agriculture* 51:151-160, <https://doi.org/10.1017/S0014479714000192>

