



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS), una técnica sencilla y rápida para la determinación de nitrógeno y carbohidratos en plantas de *Castanea sativa* Mill.

DORADO REYES, F. J.¹, MERLO SÁNCHEZ, E.², PIÑEIRO GARCÍA, M.², CAMISÓN CABALLERO, A.¹, SOLLA HACH, A.¹

¹Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Instituto de Investigación de la Dehesa (INDEHESA), Universidad de Extremadura. Avenida Virgen del Puerto 2, Plasencia, España (fdoradoreyes@unex.es; asolla@unex.es).

²MaderaPlus Calidad Forestal S.L., Parque Tecnológico de Galicia, Ed. CEI, Ourense, España (maderaplus@maderaplus.es).

Resumen

Los carbohidratos no estructurales y el nitrógeno de la planta tienen importantes implicaciones para el crecimiento, productividad y supervivencia de los bosques. Los métodos tradicionales de cuantificación de estos rasgos son costosos en tiempo y recursos, mientras que la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) constituye un método alternativo de diagnóstico rápido, barato, no invasivo y en tiempo real que permite identificar compuestos químicos debido a las vibraciones moleculares de los enlaces C-H, O-H y N-H. El objetivo de este estudio es desarrollar modelos de predicción NIRS para la medición rápida de nitrógeno, azúcares solubles, almidón y carbohidratos no estructurales totales en muestras de tejido foliar y radicular de *C. sativa*. Se utilizaron 180 muestras de hoja y raíz de plántulas no estresadas y plántulas sometidas a estrés térmico, estrés hídrico y una combinación de ambos estreses. En cada tejido se evaluaron las relaciones entre la concentración de nitrógeno, azúcares solubles, almidón y carbohidratos no estructurales totales y los espectros NIRS usando regresión de mínimos cuadrados parciales. Se desarrollaron modelos predictivos parsimoniosos para el nitrógeno (R^2 de 0.95 y 0.94, error medio cuadrático - RMSE - de 0.09% y 0.18 en la validación externa de hojas y raíces), almidón (R^2 = 0.77 y 0.63 y RMSE = 1.25% y 1.76%) y carbohidratos no estructurales totales de las raíces (R = 0.72 y RMSE = 1.50%). Sin embargo, los modelos desarrollados para azúcares solubles en hoja y raíz y para carbohidratos no estructurales en hoja no mostraron buena capacidad predictiva. Los modelos desarrollados ayudarán en la comprensión de la dinámica de carbohidratos y nitrógeno ante situaciones ambientales cambiantes o de estrés biótico.

Palabras clave

Estrés hídrico, calor, diagnóstico, almidón, azúcares solubles, fisiología.

1. Introducción

Los árboles requieren nutrientes y energía para el mantenimiento de su metabolismo primario y secundario, y así realizar funciones como el crecimiento, la respiración, la reproducción y la defensa. Sin embargo, en condiciones de compromiso (por ejemplo, crecimiento y reproducción) o en situaciones ambientales desfavorables la movilización de las reservas almacenadas es crucial para satisfacer las demandas de la planta en términos de nutrientes y energía (VILLAR-SALVADOR et al., 2015). El nitrógeno (N) y los carbohidratos no estructurales (NSC) son sustancias de reserva fundamentales por su cantidad y relevancia funcional (MILLARD & GRELET, 2010). El N es un nutriente esencial almacenado en la planta en forma de aminoácidos y proteínas que desempeña un papel importante en el crecimiento y productividad de los bosques (VITOUSEK & HOWARTH, 1991). Los NSCs incluyen los azúcares solubles (SS) y almidón (ST) y son importantes para la adaptación al estrés y a condiciones cambiantes, proporcionando la energía que las células demandan para sostener el crecimiento y metabolismo en tales condiciones (QUENTIN et al., 2017). La cuantificación de N y NSCs se ha llevado a cabo tradicionalmente por métodos analíticos destructivos que implican el análisis de gran cantidad de muestras y consumen mucho tiempo y

recursos económicos (SUI et al., 2005; QUENTIN et al., 2017; ALI et al., 2017). Además, existe una fuerte controversia acerca de la comparabilidad de mediciones de NSCs realizadas en distintos laboratorios, pues los resultados se ven influenciados por los protocolos usados para la extracción de SS y la digestión de ST, entre otros factores (CHOW & LANDHÄUSSER, 2004; BELLASIO, FINI & FERRINI, 2014; RAMIREZ et al., 2015).

En comparación con las técnicas analíticas convencionales, la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) es rápida, no invasiva, barata y proporciona resultados en tiempo real (WANG et al., 2021). La técnica se basa en proyectar luz con un rango de longitudes de onda de 750 nm a 2600 nm sobre una muestra, donde algunas frecuencias serán absorbidas y otras reflejadas por uniones químicas específicas, lo que se conoce como reflectancia NIRS. La reflectancia NIRS mide el número de rayos de luz a longitudes de onda específicas que llegan a una célula de medición procedentes de diferentes enlaces moleculares presentes en la muestra (quimiometría), principalmente enlaces C-H, O-H y N-H que son los principales constituyentes de los compuestos orgánicos. La esencia del uso cuantitativo del NIRS es utilizar la quimiometría para construir correlaciones entre los atributos químicos medidos por técnicas convencionales y los espectros de las muestras NIR (WANG et al., 2021). Existen numerosos ejemplos de aplicación de NIRS para predecir contenidos en nitrógeno, carbono, fósforo, carbohidratos, taninos o lignina, entre otros compuestos (GILLON, HOUSSARD & JOFFRE, 1999; PETISCO et al., 2005; RUBERT-NASON et al., 2013; RAMIREZ et al., 2015; QUENTIN et al., 2017; LI et al., 2022).

El castaño (*Castanea sativa* Mill.) es un árbol polivalente originario de Europa donde forma masas forestales naturales, seminaturales y cultivadas incluyendo sistemas agroforestales de gran valor cultural, económico y medioambiental. En la cuenca Mediterránea, la especie sufre el impacto creciente del cambio climático, con temperaturas extremas, olas de calor y sequías más frecuentes e intensas (PETIT et al., 2005; ALCAIDE et al., 2019; LIONELLO & SCARASCIA, 2020; CASTELLANA et al., 2021). Estudios previos en castaño resaltaron el papel que juegan los NSCs en la capacidad para tolerar sequía (CAMISÓN et al., 2020) y *Phytophthora cinnamomi* (CAMISÓN et al., 2019; ALCAIDE et al., 2020). El desarrollo de métodos rápidos para la cuantificación de compuestos basados en tecnología NIRS puede suponer un gran avance en el conocimiento de la respuesta de *C. sativa* ante factores de estrés relacionados con el cambio global.

2. Objetivos

El objetivo de este estudio es desarrollar modelos de predicción para la medición rápida mediante NIRS de nitrógeno, azúcares solubles, almidón y carbohidratos no estructurales totales en muestras de tejido foliar y radicular de *C. sativa*. Para ello, se combinó el análisis quimiométrico de los espectros NIRS con la determinación convencional de los compuestos.

3. Metodología

Un total de 180 muestras, 90 de hoja y 90 de raíz, de plantas de castaño fueron utilizadas a partir de un ensayo en el que se incluyeron plantas 'control' (n=36 por tejido), y plantas sometidas a 'estrés térmico' (n=36 por tejido), 'estrés hídrico' (n=6 por tejido) y 'estrés térmico e hídrico combinado' (n=12 por tejido), con el fin de partir de suficiente variabilidad en los contenidos de nitrógeno, almidón y azúcares totales en las muestras. Las plántulas utilizadas tenían una savia y fueron obtenidas a partir de semillas recolectadas en tres regiones de España (Castilla y León, Extremadura y Andalucía). Las muestras se tomaron entre las 14:00 y las 15:00 h de la tarde y se sometieron a un tratamiento con microondas (80 s, 800 W) dentro de los 30 minutos posteriores al muestreo para desactivar las enzimas respiratorias y evitar la respiración celular durante el proceso de secado (HOCH et al., 2002). Las muestras se secaron en estufa (48 h, 60 °C) y se molieron hasta obtener un polvo fino en un molino de bolas (Mixer Mill MM 400, Retsch, Alemania), y se pasaron

por un tamiz de 0,42 mm de luz. La muestra se dividió en dos: para el análisis químico convencional y para el análisis NIRS (Figura 1).

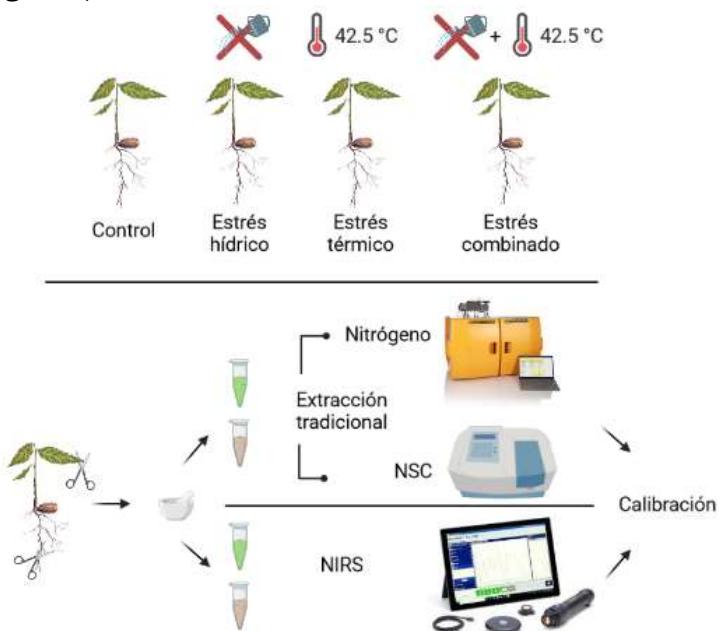


Figura 1. Esquema del diseño experimental para la obtención de los modelos de calibración de nitrógeno, azúcares solubles, almidón y carbohidratos no estructurales (NSC) en hoja y raíz de plántulas de seis meses de edad de *C. sativa* sometidas a los tratamientos de estrés térmico, hídrico, combinado y control. Tras ser molidas las muestras, se realizó la extracción por métodos tradicionales del nitrógeno y los NSC, mientras que el polvo restante se empleó para la obtención de los datos espectrales de las muestras mediante un medidor NIRS. Los datos empíricos se utilizaron para realizar correlaciones cuantitativas con los espectros (calibración) y obtener los modelos de ajuste. Figura realizada con <https://app.biorender.com/>

El nitrógeno total en los tejidos se evaluó con un analizador DUMATHERM® CN (C-Gerhardt Analytical Systems) usando unos 100 mg de tejido seco en polvo y se expresó como porcentaje de peso seco. Los azúcares solubles y el almidón se determinaron siguiendo el protocolo adaptado para el castaño en CAMISÓN et al., (2020). 25 mg de tejido en polvo se lavaron tres veces con una mezcla de 5 mL de metanol, cloroformo y agua (12:5:3) para extraer los SS y se combinaron los extractos, mientras que el pellet se secó en el horno (48 h, 60 °C) para la cuantificación del almidón. Para el análisis de los azúcares solubles, se utilizó el método clásico de la antrona, midiéndose la absorbancia de las muestras a 625 nm en un espectrofotómetro (Helios Beta, Spectronic Unicam, Inglaterra). Para la determinación del almidón, el pellet se sometió a gelificación y digestión enzimática con amiloglucosidasa (Sigma-Aldrich 10115) a un pH 4.5. Tras la digestión, una alícuota de 500 µL de la muestra se mezcló con 5 mL del complejo peroxidasa-glucosa-oxidasa y la mezcla se incubó 30 min a 37 °C. La absorbancia se midió a 450 nm en un espectrofotómetro (Helios Beta, Spectronic Unicam, Inglaterra). Cada muestra se determinó por triplicado. La determinación de la concentración de azúcares solubles y de glucosa liberada del almidón digerido se realizó con una curva estándar (0-280 mg/L y 0-180 mg/L, respectivamente) utilizando D (+) glucosa anhidra como patrón, y los resultados fueron expresados en porcentaje de materia seca. Los carbohidratos no estructurales totales de una muestra fueron calculados como la suma de los azúcares solubles y del almidón, expresados en porcentaje de materia seca.

Para la realización de las mediciones NIRS, cada muestra molida se colocó en una superficie circular de 4 cm de diámetro y se midió su espectro con un espectrómetro NIRS portátil MicroNIR OnSite (VIAVI Solutions Inc., Arizona, Estados Unidos). Este permite realizar medidas de reflectancia y cubre un rangopectral de 950 a 1650 nm (10526-6060 cm⁻¹) a una resolución de 6.19 nm (9.904 cm⁻¹). Cada muestra se escaneó dos veces, girando manualmente el recipiente de la muestra

aproximadamente 180° con respecto al escaneo anterior, y la media de los dos espectros se consideró representativa de cada muestra.

El análisis quimiométrico se realizó con el software libre R (R CORE TEAM, 2018). Antes de la calibración, los espectros log (1/R) se corrigieron para eliminar los efectos de la dispersión utilizando los algoritmos de la variante normal estándar (SNV), de la tendencia negativa (Detrend), primera derivada (SG1), segunda derivada (SG2), normalización y primera derivada (SNV + SG1) y normalización y segunda derivada (SNV + SG2). Para desarrollar ecuaciones predictivas, se calibraron los valores de referencia del laboratorio cada compuesto químico con respecto a los espectros del NIRS utilizando mínimos cuadrados parciales (PLS) y varias combinaciones de corrección de la dispersión (Crudo, Detrend, SNV, SG1, SG2, SNV+SG1, SNV+SG2). Antes de aplicar el procedimiento PLS, el conjunto de datos se dividió aleatoriamente en dos grupos, de modo que aproximadamente el 75% de las muestras se utilizaron para el modelo de calibración y el 25% restante para el modelo de validación. Así se evaluó el rendimiento de la calibración como modelo de predicción. Además, sobre la base de datos de entrenamiento se realizaron validaciones cruzadas dejando un dato fuera (*leave one out, LOO*). Ello permite establecer el número óptimo de componentes, aquel en el que la adición de un nuevo componente no supone una disminución del error medio cuadrático de las predicciones llevadas a cabo por dicha validación cruzada (RMSE). El error cuadrático medio de predicción da una media de la incertidumbre que cabe esperar para los valores predichos. El coeficiente de determinación (R^2) es también un factor importante en la selección del modelo, por lo que un valor cercano a 1 para el R^2 indicará una calibración de alta calidad. Además, el índice RPD se calculó como la ratio entre la desviación estándar de los valores de referencia de laboratorio y el RMSE, y ofrece una evaluación de la precisión de la predicción en comparación con los valores de referencia de laboratorio medidos (SAEYS et al., 2005). El valor de la calibración puede obtenerse en función de los valores de RPD. Así, valores inferiores a 2 indican que la calibración no se puede utilizar, valores entre 2 y 2,5 indican que es posible realizar predicciones cuantitativas aproximadas, y valores superiores a 2,5 indican una buena calibración (QUENTIN et al., 2017). De esta forma, un modelo PLS fiable debe tener un valor alto de R^2 y RPD y un valor bajo de RMSE (BALA & SINGH, 2013).

4. Resultados

Independientemente del órgano y compuesto, la transformación de los espectros mejoró la linealidad de la relación entre la referencia y los valores espectrales (crudo vs resto de transformaciones en Tablas 1 y 2). La primera derivada (SG1), previa normalización (SNV) o no, fue el mejor pretratamiento de los datos independientemente del órgano de la planta y el compuesto, exceptuando el modelo de calibración para los NSC_T de la raíz que mostró mejores resultados únicamente realizando una normalización estándar de los datos (SNV; Tabla 2).

El análisis de regresión PLS entre los espectros NIRS y los valores medidos en laboratorio produjo buenos modelos de calibración para el contenido de N en hoja y raíz de *C. sativa* (Tablas 1 y 2). Estos modelos de calibración mostraron los valores de R^2 más altos (0,99 y 0,97, respectivamente), RMSE más bajos y RPD_{cv} por encima de 2,5 (5,74 y 3,86 para hoja y raíz, respectivamente) (Tablas 1 y 2). El modelo de calibración de los NSC_T para raíz fue aceptable, con valores de R^2 de 0,93 y RPD_{cv} de 2,54. El ajuste de calibración para el ST independientemente del órgano analizado (hoja y raíz) fue aceptable en términos de R^2 elevados (0,86 y 0,91, respectivamente) y RPD_{cv} entre 2 y 2,5 (2,16 y 2,48, respectivamente) (Tablas 1 y 2). Los modelos de SS en hoja y raíza, así como el de NSC_T en hoja, mostraron valores bajos de R^2 y RPD_{cv}, indicando un mal ajuste (Tablas 1 y 2).

Los valores de los modelos de validación cruzada y externa de R^2_{cv} y R^2_{VE} fueron más bajos y RMSE_{cv} y RMSE_{VE} más altos que el de sus homólogos del modelo de calibración. A pesar de esto, los

indicadores de bondades de ajuste se mantuvieron en valores similares a los indicados para los modelos de calibración, siendo los modelos de N, ST y NSC_T desarrollados para raíz los mejores.

Las Figuras 2 y 3 muestran la relación entre los valores predichos por el NIRS y los valores de referencia en el conjunto de calibración y validación externa para el N, SS, ST y NSC_T en hojas y raíces de plántulas de una savia de *C. sativa*. Excepto para los SS (Figura 2c y d y 3c y d) y los NSC_T en hoja (Figura 2g y h), se identificaron modelos de calibración robustos y parsimoniosos y se mantuvo su poder predictivo en la validación externa (Figura 2 y 3).

Tabla 1. Estadística de calibración, validación cruzada y externa para la estimación del contenido de nitrógeno, azúcares solubles, almidón y carbohidratos no estructurales totales en hojas de *Castanea sativa* obtenida por regresión PLS.

Rasgo	Espectro	NC	R ²	R ² _{cv}	R ² _{VE}	RMSE	RMSE _{cv}	RMSE _{VE}	RPD _{cv}	n	n _{VE}
N	Crudo	12	0,98	0,91	0,93	0,06	0,11	0,09	3,55	56	23
	SNV	12	0,99	0,96	0,95	0,05	0,08	0,09	4,81		
	Detrend	11	0,98	0,96	0,95	0,05	0,08	0,08	4,94		
	SG1	12	0,99	0,96	0,95	0,04	0,08	0,09	4,99		
	SG2	8	0,99	0,95	0,92	0,04	0,09	0,13	4,73		
	SNV + SG1	12	0,99	0,97	0,95	0,04	0,07	0,09	5,74		
SS	SNV + SG2	7	0,99	0,96	0,92	0,05	0,08	0,14	4,89	56	23
	Crudo	2	0,20	0,10	0,04	1,24	1,31	1,44	1,07		
	SNV	4	0,46	0,31	0,33	1,01	1,15	1,18	1,21		
	Detrend	7	0,72	0,54	0,46	0,73	0,93	1,07	1,49		
	SG1	6	0,71	0,50	0,48	0,74	0,98	1,10	1,42		
	SG2	6	0,82	0,43	0,45	0,58	0,95	1,26	1,47		
ST	SNV + SG1	7	0,76	0,55	0,48	0,67	0,93	1,03	1,50	54	23
	SNV + SG2	5	0,79	0,52	0,42	0,64	0,96	1,21	1,45		
	Crudo	6	0,83	0,74	0,73	0,90	1,07	1,37	1,98		
	SNV	5	0,82	0,75	0,79	0,92	1,09	1,28	1,99		
	Detrend	4	0,82	0,73	0,65	0,93	1,10	1,57	1,98		
	SG1	5	0,86	0,80	0,77	0,80	1,00	1,25	2,16		
NSC _T	SG2	4	0,86	0,77	0,58	0,80	1,07	1,70	2,04	53	23
	SNV + SG1	3	0,83	0,78	0,69	0,90	1,05	1,48	2,04		
	SNV + SG2	4	0,87	0,70	0,54	0,79	0,99	1,83	1,18		
	Crudo	11	0,87	0,72	0,47	0,82	1,21	2,36	1,87		
	SNV	11	0,90	0,70	0,65	0,80	1,36	1,95	1,83		
	Detrend	7	0,83	0,71	0,42	0,94	1,22	2,43	1,89		
NSC _T	SG1	9	0,91	0,71	0,64	0,77	1,27	1,91	1,88	53	23
	SG2	5	0,88	0,62	0,49	0,89	1,45	2,41	1,63		
	SNV + SG1	9	0,91	0,70	0,57	0,77	1,25	2,10	1,85		
	SNV + SG2	6	0,90	0,61	0,46	0,80	1,38	2,46	1,62		

NC, número de componentes del modelo; R², coeficiente de determinación del modelo; R²_{cv}, coeficiente de determinación de la validación cruzada; R²_{VE}, coeficiente de determinación de la validación externa; RMSE, raíz del error medio cuadrático del modelo; RMSE_{cv}, raíz del error medio cuadrático de la validación cruzada; RMSE_{VE}, raíz del error medio cuadrático de la validación externa; RPD_{cv}, relación entre la desviación estándar y el error estándar de validación cruzada; n, número de datos de entrenamiento; n_{VE}, número de datos de test. Los rasgos son: N, nitrógeno; SS, azúcares solubles; ST, almidón; NSC_T, carbohidratos no estructurales totales. Los espectros se corresponden con las siguientes transformaciones: crudo, datos en crudo; SNV, variante normal estándar; Detrend, tendencia negativa; SG1, primera derivada; SG2, segunda derivada; SNV + SG1, normalización y primera derivada; SNV + SG2, normalización y segunda derivada. En negrita se resaltan los mejores modelos de calibración para cada compuesto.

Tabla 2. Estadística de calibración, validación cruzada y externa para la estimación del contenido de nitrógeno, azúcares solubles, almidón y carbohidratos no estructurales totales en raíces de *C. sativa* obtenida por regresión PLS.

Rasgo	Espectro	NC	R ²	R ² _{CV}	R ² _{VE}	RMSE	RMSE _{CV}	RMSE _{VE}	RPD _{CV}	n	n _{VE}
N	Crudo	12	0,97	0,92	0,80	0,05	0,08	0,21	3,53	59	26
	SNV	11	0,96	0,90	0,85	0,05	0,09	0,19	3,32		
	Detrend	12	0,98	0,92	0,86	0,04	0,08	0,18	3,58		
	SG1	10	0,98	0,94	0,83	0,04	0,07	0,20	4,06		
	SG2	10	0,98	0,87	0,83	0,04	0,10	0,20	2,79		
	SNV + SG1	10	0,97	0,94	0,86	0,04	0,07	0,18	3,82		
SS	SNV + SG2	9	0,97	0,82	0,86	0,04	0,12	0,19	2,44	59	26
	Crudo	7	0,69	0,43	0,63	1,43	1,93	1,66	1,34		
	SNV	7	0,69	0,36	0,72	1,42	2,05	1,82	1,26		
	Detrend	8	0,75	0,43	0,70	1,29	1,94	1,48	1,33		
	SG1	8	0,78	0,54	0,77	1,20	1,73	1,35	1,49		
	SG2	6	0,80	0,47	0,58	1,15	1,87	1,88	1,38		
ST	SNV + SG1	7	0,78	0,55	0,75	1,20	1,71	1,40	1,51	59	26
	SNV + SG2	4	0,76	0,50	0,59	1,27	1,82	1,81	1,41		
	Crudo	11	0,91	0,84	0,60	1,32	1,79	1,83	2,41		
	SNV	9	0,90	0,84	0,54	1,37	1,81	1,96	2,47		
	Detrend	10	0,92	0,84	0,59	1,26	1,81	1,89	2,44		
	SG1	8	0,91	0,84	0,63	1,29	1,82	1,76	2,48		
NSC _T	SG2	6	0,92	0,81	0,46	1,29	1,94	2,42	2,35	59	26
	SNV + SG1	6	0,90	0,84	0,58	1,43	1,78	1,92	2,45		
	SNV + SG2	6	0,93	0,83	0,48	1,18	1,88	2,31	2,40		
	Crudo	10	0,90	0,77	0,67	1,18	1,84	1,49	2,33		
	SNV	12	0,93	0,84	0,72	1,02	1,63	1,50	2,54		
	Detrend	11	0,93	0,84	0,69	1,04	1,67	1,63	2,48		
NSC _T	SG1	10	0,93	0,82	0,66	1,08	1,61	1,71	2,43	59	26
	SG2	9	0,95	0,76	0,68	0,85	1,84	1,76	2,04		
	SNV + SG1	8	0,92	0,84	0,69	1,07	1,52	1,61	2,68		
	SNV + SG2	9	0,96	0,76	0,70	0,81	1,98	1,71	2,17		

NC, número de componentes del modelo; R², coeficiente de determinación del modelo; R²_{CV}, coeficiente de determinación de la validación cruzada; R²_{VE}, coeficiente de determinación de la validación externa; RMSE, raíz del error medio cuadrático del modelo; RMSE_{CV}, raíz del error medio cuadrático de la validación cruzada; RMSE_{VE}, raíz del error medio cuadrático de la validación externa; RPD_{CV}, relación entre la desviación estándar y el error estándar de validación cruzada; n, número de datos de entrenamiento; n_{VE}, número de datos de test. Los rasgos son: N, nitrógeno; SS, azúcares solubles; ST, almidón; NSC_T, carbohidratos no estructurales totales. Los espectros se corresponden con las siguientes transformaciones: crudo, datos en crudo; SNV, variante normal estándar; Detrend, tendencia negativa; SG1, primera derivada; SG2, segunda derivada; SNV + SG1, normalización y primera derivada; SNV + SG2, normalización y segunda derivada. En negrita se resaltan los mejores modelos de calibración para cada compuesto.

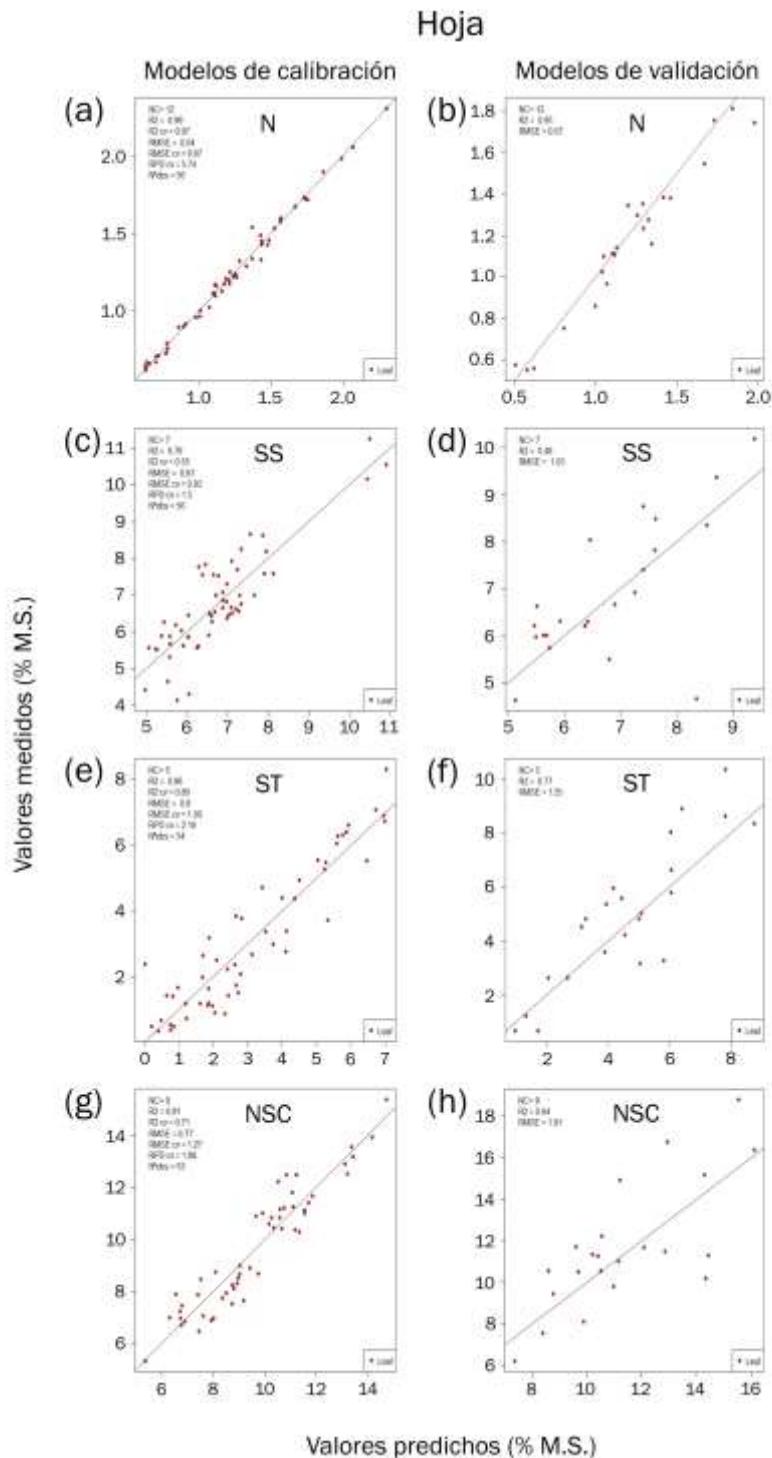


Figura 2. Relación entre los valores medidos con los métodos de referencia estándar (eje y) y los valores predichos por NIRS (eje x) en los modelos de calibración (paneles de la izquierda) y validación externa (paneles de la derecha) para el nitrógeno (a, b), los azúcares solubles (c, d), el almidón (e, f) y los carbohidratos no estructurales totales (g, h) en hojas de una savia de *C. sativa*. La línea sólida es la relación entre los valores medidos y los predichos en los conjuntos de calibración y validación para cada compuesto.

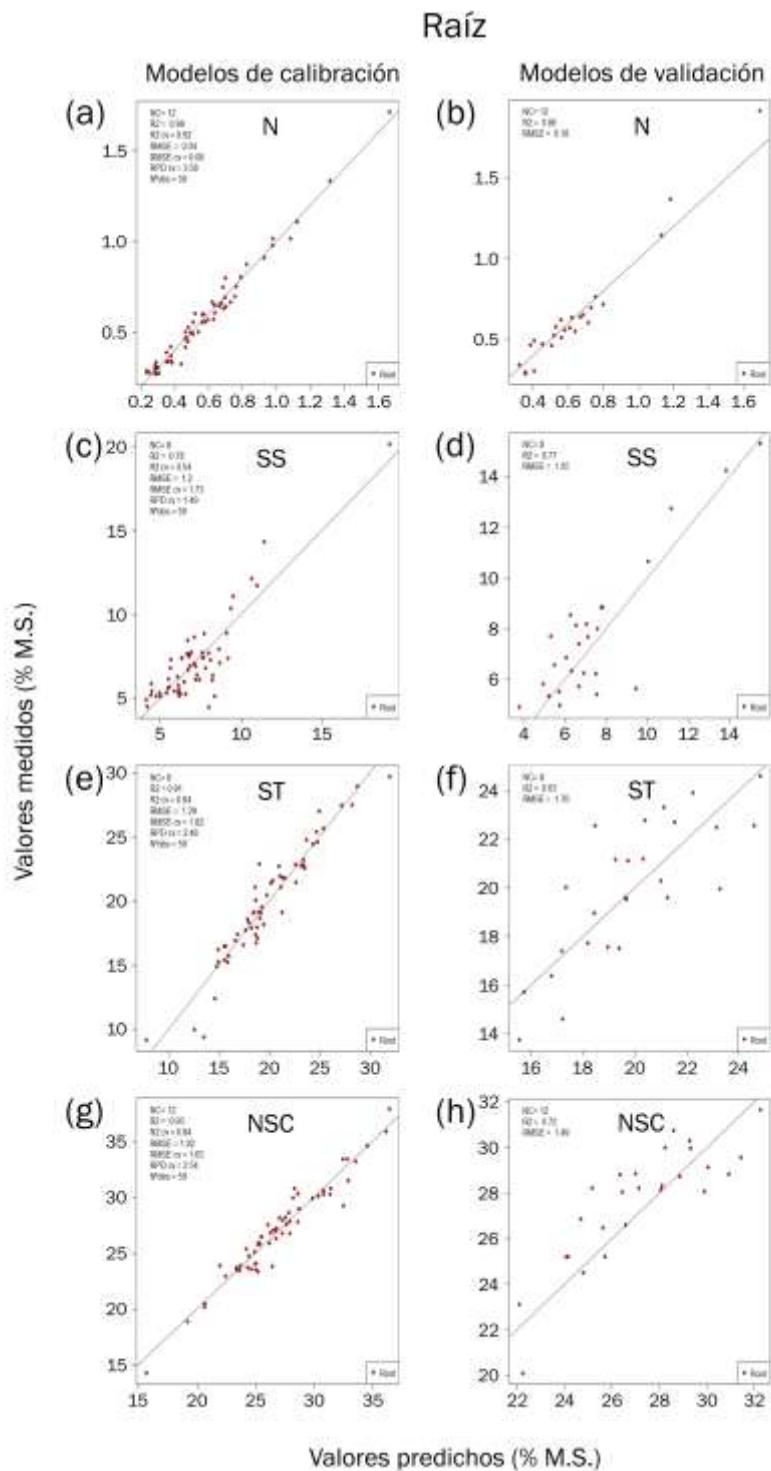


Figura 3. Relación entre los valores medidos con los métodos de referencia estándar (eje y) y los valores predichos por NIRS (eje x) en los modelos de calibración (paneles de la izquierda) y validación externa (paneles de la derecha) para el nitrógeno (a, b), los azúcares solubles (c, d), el almidón (e, f) y los carbohidratos no estructurales totales (g, h) en raíces de una savia de *C. sativa*. La línea sólida es la relación entre los valores medidos y los predichos en los conjuntos de calibración y validación para cada compuesto.

5. Discusión

Este estudio genera modelos de predicción robustos para la estimación del contenido de N y ST en hoja y raíz, y de NSC_T en raíz a partir de la espectroscopía NIRS en *C. sativa*. Pese al creciente interés en el uso del NIRS entre la comunidad forestal para la predicción de rasgos cuantitativos, ningún estudio ha hecho uso de la espectroscopía NIRS para la predicción de rasgos fisiológicos en planta joven de *C. sativa*. Debido a la importancia del N y los NSCs en la productividad, crecimiento y defensa de árboles forestales, los modelos desarrollados tienen numerosas aplicaciones potenciales, desde la detección de requerimientos de N en plantaciones y viveros hasta la realización de estudios ecológicos, fisiológicos y de patología.

El rendimiento del modelo de calibración para N foliar en nuestro estudio estuvo en el orden de magnitud de los rendimientos obtenidos en otros estudios en que se estimó el contenido de N en tejidos foliares utilizando NIRS (GILLON, HOUSSARD & JOFFRE, 1999; PETISCO et al., 2005). Por ejemplo, para estimar el contenido de N en hojas de plantas leñosas PETISCO et al. (2005) reportaron $R^2 = 0,99$ en el modelo de calibración y $R^2 = 0,97$ en la validación externa. Aquí se ha logrado un mejor modelo predictivo de N en raíz que el desarrollado por otros autores para raíz de pino ($R^2 = 0,97$ según Tabla 2 vs $R^2 = 0,42$ según LI et al. 2022). Los modelos predictivos del contenido de ST en hoja y raíz de *C. sativa* tuvieron un rendimiento equiparable a los publicados anteriormente para otras especies de plantas (KATOVICH et al., 1998; DECRUYENAERE et al., 2012; RAMIREZ et al., 2015), aunque el modelo presentado por RAMIREZ et al. (2015) para predecir el contenido de ST se obtuvo de un pool de órganos de la planta sin hacer distinción entre los mismos. De igual forma, una predicción razonablemente aceptable se ha obtenido aquí para el contenido de NSC_T en raíz de castaño ($R^2 = 0,93$, RMSE = 1,02%), similar al obtenido por otros autores en raíz de especies leñosas ($R^2 = 0,99$, RMSE = 0,55%; RAMIREZ et al., 2015). Las calibraciones con valores de R^2 y RPD_{cv} bajos y RMSE elevados fueron descartadas por su elevada incertidumbre predictiva, lo que las invalida para aplicaciones prácticas y para ser utilizadas en investigación (QUENTIN et al., 2017). En nuestro estudio los SS de hoja y raíz fueron los modelos menos robustos, e independientemente del pretratamiento aplicado a los espectros, los valores de R^2 fueron relativamente bajos (0,76 y 0,78 para hoja y raíz, respectivamente). Estos valores de R^2 fueron similares a los obtenidos en estudios previos ($R^2 = 0,76$, según QUENTIN et al. (2017) y $R^2 = 0,77$ según KATOVICH et al. (1998)). Sin embargo, los valores de RPD_{cv} de los modelos de SS y NSC_T en hoja no llegaron a valores por encima de 2, lo que los hace poco aptos para su uso predictivo. A la hora de realizar modelos de calibración de un compuesto es importante que coincida el rango de valores de la calibración con el del test de validación (DECRUYENAERE et al., 2012). Si el rango no coincide, el modelo podría subestimar o sobreestimar los valores predichos, lo que podría explicar que R^2_{VE} de la validación externa bajara considerablemente para algunos compuestos (por ejemplo en este estudio ST y SS, Tablas 1 y 2).

Un aspecto importante a considerar para la aplicación práctica de los modelos predictivos desarrollados en este estudio es su extrapolabilidad a plantas de *C. sativa* de mayor edad, diferente origen o ambiente de crecimiento. En general, la extrapolabilidad de las calibraciones NIRS obtenidas en un estudio concreto hacia material vegetal heterogéneo es objeto de controversia (WANG et al., 2021), y ha de ser tomada con cautela. Desconocemos el rendimiento de nuestros modelos predictivos por ejemplo en árboles adultos, o en material vegetal aclimatado a otras condiciones. La validez de las calibraciones obtenidas en este estudio hacia material vegetal de *C. sativa* será testada en próximos estudios.

6. Conclusiones

Mediante la combinación de NIRS y quimiometría es posible predecir con suficiente certidumbre los contenidos de N, ST y NSC_T en raíces de *C. sativa*, pero no los contenidos de SS en

hoja y raíz, y NSC_T en hoja. La extrapolabilidad de las calibraciones obtenidas será objeto de un posterior estudio.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el VI-Plan Regional de I+D+i de la Consejería de Economía e Infraestructuras (Junta de Extremadura) bajo el proyecto ‘Impacto del estrés térmico en castaño y alcornoque: obtención de genotipos tolerantes para Extremadura’ (IB18091), por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Unión Europea, y por el proyecto piloto “Nematodo-Screen”: Infrarrojo cercano para seleccionar por susceptibilidad al nematodo”, cofinanciado con el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) en el marco del Programa de desarrollo rural (PDR) de Galicia 2014-2020. F.J. Dorado ha sido financiado por el Ministerio de Educación a través de FPU16/03188.

8. Bibliografía

- ALCAIDE, F.; SOLLA, A.; CHERUBINI, M.; MATTIONI, C.; CUENCA, B.; CAMISÓN, Á., MARTÍN, M.Á.; 2020. Adaptive evolution of chestnut forests to the impact of ink disease in Spain. *J System Evol*, 58(4), 504-516.
- ALCAIDE, F.; SOLLA, A.; MATTIONI, C.; CASTELLANA, S.; MARTÍN, M.Á.; 2019. Adaptive diversity and drought tolerance in *Castanea sativa* assessed through EST-SSR genic markers. *Forestry* 92(3), 287-296.
- ALI, M. M.; AL-ANI, A.; EAMUS, D.; TAN, D. K.; 2017. Leaf nitrogen determination using non-destructive techniques-A review. *J Plant Nutr* 40(7), 928-953.
- BALA, M.; SINGH, M.; 2013. Non destructive estimation of total phenol and crude fiber content in intact seeds of rapeseed-mustard using FTNIR. *Ind Crops Prod* 42, 357-362.
- BELLASIO, C.; FINI, A.; FERRINI, F.; 2014. Evaluation of a high throughput starch analysis optimised for wood. *PLoS One* 9(2), e86645.
- CAMISÓN, Á.; MARTÍN, M. Á.; DORADO, F. J.; MORENO, G.; SOLLA, A.; 2020. Changes in carbohydrates induced by drought and waterlogging in *Castanea sativa*. *Trees* 34(2), 579-591.
- CAMISÓN, Á.; MARTÍN, M.Á.; SÁNCHEZ-BEL, P.; FLORS, V.; ALCAIDE, F., et al. 2019. Hormone and secondary metabolite profiling in chestnut during susceptible and resistant interactions with *Phytophthora cinnamomi*. *J Plant Physiol* 241, 153030.
- CASTELLANA, S.; MARTIN, M.Á.; SOLLA, A.; ALCAIDE, F.; VILLANI, F.; et al. 2021. Signatures of local adaptation to climate in natural populations of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) from southern Europe. *Ann For Sci* 78, 27.
- CHOW, P. S.; LANDHÄUSSER, S. M.; 2004. A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues. *Tree Physiol* 24(10) 1129-1136.

DECROYENAERE, V.; CLÉMENT, C.; AGNEESSENS, R.; LOSSEAU, C.; STILMANT, D.; 2012. Development of near-infrared spectroscopy calibrations to quantify starch and soluble sugar content in the roots of *Rumex obtusifolius*. *Weed Res* 52(1) 1-5.

GILLON, D.; HOUSSARD, C.; JOFFRE, R.; 1999. Using near-infrared reflectance spectroscopy to predict carbon, nitrogen and phosphorus content in heterogeneous plant material. *Oecologia* 118(2), 173-182.

HOCH, G.; POPP, M.; KÖRNER, C.; 2002. Altitudinal increase of mobile carbon pools in *Pinus cembra* suggests sink limitation of growth at the Swiss treeline. *Oikos* 98(3), 361-374.

KATOVICH, E. J. S.; BECKER, R. L.; SHEAFFER, C. C.; HALGERSON, J. L.; 1998. Seasonal fluctuations of carbohydrate levels in roots and crowns of purple loosestrife (*Lythrum salicaria*). *Weed Sci* 46(5), 540-544.

LI, Y.; SUN, H.; TOMASETTO, F.; JIANG, J.; LUAN, Q.; 2022. Spectrometric Prediction of Nitrogen Content in Different Tissues of Slash Pine Trees. *Plant Phenomics*. Doi: 10.34133/2022/9892728

LIONELLO, P.; SCARASCIA, L.; 2020. The relation of climate extremes with global warming in the Mediterranean region and its north versus south contrast. *Reg Environ Change* 20(1), 1-16.

MILLARD, P.; GRELET, G. A.; 2010. Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiol* 30(9), 1083-1095.

PETISCO, C.; GARCÍA-CRIADO, B.; DE ALDANA, B. V.; ZABALGOGEAZCOA, I.; MEDIAVILLA, S.; 2005. Use of near-infrared reflectance spectroscopy in predicting nitrogen, phosphorus and calcium contents in heterogeneous woody plant species. *Anal Bioanal Chem* 382(2), 458-465.

PETIT, R. J.; HAMPE, A.; CHEDDADI, R.; 2005. Climate changes and tree phylogeography in the Mediterranean. *Taxon* 54(4), 877-885.

QUENTIN, A. G.; RODEMANN, T.; DOUTRELEAU, M. F.; MOREAU, M.; DAVIES, N. W.; MILLARD, P.; 2017. Application of near-infrared spectroscopy for estimation of non-structural carbohydrates in foliar samples of *Eucalyptus globulus* Labilladière. *Tree Physiol* 37(1), 131-141.

R CORE TEAM; 2018. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMIREZ, J. A.; POSADA, J. M.; HANNA, I. T.; HOCH, G.; VOHLAND, M.; MESSIER, C.; & REU, B.; 2015. Near-infrared spectroscopy (NIRS) predicts non-structural carbohydrate concentrations in different tissue types of a broad range of tree species. *Methods Ecol Evol* 6(9), 1018-1025.

RUBERT-NASON, K. F.; HOLESKI, L. M.; COUTURE, J. J.; GUSSE, A.; UNDERSANDER, D. J.; LINDROTH, R. L.; 2013. Rapid phytochemical analysis of birch (*Betula*) and poplar (*Populus*) foliage by near-infrared reflectance spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 405(4), 1333-1344.

SAEYS, W.; MOUAZEN, A. M.; RAMON, H.; 2005. Potential for onsite and online analysis of pig manure using visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Biosyst Eng* 91(4), 393-402.

SUI, R.; WILKERSON, J. B.; HART, W. E.; WILHELM, L. R.; HOWARD, D. D.; 2005. Multi-spectral sensor for detection of nitrogen status in cotton. *Appl Eng Agric* 21(2), 167-172.

VILLAR-SALVADOR, P.; USCOLA, M.; JACOBS, D. F; 2015. The role of stored carbohydrates and nitrogen in the growth and stress tolerance of planted forest trees. *New Forest* 46, 813-839.

VITOUSEK, P. M.; HOWARTH, R. W.; 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry* 13(2), 87-115.

WANG, Y.; XIANG, J.; TANG, Y.; CHEN, W.; XU, Y.; 2021. A review of the application of near-infrared spectroscopy (NIRS) in forestry. *Appl Spectrosc Rev* DOI: 10.1080/05704928.2021.1875481