



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-290

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Modelo de predicción del estado nutricional de elementos minerales y de azúcares solubles en especies de Pinos Ibéricos por espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)

GAMARRA ROMERO, L.¹, OLIET PALÁ, J.A.², GARCÍA-REBOLLAR, P.²

¹ Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

² Universidad Politécnica de Madrid. España

Resumen

El análisis tradicional de constituyentes minerales para evaluar el estado nutricional y de reservas de azúcares en especies forestales es clave en la investigación, particularmente en viverismo, pero supone una considerable inversión de recursos. Una alternativa para reducir costes es utilizar la técnica de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS). El objetivo del presente trabajo fue evaluar esta técnica para determinar las concentraciones de N, P, K y azúcares solubles totales (AST) de cuatro especies de pinos ibéricos en fase de plántula. Para las calibraciones se emplearon 350 muestras molidas en polvo de parte aérea, acículas, tallos y raíces, escaneadas usando un espectrofotómetro NIR en el rango 1100-2500 nm. Para el desarrollo de modelos de predicción se empleó regresión por Mínimos Cuadrados Parciales Modificados (MPLS) y validación cruzada. Los modelos globales para la predicción de N, P, K y AST presentaron un R² de 0,86; 0,76; 0,87 y 0,96, y un SECV de 1,63; 0,43; 1,05, y 5,56% respectivamente. Estos resultados demuestran que los constituyentes minerales pueden predecirse aceptablemente, y los azúcares solubles totales de forma muy precisa. Se concluye entonces la gran utilidad y potencialidad de la técnica NIRS para la predicción del estado nutricional mineral y de azúcares solubles totales en plántulas de vivero de forma rápida y a bajo coste.

Palabras clave

Nitrógeno, fósforo, potasio, azúcares solubles, NIRS, calidad de planta, espectroscopía

1. Introducción

La administración de la fertilización en vivero es la principal responsable del estado nutricional de la planta (CORTINA *et al.*, 2007), el cual es uno de los atributos más importantes de calidad de plántulas (LANDIS, 1989). Existen evidencias científicas que hacen hincapié en la importancia de la nutrición mineral, principalmente NPK, en relación con el éxito de la plantación (supervivencia y crecimiento) en ambientes mediterráneos. Una contribución a dicho éxito es la adquisición de rasgos relacionados con la evitación de la sequía, resistencia al frío, crecimiento rápido y temprano de raíces y regulación de estomas (OLIET *et al.*, 2013; HEREDIA *et al.*, 2014; VILLAR-SALVADOR *et al.*, 2013). Otro atributo fisiológico importante de calidad de planta forestal, que también puede determinar el éxito de las plantaciones, es la cantidad de carbohidratos no estructurales almacenados por las plantas al salir del vivero. Estos se dividen en dos grupos: por un lado, el almidón (de elevado peso molecular) y, por otro lado, los azúcares solubles, que comprenden una heterogénea familia de azúcares de pequeño peso molecular como, por ejemplo: sacararosa, maltosa, glucosa, fructosa, etc. (VILLAR *et al.*, 2000; Villar-Salvador *et al.*, 2013). Por su papel osmorregulador, los azúcares solubles permiten estabilizar las membranas evitando el riesgo de deshidratación celular causada por la congelación o la sequía (VILLAR-SALVADOR *et al.*, 2015).

La determinación del estado nutricional mineral por métodos analíticos convencionales consume recursos, por lo que, a pesar de la importancia reconocida no ha sido incorporado como atributo de caracterización de calidad de planta forestal en las evaluaciones rutinarias (VILLAR *et al.*, 2000; VILLAR-SALVADOR *et al.*, 2013). Del mismo modo son diversas las técnicas analíticas existentes para la determinación del contenido de azúcares no estructurales (QUENTIN *et al.*, 2016). La mayoría de estas técnicas ofrecen buenos resultados en análisis cuantitativos de carbohidratos; sin embargo, se trata de analíticas complejas y con unos costes bastantes elevados, lo que ha impedido hasta el momento incorporar este parámetro en las evaluaciones rutinarias de la calidad de plántulas durante una repoblación en España (PALACIOS *et al.*, 2001).



La técnica de espectroscopía por reflectancia en el infrarrojo cercano (del inglés “near infrared”, NIRS) se basa en la cuantificación de la energía absorbida por la vibración de las moléculas de una muestra medida con un espectrofotómetro. Cuando una muestra es sometida a una radiación NIR (780 a 2500 nm) los enlaces moleculares de la materia orgánica presentes en la muestra (principalmente enlaces con hidrogeno, X-H) absorben una cantidad de energía que es evaluada por reflectancia (ARES, 2010). En el caso de componentes inorgánicos, la base teórica de la capacidad de la técnica NIRS para estimar componentes inorgánicos en una muestra vegetal es la asociación entre los minerales y los grupos funcionales orgánicos o la propia matriz orgánica. Así muestras con diferentes composiciones químicas (orgánica e inorgánica) tendrán diferentes espectros en el infrarrojo cercano, los cuales por consiguiente recogen información sobre los constituyentes químicos (GÁLVEZ *et al.*, 2015; GUERRERO *et al.*, 2008).

Existen numerosos estudios que demuestran la capacidad de la técnica NIRS en relación a la determinación de constituyentes químicos de tejidos vegetales. Por ejemplo, Norris y Hart (1965) comenzaron aplicándola a la determinación de grasa, proteína y humedad en granos de semillas oleaginosas. Posteriormente las investigaciones de Shenk *et al.* (1977, 1978) y García Criado *et al.* (1977, 1978) ofrecieron también buenos resultados para la predicción de constituyentes orgánicos en forrajes. En las últimas décadas se han desarrollado nuevas aplicaciones orientadas a la cuantificación de elementos minerales en vegetales. Por ejemplo, Shenk (1979) menciona que elementos como Ca, P, K y B pueden predecirse satisfactoriamente empleando la técnica NIRS. Estos resultados se han confirmado posteriormente en especies vegetales de interés alimentario para un gran número de elementos minerales como B, Ca, Cl, Cu, Fe, Mn, Mg, N, P, K, Na y Zn (GARCÍA *et al.*, 1983 y GÁLVEZ *et al.*, 2015). Sin embargo, existen pocos ejemplos de empleo de la técnica NIRS en especies forestales, salvo en trabajos preliminares para la determinación de carbohidratos (PALACIOS *et al.*, 2001).

Este trabajo presenta a la técnica NIRS como una herramienta para evaluar de forma rápida y económica el estado nutricional de N, P, K y AST de *Pinus pinea*, *Pinus halepensis*, *Pinus nigra* y *Pinus pinaster* en fase de plántulas de vivero. Si bien los modelos desarrollados podrían emplearse para la predicción de los constituyentes minerales y azúcares solubles totales en tejidos vegetales en general, estos tienen en principio aplicación a planta juvenil de vivero de pino de las cuatro especies mencionadas y deberían ser validados para otras especies forestales.

2. Objetivos

El objetivo general es evaluar el potencial de la tecnología NIRS para la predicción del estado nutricional de elementos minerales N, P, K y de los AST en planta forestal de vivero de especies de pinos ibéricos. Mientras que los objetivos específicos son: (i) elaborar modelos globales de predicción NIRS para N, P, K y AST; y (ii) estudiar si la precisión del modelo global seleccionado mejora al considerar colectivos de calibración independientes para las diferentes fracciones de tejidos: acículas, tallos y raíces.

3. Metodología

Para el presente trabajo se dispuso de 350 muestras en polvo procedentes de dos ensayos diferentes de vivero, uno de fertilización con un amplio gradiente de disponibilidad nutricional y otro de distintos sustratos. Del primer ensayo se dispuso de un total de 318 muestras, 106 de acículas, 106 de tallos y 106 de raíces de cuatro especies de pinos ibéricos (81 de *Pinus pinea*, 78 de *Pinus halepensis*, 78 de *Pinus nigra* y 81 de *Pinus pinaster*). Del segundo ensayo se contó con 16 muestras de parte aérea (acículas+tallos) y 16 muestras de raíces de dos especies de pinos ibéricos (16 de *Pinus pinea* y 16 de *Pinus halepensis*). En ambos ensayos las muestras procedían de plantas de una savia cultivadas en vivero. Para la determinación de los respectivos valores analíticos de referencia de N, P, K y AST (azúcares solubles totales = rafinosa + sucrosa + maltosa + glucosa + galactosa + fructosa) en las 350 muestras era necesario prepararlas previamente mediante un secado en estufa a 65 °C durante 24 horas, posteriormente los tejidos



fueron molidos en molino de bolas (PM 100, Retsch, Hann, Alemania) durante aproximadamente 10 minutos a 500 rpm (lo que permitió una presentación más homogénea). El polvo así obtenido se analizó para determinar la concentración de N, P, K y AST. Para determinar la concentración de los tres constituyentes minerales (NPK) fue necesario hacer dos digestiones, una para extraer el N y P y la otra para el K. Para determinar el N y P se tomó 50 miligramos de la muestra en polvo y se realizó una digestión Kjeldah y el producto de esta digestión fue medido en forma de PO_4 y NH_4 en un autoanalizador. Para determinar la concentración de K también se tomó 50 miligramos de la muestra en polvo y se realizó una digestión ácida, el producto de la digestión también fue medido en un autoanalizador. Ambas digestiones se llevaron a cabo en la Universidad Rey Juan Carlos. Por su parte para determinar la concentración de AST se empleó la metodología de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), el cual se llevó a cabo en la Universidad Alcalá de Henares.

Del colectivo total de 350 muestras se descartaron 27 por no tener la cantidad necesaria (mayor a 2 g) para llenar las cápsulas rectangulares de $\frac{1}{4}$ de presentación de muestras en el equipo FOSS-NIRSystem 5000. Las 323 muestras restantes se colocaron en crisoles y fueron secadas en estufa a una temperatura de 50 °C durante 24 horas. Trascorrido ese tiempo, los crisoles se introdujeron en un desecador con gel de sílice durante 20 minutos. Tras homogeneizar la muestra en polvo, se rellenaron dos cápsulas por muestra, y en los casos donde no hubo suficiente cantidad para preparar dos capsulas, la lectura se realizó con la misma muestra vaciando y rellenando de nuevo la capsula. Para la presentación de las muestras, se utilizó el sistema "transport". Este sistema traslada las cápsulas en sentido vertical frente a la fuente de luz, haciendo un total de 32 lecturas que se promedia para dar un espectro final. El rango de recogida de espectros fue entre 1100 a 2500 nm, y fueron almacenados como absorbancia (1/reflectancia), permitiendo como diferencia máxima entre espectros de una misma muestra un valor estadístico RMS (root mean square) de 3000. Se tomaron 323 espectros con el software WINISIScan v.1.50 (Infrasoft International, Por Matilda, PA, USA) y para la detección de anómalos espectrales se utilizó el algoritmo CENTER basado en el cálculo de la distancia de Mahalanobis (H). Las muestras con una distancia espectral $H > 3$ al espectro medio del colectivo de calibración fueron descartadas por estar insuficientemente representadas. Así quedaron finalmente 316 espectros, los cuales fueron usados para el desarrollo de las calibraciones de rutina y la validación externa.

El tratamiento quimiométrico para el desarrollo y evaluación de los modelos de predicción se realizó utilizando el software WinISI ver. 1.50 (Infrasoft International). Se evaluaron 16 tratamientos matemáticos de los espectros para generar los modelos globales de predicción NIRS, diseñados de acuerdo con referencias bibliográficas (PETISCO *et al.*, 2005; BOTERO *et al.*, 2009; SANDOVAL *et al.*, 2008 y GÁLVEZ *et al.*, 2015). Los tratamientos correspondieron a combinaciones de dos intervalos de lectura (2 y 8) de longitudes de onda en el rango del NIR (1100-2500 nm), al cálculo de una primera y segunda derivada para corregir el efecto de diferencias en el tamaño de partícula de las muestras, y a diferentes algoritmos aplicados para corregir el efecto del scatter debido a diferencias en el empaquetamiento de las muestras como: SNV (corrección de variación normal), MSC (corrección de dispersión multiplicativa), Detrend (eliminación de efectos offset en la línea base), y la combinación de SNV&Detrend y None. En la tabla 1 se muestran las diferentes combinaciones de tratamientos matemáticos aplicados para el desarrollo de las ecuaciones globales de predicción.

Las ecuaciones de calibración fueron generadas utilizando el procedimiento de regresión por Mínimos Cuadrados Parciales Modificado (MPLS), que consiste en estandarizar los residuos obtenidos después del cálculo de cada término de regresión para optimizar el número de factores (F) de la ecuación. Durante el desarrollo de los modelos de predicción se permitieron dos pases de eliminación de muestras outliers utilizando el estadístico T, similar a una t de Student, que evalúa la presencia de muestras anómalas ($T > 2,5$) comparando los valores predichos por el modelo y sus valores analíticos de referencia. Para valorar la capacidad predictiva y la exactitud de las ecuaciones se utilizaron varios estadísticos: i) el coeficiente de

determinación de validación cruzada (R^2), que indica el porcentaje de variación en el colectivo de calibración para el constituyente considerado que puede ser explicado por la ecuación de regresión; ii) el error estándar de calibración (SEC), que describe como se ajustan las muestras del colectivo de calibración al modelo de regresión utilizado para calcular la ecuación; iii) el error estándar de validación cruzada (SECV) es igual al SEC pero para los colectivos de validación cruzada, y se considera un estadístico más real que el SEC en la predicción de muestras de rutina. Los valores de ambos estadísticos, SEC y SECV, deben ser los menores posibles y de magnitud similar al error estándar del laboratorio (SEL) del método analítico de referencia (ARES, 2010).

No existe un criterio generalizado sobre los estadísticos que se deben de usar para elegir la mejor ecuación de calibración, por lo que el mejor modelo de predicción para elementos minerales N, P, K y AST en este trabajo se seleccionó siguiendo los criterios recomendados por diferentes autores (SANDOVAL *et al.*, 2008; CAMPO Y MORENO, 2014; BOTERO *et al.*, 2009). La elección del tratamiento matemático se basó en seleccionar el modelo con mayor coeficiente de determinación de validación cruzada (R^2), menor error estándar de calibración cruzada (SECV), menor número de términos (F) y un ratio elevado RPD (relación entre la desviación estándar de los datos de referencia y el SECV). Este cociente ha de ser mayor o igual a 3 para alcanzar niveles de exactitud excelente, aunque un valor de 2,5 es también aceptable cuando la desviación estándar en el colectivo de calibración es baja (WILLIAMS, 2003).

Una vez elegido el mejor tratamiento matemático de los 16 ensayados para el modelo global de predicción en rutina, se desarrollaron también ecuaciones de predicción considerando tres colectivos de calibración diferentes según partes morfológicas de las plántulas (acículas, tallos y raíces). Finalmente, para evaluar la robustez del modelo global elegido se llevó a cabo la validación externa del mismo. Para ello se escogieron al azar 36 muestras de (12 de tallos, 12 de raíces y 12 de acículas) que se eliminaron del colectivo inicial de calibración; a continuación, se aplicó de nuevo el mejor tratamiento elegido, y la ecuación de calibración obtenida se validó con dicho colectivo de muestras externas. Para evaluar su exactitud se calculó el error estándar de predicción (SEP) comparando los valores predichos a partir de las ecuaciones NIRS, con los valores analíticos de referencia de estas muestras externas. Cabe resaltar que los valores del SEL (error estándar de laboratorio) fueron extraídos de la investigación realizada anteriormente por PACHO (2016).

Tabla 1: Tratamientos matemáticos evaluados para desarrollar los modelos globales de predicción

Modelos	Corrección de Scatter	Rango de longitud de onda; intervalo de lectura	Tratamiento matemático ¹
E1	SNV&Detrend	1100-2500;2	2,5,5,1
E2	SNV&Detrend	1100-2500;8	2,10,10,1
E3	SNV&Detrend	1100-2500;2	2,10,10,1
E4	SNV&Detrend	1100-2500;8	2,5,5,1
E5	None	1100-2500;2	2,4,4,1
E6	None	1100-2500;8	2,10,10,1
E7	None	1100-2500;2	2,10,10,1
E8	None	1100-2500;8	2,4,4,1
E9	Detrend only	1100-2500;2	1,10,10,1
E10	Detrend only	1100-2500;8	1,5,5,1
E11	Detrend only	1100-2500;2	1,5,5,1
E12	Detrend only	1100-2500;8	1,10,10,1
E13	Estandar MSC	1100-2500;2	1,5,5,1
E14	Estandar MSC	1100-2500;8	2,10,10,1



E15	Estandar MSC	1100-2500;2	2,10,10,1
E16	Estandar MSC	1100-2500;8	1,5,5,1

¹El primer dígito es el orden de la derivada aplicada (1=1ª derivada y 2=2ª derivada). El segundo dígito indica el tamaño del segmento de longitudes de onda sobre el cual se realiza la derivación. El tercer y cuarto dígitos corresponden al tamaño de los intervalos de longitudes de onda empleados para el cálculo de suavización de la derivada (ARES, 2010)

4. Resultados

Las tablas 2 y 3 muestran la composición química y el rango de variación de los minerales y AST determinados en las muestras que componen los colectivos de calibración global y por fracciones (acículas, tallos y raíces) de las plántulas, tras haber eliminado las muestras detectadas como anómalas espectrales.

Tabla 2: Composición química y rango de variación de N y P

Colectivos de calibración		N					P				
		n	Media	SD	Max	Min	n	Media	SD	Max	Min
Global	TO	316	10,44	5,36	32,67	3,10	226	2,14	0,93	4,93	0,50
Partes morfológicas	A	103	14,35	5,90	32,67	7,24	71	2,69	0,91	4,93	1,31
	T	76	6,60	3,87	22,04	3,10	52	2,60	0,69	4,41	1,61
	R	121	8,88	2,47	16,10	4,71	87	1,57	0,67	4,47	0,50

TO=Población global; A=acículas; T=tallos; R=raíces; n=número de muestras; Media=promedio aritmético (mg/g); SD=desviación estándar; Max=máximo (mg/g) y Min=Mínimo (mg/g);

Tabla 3: Composición química y rango de variación de K y AST

Colectivos de calibración		K					AST				
		n	Media	SD	Max	Min	n	Media	SD	Max	Min
Global	TO	226	5,32	2,87	11,19	0,63	142	46,78	31,64	129,53	6,08
Partes morfológicas	A	71	7,20	1,95	11,11	3,56	71	72,56	24,77	129,53	35,54
	T	52	4,50	2,14	8,35	0,63	nd	nd	nd	nd	nd
	R	87	3,88	3,04	11,19	0,85	71	21,00	7,38	40,61	6,08

TO=Población global; A=acículas; T=tallos; R=raíces; n=número de muestras; Media=promedio aritmético (mg/g); SD=desviación estándar; Max=máximo (mg/g); Min=Mínimo (mg/g); y nd=no existe datos de referencia

Los estadísticos de la calibración de rutina obtenidos para cada uno de los 16 modelos descritos en la tabla 1, se muestran en la tabla 4. Como puede observarse a partir de estos valores, en general la precisión y exactitud para N, K y AST fue buena, y peor para el P. Los mejores estadísticos para un modelo global de predicción de minerales y AST se obtuvieron con el tratamiento E6. Este modelo fue seleccionado por presentar un valor alto del coeficiente de determinación en calibración (R^2), bajo número de términos (F), un valor bajo del error estándar de validación cruzada (SECV) y un valor alto de RPD de manera simultánea para los tres elementos minerales y AST, los cuales se muestran en la tabla 5. El modelo E6 arrojó un R^2 de 0,86; 0,76; 0,87 y 0,96 y un SECV de 1,63; 0,43; 1,05 y 5,56% para N, P, K y AST, respectivamente. De acuerdo con WILLIAMS (2003), los valores de R^2 para la calibración de

rutina fueron excelentes ($R^2 > 0,90$) para AST, buenos ($0,80 < R^2 < 0,90$) para N y K, y aceptables ($0,70 < R^2 < 0,80$) para el P.

La figura 1 muestra la comparación de los valores analíticos de referencia con los obtenidos a partir del modelo global de predicción NIR seleccionado (E6), indicando las muestras eliminadas en el proceso de calibración como outliers en cuanto a su composición química ($T > 2.5$), las cuales se presentan de forma de triángulos.

La tabla 6 muestra los estadísticos de calibración después de aplicar el modelo global de predicción (E6) considerando esta vez colectivos de calibración de rutina diferenciados por partes morfológicas. Los valores de R^2 y SECV aumentaron para la predicción de N y P en acículas y tallos, mientras que no hubo mejoras evidentes para K y AST, respecto con el colectivo global de calibración. Por otro lado, la tabla 7 muestran los nuevos estadísticos de calibración sin considerar las 36 muestras extraídas para validación externa, así como también los estadísticos de la validación externa. Cabe resaltar que la validación externa permite corroborar los resultados obtenidos en la calibración de rutina. Finalmente, para evaluar la exactitud del modelo global de predicción NIR, en la tabla 8 se presentan la comparación entre el error estándar de laboratorio (SEL), el error estándar de validación cruzada (SECV) y el error estándar de predicción (SEP) en validación externa.

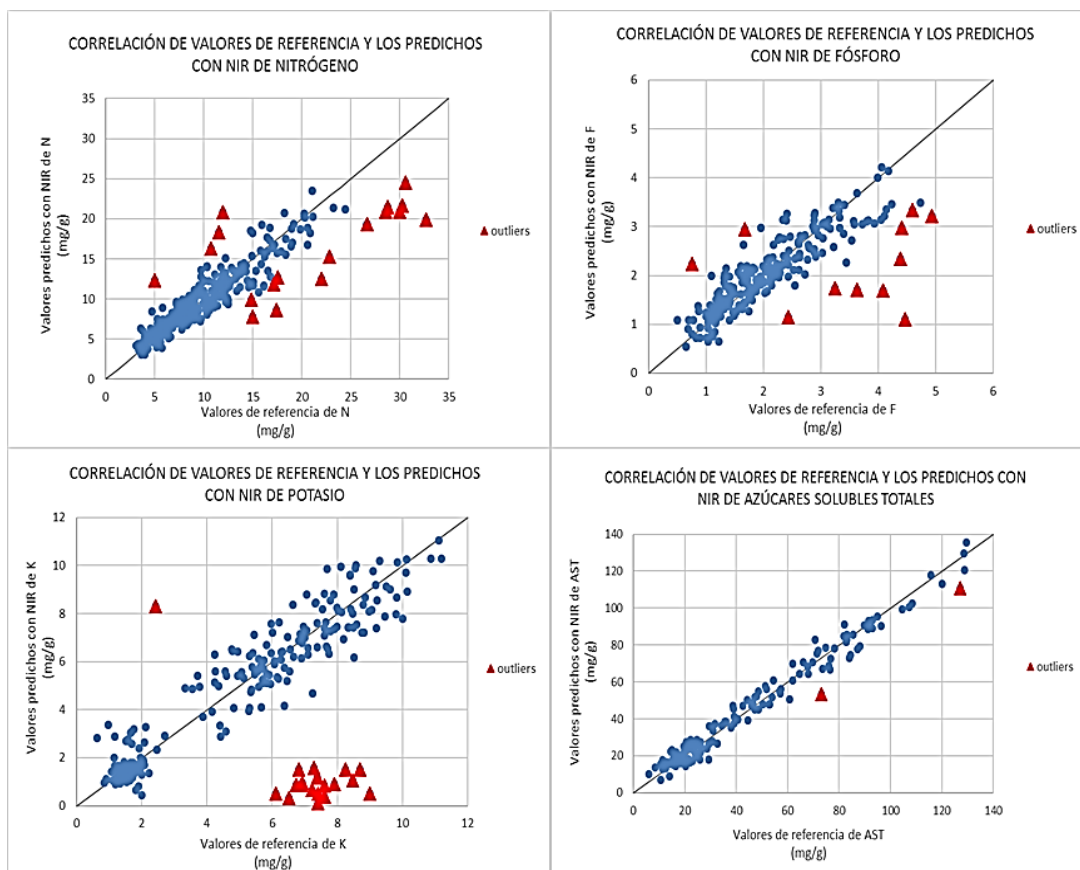
Tabla 4: Estadísticos de calibración para cada uno de los 16 modelos globales de predicción

Modelos	N				P			
	F	SECV	R^2	RPD	F	SECV	R^2	RPD
E1	8	1,58	0,89	2,80	11	0,46	0,72	1,87
E2	8	1,58	0,89	2,82	11	0,46	0,72	2,00
E3	8	1,61	0,87	2,69	11	0,47	0,71	1,88
E4	8	1,58	0,89	2,87	11	0,46	0,72	1,87
E5	8	1,59	0,88	2,82	9	0,49	0,68	1,77
E6	7	1,63	0,86	2,72	12	0,43	0,75	2,00
E7	7	1,63	0,86	2,66	12	0,43	0,75	2,00
E8	8	1,59	0,88	2,82	9	0,49	0,68	1,77
E9	11	1,55	0,87	2,78	11	0,50	0,66	1,71
E10	11	1,64	0,87	2,74	11	0,47	0,70	1,78
E11	11	1,64	0,87	2,74	11	0,47	0,70	1,82
E12	11	1,58	0,87	2,73	11	0,50	0,66	1,73
E13	11	1,58	0,87	2,76	12	0,51	0,67	1,73
E14	8	1,60	0,90	2,66	12	0,43	0,76	2,04
E15	8	1,63	0,88	2,74	12	0,43	0,76	2,08
E16	11	1,58	0,87	2,76	12	0,51	0,67	1,73
Modelos	K				AST			
	F	SECV	R^2	RPD	F	SECV	R^2	RPD
E1	7	1,10	0,86	2,64	10	5,23	0,97	5,93
E2	8	1,10	0,86	2,64	10	5,59	0,97	5,53
E3	8	1,07	0,87	2,71	10	5,59	0,97	5,53
E4	7	1,10	0,86	2,64	10	5,23	0,97	5,93
E5	10	1,06	0,87	2,74	9	5,53	0,97	5,62
E6	9	1,05	0,87	2,76	9	5,56	0,97	5,56
E7	9	1,05	0,87	2,76	9	5,56	0,97	5,56
E8	10	1,06	0,87	2,74	9	5,53	0,97	5,62
E9	10	1,04	0,87	2,80	10	6,17	0,96	5,12
E10	10	1,03	0,88	2,83	10	5,76	0,97	5,51



E11	10	1,03	0,88	2,83	10	5,76	0,97	5,51
E12	10	1,04	0,87	2,80	10	6,17	0,96	5,12
E13	10	1,02	0,88	2,83	9	6,38	0,96	4,95
E14	8	1,07	0,87	2,71	10	5,61	0,97	5,51
E15	8	1,07	0,87	2,71	10	5,61	0,97	5,51
E16	10	1,02	0,88	2,83	9	6,38	0,96	4,95

R^2 = coeficiente de determinación en validación cruzada; F= número de términos;
 SECV = error estándar de validación cruzada y
 RPD = relación entre la desviación estándar de los datos de referencia y el SECV.



F

figura 1: Comparación entre los valores predichos con la técnica NIRS y los valores analíticos de referencia para N, P, K y AST.

Tabla 5: Estadísticos de calibración del mejor modelo seleccionado (E6)

CALIBRACIÓN	Variable	Población total			
		F	SECV	R^2	RPD
	N	7	1,63	0,86	2,72
	P	12	0,43	0,76	2,00
	K	9	1,05	0,87	2,76
	AST	9	5,56	0,96	5,56

R^2 = coeficiente de determinación; F= número de términos; SECV = error estándar de validación cruzada y RPD = relación entre la desviación estándar de los datos de referencia y el SECV.



Tabla 6: Estadísticos de calibración con colectivos de calibración independientes para diferentes partes morfológicas de las plántulas de pino

CALIBRACIÓN	Variable	Acículas			Tallo			Raíces		
		SECV	R ²	RPD	SECV	R ²	RPD	SECV	R ²	RPD
	N	1,68	0,91	3,40	0,69	0,93	3,65	1,02	0,80	2,34
	P	0,33	0,87	2,74	0,51	0,35	1,23	0,21	0,76	2,02
	K	0,95	0,76	2,05	1,42	0,55	1,50	2,36	0,39	1,28
	AST	6,21	0,94	4,02	nd	nd	nd	2,83	0,86	2,61

R² = coeficiente de determinación; F = número de términos; SECV = error estándar de validación cruzada y RPD = relación entre la desviación estándar de los datos de referencia y el SECV.

Tabla 7: Estadísticos de calibración con validación externa

CALIBRACIÓN NUEVA DE RUTINA	Variable	Población total		
		SECV	R ²	RPD
	N	1,65	0,85	2,56
	P	0,51	0,68	1,77
	K	1,13	0,85	2,56
	AST	6,02	0,96	5,24
VALIDACIÓN EXTERNA	Variable	Población total		
		SD	SEP	RPD _v
	N	4,92	2,13	2,31
	P	0,71	0,49	1,45
	K	2,87	2,14	1,34
	AST	32,02	3,75	8,54

SECV = error estándar de validación cruzada; R² = coeficiente de determinación; RPD = relación entre la desviación estándar de los datos de referencia y el SECV; RPD_v = relación entre la desviación estándar de los datos de referencia y el SEP y SEP = error estándar de predicción.

Tabla 8: Comparación entre SEL, SECV y SEP

Variable	Población total		
	SEL	SECV	SEP
N	1,36	1,65	2,13
P	0,13	0,51	0,49
K	1,27	1,13	2,14

SEL=errores estándar de laboratorio, SECV=errores estándar de validación cruzada y SEP=errores estándar de predicción en la validación externa

5. Discusión

Los buenos resultados obtenidos en la predicción de P y K del presente estudio contrastan con los obtenidos en un trabajo preliminar realizado por PACHO (2016), donde se obtuvieron peores estadísticos para P (R² de 0,46) y K (R² de 0,32). Es posible que el alto grado de homogeneidad que proporciona la molienda en molino de bolas de las muestras en el presente trabajo, frente a la molienda convencional de martillos realizada por PACHO (2016), puedan explicar las diferencias en la capacidad predictiva de las ecuaciones obtenidas. Numerosos autores (GÁLVEZ *et al.*, 2015; GUERRERO *et al.*, 2008; BOTERO *et al.*, 2009 y ARES, 2010) señalan la importancia de los atributos físicos y estructurales de las muestras, ya que en

espectroscopía NIR la radiación sufre modificaciones observables y medibles al interactuar con la muestra, debidas a un tamaño de partículas o a una densidad diferente, que resultan en interferencias ópticas no deseadas.

Las razones por las cuales el modelo general E6 posee una excelente capacidad predictiva para los AST son debidas, por un lado, a que los azúcares solubles comprenden una heterogénea familia de moléculas orgánicas (ejemplo: sacarosa, maltosa, glucosa, fructosa, etc.) que poseen numerosos enlaces con el H, los cuales absorben de manera eficiente la radiación NIRS. Por el contrario, parte de los elementos minerales, están presentes solo en asociación con grupos funcionales orgánicos o de la matriz orgánica, y su absorbancia en la región NIR es más reducida. Por otro lado, la distribución de frecuencias de los valores analíticos de referencia de AST presenta un número suficiente de muestras distribuidas en todos los intervalos de concentración y en un rango muy amplio de variación. Por el contrario, los histogramas de frecuencias de los valores analíticos para el N, P y K presentan una distribución en forma de curva normal, con la mayor de parte de muestras situadas en torno a la media.

La figura 1 permite evaluar el comportamiento de muestras outliers, en cuanto a su composición química, para tratar de identificar las causas de sus valores anómalos. No se encontró ningún patrón definido relacionado con las especies de pinos considerados o con las fracciones vegetales analizadas, excepto para el K donde el 95% de las muestras outliers correspondieron a raíces.

Al considerar colectivos de calibración diferentes por partes morfológicas de las plántulas (tabla 6) la precisión del modelo global E6 mejoró para el N y P. El estadístico RPD aumentó para el N desde 2,72 en el modelo general, a 3,40 y 3,65 en acículas y tallos respectivamente, y para el caso del P desde 2,00 a 2,74 en acículas. Esta mejora de la precisión de los modelos puede explicarse en base a que tanto el N como P se incorporan en forma de moléculas orgánicas que se acumulan en acículas o tallos. Estas moléculas presentan enlaces H que absorben la energía luminosa en el rango NIR y permiten su captación por el espectrofotómetro. Además, en el caso del N, al considerar los colectivos de calibración de acículas y tallos por separado, la distribución de los valores analíticos de las muestras en sus respectivos rangos de variación fue más homogénea que la obtenida para el colectivo total de calibración. Por el contrario, para el K la precisión del modelo global E6 no mejoró al considerar colectivos de calibración diferentes por fracciones. Así, el estadístico RPD disminuyó para el K desde 2,76 a 1,50 y 1,28 en tallos y acículas, respectivamente, y para los AST desde 5,56 a 2,61 en raíces. En el caso del K, la disminución de la precisión del modelo global de predicción al considerar colectivos de calibración independientes para las partes morfológicas de las plántulas puede deberse a que el K se incorpora en forma iónica en tallos y acículas, sin formar parte de moléculas orgánicas, y por lo tanto no absorbe energía en la región NIR.

En la tabla 7 se puede apreciar que los estadísticos obtenidos en la nueva calibración de rutina con validación externa presentan valores similares a los obtenidos en la calibración de rutina (tabla 5), corroborando los resultados obtenidos en el proceso de calibración por validación cruzada. Los resultados obtenidos para RPD_v fueron de 2,31; 1,45; 1,34; y 8,54 y un SEP de 2,13; 0,49; 2,14 y 3,75 para N, P, K y AST, respectivamente. Estos resultados de acuerdo con MALLEY *et al.*, (2004) demuestran que para los tres componentes minerales el modelo tiene una capacidad predictiva de moderadamente útil a un éxito moderado; mientras que para los AST el modelo de predicción es categorizado como excelente. Así mismo en la tabla 8 se puede apreciar que la magnitud del SECV y SEP es similar a la obtenida con los métodos analíticos de referencia (SEL), lo que demuestra la validez de la tecnología NIRS para la predicción de la concentración de minerales N, P K y de reservas de AST en plántulas de pino juveniles, y permiten estimar la exactitud esperada de las predicciones.



6. Conclusiones

La técnica NIRS permite evaluar de forma rápida y económica el estado nutricional de elementos minerales N, P, K y AST en tejidos juveniles de especies de pino. El modelo global tiene una buena capacidad predictiva para los tres constituyentes minerales N, P y K y una excelente capacidad predictiva para los AST. La precisión de los modelos de predicción del N mejora al considerar acículas y tallos como colectivos de calibración específicos, mientras que para la predicción del P sólo mejora al considerar el colectivo de acículas; para el resto de los constituyentes y fracciones el mejor modelo es el global obtenido con los datos de raíz, tallo y hoja conjuntamente. La precisión del modelo global disminuye para la predicción de K y AST al considerar colectivos de calibración específicos.

7. Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento al Programa Nacional de Becas y Créditos Educativos por otorgarme la Beca Presidente de la República de Perú.

8. Bibliografía

ARES, J. (2010). La espectroscopia de infrarrojo cercano aplicada al análisis del contenido de proteína y caseína total de la leche de cabra. Córdoba, España.

BOTERO, J., PARRA, L., CABRERA, K. (2009). Determinación del nivel de nutrición foliar en banano por espectroscopia de reflectancia. Revista Facultad Nacional Agraria Medellín, 62(2), 10 páginas.

CAMPO y MORENO. (2014). Ecuaciones NIRS desarrolladas para la estimación del contenido de proteína y almidón en grano de Maíz. Pastos y PAC 53ª Reunión Científica de la SEEP, 34 páginas.

CORTINA, J., PEÑUELAS, J., PUÉRTOLAS, J., SAVE, R., VILAGROSA, A. (2007). Calidad de planta forestal para la restauración en ambientes mediterráneos degradados. Naturaleza y parques nacionales, 193 páginas.

GARCÍA, A., GARCÍA, B., GARCÍA, I. (1983). Análisis rápido de especies herbáceas por espectroscopia de la reflectancia en el infrarrojo cercano. Revista Centro de Edafología y Biología aplicada (C.S.I.C), 12 páginas.

GÁLVEZ, L., GARCÍA, F., PÉREZ, J., GIMENO, V., NAVARRO, J., MORAL, R., MARTÍNEZ, J. (2015). Rapid estimation of nutritional elements on citrus leaves by near infrared reflectance spectroscopy. Rev. Methods, 6, Article 571, 8 páginas.

GUERRERO, C., ZORNOZA, R., PÉREZ, A., MATAIX, J., GÓMEZ, I. GARCÍA, F. (2008). Uso de la espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIRS) para la estimación rápida del carbono orgánico y la respiración basal en suelos forestales. Revista Ciencias Forestales, 25, 209-214.

HEREDIA, N., OLIET, J., VILLAR, P., BENITO, L., PEÑUELAS, J. (2014). Fertilization regime interacts with fall temperature in the nursery to determine the frost and drought tolerance of the mediterranean oak *Quercus ilex* sub. *bellota*. Forestry Ecology and Management, 331, 50-59.

LANDIS, T. (1989). Nutrientes minerales y fertilización. Manual de viveros para la Producción de Especies Forestales en Contenedor, 4, 71 páginas.

MALLEY, D. F., BEN-DOR, E., MARTIN, P. D. (2004). Application in analysis of soils, in Near Infrared Spectroscopy in Agriculture, eds C. Robert, J. Workman, and J.B. Reeves (Madison: American Society of Agronomy, soil Science Society of American and Crop Science Society of America), 729-784.



OLIET, J., PUÉRTOLAS, J., PLANELLES, R., JACOBS, D. (2013). Nutrient loading of forest tree seedlings to promote stress resistance and field performance: Mediterranean perspective. *Revista New Forest*, 44 (5), 649-669.

PACHO, L. (2016). Modelo de predicción NIRS (Espectroscopia en infrarrojo cercano) para la caracterización del estado nutricional de la encina (*Quercus ilex* L.). (Tesis de grado Máster Restauración de Ecosistemas). Universidad Politécnica de Madrid.

PALACIOS, G., NAVARRO, R., DEL CAMPO, A. (2001). Desarrollo y evaluación de una ecuación NIRS para la determinación del contenido de almidón en raíces de plantas forestales. Departamento de Ingeniería Forestal. Escuela técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes Universidad de Córdoba.

PETISCO, C., GARCÍA, A., VÁZQUEZ, B., ZABALGOGEAZCOA, I., MEDIA, S., GARCÍA, B. (2005). Determinación de lignina y celulosa en acículas de plantas leñosas mediante NIRS: comparación de métodos estadísticos. *Revista producciones ganaderas: Gestión eficiente y conservación del medio natural*, 1, 8 páginas.

QUENTIN, A. (2016). Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. *Tree Physiology*, 35, 1146-1165.

SANDOVAL, L., BUESCO, F., VÉLEZ, M. (2008). Predicción nutricional para pastos tropicales por espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano. *Revista agronomía mesoamericana*, 19(2), 221-225.

VILLAR, P., DOMÍNGUEZ, S., PEÑUELAS, J., CARRASCO, I., HERRERO, N., PARAGÓN, N., OCAÑA, L. (2000). Plantas grandes y mejor nutridas de *Pinus pinea* mejor desarrollado en campo. *Revista simposio sobre el pino piñonero*, 1, 219-227.

VILLAR, P., USCOLAS, M., JACOBS, D. (2015). The role of stored carbohydrates and nitrogen in the growth and stress tolerance of planted trees. *Revista New Forest*, 27 páginas.

WILLIAMS, P. (2003). Near-infrared Technology-Getting the Best Out of Light. PDK Grain. Nanaimo, Canada, 132 páginas.

