

Primeros pasos en el uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano para la caracterización fenotípica de *Nothofagus alpina*

Jorge Andrés Arias-Ríos¹, Paula Marchelli²,
Marianela Batistelli³, Verónica Andrea El Mujtar⁴

Palabras Clave: NIRS, variación poblacional, metodología costo-efectiva

Introducción

La conservación, el manejo y la restauración de ecosistemas boscosos requiere conocer la variación ecológica de caracteres fenotípicos, cuya expresión depende de la interacción entre el genotipo y el ambiente. Los ensayos de ambiente común permiten evaluar progenies (i.e. individuos derivados de una madre conocida) provenientes de diferentes poblaciones (i.e. regiones geográficas dentro del rango de distribución de la especie) creciendo en un mismo ambiente. De esta forma es posible determinar el control genético de la variación fenotípica (e.g. de Villemereuil et al. 2018). En un contexto de cambio climático en Patagonia, con aumento de temperatura, disminución de precipitaciones (Barros et al. 2015) y aumento de la frecuencia de eventos climáticos extremos (Alexander et al. 2006), es clave el conocimiento de la variación ecológica de caracteres potencialmente adaptativos. Entre estos caracteres se encuentran el momento de apertura de yemas, el inicio de senescencia y el contenido de compuestos foliares asociados al ciclo de crecimiento o a la respuesta a estrés. Sin embargo, la evaluación de estos caracteres insume mucho tiempo a campo y en laboratorio. Por lo tanto, es central avanzar en la implementación de metodologías de bajo costo que permitan además la caracterización de un gran número de individuos en poco tiempo. La espectroscopía de infrarrojo cercano (near infrared spectroscopy, NIRS) es una metodología promisoriosa para tal fin, en tanto que el espectro de infrarrojo cercano derivado de una muestra depende directamente de la combinación de compuestos orgánicos que la constituyen (e.g. Wang

et al. 2022).

En Patagonia existen numerosos ensayos de ambiente común de especies forestales sobre los que se evalúan caracteres potencialmente adaptativos como base para el desarrollo de programas de conservación, manejo y restauración (Pastorino & Marchelli 2021). Sin embargo, hasta donde conocemos la implementación de NIRS como metodología costo-efectiva de caracterización fenotípica en dichos ensayos no ha sido aún evaluada. En *Nothofagus alpina*, estudios previos determinaron que dos poblaciones de un ensayo de ambiente común presentan comportamientos contrastantes en caracteres potencialmente adaptativos (Duboscq-Carra et al. 2020, Arias-Ríos et al. 2022). En particular estas dos poblaciones presentan diferenciación en el contenido de pigmentos foliares, estando dicha composición además relacionada negativamente con el momento de apertura de yemas y positivamente con el inicio de la senescencia y la duración de la estación de crecimiento (Arias-Ríos et al. 2022). Por tanto, el objetivo de nuestro trabajo fue realizar una primera evaluación del uso de NIRS en *N. alpina*, bajo la hipótesis de que la diferencia en el contenido de pigmentos foliares entre poblaciones se traducirá en una diferencia de espectros entre las mismas.

Materiales y Métodos

El ensayo de ambiente común de *N. alpina* utilizado en este trabajo se encuentra localizado en el Campo Forestal Gral. San Martín de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) de INTA Bariloche (41°59'50" S, 71°31'31" O, 415 m s.n.m.). El mismo fue instalado en el año 2011, contando actualmente con 450 individuos provenientes de ocho poblaciones naturales. Considerando como criterio básico el desarrollo de una

1 EEA Bariloche IFAB (INTA – CONICET) (Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche) (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Contacto: ariasrios.jorge@inta.gob.ar.

2 EEA Bariloche IFAB (INTA – CONICET) (Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche) (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Contacto: marchelli.paula@inta.gob.ar

3 EEA Bariloche IFAB (INTA – CONICET) (Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche) (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Contacto: bastistelli.marianela@inta.gob.ar.

4 EEA Bariloche IFAB (INTA – CONICET) (Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias Bariloche) (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Contacto: elmujtar.veronica@inta.gob.ar.

metodología costo-efectiva decidimos, en esta etapa, adquirir espectros sobre hojas completas, es decir sin molienda previa. En noviembre de 2019, realizamos la colecta de hojas de las dos poblaciones contrastantes del ensayo, Boquete (34 individuos) y Tren Tren (49 individuos). Para ello, de cada individuo colectamos al azar un mínimo de diez hojas no sombreadas provenientes de diferentes ramas del tercio superior de la copa abarcando todos los sentidos de exposición. Las hojas fueron colocadas en bolsas de papel madera y trasladadas hasta el laboratorio, donde se sometieron a un proceso de secado en estufa a 40°C. Una vez finalizado el secado, se conservaron en cajas con silica-gel hasta la adquisición de espectros. En julio 2022 se realizó la adquisición de espectros en un equipo MPA FT-NIR (Multi Purpose Analyzer Fourier Transform - Near Infrared, Bruker), con método de reflectancia difusa; registrándose la absorbancia en el rango de frecuencia de 4000 a 9000 cm⁻¹, con resolución de 8 cm⁻¹ y tiempo de barrido y escaneo de 32 escaneos/espectro. Considerando que pueden existir diferencias entre orientaciones de una hoja, para cada una de ellas se determinó el espectro del haz y el envés, evaluándose un mínimo de cinco hojas por individuo. Los datos fueron filtrados eliminándose aquellos espectros que se diferenciaban fuertemente del resto de los correspondientes al mismo individuo. Luego del filtrado los espectros adquiridos para cada individuo, en cada orientación, fueron promediados. Posteriormente se realizó un pretratamiento a fin de eliminar diferencias debidas a factores distintos a la composición orgánica de la muestra. El pretratamiento apunta a corregir deformaciones de espectros como los efectos multiplicativos o aditivos asociados mayoritariamente a las propiedades físicas de la muestra. El pretratamiento aplicado a cada muestra consistió en una normalización, restando a cada valor de absorbancia el valor de la absorbancia mínima y dividiendo el valor resultante por la diferencia entre la absorbancia máxima y mínima. Posteriormente los espectros normalizados se utilizaron para un análisis de componentes principales (ACP). El ACP es un método de análisis no supervisado ampliamente utilizado como método exploratorio ya que permite identificar la estructura subyacente a los datos espectrales. El ACP fue realizado con la totalidad de los datos, considerando como variables cualitativas la población y la orientación de la hoja en el escaneo. Para el manejo, pretratamiento y análisis de los datos se trabajó con SpectraGryph, ChemFlow y FactoMiner.

Resultados

Un total de 876 espectros fueron adquiridos para *N. alpina*, cada uno de los cuales incluyó 1296 variables de análisis. Los espectros presentaron algo de dispersión en la absorbancia, siendo el valor medio y el desvío de 0.551 y 0.068 respectivamente. Luego del filtrado, los 677 espectros remanentes mostraron en términos generales bajo ruido, deformaciones mayormente asociadas a efectos aditivos y similar perfil entre poblaciones/orientaciones, aunque con mayores absorbancias para Boquete que para Tren Tren y para haz que para envés (Figura 1). El ACP reveló estructuración de los datos espectrales, dando cuenta de un 81.65% de la variación entre espectros (Figura 2). De acuerdo con el test de Wilks, la variable que mejor explica la distancia entre espectros es la que resulta de la interacción entre la población y la orientación ($p < 0.05$). Si consideramos las variables por separado, la orientación explicaría mejor que la población la separación entre espectros, aunque ambas son significativas.

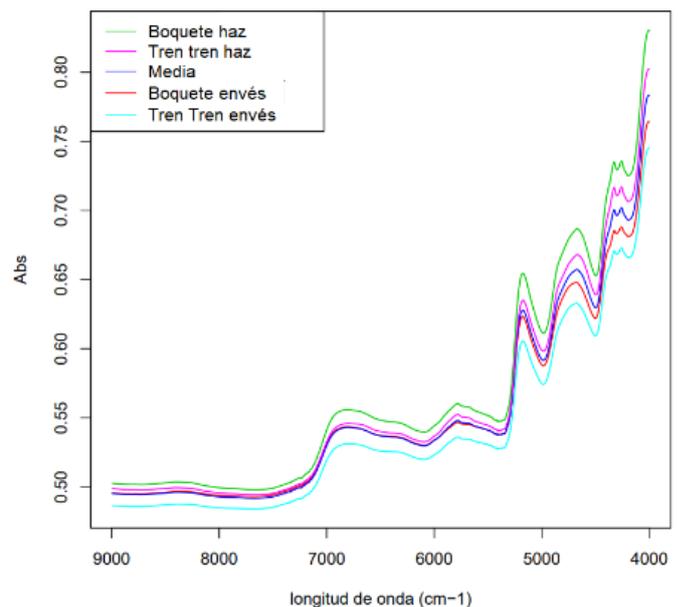


Figura 1. Espectro NIRS de hojas completas (haz y envés) de individuos de *N. alpina* provenientes de dos poblaciones con valores contrastantes en el contenido de pigmentos foliares.

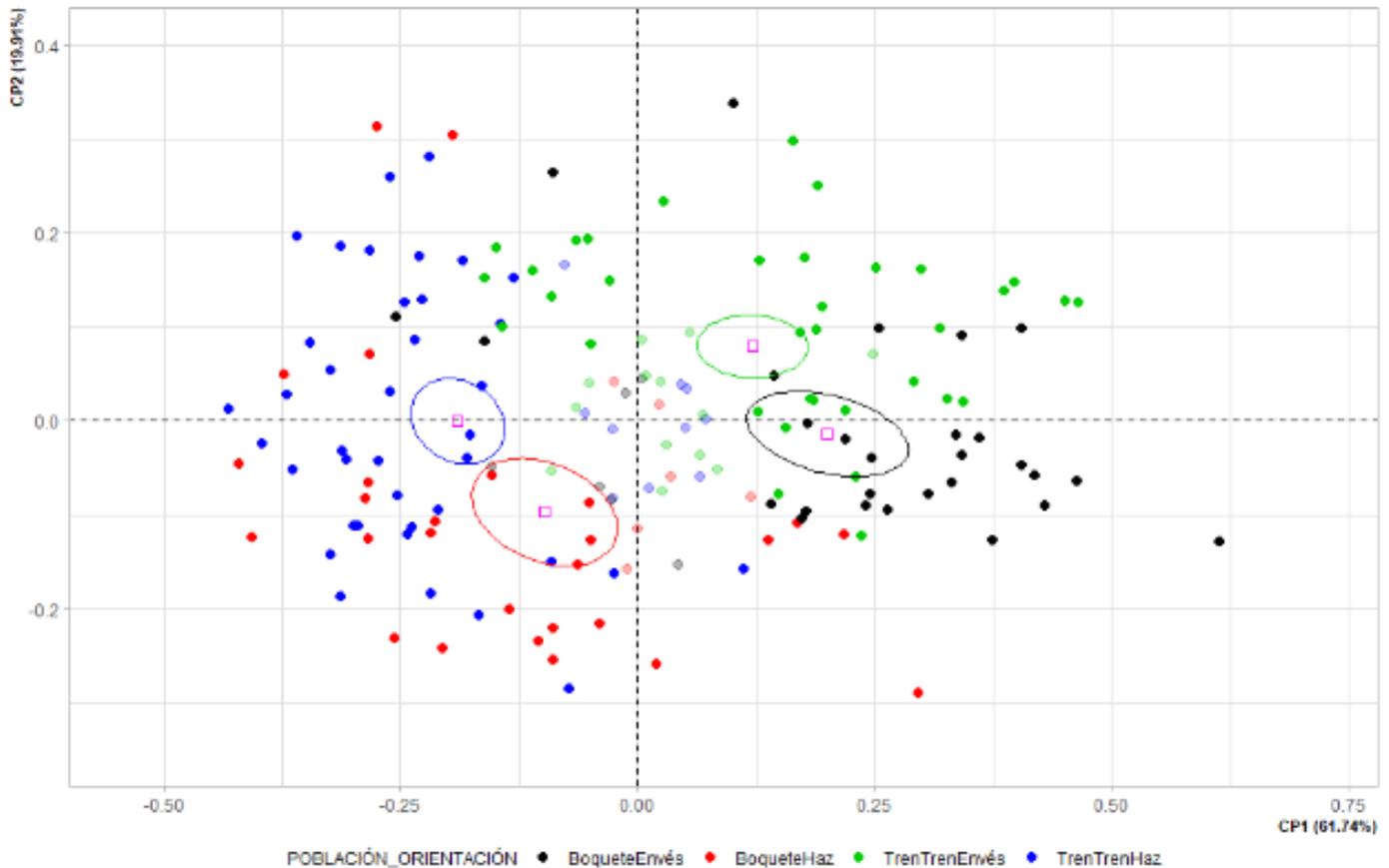


Figura 2. Análisis de componentes principales de los datos espectrales. El gráfico presenta la separación, en el primer plano, entre espectros de *N. alpina* provenientes de dos poblaciones con valores contrastantes en el contenido de pigmentos foliares, adquiridos en haz y envés de hojas completas. Las elipses representan el intervalo de confianza (0.95) de cada variable cualitativa. Los cuadrados rosas dentro de cada elipse representan la localización de la variable cualitativa en el plano.

Discusión

La estructuración de los espectros según población y orientación resulta promisorio para el desarrollo de una metodología costo-efectiva de caracterización de *N. alpina*. La separación por población se corresponde con la previamente reportada en base a la determinación colorimétrica de pigmentos foliares (Arias-Rios et al. 2022). Esto sugiere que los datos espectrales podrán ser utilizados para el desarrollo de modelos predictivos de contenido de pigmentos en la especie. La separación según orientación de la hoja (i.e. haz, envés) resulta relevante en términos prácticos indicando que es importante registrar y mantener el lado de la hoja que se analiza en cada evaluación y/o entre evaluaciones sucesivas que se quieran comparar. El uso de hojas completas permitió una adquisición de espectros sin pretratamiento adicional de las muestras. Sin embargo, los resultados presentaron cierta dispersión. En parte, dicha dispersión podría ser debida a la existencia de deformaciones y/o alte-

raciones de compuestos orgánicos dentro de una hoja o entre hojas derivadas del secado. Sin embargo, es importante considerar también el extenso período de tiempo de conservación de las muestras hasta la adquisición de espectros (más de 2 años). Este período fue consecuencia del aislamiento por la pandemia del COVID19, no fue planificado y podría afectar la performance del análisis mediante NIRS debido a un proceso de degradación de compuestos orgánicos en las muestras. Consideramos que disminuir el tiempo de conservación, optimizar el proceso de secado, o reemplazarlo por una metodología con mayor robustez para el deshidratado sin alteración de composición química (ej. liofilización), permitirá avanzar en la puesta a punto de la implementación de la espectroscopia de infrarrojo cercano. La adquisición de espectros desde hojas molidas podría ser otra alternativa a evaluar a futuro, aunque esto aumentaría el tiempo de tratamiento de la muestra.

Conclusiones

El uso de la espectroscopia de infrarrojo cercano resultó simple, rápido y práctico de aplicar en un número elevado de hojas secas de *N. alpina* lo que aporta robustez estadística a los análisis. Si bien se requieren nuevas evaluaciones de ajuste, la caracterización por NIRS muestra gran potencial como metodología costo-efectiva de caracterización fenotípica en ensayos de ambiente común de especies forestales.

Agradecimientos

Los autores agradecen al LEEMA (Laboratorio de Ecología, Ecofisiología y Madera) de INTA EEA Bariloche por permitir el acceso a las instalaciones y al equipamiento para la adquisición de los espectros.

Bibliografía

- Alexander LV, Zhang X, Peterson TC, Caesar J, Gleason B, Klein Tank AMG, et al. 2006. Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*: 111(D5).
- Arias-Rios JA, El Mujtar VA, Pastorino M, Marchelli P. 2022. Genetic variation of leaf pigment content in a southern beech. *Trees*: 1-14.
- Barros VR, Boninsegna JA, Camilloni IA, Chidiak M, Magrín GO, Rusticucci M. 2015. Climate change in Argentina: trends, projections, impacts and adaptation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* 6: 151-169.
- de Villemereuil P, Mouterde M, Gaggiotti OE, Till-Bottraud I. 2018. Patterns of phenotypic plasticity and local adaptation in the wide elevation range of the alpine plant *Arabis alpina*. *Journal of Ecology* 106:1952–1971.
- Duboscq-Carra VG, Arias-Rios JA, El Mujtar VA, Marchelli P, Pastorino MJ. 2020. Differentiation in phenology among and within natural populations of a South American *Nothofagus* revealed by a two-year evaluation in a common garden trial. *Forest Ecology and Management* 460: 117858.
- Pastorino MJ, Marchelli P. 2021. *Low Intensity Breeding of Native Forest Trees in Argentina*. Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.
- Wang Y, Xiang J, Tang Y, Chen W, Xu Y. 2022. A review of the application of near-infrared spectroscopy (NIRS) in forestry. *Applied Spectroscopy Reviews* 57: 300-317.