

Espectroscopía NIR como Técnica Exploratoria Rápida para Detección de Amarillamiento en Hojas de Crisantemo (*Dendranthema grandiflora* var. Zembla)

NIR Spectroscopy as Quick Exploratory Technique for Detection of Chrysanthemum Leaf Yellowing (*Dendranthema grandiflora* var. Zembla)

Juan Carlos Pérez Naranjo¹; Juliana Soler Arango²; Gloria Arango Pulgarín³; Elizabeth Meneses Ospina⁴ y Orlando Simón Ruiz Villadiego⁵

Resumen. El diagnóstico seguro de enfermedades en las plantas depende de técnicas costosas, que requieren de tiempo y entrenamiento especializado. Esta investigación evaluó el uso de espectroscopía infrarroja cercana NIR (por sus siglas en inglés near-infrared) para la detección rápida del "amarillamiento de hojas de crisantemo", una enfermedad de etiología incierta que genera pérdidas económicas importantes. En este experimento se tomaron espectros infrarrojos en hojas con niveles de amarillamiento diferentes según la clasificación empleada por los agricultores (asintomáticas, síntomas intermedios y hojas deformadas con síntomas avanzados). Mediante un análisis de componentes principales y con los valores de los espectros de esas muestras, se desarrolló un modelo de clasificación de hojas. Ese modelo aplicado en espectros de hojas tomados al azar separó adecuadamente el grupo de espectros NIR de hojas asintomáticas de un grupo indiferenciado de espectros obtenidos de hojas con síntomas intermedios o avanzados. Los resultados sugieren que para esta enfermedad es posible desarrollar un modelo de detección en muestras problema. Para ello, se requerirá incorporar al modelo un mayor número de muestras en rangos de enfermedad bien definidos. Estos resultados permiten vislumbrar las posibilidades del uso de esta técnica no destructiva, para detección temprana de los síntomas del amarillamiento foliar en crisantemo y como herramienta para el diseño de estrategias oportunas y efectivas de manejo de esta y otras enfermedades en las plantas.

Palabras clave: Diagnóstico rápido de enfermedades, espectroscopía NIR, frenching, plantas ornamentales.

Abstract. The safe diagnostic of plant diseases depends on expensive techniques which require time and specialized training. This study evaluated the use of near-infrared spectroscopy (NIR) for the rapid detection of "chrysanthemum leaf yellowing", a disease of unknown etiology causing important economic losses in Antioquia's chrysanthemum main producing areas. Spectral NIR data from intact leaves showing different levels of yellowing (healthy leaves, slightly deformed leaves or highly deformed leaves with advanced yellowing), used in conjunction with multivariate statistical analysis of NIR spectra, were used to build a descriptive model for chrysanthemum leaf yellowing classification. The descriptive model indicated the presence of two groups of NIR spectra belonging to asymptomatic or symptomatic leaves, with no further differentiation of NIR spectra from leaves showing mild or severe yellowing symptoms. Not without the drawbacks of a low number of NIR spectra, these results suggests that it is possible to develop a fast, accurate and nondestructive, spectroscopic based system to detect this disease on blind plant samples. Improvements to the sensitivity of this model in detecting multiple stages of this disease will depend on obtaining and adding new NIR leaf spectra obtained from clearly defined ratings of the disease. Due to its sensitivity and wide application, NIR spectroscopy appear to be a core technique to further develop new systems for the early detection of chrysanthemum leaf yellowing and other plant diseases. This in turn may result in the design of opportune and timely systems for plant disease control.

Key words: Diagnostic of plant diseases, NIR spectroscopy, frenching, ornamental plants.

El "amarillamiento del crisantemo" describe una enfermedad de naturaleza incierta que generalmente se diagnostica por una reducción severa del crecimiento, amarillamiento y deformación de hojas en algunas variedades. Esta enfermedad genera pérdidas económicas importantes en cultivos del Oriente Antioqueño. Información recogida localmente indicó que el problema es más severo en algunas variedades de crisantemos

sembradas repetidamente en el mismo suelo, pero las plantas pueden recuperarse al trasplantarlas a suelo sembrado previamente con otras variedades que parecen ser resistentes. Una sintomatología parecida se relacionó anteriormente con la presencia de grupos específicos de bacterias rizosféricas (Woltz, 1978) y con la absorción de isómeros de aminoácidos tóxicos a las plantas (Woltz y Jackson, 1961).

¹ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias - Laboratorio de Microbiología de Suelos. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <jcperez@unal.edu.co>

² Ingeniera Biológica. Investigadora. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín, Facultad de Ciencias - Laboratorio de Microbiología de Suelos. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <jsoler@unal.edu.co>

³ Química. Analista. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias - Laboratorio de Microbiología de Suelos. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <garango@unal.edu.co>

⁴ Bacterióloga. Estudiante Doctorado en Agroecología. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias Agrarias. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <elmeneses@unal.edu.co>

⁵ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín - Facultad de Ciencias - Laboratorio de Suelos. A.A. 3840, Medellín, Colombia. <osruiz@unal.edu.co>

Recibido: Marzo 20 de 2013; aceptado: Septiembre 7 de 2013.

Para conocer mejor las causas, y elaborar planes de manejo de esta enfermedad, es necesario usar herramientas suficientemente rápidas y sensibles que permitan relacionar niveles de la enfermedad con otras características de plantas o sustratos.

La espectroscopia infrarroja cercana o espectroscopia NIR (por sus siglas en inglés near-infrared), permite obtener patrones bioquímicos en hojas de plantas para detectar enfermedades bióticas o abióticas en forma rápida y temprana; es decir, cuando aún no se observan a simple vista síntomas de ellas (Liew *et al.*, 2008). Esta técnica cuantifica la interacción de la materia con un haz de luz incidente, donde una porción de fotones es reflejada (reflectancia) y el resto es absorbida (absorbancia). Dependiendo de la longitud de onda de la luz incidente, la absorbancia o reflectancia de la luz se relaciona con el número ó concentración de moléculas absorbentes presentes en la muestra (Blanco y Villarroya, 2002). En materiales químicamente heterogéneos, como un tejido vegetal, los espectros obtenidos en la región NIR 800 a 2.500 nm, son combinaciones de bandas de absorción sobrepuestas o muy cercanas. Mediante algoritmos y modelos estadísticos apropiados, la información espectral puede relacionarse con la composición físico-química o bioquímica de la muestra (Liew *et al.*, 2008).

El sistema NIR puede implementarse para su uso en forma cualitativa o cuantitativa, ejemplo de ello es el estudio realizado por Cozzolino (2002) con 400

muestras de alimentos para animales, donde se encontraron coeficientes de determinación mayores a 0,8 para la relación entre varias propiedades medidas por métodos estándar y los valores para esas mismas propiedades obtenidos espectroscópicamente. Aunque en ese estudio se utilizó un rango de longitud de onda que cubre el visible e infrarrojo cercano (400 – 2.500 nm), se demuestra las posibilidades de esta técnica.

En esta investigación se evaluó el uso de espectroscopia NIR (1.000 a 2.500 nm) en modo de reflectancia, para diferenciar hojas de plantas afectadas por amarillamiento de crisantemo. Los resultados sugieren que esta técnica podría aplicarse para detectar en forma rápida, temprana y no destructiva esta y otras enfermedades de plantas de crisantemo. Esto permitiría diseñar estrategias de manejo oportunas y efectivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

De la sección de plantas madres de un cultivo comercial ubicado en el Oriente Antioqueño (Antioquia, Colombia), se obtuvieron tres conjuntos de muestras, cada uno de ellos compuesto por 20 hojas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* var. Zembla), 60 hojas en total, que presentaban uno de los tres niveles de amarillamiento definidos por el agricultor al suministrar las hojas (asintomáticas, síntomas intermedios y hojas deformadas con síntomas avanzados), como lo ilustra la Figura 1.

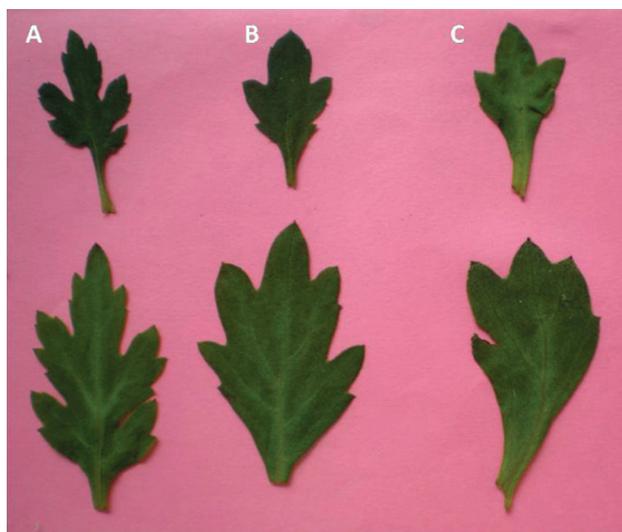


Figura 1. Apariencia de las hojas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* var. Zembla) Hojas asintomáticas (A); hojas con síntomas intermedios (B) y hojas con síntomas avanzados de amarillamiento (C). Arriba, hojas tomadas de los ápices; abajo, hojas basales.

Para los análisis espectroscópicos de las 60 hojas, las mediciones de reflectancia se obtuvieron ubicando el haz de cada hoja directamente sobre la ventana de lectura de un espectroscopio FT-NIR BUCHI® NIRFlex 500, disponible en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Para cada hoja, se obtuvo un espectro en un rango de longitudes de onda entre 1.000 a 2.500 nm (1.501 datos). Luego, el espectro de cada muestra se transformó mediante técnicas numéricas estándar para este tipo de análisis (segunda derivada, aplicando el filtro de Savitzky – Golay en una ventana de nueve puntos y el método SNV [Standard Normal Variate]).

Para conocer la capacidad discriminante del sistema quimiométrico del espectroscopio (software NIRCal V. 5.4.), se estimó un modelo descriptivo (PCA – Cluster) a partir de 40 espectros de hojas seleccionados al azar por el sistema quimiométrico, teniendo en cuenta las categorías sintomáticas descritas en la Figura 1.

RESULTADOS

La Figura 2 presenta el promedio de espectros NIR (1.000 a 2.500 nm) de las hojas de crisantemo en las categorías de hojas asintomáticas, hojas con síntomas intermedios y hojas con síntomas avanzados.

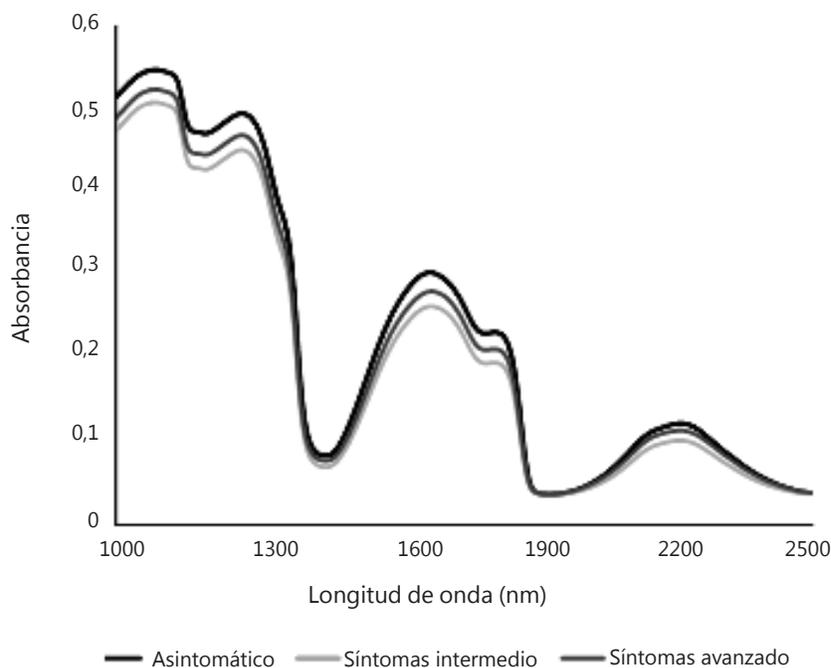


Figura 2. Promedio de los espectros de las muestras de hojas de crisantemo, analizadas en el rango del NIR (1.000 a 2.500 nm) para las categorías asintomáticas (línea negra), síntomas intermedios (línea gris clara) y avanzados (línea gris oscura).

La Figura 3A muestra la distribución de espectros de hojas de crisantemo asintomáticas o afectadas por amarillamiento, en un plano cartesiano cuyos ejes son los componentes principales de mayor significancia estadística. En general, se observan dos grupos de espectros. En la parte superior del plano, se agruparon la mayor cantidad de espectros de hojas calificadas como asintomáticas (círculos negros). En la parte inferior del plano, se combinaron en un segundo grupo los conjuntos de espectros de hojas clasificadas con síntomas intermedios (triángulos) o avanzados (cuadrados), sin que se diferencien claramente entre ellos. Cada punto en ese plano es una proyección de

los 1.501 valores de reflectancia infrarroja que componen el espectro de cada hoja analizada. En ese plano de componentes principales, la semejanza o relaciones entre espectros de cada hoja están representadas por la distancia o posición de los puntos en el plano (Cuadras, 2007). Los resultados indican que a excepción de una muestra, las hojas sin síntomas presentan correlación positiva con bandas espectrales correspondientes a las zonas de 1.124 a 1.392 y de 1.548 a 1.855 nm. Para las hojas con síntomas intermedios y avanzados las bandas espectrales corresponden a las zonas de 1.000 a 1.304 nm para los dos grupos de hojas.

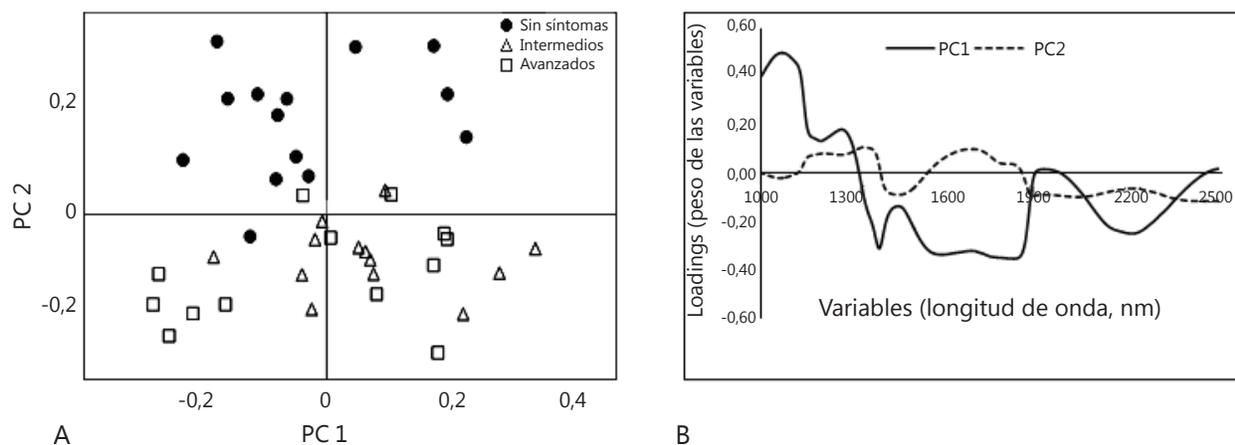


Figura 3. Análisis de componentes principales (PCA – Cluster) de 40 espectros de infrarrojo cercano obtenidos de hojas de crisantemo que fueron clasificadas previamente por agricultores en tres categorías de amarillamiento (A): Sin síntomas (círculos negros), síntomas intermedios (triángulos) y síntomas avanzados (cuadrados). Cada punto en el plano representa el espectro infrarrojo de una hoja de crisantemo. En (B), Longitudes de onda que mejor explican las componentes principales (PC1 y PC2, con valores positivos y alejados de la línea horizontal. Ver texto en sección de resultados).

La Figura 3B representa las longitudes de onda que conforman las componentes principales (PC1 y PC2) y el peso o importancia relativa de cada una de estas variables, al momento de establecer el modelo clasificatorio según las tres categorías de amarillamiento, definidas por el agricultor.

DISCUSIÓN

La mayoría de las hojas asintomáticas presentaron espectros diferentes a los que presentaron las hojas con síntomas. Esas diferencias al ser detectadas por espectroscopia infrarroja, sugieren que existen cambios significativos en la composición química o bioquímica de estos dos grupos de hojas. Esa diferenciación se observa más claramente a lo largo del eje vertical en el modelo descriptivo presentado en la Figura 3 A y es soportada por la contribución de bandas espectrales específicas que van de 1.000 a 1.124 nm para las hojas con síntomas intermedios y avanzados y de 1.548 a 1.855 nm para las hojas sin síntomas. De acuerdo con Workman y Weyer (2007), las bandas del primer grupo corresponden a estiramientos C-H de compuestos aromáticos y las del segundo grupo corresponden a estiramientos N-H de grupos aminos, amídicos y estiramientos C-H de grupos alifáticos. Esta información es importante porque permitiría dirigir la búsqueda

de los compuestos que explican el desarrollo de estos sistemas y posteriormente las causas de esta enfermedad. Aunque este modelo descriptivo es débil, debido al bajo número de muestras empleadas, estos resultados tienen varias implicaciones para entender esta y otras enfermedades en crisantemo, lo que permitiría diseñar estrategias para abordar su manejo anticipado y racional.

Al desarrollar librerías de espectros infrarrojos de hojas u otros tejidos de plantas en diferentes estados sanitarios o nutricionales, es posible detectar esos estados antes de que se presenten síntomas visibles al ojo humano (Liew *et al.*, 2008). Por ejemplo, en análisis posteriores en hojas de crisantemo de la misma variedad, pero de origen desconocido, podrían obtenerse espectros e interpolarse en un modelo clasificatorio más robusto, para detectar así el grado de amarillamiento de hojas. La misma estrategia de clasificación espectroscópica de hojas afectadas diferencialmente por una enfermedad, podría emplearse también en suelo o cualquier tipo de sustrato para prevenir la siembra de plantas sensibles en lugares inapropiados, o para conocer mejor la relación de esta enfermedad con otras condiciones bióticas o abióticas. Adicionalmente, al confirmar la asociación entre síntomas en hojas con bandas espectrales específicas, se podría definir con

alguna certeza si los síntomas que se presentan en diferentes lugares se asocian a las mismas condiciones bioquímicas en las plantas o si los síntomas son causados por los mismos agentes. Sin embargo, para lograr el mejor uso de este sistema deben analizarse un gran número de muestras de plantas y sustancias de referencia. A pesar de sus limitaciones, este estudio hace un aporte metodológico al uso del NIR, como herramienta diagnóstica en sanidad vegetal y para su implementación segura, haciéndose necesaria la participación del sector floricultor para lograr desarrollos posteriores. Los beneficios de mejorar esta herramienta descriptiva podrían entenderse mejor en el contexto de enfermedades altamente destructivas y de carácter cuarentenario internacional, como la roya blanca del crisantemo (De Backer *et al.*, 2011). En estados iniciales, el patógeno (*Puccinia horiana* Henn) puede infectar hojas asintóticamente antes de producir estructuras o daños visibles (De Backer *et al.*, 2011). Durante ese período de latencia es imposible detectar el patógeno en forma rápida en el campo, pero su presencia en la planta debe generar cambios cualitativos y cuantitativos de los compuestos detectables por espectroscopía NIR, ya que en esta técnica analítica la interacción radiación - tejido vegetal genera cambios energéticos relacionados con la vibración de los enlaces químicos C-H, N-H, O-H y S-H (Blanco y Villarroya, 2002). Algunos de esos enlaces se detectaron aquí y son comunes en compuestos vegetales cuyo tipo y concentraciones pueden alterarse por la interacción con patógenos.

Esta técnica podría usarse para análisis directos en el campo, ya que actualmente existen espectroscopios móviles muy pequeños, que se conectan vía USB a un computador portátil (ver por ejemplo: www.oceanoptics.com/; www.jdsu.com/), adicional a los espectroscopios fijos más robustos como el usado en este estudio. Es posible que al preparar librerías de espectros obtenidos de microorganismos y plantas afectadas diferencialmente por ellos, puedan detectarse en forma simple las estructuras mismas del patógeno o los compuestos de defensa producidos por la planta. En esta forma se dispondría de un sistema de diagnóstico rápido, barato, anticipado y objetivo basado en la detección directa del patógeno, sus moléculas o los cambios bioquímicos que se producen. Para nuestro conocimiento, esas condiciones no son posibles al usar otros métodos de diagnóstico.

Finalmente, la clasificación espectroscópica mejorará al incrementar el número de muestras en

librerías espectrales e incluir otras características cuantitativas de las hojas (Massart *et al.*, 2003), como concentración de nutrientes. Esto permitiría superar el grado de subjetividad asociado con la forma como se establecen los grupos sintomatológicos. Igualmente, debido a las características químicas y anatómicas de cada variedad vegetal, es necesario desarrollar librerías con suficiente número de espectros para cada combinación planta-enfermedad. Pero esa limitación se compensa con la rapidez y bajo costo de los análisis. Bajo las condiciones de operación de este estudio, se obtiene un espectro completo de una hoja en menos de un minuto y a un costo comercial de \$5.000 CP (aproximadamente US\$2,7 cada espectro).

CONCLUSIONES

Se desarrolló un modelo preliminar de detección espectroscópica NIR para el amarillamiento del crisantemo, a partir de material clasificado visualmente por los agricultores. La validación del modelo y el desarrollo posterior para detección de otras enfermedades dependerá del análisis espectroscópico de un mayor número de enfermedades y variedades de plantas, en ambientes biofísicos variables.

AGRADECIMIENTOS

Las muestras de hojas y su clasificación fueron suministradas por un agricultor que prefirió permanecer anónimo.

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, M. and I. Villarroya. 2002. NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21(4): 240-250.
- Cuadras, C.M. 2007. Nuevos métodos de análisis multivariante. CMC Editions, Barcelona. 249 p.
- Cozzolino, D. 2002. Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) en el análisis de alimentos para animales. *Agrociencia* 6(2): 25- 32.
- De Backer, M., H. Alaei, E. Van Bockstaele, I. Roldan-Ruiz, T. van der Lee, M. Maes and K. Heungens. 2011. Identification and characterization of pathotypes in *Puccinia horiana*, a rust pathogen of

Chrysanthemum x morifolium. European Journal of Plant Pathology 130(3): 325-338.

Liew, O.W., P.C.J. Chong, B. Li and A.K. Asundi. 2008. Signature optical cues: emerging technologies for monitoring plant health. Sensors 8(5): 3205-3239.

Massart, D.L., B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte and L. Kaufman. 2003. Chemometrics: A Textbook. Fifth edition. Elsevier Science B.V., Amsterdam. 488 p.

Woltz, S.S. 1978. Nonparasitic plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 16: 403-430.

Woltz, S.S. and C.R. Jackson. 1961. Production of yellow strapleaf of chrysanthemum and similar disorders by amino acid treatment. Plant physiology 36(2): 197-201.

Workman, J. and L. Weyer. 2007. Practical Guide to interpretative Near-Infrared Spectroscopy. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York. 332 p.