

# CRUDE PROTEIN PREDICTION OF HETEROGENEOUS MOUNTAIN GRASSLAND WITH VISIBLE-NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY

## PREDICCIÓN DE PROTEÍNA BRUTA CON ESPECTROSCOPIA VISIBLE E INFRARROJO CERCANO EN PASTOS HETEROGÉNEOS DE MONTAÑA

Maite **Gandariasbeitia**<sup>1</sup>, Gerardo **Besga**<sup>1</sup>, Isabel **Albizu**<sup>1</sup>, Santiago **Larregla**<sup>2</sup>, Sorkunde **Mendarte**<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>NEIKER-Basque Institute for Agricultural Research and Development. Conservation of Natural Resources Department. Berreaga, 1. Derio. E-48160. Spain (smendarte@neiker.eus).

<sup>2</sup>NEIKER-Basque Institute for Agricultural Research and Development. Plant Protection Department. Berreaga, 1. Derio. E-48160. Spain.

### ABSTRACT

Species-rich *Nardus* grasslands are some of the most widespread habitats in the European mountainous areas and its Crude Protein (CP) content is one of the nutritional properties studied for sustainable grazing management. Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) and Visible-Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (VNIRS) were reported to be alternative technologies to measure CP content in grass and forage. Despite being a fast, cheap and environmental-friendly method, issues related with sample presentation need to be considered, foremost in field conditions. The objective of this study was to evaluate the potential of VNIRS to estimate the CP content in heterogeneous species-rich *Nardus* grasslands for non-processed samples in field conditions (on-site) and processed samples scanned in laboratory conditions. The hypothesis was that accurate calibration models could be developed to predict CP content in heterogeneous grasslands for both sample presentation conditions. In this study, 103 samples of heterogeneous grass were scanned and collected for chemical analysis. Samples points were selected following a completely randomized experimental design considering spatial and temporal variability. Successful results ( $R_c^2 \geq 0.90$ ) were obtained for CP calibrations for both on-site and laboratory conditions. However, better predictive ability and better ratio of prediction deviation (RPD) were obtained for processed samples in laboratory conditions ( $R_p^2=0.93$  and  $RPD=4.01$ ) compared to non-processed samples in field conditions ( $R_p^2=0.81$  and  $RPD=2.43$ ). According to the results, it was concluded that accurate calibration model for CP estimation in heterogeneous species-rich *Nardus* grasslands was possible for processed samples in laboratory conditions. Conversely, calibration equation for

### RESUMEN

Las formaciones herbosas *Nardus*, con numerosas especies, son algunos de los hábitats más vastos de las zonas montañosas de Europa y su contenido de proteína bruta (CP) es una de las propiedades estudiadas para el manejo de pastoreo sustentable. La espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) y la espectroscopía visible e infrarrojo cercano (VNIRS) son tecnologías alternativas para medir el contenido de CP en pastos y forrajes. A pesar de ser un método rápido, barato y respetuoso con el ambiente, se deben tomar en cuenta problemas relacionados con la presentación de la muestra a considerar, en especial en condiciones de campo. El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de la VNIRS para estimar el contenido de CP en formaciones herbosas con *Nardus*, con numerosas especies, en muestras no procesadas en condiciones de campo (en el sitio) y muestras procesadas escaneadas en condiciones de laboratorio. La hipótesis fue que se pueden desarrollar modelos de calibración precisos para predecir contenidos de CP en pastos heterogéneos para ambas condiciones de presentación de muestras. En este estudio se recolectaron y escanearon 103 muestras de pasto heterogéneo para su análisis químico. Los puntos de muestreo se eligieron de acuerdo con un diseño experimental completamente aleatorio, considerando la variabilidad espacial y temporal. Resultados exitosos ( $R_c^2 \geq 0.90$ ) se obtuvieron para las calibraciones de CP, para condiciones en el campo y en el laboratorio. Además, se obtuvieron una mayor capacidad predictiva y una mejor proporción de desviación predictiva (RPD) para las muestras procesadas en condiciones de laboratorio ( $R_p^2=0.93$  y  $RPD=4.01$ ), en comparación con muestras no procesadas en condiciones de campo ( $R_p^2=0.81$  and  $RPD=2.43$ ). Según los resultados, se concluyó que un modelo preciso de calibración para la estimación de la CP en pastos heterogéneos de formaciones herbosas con *Nardus*, con numerosas especies, es posible para muestras procesadas en condiciones de laboratorio. En cambio, la ecuación de calibración para las mues-

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: July, 2018. Approved: October, 2018.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 53: 1105-1118. 2019.

non-processed samples in field conditions could be useful when quick response is needed in decision-making process. Thus, VNIRS can be used as an alternative technique to estimate CP content in heterogeneous grasslands for both field and laboratory conditions and it could be a useful tool in decision-making for sustainable grazing management.

**Key words:** mountain *Nardus* grasslands, field condition, feeding value, non-processed sampling calibration, Visible-NIRS.

## INTRODUCTION

Grazing is an important agricultural activity in mountainous areas and species-rich *Nardus* grasslands are some of the most widespread habitats in the European mountainous areas. Nevertheless, the area occupied by this habitat has declined in the last decades due to the intensification of agricultural practices and land abandonment or extremely low intensive use (Spiegelberger *et al.*, 2010). Both over- and under-grazing are conservation threats (Galvánek and Janák, 2008). Long-term existence of this habitat is closely related to traditional grazing management and regular grazing (Galvánek and Janák, 2008).

Nutritional properties of grass and forage need to be considered for sustainable grazing management. Traditionally, standard wet chemical methods are used to determine chemical nutritive value of forage. These methods are widespread although they are time-consuming and expensive. Therefore, a faster and cheaper but still reliable and accurate technique is needed and Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) and visible-Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (VNIRS) have become potential tools. VNIRS enables to analyze high number of samples in a short period time. Moreover, it is a non-destructive, cost effective and environmentally friendly (neither requiring reagents nor producing waste) method. The alternative technique was successfully applied for nutritional attributes such as nitrogen (N), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) of grass and forage (McClure *et al.*, 2002; Gislum *et al.*, 2004; Valdés *et al.*, 2006; Alomar *et al.*, 2009; Reddersen *et al.*, 2013; Godin *et al.*, 2015). However, this is a secondary analytical method that must be calibrated with reference values, being subject to the disadvantages arising from the reference method used for calibrations (Andrés *et al.*, 2005).

tras no procesadas en condiciones de campo podría ser útil cuando se requiere de una respuesta rápida en un proceso de toma de decisiones. Por ello, la VNIRS se puede usar como una técnica alternativa para estimar el contenido de CP en pastos heterogéneos en condiciones de campo y de laboratorio, y podría ser una herramienta útil en la toma de decisiones para el manejo del pastoreo sustentable.

**Palabras clave:** pastos *Nardus* de montaña, condición de campo, valor de alimentación, calibración de muestras no procesadas, NIRS visible.

## INTRODUCCIÓN

El pastoreo es una actividad agrícola importante en áreas montañosas y los pastizales de formas herbosas con *Nardus*, con numerosas especies, son algunos de los hábitats más vastos de las zonas montañosas de Europa. Sin embargo, el área abarcada por este hábitat se ha reducido en décadas recientes por la intensificación de prácticas agrícolas y el abandono de tierras o el uso intensivo muy bajo (Spiegelberger *et al.*, 2010). Tanto el sobrepastoreo como el subpastoreo representan amenazas a la conservación (Galvánek y Janák, 2008). La existencia en el largo plazo de este hábitat tiene una estrecha relación con el manejo de pastoreo tradicional y con el pastoreo regular (Galvánek y Janák, 2008).

Las propiedades nutricionales de pasto y forraje se deben tomar en cuenta para el manejo del pastoreo sustentable. Los de vía húmeda con reactivos químicos tradicionales se emplean para determinar el valor nutritivo del forraje. Estos métodos son comunes, aunque requieren mucho tiempo y son costosos. Por lo tanto, se necesita una técnica más rápida y barata pero confiable y precisa, y tanto la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) como la espectroscopía visible e infrarrojo cercano (VNIRS) se han convertido en herramientas imprescindibles. La VNIRS permite analizar un número alto de muestras en un corto periodo de tiempo. Además, es un método no destructivo, rentable y respetuoso con el ambiente (no requiere reactivos ni produce residuos). La técnica alternativa se aplicó con éxito para atributos nutricionales como nitrógeno (N), proteína bruta (CP), fibra detergente neutro (NDF) y fibra detergente ácido (ADF) de pasto y forraje (McClure *et al.*, 2002; Gislum *et al.*, 2004; Valdés *et al.*, 2006; Alomar *et al.*, 2009; Reddersen *et al.*, 2013; Godin *et al.*, 2015). Sin embargo, éste es un método analítico secundario

Currently, most research about grass nutritional studies with NIRS are applied to processed samples (García-Ciudad *et al.*, 1999; McClure *et al.*, 2002; Gislum *et al.*, 2004; Andrés *et al.*, 2005; Valdés *et al.*, 2006) due to the difficulties associated with high water content present in fresh samples. Although the effects of sample presentation need to be considered, a recent increase in research related to on-site conditions and non-processed samples can be found (McClure *et al.*, 2002; Alomar *et al.*, 2003; Alomar *et al.*, 2009; Ramoelo *et al.*, 2011; Reddersen *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2013). Difficulties associated with field conditions, such as the heterogeneous nature of samples and high moisture, are notable (Alomar *et al.*, 2003). These differences call for the consideration of larger and more diverse sample populations as well as increased calibration accuracy with method standardization (Reddersen *et al.*, 2013). In any case, quick response in non-processed samples is helpful in the decision-making process for sustainable management. Thus, different accuracy criteria are applied in both non-processed and processed sample calibrations (Terhoeven-Urselmans *et al.*, 2008; Reddersen *et al.*, 2013).

The objective of this study was to evaluate the potential of VNIRS technology to determine CP content in species-rich *Nardus* grasslands using a contact plant probe in non-processed samples in field conditions and the muglight probe in dried and ground processed samples scanned in laboratory conditions. The hypothesis was that it is possible to develop sufficiently accurate calibration models to assess CP content in species-rich grassland in both non-processed and processed.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling area

The study area was located in Aizkorri-Aratz Natural Park (9460 ha), in Basque Country, Northern Spain, where beech forest is the most important habitat (4530 ha), but from the livestock production point of view, species-rich *Nardus* grassland is the most important habitat (256 ha). The dominant species are the grasses *Agrostis capillaris* L. and *Festuca rubra* L., and the legume *Trifolium repens* L. Other grasses such as *Danthonia decumbens* (L.) DC, *Poa pratensis* L., and legumes such as *Medicago lupulina* L. and *Lotus corniculatus* L. appear with other species like *Bellis perennis* L., *Carex* sp., *Potentilla montana* Brot.,

que se debe calibrar con valores de referencia, y queda sujeto a las desventajas que puedan surgir por el método de referencia usado para calibrar (Andrés *et al.*, 2005).

La mayoría de los estudios nutricionales de pasto con NIRS se aplicaron a muestras procesadas (García-Ciudad *et al.*, 1999; McClure *et al.*, 2002; Gislum *et al.*, 2004; Andrés *et al.*, 2005; Valdés *et al.*, 2006) debido a las dificultades asociadas con el alto contenido de agua en muestras frescas. Si bien los efectos de la presentación de muestra se deben tomar en cuenta, se observa un aumento reciente en estudios relacionados con las condiciones *in situ* y muestras no procesadas (McClure *et al.*, 2002; Alomar *et al.*, 2003; Alomar *et al.*, 2009; Ramoelo *et al.*, 2011; Reddersen *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2013). Las dificultades relacionadas con las condiciones de campo son notables, tales como la naturaleza heterogénea de las muestras y la humedad alta (Alomar *et al.*, 2003). Estas diferencias demandan la consideración de poblaciones de muestreo más grandes y diversas, así como una mayor precisión en la calibración con una estandarización de métodos (Reddersen *et al.*, 2013). En cualquier caso, una respuesta rápida en muestras no procesadas es útil en la toma de decisiones para un manejo sustentable. Por ende, los diferentes criterios se aplican para calibraciones de muestras procesadas y no procesadas (Terhoeven-Urselmans *et al.*, 2008; Reddersen *et al.*, 2013).

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de la tecnología VNIRS para determinar el contenido de CP en formaciones herbosas con *Nardus*, con numerosas especies, usando una sonda de contacto para planta en muestras no procesadas bajo condiciones de campo y la sonda muglight en muestras secas y molidas escaneadas en condiciones de laboratorio. La hipótesis fue que es posible desarrollar modelos de calibración con precisión suficiente para determinar el contenido de PB en pastos ricos en especies, tanto para muestras procesadas como no procesadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de muestreo

El área de estudio se ubicó en el parque natural Aizkorri-Aratz (9460 ha), en el País Vasco, en el norte de España, donde los bosques de haya son el hábitat más importante (4530 ha), aunque desde el punto de vista ganadero, las formaciones

*Potentilla erecta* (L.) Raeuschel, *Galium saxatile* L., *Taraxacum* gr. *officinale* Weber, *Achillea millefolium* L., *Cerastium fontanum* Baumg., *Hieracium pilosella* L., *Luzula campestris* (L.) DC, etc., all of them form species-rich and high diversity grasslands.

### Grassland sampling, NIRS scanning and reference Crude Protein

In this study, temporal and spatial variability were considered, and randomly selected samples were collected throughout the study area. Grass samples were taken in May and October during two consecutive years (2007-2008) and spatial variability related to topography and orientation was considered to determine sampling points. Regarding on-site conditions, at each sampling point, a 50 x 50 cm square was marked, and twenty-five co-added scans were acquired using a VNIR reflectance instrument (LabSpec® 5000 NIR; ASD, USA) and a contact plant probe of optical fibre. An average spectrum was saved for each sample point. The spectral device was calibrated with a white spectralon tile at the beginning of the spectra acquisition procedure.

After spectra acquisition, the grass was cut, properly bagged and brought back to the laboratory for sample processing. In this case, samples were dried in an oven (60 °C, 48-96 h), ground to 1 mm and scanned in the laboratory using the same VNIR reflectance instrument but using the muglight probe (halogen light source integrated in a stable power system equipped with a quartz window on the top). Twenty-five co-added scans were acquired, and an average spectrum was saved for each sample.

In both cases, reflectance (R) measurements were acquired from 350 to 2500 nm with a spectral resolution of 3-10 nm intervals. This signal was converted to absorbance (A) values using  $A = \log(1/R)$  expression. The Indico Pro® (ASD, USA) software was used for spectra acquisition and The Unscrambler X® software was chosen for spectra pretreatment and calibration development. After removing the extremely noisy wavebands, 500-2400 nm full spectral range was used in the development process of calibration models.

Finally, chemical analyses were performed and CP (%) content was obtained in grass samples by determining N content by Kjeldahl (AOAC, 1999) and multiplying by 6.25.

Sample points were selected following a completely randomized experimental design considering spatial and temporal variability. Sampling was repeated at the beginning and at the end of sampling season in order to consider temporal variability during grazing season. At the end, 103 samples of heterogeneous grass were collected, VNIRS scanned (on-site and in laboratory conditions) and reference CP analysis were performed to develop calibration and prediction equations.

herbosas con *Nardus*, con numerosas especies, son el más importante (256 ha). Las especies gramíneas dominantes son *Agrostis capillaris* L. y *Festuca rubra* L., así como la leguminosa *Trifolium repens* L. Otras gramíneas, tales como *Danthonia decumbens* (L.) DC, *Poa pratensis* L., y leguminosas como *Medicago lupulina* L. y *Lotus corniculatus* L. aparecen con otras especies como *Bellis perennis* L., *Carex* sp., *Potentilla montana* Brot., *Potentilla erecta* (L.) Raeuschel, *Galium saxatile* L., *Taraxacum* gr. *officinale* Weber, *Achillea millefolium* L., *Cerastium fontanum* Baumg., *Hieracium pilosella* L., *Luzula campestris* (L.) DC, etc., los cuales forman pastizales ricos en especies y de alta diversidad.

### Muestreo de pastos, escaneo de NIRS y proteína bruta de referencia

En este estudio se tuvieron en cuenta la variabilidad temporal y espacial y se tomaron muestras elegidas al azar de toda el área de estudio. Las muestras de pasto se tomaron en mayo y octubre dos años consecutivos (2007-2008) y la variabilidad espacial relacionada a la topografía y orientación se consideró para determinar los puntos de muestreo. Con respecto a las condiciones en cada sitio, en cada punto de muestreo se marcó un cuadrado de 50 x 50 y se adquirieron veinticinco subréplicas de escaneo usando un instrumento VNIR de reflectancia (LabSpec® 5000 NIR; ASD, USA) y una sonda de fibra óptica de contacto para planta. Un espectro promedio se guardó para cada punto de muestreo. El dispositivo espectral se calibró con un blanco Spectralon de referencia al principio del procedimiento de adquisición de los espectros.

Después de adquirir los espectros, el pasto se cortó, embolsó y llevó al laboratorio para el procesamiento de muestras. Las muestras se secaron en un horno (60 °C, 48-96 h), se molieron a 1 mm y se escanearon en el laboratorio con el mismo instrumento de reflectancia VNIR, pero usando la sonda muglight (fuente de luz halógena integrada en un sistema de energía estable equipado con una ventanilla de cuarzo en la parte superior). Veinticinco subréplicas de escaneo se adquirieron y se guardó un espectro promedio para cada muestra.

En ambos casos se tomaron medidas de reflectancia (R) de 350 a 2500 nm con una resolución espectral de intervalos de 3-10 nm. Esta señal se convirtió a valores de absorbancia (A) usando la expresión  $A = \log(1/R)$ . El software Indico Pro® (ASD, USA) se usó para adquirir los espectros y el software The Unscrambler X® se eligió para el pretratamiento de espectros y desarrollo de calibraciones. Después de extraer las ondas de sonido extremadamente ruidosas, se utilizó un rango espectral completo de 500-2400 nm en el proceso de desarrollo de los modelos de calibración.

### Statistical analysis for calibration procedures

In this study, the external validation procedure was used to develop the calibration and prediction models. For that, sample population was split into randomly selected calibration (83 samples) and external validation populations (20 samples). Outliers were removed from the calibration population and, finally, the most significant 80 samples and specific wavelengths were used to determine the best calibration equation for both non-processed and processed samples. The use of cross-validation (CV) could be justified in those situations in which calibration samples are randomly selected or the calibration sample population is too small (Landau *et al.*, 2006; Towett *et al.*, 2013). However, in this study, the external validation procedure was applied because the CV procedure may give overly optimistic results (Landau *et al.*, 2006).

The complexity of the NIR signal requires the implementation on chemometric techniques. The most widely used scatter correction methods, Standard Normal Variate (SNV) and Multiplicative Scatter Correction (MSC) (Rinnan *et al.*, 2009) and spectral first and second derivatives pre-processing techniques were applied with the goal of reducing the un-modelled variability in the data. The SNV mathematical treatment corrects problems associated with the multiplicative interference and the particle size, while the MSC method prevents the effects of scattering (obtaining the same level of scatter for all the spectra) (Azzouz *et al.*, 2003). In addition, median filter smoothing pretreatment was applied in order to optimize the signal-to-noise ratio, especially for on-site acquired spectral data (Cen and He, 2007). After data treatment, spectra were able to incorporate sample component information.

The Partial Least Squares Regression (PLSR), a common multivariate method used for developing regression models from spectral information and reference analytical values (Soriano-Disla *et al.*, 2014), was performed with The Unscrambler<sup>®</sup> X software. This technique is one of the most widely applied for quantitative analyses. It is a powerful tool to calibrate multivariate data, which is the case of the VNIR spectra. This method has been previously developed with success to determine plant N concentrations in fresh and dried grass samples grown in greenhouse (McClure *et al.*, 2002; Gislum *et al.*, 2004) and in semiarid grasslands (García-Ciudad *et al.*, 1999).

Principal Component Analysis (PCA) was performed with the whole sample population as screening analysis in order to study possible samples grouping.

As in most studies, calibration models were evaluated in terms of the coefficient of determination for calibration ( $R_c^2$ ), the coefficient of determination for cross validation ( $R_{cv}^2$ ), the standard error of cross validation (SECV), the standard error of

Al final, se realizaron análisis químicos y se determinó el contenido de PB (%) en muestras de pasto al medir el contenido de N por Kjeldalh (AOAC, 1999) y multiplicar por 6.25.

Los puntos de muestreo se eligieron con un diseño experimental completamente aleatorio considerando la variabilidad espacial y temporal. El muestreo se repitió el principio y al final de cada campaña de muestreo para considerar la variabilidad temporal durante la temporada de pastoreo. Al final se recolectaron 103 muestras de pasto heterogéneo, se realizaron escaneos VNIRS (en el sitio y en condiciones de laboratorio), y se hicieron análisis de CP de referencia para desarrollar ecuaciones de calibración y predicción.

### Análisis estadístico para procedimientos de calibración

En este estudio se utilizó el procedimiento de validación externa para desarrollar los modelos de calibración y predicción. Para ello se dividió a la población de muestras en poblaciones de calibración (83 muestras) y de validación externa (20 muestras) elegidas al azar. Los casos atípicos de la población de calibración se removieron y al final se usaron las 80 muestras más significativas y longitudes de onda específicas para determinar la mejor ecuación de calibración, tanto para muestras procesadas como no procesadas. El uso de la validación cruzada (VC) se podría justificar en situaciones en las que las muestras de calibración son elegidas al azar o cuando la población para calibración es muy pequeña (Landau *et al.*, 2006; Towett *et al.*, 2013). Sin embargo, en este estudio aplicamos el procedimiento de validación externa porque el procedimiento de VC podría dar resultados demasiado optimistas (Landau *et al.*, 2006).

La complejidad de la señal NIR requiere la implementación de técnicas quimiométricas. Para ello se aplicaron los métodos de corrección de dispersión más usados, la Variante Normal Estándar (SNV) y la Corrección de Dispersión Multiplicativa (MSC) (Rinnan *et al.*, 2009), así como técnicas de preprocesamiento espectral de primeras y segundas derivadas con el fin de reducir la variabilidad no modelada en los datos. El tratamiento matemático VNS corrige problemas relacionados con la interferencia multiplicativa y el tamaño de partículas, mientras que el método MSC previene los efectos de la dispersión (obteniendo el mismo nivel de dispersión para todos los espectros) (Azzouz *et al.*, 2003). Además, se aplicó un pretratamiento de filtro medio para optimizar la proporción de señal y ruido, sobre todo para datos espectrales adquiridos en el sitio (Cen and He, 2007). Después del tratamiento de los datos, los espectros pudieron incorporar la información de los componentes de las muestras.

La regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR), un método multivariable común, usado para desarrollar modelos de

calibration (SEC), the standard error of prediction (SEP), and the ratio of prediction deviation (RPD). The final calibration models were selected according to the lowest errors and the highest  $R_c^2$ ,  $R_{cv}^2$  and RPD.

## RESULTS AND DISCUSSION

The CP content of the grassland exhibited a 7.29% difference between the maximum and minimum value, showing the temporal and spatial heterogeneity considered in the experimental design. In the Atlantic area of Northern Spain, in similar species-rich grassland, average of CP content showed a seasonal variability during the grazing period ranging from 13.28% in spring, to intermediate values in early summer (11.20%) and summer (10.30%), and with the lowest values in autumn (10.20%) (Bedia and Busqué, 2013).

CP values were slightly higher (14.79-22.08%) than those reported by Mandaluniz *et al.* (2009) near Gorbeia Natural Park (14.1±2.9%), and higher than those obtained by Dale *et al.* (2012) (15.22%) in *Agrostis capillaris* and *Festuca rubra* grassland. NIRS is a secondary method that requires a calibration set that assumed the uniformly distributed variability likely to be encountered in future samples (Andrés *et al.*, 2005; Godin *et al.*, 2015) and a wide range of reference values (Gislum *et al.*, 2004). In this case, these requirements were met in terms of distribution and analyzed data range (Table 1).

regresión de información espectral y valores analíticos de referencia (Soriano-Disla *et al.*, 2014), se realizó con el software The Unscrambler® X. Esta técnica es una de las más aplicadas para los análisis cuantitativos y es una herramienta poderosa para calibrar datos multivariados, que es el caso del espectro VNIR. Este método se desarrolló con éxito para determinar concentraciones de N en plantas en muestras frescas y secas de pasto cultivadas en invernadero (McClure *et al.*, 2002; Gislum *et al.*, 2004) y en pastizales semiáridos (García-Ciudad *et al.*, 1999).

Un Análisis de Componentes Principales (PCA) se realizó con toda la población de muestras como análisis de evaluación para estudiar el posible agrupamiento de muestras.

Al igual que en la mayoría de los estudios, los modelos de calibración se evaluaron en términos del coeficiente de determinación para la calibración ( $R_c^2$ ), el coeficiente de determinación para la validación cruzada ( $R_{cv}^2$ ), el error estándar de validación cruzada (SECV), el error estándar de calibración (SEC), el error estándar de predicción (SEP) y la proporción de desviación predictiva (RPD). Los modelos finales de calibración fueron elegidos según los errores menores y los  $R_c^2$ ,  $R_{cv}^2$  y RPD más altos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de CP del pasto presenta una diferencia de 7.29% entre los valores máximo y mínimo, y muestra la heterogeneidad temporal y espacial consideradas en el diseño experimental. En el área del Atlántico del norte de España, en pastos similares ricos en especies, un promedio de CP mostró una variabilidad estacional durante el periodo de pastoreo de entre

**Table 1.** Reference crude protein (CP) values (mean, SD, maximum, minimum and range), expressed in percentage, for calibration and prediction sample sets of both studied conditions, on-site non-processed and processed samples in laboratory conditions.

**Cuadro 1.** Valores de referencia de proteína bruta (CP) (media, SD, máxima, mínima y rango), expresados en porcentajes, para la calibración y conjuntos de muestras de predicción de ambas condiciones estudiadas, muestras *in situ* no procesadas y procesadas en condiciones de laboratorio.

CP (%)	n	mean	SD	max	min	range
Total population	103	18.24	2.03	22.08	14.79	7.29
Calibration set; non-processed, on-site	80	18.13	2.05	21.75	14.79	6.96
Prediction set; non-processed, on-site	20	18.62	2.11	22.08	15.32	6.76
Calibration set; processed, in laboratory	80	18.22	2.02	21.75	14.79	6.96
Prediction set; processed, in laboratory	20	18.63	2.05	22.08	15.32	6.76

n: data population, CP: crude protein, SD: standard deviation, mean: mean value, max: maximum value and min: minimum value ♦ n: población de datos; CP: proteína bruta; SD: desviación estándar; media: valor medio; max: valor máximo; min: valor mínimo.

VNIRS full spectral average (500-2400 nm) of heterogeneous species-rich *Nardus* grassland for non-processed on-site samples showed higher absorbance values than for processed samples in laboratory conditions. Spectra of fresh samples exhibited water absorption bands at 970, 1196, 1450 and 1932 nm (McClure *et al.*, 2002), similar to those peaks observed in on-site conditions (Figure 1). In addition, a strong absorption band at 672 nm was due to large amounts of chlorophyll (McClure *et al.*, 2002).

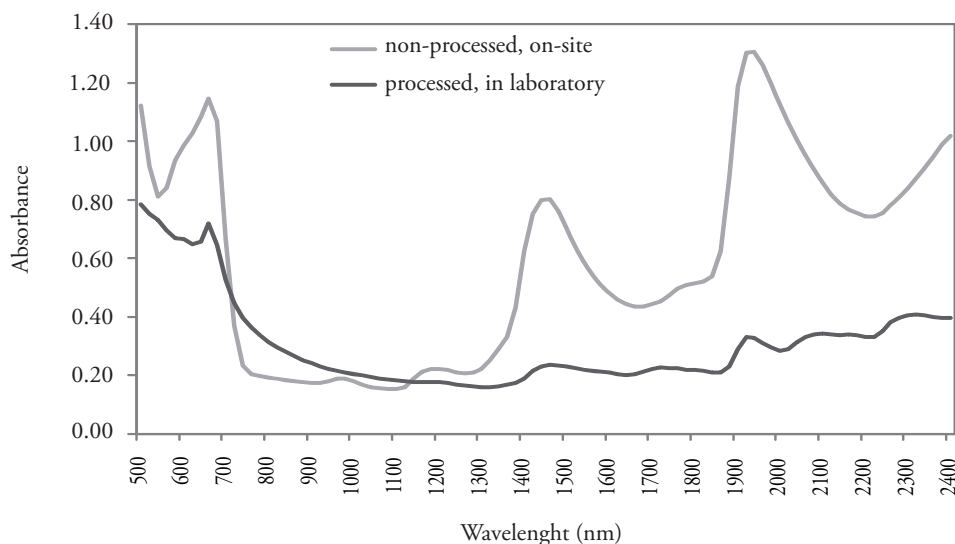
High water content in fresh grass samples presents some difficulties for NIRS analysis related to the heterogeneous nature of the samples and the water strong absorption signal which overlaps and can cause non-linear responses (Alomar *et al.*, 2003). At the same time, spectral differences due to sample presentation were relevant and the PCA clearly classified both populations and showed higher heterogeneity for on-site conditions (Figure 2).

NIRS full spectrum is likely to contain uninformative or redundant information which can affect the modeling predictive ability (Liu *et al.*, 2015). While many authors selected wavebands, i.e. wavelengths close to 2150 nm, which is the main band for protein estimation in forages (García-Ciudad *et al.*, 2004), this study proved to be sensitive to spectral range removal and better results were

13.28% en la primavera hasta valores intermedios al comienzo del verano (11.20%) y en verano (10.30%) y con los valores más bajos en otoño (10.20%) (Bedia y Busqué, 2013).

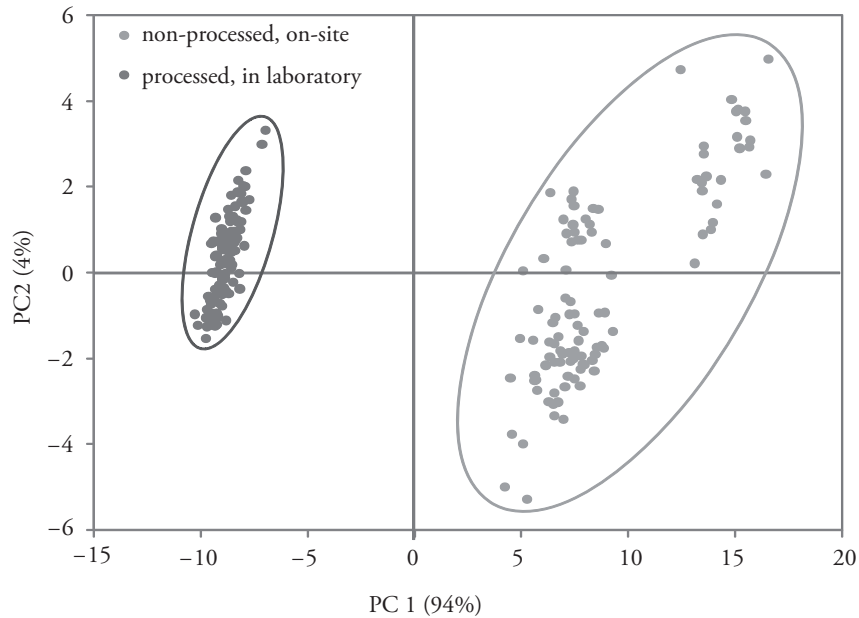
Los valores de CP fueron ligeramente más altos (14.79-22.08%) que los reportados por Mandaluniz *et al.* (2009) cerca del parque natural Gorbeia (14.1±2.9%) y más altos que los obtenidos por Dale *et al.* (2012) (15.22%) en pastos de *Agrostis capillaris* y *Festuca rubra*. El NIRS es un método secundario que requiere de una calibración que asume la variabilidad distribuida de manera uniforme factible de ser hallada en muestras futuras (Andrés *et al.*, 2005; Godin *et al.*, 2015) y una amplia variedad de valores de referencia (Gislum *et al.*, 2004). En este caso, estos requerimientos fueron satisfechos en términos de distribución y rangos de datos analizados (Cuadro 1).

El promedio completo espectral de VNIRS (500-2400 nm) de formaciones herbosas con *Nardus*, con numerosas especies, en muestras no procesadas *in situ* presentó valores mayores de absorbancia que para las muestras procesadas en condiciones de laboratorio. Los espectros de muestras frescas presentaron bandas de absorción de agua a 970, 1196, 1450 y 1932 nm (McClure *et al.*, 2002), similares a los picos observados en condiciones *in situ* (Figura 1). Además, una fuerte banda de absorción a 672 nm se debió a altas cantidades de clorofila (McClure *et al.*, 2002).



**Figure 1.** Absorbance average of NIRS spectrum acquired in heterogeneous species-rich *Nardus* grassland with contact probe for non-processed on-site samples and with muglight probe for processed samples in laboratory conditions (2007-2008).

**Figura 1.** Promedio de absorbancia del espectro NIRS adquirido en pastos *Nardus* rico en especies con sonda de contacto para muestras no procesadas *in situ* y con una sonda muglight para las muestras procesadas en condiciones de laboratorio (2007-2008).



**Figure 2.** Principal component analyses of non-processed on-site conditions spectra acquired with contact probe and processed samples in laboratory conditions spectra acquired with muglight probe (2007-2008).

Figura 2. Análisis de componentes principales de los espectros de condiciones *in situ* no procesados, adquiridos con una sonda de contacto y espectros de muestras procesadas en condiciones de laboratorio adquiridos con sondas muglight (2007-2008).

obtained when considering wide spectral ranges (García-Ciudad *et al.*, 2004; Reddersen *et al.*, 2013). Thus, a wide wavelength range selection was used for calibration of both sample presentations, non-processed (555-758, 840, 917-1008, 1042-1079, 1128-1265, 1301-1487, 1563-1580, 1629-1671, 1747-1756, 1873-2044, 2145-2261, 2340-2391 nm) and processed (1339, 1452-1509, 1571-1575, 1657-1757, 1969-2014, 2062-2146, 2226-2298 nm). Larger wavelength selection range was needed to improve non-processed samples on-site conditions calibration. At the same time, this was in concordance with authors which observed that more wavelengths were required in the calibration equations with increasing botanical heterogeneity (García-Ciudad *et al.*, 1999; Andrés *et al.*, 2005) and with none or lightly processed samples.

The efficiency of NIRS calibrations can be assessed by different statistical parameters such as  $R_c^2$ , SEC and RPD. Based on  $R_c^2$  classification used by many authors (Godin *et al.*, 2015), our results could be considered successful ( $R_c^2 \geq 0.90$ ) for non-processed on-site and processed in laboratory conditions (Table 2). Similarly, and in concordance

El alto contenido de agua en muestras frescas de pasto presenta algunas dificultades para el análisis de NIRS relacionado con la naturaleza heterogénea de las muestras y la señal de fuerte absorción de agua que se superpone y puede generar respuestas no lineales (Alomar *et al.*, 2003). Al mismo tiempo, las diferencias espectrales debidas a la presentación de muestras fueron relevantes y la PCA clasificó con claridad a ambas poblaciones y presentó una mayor heterogeneidad para condiciones *in situ* (Figura 2).

Es posible que el NIRS de espectro completo contenga información no instructiva o redundante que pueda afectar el potencial predictivo del modelo (Liu *et al.*, 2015). Muchos autores seleccionaron bandas de frecuencias, es decir, longitudes de onda cercanas a los 2150 nm, que es la banda principal para la estimación de proteínas en forrajes, (García-Ciudad *et al.*, 2004), pero el presente estudio demostró ser sensible a la extracción de rango espectral y se obtuvieron mejores resultados cuando se tomaron en cuenta rangos espectrales amplios (García-Ciudad *et al.*, 2004; Reddersen *et al.*, 2013). Por ello, se empleó selección amplia de longitudes de onda para calibrar tanto muestras no procesadas



with many authors (McClure *et al.*, 2002; Alomar *et al.*, 2003; Alomar *et al.*, 2009; Ramoelo *et al.*, 2011; Zhai *et al.*, 2013) our results seemed to be effective on-site in heterogeneous grassland and supported the potential of NIRS technology for fresh samples without the delay of the drying process. Previous  $R_c^2$  values obtained by other authors were in the range of 0.59 (Godin *et al.*, 2015) to 0.93 (Alomar *et al.*, 2009). However, in another study (González-Martín *et al.*, 2006) a value of  $R_c^2 = 0.991$  was obtained with a remote reflectance fiber-optic probe.

For dried and processed heterogeneous grassland samples our results were better than those obtained on-site (Table 2). Regarding the aforementioned difficulties, this research confirmed that results with wet samples are not as good as those for dried samples (McClure *et al.*, 2002; Reddersen *et al.*, 2013). Water absorption in the NIR region makes it difficult but does not stop spectrometric method of samples containing a high proportion of water, such as food, but proper multivariate calibration and validation are required (Azzouz *et al.*, 2003).

Some authors obtained excellent results ( $R_c^2=0.97$  and RPD=6.90 (Andrés *et al.*, 2005);  $R_c^2=0.98-0.99$  (García-Ciudad *et al.*, 1999)) in the determination of CP content in dried samples from permanent mountain meadows, characterized by a highly botanical diversity. However, another study ( $R_c^2=0.97$  and RPD=3.9) (Valdés *et al.*, 2006) highlighted that the prediction of the different N fractions was not so accurate.

(555-758, 840, 917-1008, 1042-1079, 1128-1265, 1301-1487, 1563-1580, 1629-1671, 1747-1756, 1873-2044, 2145-2261, 2340-2391 nm) como procesadas (1339, 1452-1509, 1571-1575, 1657-1757, 1969-2014, 2062-2146, 2226-2298 nm). Un rango mayor de longitud de onda se requirió para mejorar la calibración de muestras no procesadas en condiciones *in situ*. Al mismo tiempo, esto coincidió con autores que observaron que se requirieron longitudes de onda mayores en la calibración de ecuaciones a medida que aumentaba la heterogeneidad botánica (García-Ciudad *et al.*, 1999; Andrés *et al.*, 2005) y con muestras con poco o nulo procesado.

La efectividad de las calibraciones NIRS se puede evaluar con diferentes parámetros estadísticos tales como  $R_c^2$ , SEC y RPD. Con base en la clasificación  $R_c^2$  usada por muchos autores (Godin *et al.*, 2015), nuestros resultados se podrían considerar exitosos ( $R_c^2 \geq 0.90$ ) para condiciones de no procesado *in situ* y procesado en laboratorio (Cuadro 2). De manera similar y en concordancia con otros autores (McClure *et al.*, 2002; Alomar *et al.*, 2003; Alomar *et al.*, 2009; Ramoelo *et al.*, 2011; Zhai *et al.*, 2013), nuestros resultados parecen ser efectivos en el sitio en pastos heterogéneos y aumentaron el potencial de la tecnología NIRS para muestras frescas sin el retraso del proceso de secado. Valores de  $R_c^2$  obtenidos por otros autores entraron en el rango de 0.59 (Godin *et al.*, 2015) a 0.93 (Alomar *et al.*, 2009). Sin embargo, González-Martín *et al.* (2006) obtuvieron un valor de  $R_c^2 = 0.991$  con una sonda de fibra óptica de reflectancia remota.

**Table 2.** Calibration and validation statistics for partial least squares regressions (PLSR) methods of crude protein (CP) for heterogeneous grasslands for non-processed on-site conditions and processed samples in laboratory conditions.

**Cuadro 2.** Estadísticas de calibración y validación para los métodos de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR) de proteína bruta (CP) para pastos heterogéneos para condiciones no procesadas *in situ* y procesadas en condiciones de laboratorio.

	Mathematical pretreatments			$R_c^2$	CP Calibration			CP Prediction		
					SEC	$R_{cv}^2$	SECV	$R_p^2$	SEP	RPD
Non-processed, on-site	MSC	MF21	1DSG	0.94	0.51	0.81	0.92	0.81	0.91	2.43
Processed, in laboratory	SNV		1DSG	0.93	0.52	0.92	0.57	0.93	0.51	4.01

MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate, MF21: median filter 21, 1DSG: first derivative Savitzky-Golay,  $R_c^2$ : coefficient of multiple determination of calibration, SEC: standard error of calibration,  $R_{cv}^2$ : coefficient of determination for cross validation, SECV: standard error of cross validation,  $R_p^2$ : coefficient of multiple determination of prediction, SEP: standard error of prediction, and RPD: ratio of prediction deviation ♦ MSC: corrección de dispersión multiplicativa; SNV: variante normal estándar; MF21: filtro mediano 21., 1DSG: primero derivado Savitzky-Golay.,  $R_c^2$ : coeficiente de determinación múltiple de calibración; SEC: error estándar de calibración;  $R_{cv}^2$ : coeficiente de determinación para la validación cruzada; SECV: error estándar de validación cruzada;  $R_p^2$ : coeficiente de determinación múltiple de predicción; SEP: error estándar de predicción; RPD: proporción de desviación de predicción.

The RPD statistic is widely used to assess the predictive power, but different RPD classifications can be found in literature with application in grasslands (Reddersen *et al.*, 2013). RPD value obtained in the prediction models were higher than 2.0 for both non-processed and processed samples (Table 2). Non-processed on-site prediction model showed an RPD value slightly greater than 2.0 and greater than 4.0 in processed samples in laboratory conditions. According to some authors,  $RPD > 3$  is necessary to be acceptable (Cozzolino *et al.*, 2006) but others defended that  $RPD > 2.5$  implies excellent models (Zhai *et al.*, 2013) or  $RPD > 2.5-3$  correspond to good and excellent prediction accuracy, respectively (Nicolai *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015). In the case of non-dried samples,  $RPD \geq 2$  is acceptable (Reddersen *et al.*, 2013), or satisfactory when  $1.4 < RPD \leq 2$  and good when  $RPD > 2$  (Terhoeven-Urselmans *et al.*, 2008).

The usefulness of a NIRS prediction depends on the accuracy of the results with respect to reference data, the level of error accepted and how fast the results can be available to make management decisions (Alomar *et al.*, 2009). In field conditions, lower precisions and accuracy could be acceptable (Gislum *et al.*, 2004). In these conditions, the quick response may compensate for the accuracy lost. Thus, it could be very helpful if samples could be scanned in their fresh state and their composition or nutritional value predicted within acceptable limits. In this way, an approach for fast and reliable predictions in the field could be developed (Alomar *et al.*, 2009). On the contrary, in the case of processed samples in laboratory conditions, the calibration and prediction method require a time-consuming pre-processing of samples but with the advantage that do not need to be performed immediately (Gislum *et al.*, 2004).

Reference values and NIRS predicted values for CP are shown for non-processed on-site and processed in laboratory conditions, for both calibration (Figure 3) and prediction sample sets (Figure 4). Although differences between non-processed and processed sample populations were highlighted, the model for laboratory conditions was more accurate, prediction equations were effective for both sample presentations.

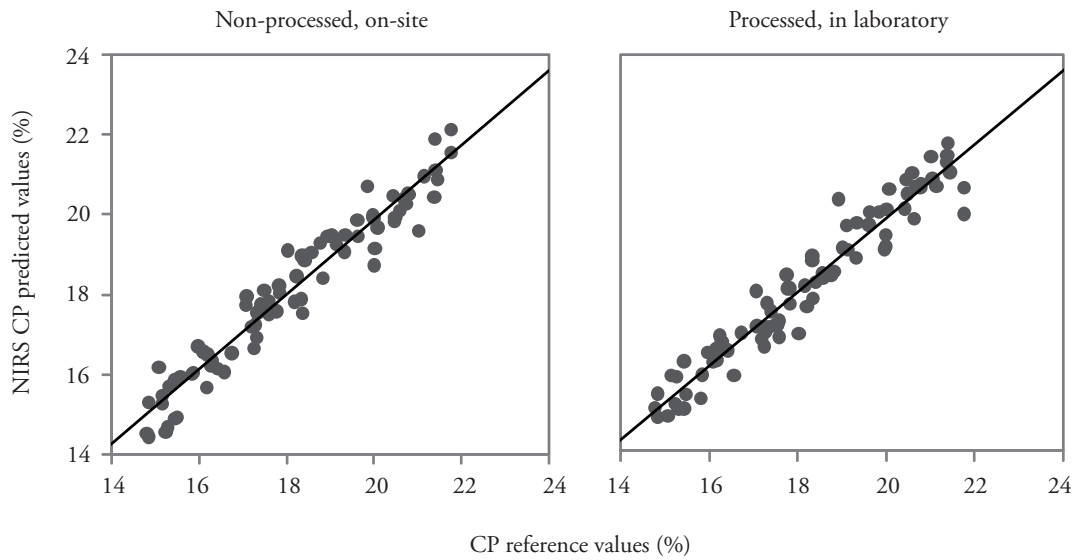
In order to avoid inter-annual variation problems and improve the calibration robustness, a large number of samples need to be incorporated to the

Para las muestras secas y procesadas de pastos heterogéneos, nuestros resultados fueron mejores que los obtenidos *in situ* (Cuadro 2). Con respecto a las dificultades ya mencionadas, esta investigación confirma que los resultados con muestras húmedas no son tan buenos como los obtenidos con muestras secas (McClure *et al.*, 2002; Reddersen *et al.*, 2013). La absorción de agua en la región NIR dificulta, pero no impide realizar el método espectrométrico de muestras con una elevada proporción de agua, tales como los alimentos, aunque sí se requiere una adecuada validación y calibración multivariable (Azzouz *et al.*, 2003).

Algunos autores obtuvieron excelentes resultados ( $R_c^2=0.97$  y  $RPD=6.90$ ; Andrés *et al.*, 2005) y  $R_c^2=0.98-0.99$  (García-Ciudad *et al.*, 1999) al determinar el contenido de PB en muestras secas de pastizos permanentes de montaña, caracterizados por una alta diversidad botánica. Sin embargo, otro estudio ( $R_c^2=0.97$  y  $RPD=3.9$ ) (Valdés *et al.*, 2006) destacó que la predicción de diferentes fracciones de N no fue tan precisa.

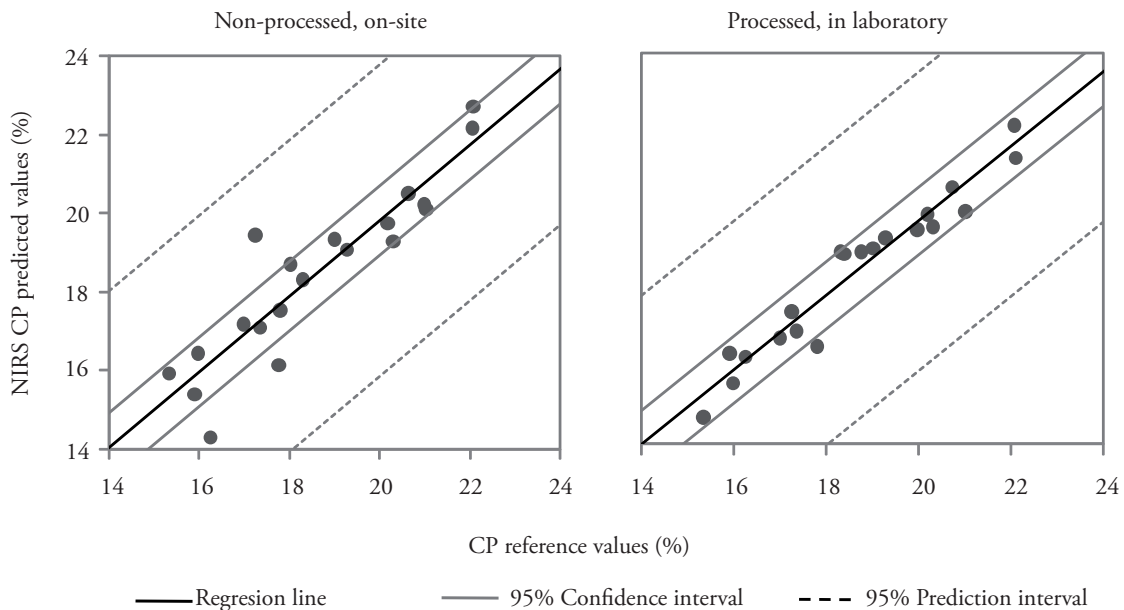
El estadístico de RPD tiene uso amplio para evaluar el poder predictivo, pero se pueden encontrar diferentes clasificaciones de RPD en la literatura con aplicación en los pastizos (Reddersen *et al.*, 2013). Los valores de RPD obtenidos en los modelos de predicción fueron mayores a 2.0, tanto para muestras procesadas como para no procesadas (Cuadro 2). El modelo de predicción *in situ* no procesado presentó un valor de RPD ligeramente mayor a 2.0 y mayor a 4.0 para muestras procesadas en condiciones de laboratorio. Según algunos autores, un  $RPD > 3$  es considerado necesario para ser aceptable (Cozzolino *et al.*, 2006), aunque otros defendieron que  $RPD > 2.5$  implica modelos excelentes (Zhai *et al.*, 2013) o  $RPD > 2.5-3$  corresponde a una precisión de predicción buena y excelente, respectivamente (Nicolai *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015). En el caso de muestras no secas, un  $RPD \geq 2$  es aceptable (Reddersen *et al.*, 2013), o satisfactorio cuando  $1.4 < RPD \leq 2$  y bueno cuando  $RPD > 2$  (Terhoeven-Urselmans *et al.*, 2008).

La utilidad de una predicción NIRS depende de la precisión de los resultados con respecto a datos de referencia, el nivel de error aceptado y cuan rápido se pueden hacer disponibles los resultados para tomar decisiones de manejo (Alomar *et al.*, 2009). En condiciones de campo, una precisión y exactitud menor podría ser aceptable (Gislum *et al.*, 2004). En estas



**Figure 3.** Relationships between PLSR-NIRS predicted and reference values of calibration equations for crude protein (CP), for non-processed on-site conditions and for processed in laboratory conditions (2007-2008).

**Figura 3.** Relaciones entre PLSR-NIRS predichas y valores de referencia de ecuaciones de calibración para la proteína bruta (CP), en condiciones *in situ* no procesadas y procesadas en condiciones de laboratorio (2007-2008).



**Figure 4.** Relationships between PLSR-NIRS Crude Protein (CP) predicted and reference values of prediction equations for non-processed on-site conditions and for processed in laboratory conditions. 2007-2008.

**Figura 4.** Relaciones entre PLSR-NIRS Proteína Bruta (CP) pronosticados y valores de referencia de ecuaciones de predicción para condiciones *in situ* no procesados y procesados en condiciones de laboratorio. 2007-2008.

calibration set. In this context, when the calibration set increases and a high variability is considered in relation to measured properties, better calibration results are expected (García-Ciudad *et al.*, 1999; Ruano-Ramos *et al.*, 1999; Gislum *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONS

The visible-near infrared spectroscopy technique has shown successful calibration results ( $R_c^2 \geq 0.90$ ) for crude protein determination in species-rich *Nardus* heterogeneous mountain grasslands in both studied conditions, on-site and laboratory. The obtained predictions were moderately successful for non-processed on-site samples ( $RPD > 2$ ) and successful for processed samples in laboratory conditions ( $RPD > 4$ ). Models accuracy could be improved with a greater temporal and spatial variability in the sampling population.

The models obtained might be applicable in both studied conditions, on-site with non-processed samples and in laboratory with processed samples. This technology could be an interesting alternative to chemical analyses. Large number of heterogeneous grass samples can be studied at low cost in a short period of time. Hence, visible-near infrared spectroscopy could be a useful tool for helping in conservation of species-rich *Nardus* mountain grasslands and its sustainable grazing management.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Basque Government (Department of Economic Development and Competitiveness). We feel very much obliged to Josean Elorrieta, Gorka Astola and Luis Ramos for field spectra acquisition help; Laura Rincón and laboratory colleagues for reference analysis and Ashley Dresser for her revision of the English text.

## LITERATURE CITED

- Alomar, D., R. Fuchslocher, and M. de Pablo. 2003. Effect of preparation method on composition and NIR spectra of forage samples. *Anim. Feed Sci. Technol.* 107: 191-200.
- Alomar, D., R. Fuchslocher, J. Cuevas, R. Mardones, and E. Cuevas. 2009. Prediction of the composition of fresh pastures by Near Infrared reflectance or interactance-reflectance. *Chil. J. Agr. Res.* 69: 198-206.
- Andrés, S., F. J. Giráldez, S. Lopez, A.R. Mantecon, and A. Calleja. 2005. Nutritive evaluation of herbage from permanent meadows by near-infrared reflectance spectroscopy: 1. Pre-

condiciones, una rápida respuesta podría compensar por la pérdida de exactitud. Por ello, sería muy útil si las muestras se pudieran escanear en su estado fresco y su composición o valor nutricional predicho dentro de los límites aceptables. De esta forma, se podría desarrollar un enfoque para hacer predicciones rápidas y confiables en el campo (Alomar *et al.*, 2009). Por el contrario, en el caso de muestras procesadas en condiciones de laboratorio, el método de calibración y predicción requieren un pre-procesamiento muy costoso, pero con la ventaja de que no es preciso reutilizarlos de manera inmediata (Gislum *et al.*, 2004).

Los valores de referencia y valores NIRS predichos se muestran para *in situ* no procesados y procesados en laboratorio, tanto para los conjuntos de muestra de calibración (Figura 3) como de predicción (Figura 4). Si bien las diferencias entre las poblaciones de muestras no procesadas y procesadas fueron resaltadas, el modelo para las condiciones de laboratorio fue más preciso, y las ecuaciones de predicción fueron efectivas para ambas presentaciones de muestras.

Para evitar problemas de variación interanual y mejorar la robustez de la calibración, una cantidad grande de muestras se debe incorporar al conjunto de datos de calibración. En este contexto, cuando el conjunto de datos de calibración aumenta y una alta variabilidad es considerada en relación con las propiedades medidas, se esperan mejores resultados en la calibración (García-Ciudad *et al.*, 1999; Ruano-Ramos *et al.*, 1999; Gislum *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

La técnica de espectroscopía visible e infrarrojo cercano ha arrojado resultados de calibración exitosos ( $R_c^2 \geq 0.90$ ) para la determinación de proteína bruta en pastos de montaña heterogéneos como las formaciones herbosas con *Nardus*, con numerosas especies, en ambas condiciones estudiadas: *in situ* y en laboratorio. Las predicciones obtenidas fueron moderadamente exitosas para muestras *in situ* no procesadas ( $RPD > 2$ ) y exitosas para muestras procesadas en condiciones de laboratorio ( $RPD > 4$ ). La precisión de los modelos podría mejorarse con una mayor variabilidad temporal y espacial en la población de muestreo.

Los modelos obtenidos se podrían aplicar en ambas condiciones estudiadas, tanto *in situ* con muestras no procesadas como en laboratorio con muestras procesadas. Esta tecnología podría ser una alternativa

- diction of chemical composition and in vitro digestibility. *J. Sci. Food Agric.* 9: 1564-1571.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) 1999. *Official Methods of Analysis of the Associations of Official Agricultural Chemists*, 16th Ed. Gaithersburg, USA. 1141 pp.
- Azzouz, T., A. Puigdoménech., M. Aragay, and R. Tauler. 2003. Comparison between different data pre-treatment methods in the analysis of forage samples using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and partial least-squares multivariate calibration method. *Anal. Chim. Acta* 484: 121-134.
- Bedia, J., and J. Busqué. 2013. Productivity, grazing utilization, forage quality and primary production controls of species-rich alpine grasslands with *Nardus stricta* in northern Spain. *Grass Forage Sci.* 68: 297-312.
- Cen, H., and Y. He. 2007. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci. Technol.* 18: 72-83.
- Cozzolino, D., A. Fassio, E. Fernández, E. Restaino, and A. La Manna. 2006. Measurement of chemical composition in wet whole maize silage by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129: 329-336.
- Dale, L. M., J. A. F. Pierna, P. Vermeulen, B. Lecler, A. D. Bogdan, I. Rotar, A. Thewis, and V. Baeten. 2012. Research on crude protein and digestibility of *Arnica montana* L. using conventional NIR spectrometry and hyperspectral imaging NIR. *J. Food Agric. Environ.* 10: 391-396.
- Galvánek D., and M. Janák. 2008. Management of Natura 2000 habitats \* Species-rich *Nardus* grasslands 6230. Directive 92/43/EEC on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. Technical Report 2008 14/24. 20 p. [http://ec.europa.eu/environment/nature/natura2000/management/habitats/pdf/6230\\_Nardus\\_grasslands.pdf](http://ec.europa.eu/environment/nature/natura2000/management/habitats/pdf/6230_Nardus_grasslands.pdf) (Access: September 2017).
- García-Ciudad, A., A. Ruano, F. Becerro, I. Zabalgoeazcoa, B. R. Vázquez de Aldana, and B. García-Criado. 1999. Assessment of the potential of NIR spectroscopy for the estimation of nitrogen content in grasses from semiarid grasslands. *Anim. Feed Sci. Technol.* 77: 91-98.
- García-Ciudad, A., B. Fernández Santos, B. R. Vázquez de Aldana, I. Zabalgoeazcoa, M. Y. Gutiérrez, and B. García-Criado. 2004. Use of near infrared reflectance spectroscopy to assess forage-quality of a Mediterranean shrub. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 35: 665-678.
- Gislum, R., E. Micklander, and J. P. Nielsen. 2004. Quantification of nitrogen concentration in perennial ryegrass and red fescue using near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) and chemometrics. *Field Crops Res.* 88: 269-277.
- Godin, B., R. Agneessens, J. Delcarte, and P. Dardenne. 2015. Prediction of chemical characteristics of fibrous plant biomasses from their near infrared spectrum: comparing local versus partial least square models and cross-validation versus independent validations. *JNIRS* 23: 1-14.
- González-Martín, I., N. Álvarez-García, and J. L. Hernández-Andaluz. 2006. Instantaneous determination of crude proteins, fat and fiber in animal feeds using near infrared reflectance spectroscopy technology and a remote reflectance fiber-optic probe. *Anim. Feed Sci. Technol.* 128: 165-171.
- Landau, S., T. Glasser, and L. Dvash. 2006. Monitoring nutrition in small ruminants with the aid of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) technology: A review. *Small Rumin. Res.* 61: 1-11.
- Liu, X., X. Zhang, Y. Z. Rong, J. H. Wu, Y. J. Yang, and Z. W. Wang. 2015. Rapid determination of fat, protein and amino acid content in coix seed using near-infrared spectroscopy technique. *Food Anal. Methods* 8: 334-342.
- Mandaluniz, N., A. Aldezabal, and L. M. Oregui. 2009. Atlantic mountain grassland-heathlands: structure and feeding value. *Span. J. Agri. Res.* 7: 129-236.
- McClure, W. F., B. Crowell, D. L. Stanfield, S. Mohapatra, S. Morimoto, and B. Graeme. 2002. Near infrared technology for precision environmental measurements: part 1. determination of nitrogen in green- and dry-grass tissue. *JNIRS* 10: 177-185.
- Nicolaï, B. M., K. Beullens, E. Bobelyn, A. Peirs, W. Saeys, K. I. Theron, and J. Lammertyn. 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biol. Tec.* 46: 99-118.
- Ramoelo, A., A.K. Skidmore, M. Schlerf, R. Mathieu, and I. M. A. Heitköning. 2011. Water-removed spectra increase the retrieval accuracy when estimating savannah grass nitrogen and phosphorus concentrations. *ISPRS J. Photogramm. Remote Sens.* 66: 408-417.
- Reddersen, B., T. Fricke, and M. Wachendorf. 2013. Effects of sample preparation and measurement standardization on the NIRS calibration quality of nitrogen, ash and NDFom content in extensive experimental grassland biomass. *Anim. Feed Sci. Technol.* 183: 77-85.
- Rinnan, A., F. W. Van Den Berg, and S. B. Engelsen. 2009. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trac Trend Anal. Chem.* 28: 1201-1222.
- Ruano-Ramos, A., A. García-Ciudad, and B. García-Ciudad. 1999. Near infrared spectroscopy prediction of mineral content in botanical fractions from semi-arid grasslands. *Anim. Feed Sci. Technol.* 77: 331-343.
- Soriano-Disla, J. M., L. J. Janik, R. A. Viscarra Rossel, L. M. MacDonald, and M. J. McLaughlin. 2014. The performance of visible, near-, and Mid-Infrared Reflectance Spectroscopy for prediction of soil physical, chemical and biological properties. *Appl. Spectrosc. Reviews* 40: 139-186.
- Spiegelberger, T., C. Deléglise, S. DeDanieli, and C. Bernard-

—Fin de la versión en Español—



- Brunet. 2010. Resilience of acid subalpine grassland to short-term liming and fertilisation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 137: 158-162.
- Terhoeven-Urselmans, T., H. Schmidt, R. G. Joergensen, and B. Ludwig. 2008. Usefulness of near-infrared spectroscopy to determine biological and chemical soil properties: Importance of sample pre-treatment. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1178-1188.
- Towett, E. K., M. Alex, K. D. Shepherd, S. Polreich, E. Aynekulu, and B.L. Maass. 2013. Applicability of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for determination of crude protein content in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves. *Food Sci. Nutr.* 1: 45-53.
- Valdés, C., S. Andrés, F. J. Giráldez, R. García, and A. Calleja. 2006. Potential use of visible and near infrared reflectance fractions for the estimation of nitrogen fractions in forages harvested from permanent meadows. *J. Sci. Food Agric.* 86: 308-314.
- Zhai, Y., L. Cui, X. Zhou, Y. Gao, T. Fei, and W. Gao. 2013. Estimation of nitrogen, phosphorus, and potassium contents in the leaves of different plants using laboratory-based visible and near-infrared reflectance spectroscopy: comparison of partial least-square regression and support vector machine regression methods. *Int. J. Remote Sens.* 7: 2502-2518.