



2022
Lleida

27 · 1
junio · juny
juliol · juliol

Cataluña
Catalunya

8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

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

8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

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

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales



Organiza

Uso de sensores hiperespectrales embarcados en RPAs como herramienta de caracterización de defensas químicas en masas forestales de *P. pinaster*

GARCÍA MATEOS, Á.^{1*}, DUARTE NAVALÓN, M.², FERNÁNDEZ MOVILLA, S.², ANA CAO³, LARRINAGA, A.R.³, ZAS, R.³, DEL BARRIO MARKAIDA, J.⁴

¹ Responsable de I+D+i del Grupo Igm-Zumain.

² Departamento de Vehículos Aéreos No Tripulados (VANT). Zumain Ingenieros.

³ Misión Biológica de Galicia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (MBG-CSIC). Apdo 28. Pontevedra 36080

⁴ Director del Grupo Igm-Zumain.

* agarciam@e-igm.com

Resumen

Muchas masas de pino de la Península tienen una situación sanitaria delicada. La puesta a punto herramientas de detección temprana de patologías y plagas sería una pieza clave en su gestión. En este trabajo se presentan los resultados de un estudio destinado a valorar las posibilidades de predecir la inversión en defensas químicas (terpenos) en las copas de árboles adultos de *Pinus pinaster* mediante imágenes hiperespectrales con RPAs.

La zona de estudio está conformada por masas distribuidas por diferentes M.U.P. en la provincia de Zamora, con diferentes estados fitosanitarios. Durante 2020, se realizaron simultáneamente 6 campañas de vuelos y de toma de muestras de hoja. En laboratorio se determinó la concentración y perfil de mono, sesqui y diterpenos mediante cromatografía de gases.

Los resultados indican la segregación de los pies estudiados en dos perfiles de terpenos bien diferenciados, con notables diferencias en los espectros aéreos entre los dos perfiles terpénicos. Mediante técnicas de *Machine Learning* se entrenó un modelo clasificador, que mostró hasta un 90% de éxito en predecir el perfil de terpenos. Los resultados se interpretan en función del posible origen de la variación química, bien genético como debido en una respuesta fenotípica frente a un ataque de perforadores.

Palabras clave

Hiperespectral, gestión, terpenos, *machine learning*, quemotipo, defensas químicas, fenotipado aéreo, sanidad forestal, RPAs,

1. Introducción

Distintos procesos asociados con el cambio global, como el aumento en la frecuencia y severidad de las sequías, la alta variación climática o la mayor incidencia de plagas y enfermedades, están comprometiendo el estado de conservación de nuestros bosques. En particular, la proliferación de plagas y enfermedades en los ecosistemas forestales aumenta a ritmos vertiginosos y convierte a la sanidad forestal en una pieza clave de la gestión forestal. La puesta a punto de herramientas de diagnóstico ágiles y eficaces es, por tanto, primordial.

En la actualidad, la caracterización fitosanitaria de los montes se sigue haciendo a pie de campo, de una manera en muchos casos muy subjetiva, basada en la experiencia de la persona que realiza la inspección, y limitada espacialmente a la capacidad de recorrer el monte que tenga dicho personal. En ocasiones se recogen muestras o se colocan trampas para mejorar dicha caracterización, pero el análisis de estas muestras y su interpretación son procesos costosos y lentos y no siempre arrojan conclusiones clarividentes.

El uso de técnicas de teledetección mediante aeronaves pilotadas por control remoto (RPAs) y sensores espectrales permiten muestrear de manera exhaustiva una mayor superficie, reducen los

costes de monitorización y podrían generar datos más objetivos y cuantificables para caracterizar una masa forestal y valorar su estado vegetativo (Dainelli *et al.*, 2021b) y sanitario (Cotrozzi, 2021). Su uso para la caracterización fenotípica de masas forestales está siendo objeto de intensa investigación (Dainelli *et al.*, 2021a), y se han registrado ya resultados exitosos para predecir una diversidad de variables fenotípicas de las hojas, como por ejemplo la superficie específica de hoja (LMA), la concentración de nutrientes e isótopos, o determinados componentes estructurales de las hojas (Feilhauer *et al.*, 2010; Serbin *et al.*, 2014; Ely *et al.*, 2019; Serbin *et al.*, 2019). Hasta el momento los mejores ajustes utilizando información espectral se han logrado para la caracterización de caracteres a nivel de hoja usando equipos de tierra, pero estos éxitos sientan las bases para su uso a nivel de copa. De hecho, el uso de la espectroscopía aérea para el seguimiento del estado sanitario se ha demostrado ya como una herramienta que permite trabajar a nivel de dosel y/o copa en masas forestales (Ensminger, 2020; Fallon *et al.*, 2020; Lordache *et al.*, 2020; Cotrozzi, 2021). En la medida que estas herramientas de fenotipado masivo sean efectivas detectando cambios en compuestos químicos defensivos de las hojas, serían de gran utilidad en las labores de policía para valorar el estado sanitario de las masas en las fases tempranas de afecciones sanitarias, permitiendo así anticiparse al problema. A su vez, este tipo de herramientas permitiría ayudar a entender cómo funcionan estas alteraciones sanitarias en sitios poco accesibles y controlados. Por último, el fenotipado sanitario masivo mediante espectrofotometría aérea se presenta como una herramienta de máximo valor para multitud de investigaciones en el ámbito forestal.

2. Objetivos

El objetivo principal del presente proyecto de investigación ha sido valorar la capacidad de la tecnología hiperespectral aérea como herramienta de caracterización fitosanitaria de masas forestales de *Pinus pinaster*. Este trabajo se plantea como el inicio de una línea de investigación orientada a ampliar esta caracterización a otros aspectos de la misma especie y de otras especies forestales. En la presente comunicación nos hemos centrado en el análisis de la capacidad predictiva de las firmas hiperespectrales aéreas de la producción de terpenos volátiles y no volátiles en las hojas de masas adultas de *Pinus pinaster* con estados sanitarios variables.

3. Metodología

El proyecto se desarrolla íntegramente en la provincia de Zamora, donde se levantan 8 parcelas de estudio de 20 metros de lado distribuidas en 3 Montes de Utilidad Pública. De esas 8 parcelas, 2 se localizan en el M.U.P. Sahu (término municipal de Alcañices), 2 en M.U.P. Terneros (término municipal de Rábano de Aliste) y las últimas 4 en el monte Urrieta las Corceras (término municipal de Trabazos; Figura 1). La localización de las parcelas es estratégica, puesto que entre todas recogen una variabilidad de estados de vigor y sanitario (estimación visual) a pesar de contar con una calidad de estación de características similares. El monte de Alcañices se ha seleccionado porque goza en general de buen estado vegetativo, sirviendo a efectos del estudio como zona de control. Las 2 parcelas de Rábano Aliste se encuentran en un monte con visibles signos de decaimiento, pero se desconocen los motivos de dicho decaimiento. El principal sospechoso es una afección fúngica, probablemente del suelo, aunque en el momento del estudio y con la información recopilada no se ha podido confirmar el (o los) agente(s) del decaimiento. Por último, las 4 parcelas de Trabazos se sitúan muy próximas a una zona enclavada en Portugal con un historial reciente de haber sufrido fuertes ataques de *Ips* sp. Las parcelas de Trabazos todavía no muestran signos evidentes de daño.



Figura 1. Croquis situación de las 8 parcelas de estudio, todas ellas masas regulares adultas de *Pinus pinaster*.

Previamente a la toma de datos hiperespectrales se realizó un levantamiento inicial de las parcelas objeto de estudio. Para ello se marcaron los vértices de cada parcela con estacas, se tomaron imágenes del área, se identificaron todos los pies con un ID unívoco, se tomaron sus coordenadas GPS y se midieron (altura total y diámetro normal), anotándose la presencia de síntomas de enfermedad y/o plagas. Con los datos de este inventario y con las parcelas delimitadas, se seleccionaron 7 pies representativos de la variabilidad existente en cada parcela, buscando siempre árboles con ramas a la mayor altura posible y suficientes ramas para realizaren los muestreos previstos. En cada uno de los árboles seleccionados (56 en total) se muestrearon acículas del crecimiento de ese mismo año de la parte superior de la copa en orientación oeste. Se realizaron un total de 6 muestreos a lo largo de la estación de crecimiento de 2020 coincidiendo con los vuelos hiperespectrales (desde junio hasta octubre aproximadamente cada 3 semanas, Tabla 1). Una vez se cortaron los ramilletes, se extrajo la muestra de acículas (ca. 250 g f.w.) que se almacenó en frío (4° C) y al vacío en bolsas de plástico herméticas. Las muestras se enviaron inmediatamente al laboratorio (MBG-CSIC) donde se realizaron las extracciones para análisis químicos sobre el material fresco. En el presente trabajo nos focalizaremos en el contenido y perfil de terpenos volátiles (mono y sesquiterpenos) y no volátiles (diterpenos). Las extracciones se hicieron en hexano ultrapuro usando dodecano y pentadecano como estándares internos. Tras vibración (vortex), sonicación (20 min) y extracción en oscuridad a temperatura ambiente (24 h), el sobrenadante se recuperó en viales cromatográficos de 1.5 ml. Una segunda alícuota del extracto en hexano se secó bajo flujo de N₂, se rediluyó en metanol con ácido heptadecanoico como estándar interno, y se derivatizó añadiendo tetramethylammonio hidroxido. Tanto para terpenos volátiles como para no volátiles, la separación y cuantificación de terpenos se realizó por cromatografía de gases en un GC-FID (Clarus 500, Perkin Elmer, MA, USA) equipado con una columna capilar Elite-5 (30 m, ID 0.25 mm, film thickness 0.25 µm, Perkin Elmer, MA, USA) acoplada a un detector de ionización de llama (FID) y con la ayuda del software Total Chrom Navigator (Perkin Elmer, MA, USA). Las condiciones del horno y del procedimiento empleado en la

inyección de las muestras puede consultarse en Suárez-Vidal et al. (2019). La identificación de picos se realizó comparando los tiempos de retención y los índices Kovat (estimados a partir de series comerciales de alcanos inyectadas cada 10 muestras) con los tiempos de retención y los índices kovats publicados en librerías públicas y en trabajos previos del equipo (López-Goldar et al., 2018; López-Goldar et al., 2019; Suarez-Vidal, 2019). El área de detección mínima se fijó en 5000 unidades de área tanto para terpenos volátiles como para no volátiles. La estimación de la concentración de cada compuesto se determinó en relación a la señal de los estándares internos y se presenta en mg g^{-1} .

Para la realización de los vuelos hiperespectrales se empleó un RPA DJI Matrice 600 Pro que se adaptó para integrar el sensor hiperespectral nano-Hyperspec de la marca Headwall. Este sensor cubre las longitudes de onda de 400 a 1000 nm mediante 272 bandas espectrales, 640 bandas espaciales y una dispersión de 2,2 nm/píxel.

La programación de los vuelos se realizó a una altura de 114 metros constantes sobre el terreno obteniendo imágenes espectrales con un Ground Sampling Distance (GSD) de 5 cm/píxel. A esta altura el ancho que captura el sensor es de 32 metros abarcando una parcela de 20 metros con margen suficiente a ambos lados. El calendario de vuelos se adaptó a las condiciones meteorológicas y ambientales, evitando días de lluvia y viento por seguridad de la operación y priorizando días soleados para una mejor calidad en la captura de datos. Coincidiendo con los muestreos de campo, se realizaron un total de 6 campañas de vuelo sobre cada parcela (Tabla 1).

Tabla 1. Fechas de vuelo y de los muestreos asociados de material vegetal en las tres zonas de estudio para las 6 campañas realizadas en 2020.

Campaña	Alcañices	Rábano Aliste	Trabazos
1	28-jun	29-jun	30-jun
2	19-jul	20-jul	21-jul
3	12-ago	13-ago	14-ago
4	01-sep	02-sep	03-sep
5	23-sep	24-sep	25-sep
6	15-oct	16-oct	17-oct

Para garantizar la integridad de los datos capturados, los vuelos se realizaron en las horas centrales del día y con cielo despejado. La comparación entre diferentes parcelas y vuelos requiere la obtención de medidas absolutas de reflectancia, para lo cual, es preciso realizar una calibración radiométrica de las imágenes obtenidas. En primer lugar, se calibró la exposición del sensor, para lo cual se realizó una captura de una superficie muy reflectante y con iluminación directa *in situ*, cuyo valor se tomó como referencia de reflectancia máxima, permitiendo así ajustar el tiempo de exposición para una óptima captura de datos. En segundo lugar, se emplearon 3 paneles patrón que servirán para realizar la corrección radiométrica en gabinete. Estos paneles, con reflectancias de referencia de 2%, 23% y 44%, se colocan a plena luz en un área despejada y se capturan cuando el dron inicia el vuelo.

Una vez obtenidas las imágenes hiperespectrales en valores de reflectancia se empleó el algoritmo de clasificación no supervisada K-means para separar los píxeles de la imagen en *k* *clústeres* basándose en los valores espectrales. Esto permitió seleccionar aquellos que contenían acículas bien iluminadas, descartando el resto tales como suelo, copa en sombra o tronco.

Sobre las imágenes filtradas se digitalizaron los pies de interés en cada vuelo y parcela para extraer los valores de reflectancia medios de la copa y su desviación típica para cada longitud de onda mediante software GIS.

La variabilidad multidimensional en el perfil de terpenos se sintetizó mediante 2 análisis de componentes principales aplicados de forma independiente sobre la fracción volátil (monoterpenos y sesquiterpenos) y la no volátil (diterpenos). En estos análisis sólo se consideraron los terpenos mayoritarios tanto por su representatividad (presentes en más del 75% de las muestras analizadas) como por su concentración ($> 0.5\%$ respecto al total de terpenos de cada tipo en la muestra). Se trabajó con la matriz de varianzas y se obtuvo una solución sin rotación. El análisis de componentes principales de la fracción de diterpenos permitió la clasificación de los perfiles químicos de las muestras analizadas (56 árboles x 6 muestreos temporales) en dos perfiles bien diferenciados, denominados A y B.

Mediante combinaciones de los valores de reflectancia se generaron 53 índices espectrales de vegetación, descartando las 20 primeras bandas y las 20 últimas ya que según el fabricante tienen un alto nivel de ruido. De esta manera se obtuvieron 285 variables explicativas sobre las que se realizó una selección empleando el algoritmo de decisión Boruta que determina si una variable aporta información relevante.

Se separó el 80% de la muestra para entrenamiento del modelo clasificador y se reservó el 20% restante para su validación. Se evaluaron 10 algoritmos (Tabla 2) de aprendizaje mediante validación cruzada empleando los datos de entrenamiento, tanto estandarizados como sin estandarizar. Finalmente, se realizó el ajuste de los parámetros de los algoritmos de aprendizaje con mejor puntuación.

Tabla 2. Algoritmos de aprendizaje evaluados mediante validación cruzada.

Logistic Regression	C-Support Vector Classification
Linear Discriminant Analysis	Adaptive Boosting Classifier
k-nearest neighbors Classifier	Gradient Boosting Classifier
Decision Tree Classifier	Random Forest Classifier
Gaussian Naive Bayes	Extra Trees Classifier

4. Resultados

El análisis de cromatografía permitió identificar un total de 44 terpenos volátiles (mono y sesquiterpenos) y 20 terpenos no volátiles (diterpenos) de los que 8 monoterpenos, 13 sesquiterpenos y 9 diterpenos cumplieron los criterios de selección (presentes en $> 75\%$ de las muestras y concentración relativa superior al 0.5%) y fueron considerados en los subsiguientes análisis. La fracción de monoterpenos estuvo dominada por α -pineno (39%) y β -pineno (16%), con presencia importante también de mirceno, 3-careno y limoneno / β -phelandreno (no distinguibles con la columna utilizada). En el caso de los sesquiterpenos, el perfil estuvo dominado por Germacrene D / α -Amorphene (28.1%) y trans- β -Caryophyllene (17.7 %) y, en menor medida, por β -Gurjunene, α -Humulene, α -Muurolene y δ/γ -Cadinene. Los compuestos mayoritarios en la fracción de diterpenos fueron los ácidos abiético (21%), dehidroabiético (13%) e isopimárico + unknown (24%) (Tabla 3).

El análisis de componentes principales de la fracción de diterpenos permitió sintetizar la variación multivariante de forma eficaz. Los 2 primeros componentes principales explicaron, en

conjunto, el 68% de la varianza total (Figura 2A). La contribución de los distintos compuestos a cada uno de estos dos ejes se muestra en la figura 2A. La representación de las muestras analizadas sobre el espacio dimensional formado por estos dos ejes permitió distinguir dos perfiles terpénicos bien diferenciados (denominados perfiles A y B) (Figura 2B). Todos los árboles muestreados en las 8 parcelas presentan el mismo perfil a lo largo de los distintos muestreos. Sin embargo, el porcentaje de árboles de cada perfil varió de forma significativa entre parcelas (Tabla 4). En las parcelas de Alcañices y Rábano-Aliste el perfil dominante fue el A, mientras que en las de Trabazos, el porcentaje de árboles de cada perfil fue variable dependiendo de la parcela (Tabla 4). En las parcelas 5 y 6 dominó el perfil B mientras que en las 4 y 5, ambos perfiles estaban presentes en porcentajes parecidos (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración promedio (y error estándar) de los mono, sesqui y diterpenos mayoritarios en las acículas de árboles adultos de *Pinus pinaster* en las 8 parcelas de investigación de la provincia de Zamora (N = 336).

Compuesto	Mean + s.e. (mg g ⁻¹)	Compuesto	Mean + s.e. (mg g ⁻¹)
MT02: α -Pinene	0.913 \pm 0.038	DT01: Unk01	1.499 \pm 0.154
MT03: Camphene	0.009 \pm 0.001	DT03: Unk02	0.726 \pm 0.069
MT05: β -Pinene	0.826 \pm 0.038	DT04: Pimaric acid	0.426 \pm 0.014
MT06: Myrcene	0.274 \pm 0.016	DT05: Sandaracopimaric acid	0.599 \pm 0.035
MT07: 3-Carene	0.124 \pm 0.015	DT07: Isopimaric acid + Unk	7.827 \pm 0.505
MT08: Limonene/ β -Phellandrene	0.136 \pm 0.008	DT08: Levopimaric/Palustric	0.867 \pm 0.036
MT09: <i>trans</i> - β -Ocimene	0.020 \pm 0.001	DT09: Arachidic acid C20:0/Unk	0.943 \pm 0.066
MT10: α -Terpinolene	0.033 \pm 0.002	DT11: Dehydroabietic acid	3.995 \pm 0.295
SQ03: α -Copaene	0.054 \pm 0.001	DT14: Abietic acid	6.775 \pm 0.476
SQ06: β -Cubeben / Sativen / β -Elemene	0.030 \pm 0.001	SQ15: Germacrene D/ α -Amorphene	1.309 \pm 0.037
SQ09: <i>trans</i> - β -Caryophyllen	0.838 \pm 0.019	SQ16: Phenethyl 2-methylbutyrate	0.087 \pm 0.013
SQ10: β -Gurjunene	0.160 \pm 0.004	SQ18: α -Murolene	0.133 \pm 0.004
SQ11: <i>trans</i> -Isoeugenol ^P	0.065 \pm 0.002	SQ20: γ -Cadinene	0.170 \pm 0.005
SQ12: α -Humulene	0.185 \pm 0.004	SQ21: Germacrene D-4-ol	0.233 \pm 0.007
SQ14: α -Amorphene	0.157 \pm 0.005	SQ26: SQunk06	0.017 \pm 0.001

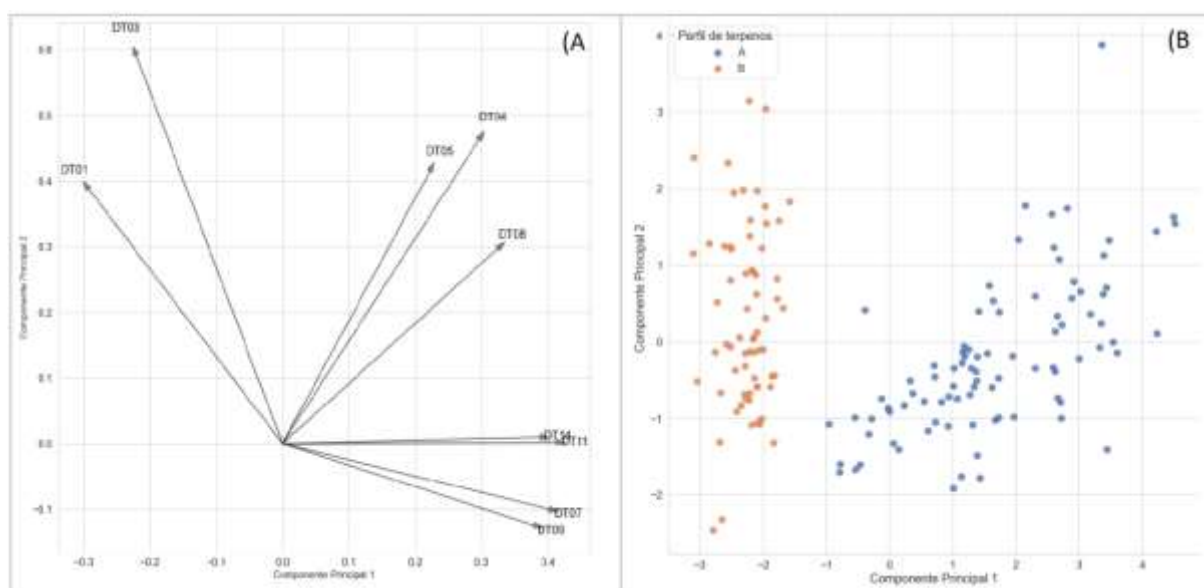


Figura 2. Resumen del análisis de componentes principales de la fracción de diterpenos o terpenos no volátiles. El panel A muestra la contribución de los distintos compuestos en los dos primeros ejes principales, que explican 54.1 y 13.6% de la varianza total multivariante, respectivamente (ver Tabla 2 para nombre de cada compuesto). El panel B muestra la distribución de las distintas mediciones (6 muestreos para cada árbol) en el espacio bidimensional formado por estos dos primeros componentes principales. Se aprecia una clara separación entre dos perfiles de diterpenos, coloreados de rojo y azul.

Tabla 4. Distribución de perfiles de diterpenos por zona y parcela.

	Perfil A	Perfil B	Total	% B
Alcañices	13	1	14	7,1
Parcela 1	6	1	7	14,3
Parcela 2	7	0	7	0,0
Trabazoss	7	21	28	75,0
Parcela 3	2	5	7	71,4
Parcela 4	4	3	7	42,8
Parcela 5	0	7	7	100,0
Parcela 6	1	6	7	85,7
Rábano Aliste	14	0	14	0,0
Parcela 7	7	0	7	0,0
Parcela 8	7	0	7	0,0
Total	34	22	56	39,3

En el caso del mono y sesquiterpenos la información multivariante fue más difícil de sintetizar. Los 4 primeros componentes principales (todos con autovalores superiores a 1) explicaron un 76% de la varianza total. Cuando se representan las muestras analizadas sobre el espacio que generan estos ejes principales agrupándolas según los dos perfiles diferenciados a partir del análisis de

diterpenos (Figura 1), se aprecia que el perfil de mono y sesquiterpenos también es marcadamente diferente entre los dos perfiles, si bien la segregación no es tan determinante como lo era para los diterpenos (Figura 2)

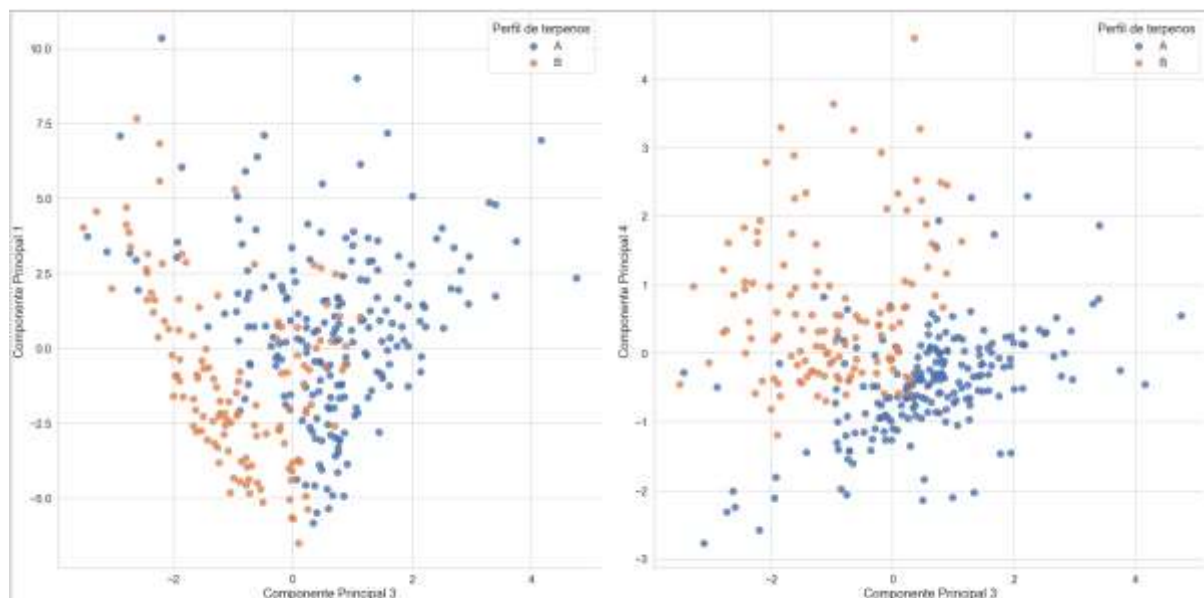


Figura 3. Representación gráfica de la distribución de las muestras analizadas sobre el espacio biodimensional formado por el primer y tercer (Panel A) y el tercer y cuarto (panel B) componente principal obtenidos en un análisis de componentes principales de la fracción no volátil de terpenos (mono y sesquiterpenos). Las muestras se representan en función del perfil diferenciado a partir del análisis del perfil de diterpenos. Las figuras ilustran que ambos perfiles también muestran perfiles diferenciados de mono y sesquiterpenos.

Como primera aproximación a la posible discriminación de estos dos perfiles mediante teledetección con sensor hiperespectral se calculó el perfil espectral medio de los árboles de cada perfil para evaluar si éstos difieren entre sí (Figura 4). El espectro de ambos perfiles se separa de forma clara a partir de la banda espectral 730nm, con reflectancias mayores en el perfil B que en el A. Este resultado dio un primer indicio de que era viable entrenar un modelo clasificador.

Tras el ajuste, el modelo clasificador entrenado presenta una precisión de 0,9 en los datos de validación empleando 60 variables predictivas, tal como se muestra en la Tabla 5. Estas variables se componen de 28 índices espectrales y 32 bandas. Estas bandas se pueden agrupar en 4 grupos, 1 en la zona verde del espectro y los otros 3 en la zona del infrarrojo cercano. Estos grupos abarcan un intervalo de 40-50 nanómetros de longitud de onda, muy similar al rango de sensores multispectrales de menor coste.

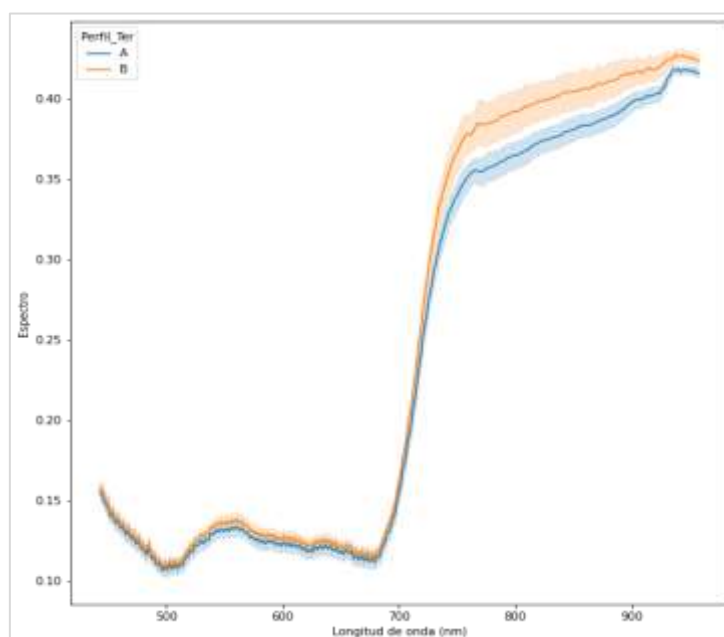


Figura 4. Perfil espectral medio (\pm desviación típica) de los pies clasificados según su perfil de diterpenos (Perfil A representado en azul y perfil B representado en naranja).

Tabla 5. Resumen de resultados de la capacidad predictiva del modelo entrenado para clasificar el perfil químico de terpenos de árboles de *P. pinaster* a partir de imágenes hiperespectrales tomadas desde dron.

Entrenamiento				Validación			
		Observado				Observado	
		A	B			A	B
Predicho	A	163	0	Predicho	A	38	3
	B	0	106		B	4	23
Precisión		100%		Precisión		89,70 %	
Sensibilidad		100%		Sensibilidad		90,48 %	
Especificidad		100%		Especificidad		88,46 %	

5. Discusión

El análisis de componentes principales revela dos perfiles claramente diferenciados de diterpenos, perfiles que se mantuvieron estables en los distintos pies a lo largo de los seis muestreos estacionales relacionados. Los perfiles de diterpenos descritos podrían corresponderse con distintos quemotipos de origen genético. La presencia de quemotipos bien diferenciados con perfiles contrastados de terpenos ha sido descrita previamente tanto entre como dentro de poblaciones en distintas especies de pino (Rodríguez *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2020). Los diferentes quemotipos podrían, por tanto, proceder de diferentes procedencias que habrían servido de material de origen en el momento de plantación de las distintas masas o podrían corresponderse con distintos genotipos que cohabiten en una o varias de las procedencias utilizadas. En cualquier caso, la constancia en el tiempo de los perfiles detectados en cada individuo y su patrón de

distribución en las distintas parcelas apoyan la interpretación de la segregación de dos perfiles como un carácter de origen genético.

Alternativamente, los dos perfiles de terpenos diferenciados podrían corresponderse con respuestas defensivas inducidas en respuesta a una posible agresión biótica que pudo afectar a un porcentaje de árboles variable en función de la parcela o de la zona de estudio. Es bien conocido que *Pinus pinaster* es una especie muy plástica que es capaz de responder a las agresiones de insectos y patógenos incrementando de forma substancial sus defensas físicas (canales resiníferos) (Vazquez-Gonzalez et al., 2019) y químicas (terpenos, fenoles) (Moreira et al., 2013). En particular, se ha descrito que el perfil de terpenos en esta especie puede variar notablemente en respuesta a un estímulo biótico (López-Goldar et al., 2018; Lundborg et al., 2018). Bajo esta hipótesis, la presencia del perfil B en las parcelas de Trabazos (dominante en las parcelas 5 y 6) se correspondería entonces con el ataque de algún agente biótico, que estaría afectando la mayoría de los pies analizados en dichas parcelas, como por ejemplo escolítidos perforadores. La menor proporción en las parcelas 3 y 4, marcaría que el impacto del agente biótico era menor o menos frecuente en esta zona, aunque estuviera afectando a más de la mitad de los pies, pero no alcanzando las proporciones de las parcelas 5 y 6. Por el contrario, la casi ausencia del perfil B en las parcelas 1, 2, 7 y 8, mostraría que dicho agente es muy poco frecuente en esta zona de trabajo, por lo menos en el momento de hacer las campañas de campo. Todo esto tendría coherencia con la presencia a pocos centenares de metros de las parcelas 3, 4, 5 y 6, ya en territorio portugués, de un gran foco afección por *Ips* sp. En el entorno de las parcelas 1, 2, 7 y 8, sin embargo, no hay constancia de focos de perforadores ni en el momento de ejecutar el trabajo ni en pasado reciente. Si este fuese el caso, la detección del perfil B en pies aislados podría presentar utilidad como herramienta para la detección temprana de este tipo de agentes.

La utilidad de estos perfiles como indicadores de distintos tipos de afección por herbívoros o patógenos depende de los condicionantes y causas que están detrás de estos perfiles, por lo que es preciso avanzar en un futuro cercano en la investigación de los mismos. Es importante señalar, no obstante, que el perfil químico de terpenos es un claro determinante de la capacidad defensiva de los pinos frente a sus enemigos naturales. Estudios previos han comprobado que diferentes quemotipos de *P. pinaster* o de otras especies de coníferas difieren en su susceptibilidad a patologías y plagas concretas o bien muestran patrones diferenciados de respuesta a la agresión de los mismos (Tomlin et al., 1997; Rodrigues et al., 2017; Davis, 2020; Goncalves et al., 2020). Teniendo esto en cuenta, sea cual sea el origen de la segregación en dos perfiles diferenciados de diterpenos (genético o respuesta inducida a una agresión), es previsible que el comportamiento de ambos en términos fitosanitarios sea diferente. La diagnosis rápida del perfil de terpenos en las copas mediante herramientas de detección aérea podría, por tanto, ser de gran utilidad para la prevención o gestión fitosanitaria de nuestros montes.

En el presente trabajo hemos demostrado que el uso de sensores hiperespectrales embarcados en RPAs es una herramienta de gran potencial para la discriminación de perfiles de diterpenos (quemotipos) en masas de *Pinus pinaster*. Los niveles de precisión, sensibilidad y especificidad logrados son muy satisfactorios y sugieren que el clasificador obtenido podrá ser utilizado en un entorno productivo en un futuro cercano. Es de destacar, por otro lado, que los valores de sensibilidad y especificidad son relativamente próximos, facilitando así su uso en distintos contextos operacionales. Desde el punto de vista empírico, es preciso poner a prueba la robustez de este clasificador en otras regiones geográficas, así como en las mismas masas en diferentes ciclos anuales. Desde el punto de vista mecanístico, aún falta trabajo de investigación para entender el significado real de los distintos perfiles de diterpenos y su origen (genético o inducido). Entender estos aspectos resulta de vital importancia a la hora de definir el alcance que puede tener en la gestión forestal la detección de perfiles de diterpenos por medio de sensores hiperespectrales y RPAs.

6. Conclusiones

La teledetección hiperspectral con RPA se ha revelado como una potente herramienta para la discriminación de una característica compleja como es el perfil de terpenos en las acículas, en condiciones tan variables como son los distintos MUP de la provincia de Zamora utilizados en el presente trabajo. Esto abre la puerta a explorar la posibilidad de detectar otras características mediante esta herramienta ampliando su utilidad en el ámbito forestal.

Será necesario en futuros proyectos verificar las causas que generan la segregación de los perfiles de terpenos, para poder explotar mejor esta metodología y desarrollar herramientas adaptadas a diferentes situaciones. Llevar a cabo esto con éxito en ambiente forestal resulta complejo por la heterogeneidad del medio y por ser un sistema completamente abierto sin posibilidad de control total, a diferencia de otras experiencias equivalentes realizadas en un laboratorio. El trabajo de campo, sin embargo, permite tener un conjunto de pies estudiados cuyas características sería muy complicado replicarlas en laboratorio.

Estos trabajos y otros realizados en el sector, deberán ser la base para poder generar un cuerpo de conocimiento en el campo de esta tecnología, con el fin de acabar trasladando esta metodología a las imágenes obtenidas desde satélite, o a RPAs de mayor alcance y productividad, lo que permitiría una monitorización más extensa y asequible para la mayoría de los agentes implicados en el seguimiento del estado sanitario de nuestros montes.

7. Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda de todo el personal del Grupo Igm-Zumain que ha colaborado en ese proyecto, en especial a Sergio Casado Sevillano, por el enorme trabajo de campo y la rigurosidad de su proceder, así como a Silvana Poceiro, María Lores, de la MBG-CSIC en el procesado y análisis de las muestras.

Agradecer también a la Junta Castilla de Castilla y León y en especial la Sección de Defensa del Medio Natural, del Servicio Territorial de Medio Ambiente de Zamora, por su apoyo y colaboración.

Por último, a los socios del Grupo Igm-Zumain en su apuesta constante por el I+D+i, por financiar este proyecto, en la creencia que la investigación es la mejor vía para el progreso.

8. Bibliografía

Cotrozzi, L.; 2021; Spectroscopic detection of forest diseases: a review (1970–2020) *Journal of Forestry Research*, <https://doi.org/10.1007/s11676-021-01378-w>.

Dainelli, R.; Toscano, P.; Di Gennaro, S.F.; Matese, A.; 2021a; Recent Advances in Unmanned Aerial Vehicle Forest Remote Sensing—A Systematic Review. Part I: A General Framework. *Forests* 12, 327.
Dainelli, R.; Toscano, P.; Di Gennaro, S.F.; Matese, A.; 2021b; Recent Advances in Unmanned Aerial Vehicles Forest Remote Sensing—A Systematic Review. Part II: Research Applications. *Forests* 12, 397.

Davis, T.S.; 2020; Toxicity of two Engelmann spruce Pinaceae monoterpene chemotypes from the southern Rocky Mountains to North American spruce beetle Coleoptera: Scolytidae. *The Canadian Entomologist* 152, 790-796.

Ely, K.S.; Burnett, A.C.; Lieberman-Cribbin, W.; Serbin, S.P.; Rogers, A.; 2019; Spectroscopy can predict key leaf traits associated with source-sink balance and carbon-nitrogen status. *Journal of Experimental Botany* 70, 1789-1799.

Ensminger, I.; 2020; Fast track diagnostics: hyperspectral reflectance differentiates disease from drought stress in trees. *Tree Physiology* 40, 1143-1146.

Fallon, B.; Yang, A.; Lapadat, C.; Armour, I.; Juzwik, J.; Montgomery, R.A.; Cavender-Bares, J.; 2020; Spectral differentiation of oak wilt from foliar fungal disease and drought is correlated with physiological changes. *Tree Physiology* 40, 377-390.

Feilhauer, H.; Asner, G.P.; Martin, R.E.; Schmidtlein, S.; 2010; Brightness-normalized Partial Least Squares Regression for hyperspectral data. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 11, 1947-1957.

Goncalves, E.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Henriques, J.; Sousa, E.; Bonifacio, L.; 2020; Effect of *Monochamus galloprovincialis* feeding on *Pinus pinaster* and *Pinus pinea*, oleoresin and insect volatiles. *Phytochemistry* 169, 112159.

Iordache, M.-D.; Mantas, V.; Baltazar, E.; Pauly, K.; Lewycky, N.; 2020; A machine-learning approach to detecting pine wilt disease using airborne spectral imagery. *Remote Sensing* 12, 2280.

López-Goldar, X.; Villari, C.; Bonello, P.; Borg-Karlson, A.K.; Grivet, D.; Sampedro, L.; Zas, R.; 2019; Genetic variation in the constitutive defensive metabolome and its inducibility are geographically structured and largely determined by demographic processes in maritime pine. *Journal of Ecology* 107, 2464-2477.

López-Goldar, X.; Villari, C.; Bonello, P.; Borg-Karlson, A.K.; Grivet, D.; Zas, R.; Sampedro, L.; 2018; Inducibility of plant secondary metabolites in the stem predicts genetic variation in resistance against a key insect herbivore in maritime pine. *Frontiers in Plant Science* 9, 1651.

Lundborg, L.; Sampedro, L.; Borg-Karlson, A.-K.; Zas, R.; 2018; Effects of methyl jasmonate on the concentration of volatile terpenes in tissues of Maritime pine and Monterey pine and its relation to pine weevil feeding. *Trees* 33, 53-62.

Moreira, X.; Lundborg, L.; Zas, R.; Carrillo-Gavilan, A.; Borg-Karlson, A.-K.; Sampedro, L.; 2013; Inducibility of chemical defences by two chewing insect herbivores in pine trees is specific to targeted plant tissue, particular herbivore and defensive trait. *Phytochemistry* 94, 113-122.

Rodrigues, A.M.; Mendes, M.D.; Lima, A.S.; Barbosa, P.M.; Ascensao, L.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G.; Mota, M.M.; Figueiredo, A.C.; 2017; *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus pinea* and *Pinus sylvestris* Essential Oils Chemotypes and Monoterpene Hydrocarbon Enantiomers, before and after Inoculation with the Pinewood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Chemistry & Biodiversity* 14, e1600153.

Serbin, S.P.; Singh, A.; McNeil, B.E.; Kingdon, C.; Townsend, P.A.; 2014; Spectroscopic determination of leaf morphological and biochemical traits for northern temperate and boreal tree species. *Ecological Applications* 24, 1651-1669.

Serbin, S.P.; Wu, J.; Ely, K.S.; Kruger, E.L.; Townsend, P.A.; Meng, R.; Wolfe, B.T.; Chlus, A.; Wang, Z.; Rogers, A.; 2019; From the Arctic to the tropics: multi-biome prediction of leaf mass per area using leaf reflectance. *New Phytologist* 224, 557-1568.

Suarez-Vidal, E.; 2019; Respuesta a estreses cruzados en pinos Ibéricos: interacción del estrés hídrico con la resistencia a la herbivoría. PhD Dissertation. U. Vigo.

Suarez-Vidal, E.; Sampedro, L.; Voltas, J.; Serrano, L.; Notivol, E.; Zas, R.; 2019; Drought stress modifies early effective resistance and induced chemical defences of Aleppo pine against a chewing insect herbivore. *Environmental and Experimental Botany* 162, 550-559.

Tomlin, E.S.; Borden, J.H.; Pierce, H.D.; 1997; Relationship between volatile foliar terpenes and resistance of Sitka spruce to the white pine weevil. *Forest Science* 43, 501-508.

Vazquez-Gonzalez, C.; Lopez-Goldar, X.; Zas, R.; Sampedro, L.; 2019; Neutral and climate-driven adaptive processes contribute to explain population variation in resin duct traits in a Mediterranean pine species. *Frontiers in Plant Science* 10, 1613.