

Evolución del comportamiento espectral y la composición química en el dosel arbóreo de una dehesa

González-Cascón, R.*¹, Pacheco-Labrador, J.², Martín, M.P.²

¹ Departamento de Medio Ambiente, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ctra. Coruña, km 7,5, 28040 Madrid (España).

² Laboratorio de Espectro-radiometría y Teledetección Ambiental, Instituto de Economía, Geografía y Demografía, Centro de Ciencias Humanas y Sociales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), C/Albasanz 26-28, 28037 Madrid (España).

Resumen: En el contexto de los proyectos BIOSPEC y FLUXPEC (<http://www.lineas.cchs.csic.es/fluxpec/>), se han realizado mediciones espectrales y de variables biofísicas a nivel de hoja en el dosel arbóreo de una dehesa de encina (*Quercus ilex*) durante cuatro períodos vegetativos. Se han llevado a cabo mediciones de reflectividad bi-cónica de hoja intacta (ASD Fieldspec 3[®] spectroradiometer), masa foliar específica (SLM), contenido de agua (LWC), concentraciones de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, y Zn) y clorofilas. Las mediciones espectrales se han relacionado con las variables biofísicas mediante análisis de regresión múltiple por pasos (SWR) y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR). Estos análisis han permitido identificar las bandas y regiones espectrales que explican la evolución de las variables biofísicas y estimar los contenidos de nutrientes a lo largo del proceso de maduración de las hojas en la copa. Se han obtenido modelos estadísticamente significativos para la mayoría de las variables foliares estudiadas. Las longitudes de onda que aportan mayor información sobre la composición química del dosel, se encuentran en las regiones espectrales del límite del rojo, la región verde del visible y el infrarrojo medio de onda corta (SWIR).

Palabras clave: Espectro-radiometría de campo, reflectividad de hoja intacta, nutrientes foliares, clorofila, SLM, LWC, *Quercus ilex*.

Evolution of spectral behavior and chemical composition in the tree canopy of a dehesa ecosystem

Abstract: In the context of the BIOSPEC and FLUXPEC projects (<http://www.lineas.cchs.csic.es/fluxpec/>), spectral and biophysical variables measurements at leaf level have been conducted in the tree canopy of a holm oak dehesa (*Quercus ilex*) ecosystem during four vegetative periods. Measurements of bi-conical reflectance factor of intact leaf (ASD Fieldspec 3[®] spectroradiometer), specific leaf mass (SLM), leaf water content (LWC), nutrient (N, P, K, Ca, Mg, Mn, Fe, and Zn) and chlorophyll concentration were performed. The spectral measurements have been related with the biophysical variables by stepwise and partial least squares regression analyses. These analyses allowed to identify the spectral bands and regions that best explain the evolution of the biophysical variables and to estimate the nutrient contents during the leaf maturation process. Statistically significant estimates of the majority of the variables studied were obtained. Wavelengths that had the highest contributions explaining the chemical composition of the forest canopy were located in spectral regions of the red edge, the green visible region, and the shortwave infrared.

Key words: Field spectroscopy, intact leaf reflectance, foliar nutrients, chlorophyll, SLM, LWC, *Quercus ilex*.

* Autor para la correspondencia: cascon@inia.es

1. Introducción

La relación entre la respuesta espectral y la estructura y composición química de las hojas ha permitido desarrollar modelos predictivos para la estimación de variables foliares en especies forestales (Richardson y Reeves, 2005; Asner et al., 2011; Stein et al., 2014; Serbin et al., 2014) y frutícolas (Tamburini et al., 2015). Los estudios previos sobre las relaciones entre la concentración foliar de bioelementos y datos espectrales de campo en hoja intacta de *Quercus ilex* se han centrado principalmente en el nitrógeno debido a su relevancia en la actividad fotosintética de la copa y, por tanto, en la producción primaria neta de los ecosistemas (Ourcival et al., 1999, Pacheco-Labrador et al., 2014). En estos estudios, las correlaciones más intensas se localizaron en la zona del visible, con máximos en el límite del rojo, seguidos por un segundo máximo en la región del verde. Las concentraciones de pigmentos foliares, el contenido de agua, la estructura y morfología del tejido y la superficie foliar son los principales factores que explican los fenómenos de reflexión, absorción y transmisión de la radiación en hoja fresca (Ourcival et al., 1999; Slaton et al., 2001; Buschmann et al., 2012). Junto con los bioelementos más directamente relacionados con la actividad fotosintética como el nitrógeno, magnesio o manganeso, algunos elementos directamente relacionados con las propiedades estructurales de la hoja como el carbono o el calcio (la rigidez de la pared celular) o el

potasio (responsable de la turgencia foliar) podrían explicar parte de la variabilidad de los cambios en la reflectividad durante los procesos de desarrollo y maduración de la hoja (Ollinger, 2011).

El objetivo de este trabajo es explorar la variabilidad temporal del contenido de nutrientes y el comportamiento espectral de hojas esclerófilas intactas durante el período vegetativo para evaluar la capacidad de la espectroscopia foliar en la estimación del contenido de elementos a nivel de copa. Para ello, las variables espectrales y biofísicas se han relacionado mediante análisis de regresión múltiple por pasos (SWR) y regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR) con el propósito de identificar las bandas espectrales que expliquen mejor la dinámica temporal de las variables biofísicas y los contenidos de nutrientes a lo largo del proceso de maduración de las hojas en la copa.

2. Material y métodos

Las mediciones se han llevado a cabo en el área de estudio de los proyectos BIOSPEC (<http://www.lineas.cchs.csic.es/biospec>) y FLUXPEC (<http://www.lineas.cchs.csic.es/fluxpec>) localizada en una dehesa de encina en Las Majadas del Tiétar (Cáceres) con uso ganadero intensivo (39°56'29"N, 5°46'24"W, Figura 1) y una cobertura arbórea media del 20%. La dehesa se desarrolla sobre suelos ácidos, pobremente drenados y con bajo contenido en materia orgánica

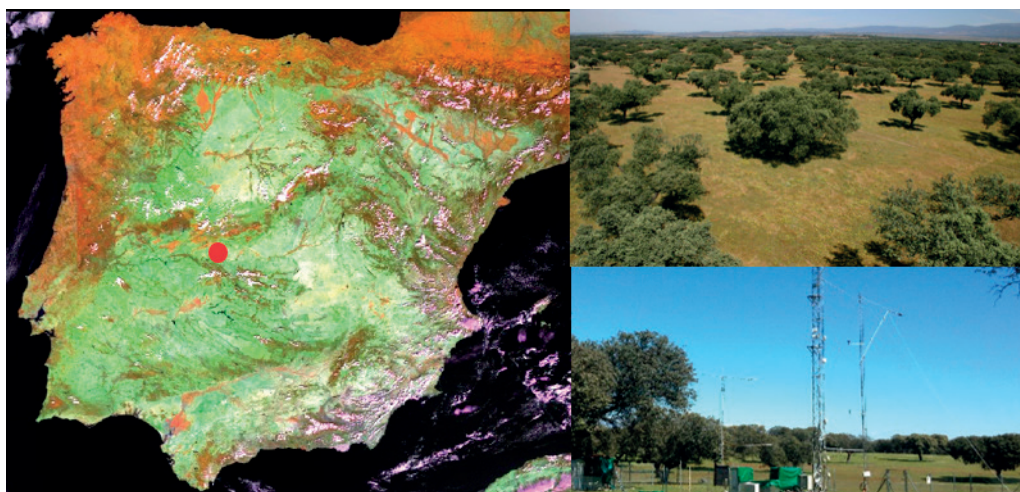


Figura 1. Localización del área de estudio en las Majadas del Tiétar (Cáceres).

(Casals *et al.*, 2009). El clima en la zona es mediterráneo con una precipitación media anual de 572 mm y 16,7°C de temperatura media. En la dehesa se encuentran instaladas tres torres de mediciones de flujos de agua y carbono por el sistema *eddy-covariance* (EC) incluidas en la red Fluxnet (<http://fluxnet.ornl.gov/site/440>).

En 2009 se establecieron en la zona de estudio 11 parcelas de seguimiento permanente de 25×25 m localizadas en un radio de 500 m en torno a la torre central EC. Durante el primer año, se llevó a cabo un muestreo mensual en las 10 encinas adultas incluidas en las parcelas de seguimiento, iniciándose el muestreo en abril de 2009. A partir del segundo año se redujo el muestreo espacial a 5 encinas representativas de los parámetros biofísicos estudiados, manteniendo la frecuencia de muestreo mensual. Los resultados de este trabajo corresponden a los dos primeros períodos vegetativos estudiados (2009-2011) que incluyen 24 campañas de muestreo.

2.1. Mediciones en campo

En cada muestreo se adquirieron espectros de hoja intacta en 24 hojas por árbol: 12 de ellas brotadas en el año en curso y 12 del brote del año previo, obtenidas de los 4 cuadrantes de cada copa (tercio superior e inferior y orientaciones norte y sur). En la cara adaxial de cada hoja se midió el factor de reflectividad bi-cónico (BCRF) (Nicodemus *et al.*, 1992) mediante un espectro-radiómetro ASD Fieldspec 3® (ASD Inc., Boulder, Colorado, Estados Unidos) en el rango espectral 400-2500 nm, equipado con un accesorio para medición por contacto de material vegetal (*Plant Probe+Leaf Clip*). Para asegurar la calidad de los datos, la optimización de la señal, la sustracción de la corriente de oscuridad y la medición de referencia fueron realizadas con frecuencia. Unos segundos antes de realizar las medidas radiométricas se obtuvieron, sobre las mismas hojas, mediciones de clorofila con el medidor Spad-502 (Konica Minolta Sensing inc., Osaka, Japón). Para finalizar, se midió en campo el peso fresco de todas las hojas muestreadas en cada árbol. De las mismas ramas abatidas para las mediciones radiométricas, se recogió una segunda muestra paralela de al menos 100 hojas para el análisis foliar en laboratorio.

2.2. Análisis de laboratorio

En el laboratorio se determinó el peso seco de las muestras foliares a 65°C. El área foliar se estimó mediante clasificación de las hojas escaneadas (Epson Perfection V30 color scanner) con una rutina del programa PCI (<http://www.pcigeomatics.com>). Con estos dos parámetros se calculó la masa foliar específica (SLM) en g/m² a 65°C y el contenido de agua de la muestra foliar fresca (%). La clorofila se cuantificó mediante una ecuación de calibración aplicada a las mediciones con el sensor Spad-502 realizadas en cada campaña de muestreo. La calibración se llevó a cabo en cuatro momentos del período vegetativo mediante un ajuste entre las mediciones de Spad realizadas y la concentración de clorofila en µg/cm² medida en laboratorio a partir de extracciones con DMSO en caliente seguidas de medición espectrofotométrica, utilizando las ecuaciones de Wellburn (1994).

Los valores de SLM, LWC y contenido en clorofilas utilizados en posteriores análisis son valores medios de los datos individuales medidos en cada árbol y clase de edad de la hoja (n=10 en el primer año y n=5 en el segundo).

Para cada día de muestreo se generó en el laboratorio una muestra foliar compuesta por la misma cantidad de material de todos los árboles muestreados individualmente para cada edad de hoja (año en curso y de año previo). En estas muestras se realizaron los análisis foliares. En las muestras foliares molidas y secas (65°C) se determinó el contenido de C y N por combustión seca en un analizador LECO modelo CN2000. Para el análisis del contenido de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, y Zn en hoja se llevó a cabo una digestión con ácido nítrico en un sistema de digestión por microondas (Milestone, MLS 1200). La determinación de los nutrientes foliares se llevó a cabo por ICP-OES en un equipo Perkin-Elmer, modelo Optima 2000. Todos los análisis químicos se llevaron a cabo por duplicado en dos repeticiones por muestra y para el control de calidad se utilizó una muestra de encina de calibración interna del laboratorio. Las concentraciones foliares de nutrientes se calcularon en peso seco a 65°C (g/kg) y, multiplicando éstas por el SLM, en g/m² (65°C).

2.3. Análisis estadístico

Los espectros foliares medidos en campo fueron sometidos a un control de calidad para eliminar datos anómalos, fundamentalmente aquellos en los que las hojas no cubrían por completo el campo de visión del espectro-radiómetro (FOV). Este problema se presentó con frecuencia en las hojas de algunos árboles cuya superficie foliar era inferior a 3 cm². La heterogeneidad del FOV del espectro-radiómetro empleado (Mac Arthur *et al.*, 2012) unida a la de las propias hojas, produjo diferencias en los valores de BCRF medidos en cada uno de los tres sensores del instrumento debido a que alguno de los sensores observaba partes de una hoja con propiedades significativamente diferentes a las observadas por el resto. En estos casos, los promedios que presentaban diferencias absolutas de BCRF superiores a 0,005 entre dos sensores del instrumento fueron depurados eliminándose consecutivamente las mediciones con las mayores diferencias entre sensores hasta que las diferencias del promedio se encontrasen por debajo de este umbral. Para el análisis estadístico se promediaron los espectros foliares de todos los árboles de cada muestreo y clase de edad de las hojas. Durante el primer año de estudio los espectros foliares para cada fecha y edad corresponden al promedio de un máximo de 132 hojas y en el segundo a 60.

La correlación entre cada una de las variables foliares analizadas y los valores de BCRF de cada una de las bandas espectrales medidas por el espectro-radiómetro fue estimada mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Se realizó un análisis de Anova para cada una de las longitudes de onda estudiadas (400-2500 nm) entre los valores de BCRF de las 24 tomas de muestra correspondientes a las hojas del año en curso y las del año anterior, con objeto de detectar las regiones espectrales en las que las diferencias entre las dos clases de edad de hoja resultaban estadísticamente significativas. Para el desarrollo de los modelos predictivos, se llevaron a cabo regresiones por pasos (SWR) y PLSR (*Partial Least Square Regression*) para las hojas del año en curso, empleándose simultáneamente las 2100 bandas espectrales disponibles (rango 400-2500 nm). En el caso de PLSR, los modelos se ajustaron empleando validación cruzada y 500 repeticiones Monte Carlo. Para el SWR, la selección de

bandas se realizó empleando todas las mediciones disponibles, pero los coeficientes de los modelos y los errores fueron estimados mediante remuestreo *bootstrap* con 500 repeticiones. Para evaluar la bondad del ajuste en las regresiones se calculó el coeficiente de determinación (R²), el error cuadrático medio relativo (RMSE) y el RMSE normalizado (NRMSE). Todas las rutinas de control y análisis se implementaron con el programa MATLAB versión R2010b, The MathWorks, Inc., Natick, MA, 2009. Para la interpretación de los resultados se diferencian las siguientes regiones espectrales: visible (400-680 nm), límite del rojo (680-740 nm), NIR (740-1350 nm) y SWIR (1350-2500 nm).

3. Resultados

3.1. Variación temporal del comportamiento espectral y del contenido de nutrientes

El análisis de los datos espectrales revela que la respuesta correspondiente a las hojas del brote del año en curso desarrolladas en primavera presenta una tendencia decreciente a lo largo del período vegetativo (mayo a octubre) en las regiones del visible y del límite del rojo con algunos máximos parciales en el período estival que tienen lugar cuando el contenido de humedad foliar alcanza valores mínimos (Figuras 2 y 3a). En la región del NIR se detecta esta tendencia decreciente especialmente en otoño cuando la hoja ha madurado (Figura 3c) y en menor medida en el SWIR, a partir de 1900 nm. En esta última región se aprecia sobre todo el incremento de reflectividad asociado a bajos LWC (Figura 3c). Los rangos máximos de variación de BCRF en las hojas del año a lo largo del período vegetativo se localizaron en la región del límite del rojo. Las hojas maduras, desarrolladas en el período vegetativo anterior presentan mucha menor variación temporal en su comportamiento espectral con valores de BCRF sistemáticamente inferiores a las hojas en desarrollo. En otoño, cuando las hojas del año han madurado desde el punto de vista de su composición química, morfología y anatomía, desaparecen las diferencias en la respuesta espectral de las diferentes clases de edad presentes en la copa. Las diferencias entre los espectros foliares para las dos clases de edad

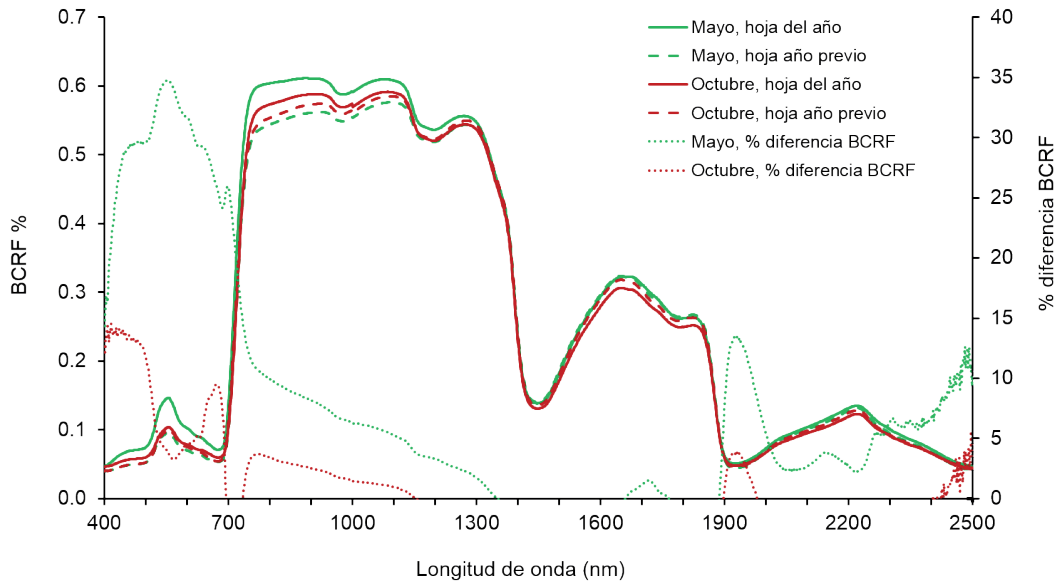


Figura 2. BCRF medio al principio y final del el periodo vegetativo para las dos clases de edad presentes en la copa y porcentaje de diferencia en cada una de las tomas de muestra.

de hoja durante todo el período vegetativo fueron significativas ($\alpha < 0,001$) en la región del visible y comienzo del límite del rojo (400-694 nm) y en el NIR (730-1139 nm). En el SWIR el grado de significación fue menor ($\alpha < 0,01$) y se localizó en los rangos 1904-1960 nm y 2481-2500 nm (Figura 2).

El patrón decreciente de reflectividad que tiene lugar durante el proceso de maduración y esclerofilización de la hoja, estuvo acompañado de un intenso aumento de SLM en primavera, seguido de un incremento mucho más paulatino hasta el final del período vegetativo en marzo (Figura 4.a). Paralelamente, la concentración de clorofilas aumentó de manera continuada en las hojas. El LWC fue máximo después de la brotación, descendiendo bruscamente en primavera y manteniéndose con poca variabilidad a lo largo del período vegetativo, excepto en momentos de baja disponibilidad de agua en el suelo en los que alcanza valores mínimos (agosto de 2009 y principios de septiembre 2010). Las concentraciones de los nutrientes C, N, Ca, Mn y Fe por unidad de superficie siguen el mismo patrón creciente de los pigmentos foliares y el SLM (Figura 5.a). El Mg se incrementa sólo en primavera, permaneciendo

prácticamente constante el resto del período vegetativo; mientras que el K es el único elemento que experimenta una disminución. Las concentraciones de los elementos P y Zn apenas sufren variación temporal en la hoja (Figura 5.a). Los contenidos de nutrientes en unidades de peso seco (g/kg) siguen el mismo patrón de variación anual que por unidad de superficie para los elementos K, Ca, Mn, Fe, P y Zn. El carbono, que en unidades de peso apenas se incrementa durante el período vegetativo, por unidad de superficie, al aumentar el SLM con la edad, duplica los valores iniciales al final del período vegetativo. El nitrógeno en unidades de peso también presenta un patrón de variación muy diferente con respecto a su variación por unidad de superficie. Su concentración es muy elevada en las hojas recién brotadas, desciende bruscamente en los primeros meses durante el proceso de expansión de la hoja y finalmente mantiene una tendencia creciente desde el comienzo del verano hasta el final del proceso de maduración foliar.

En las hojas brotadas el año anterior, se mantienen estables las concentraciones de pigmentos y nutrientes y el SLM alcanzados al final del primer

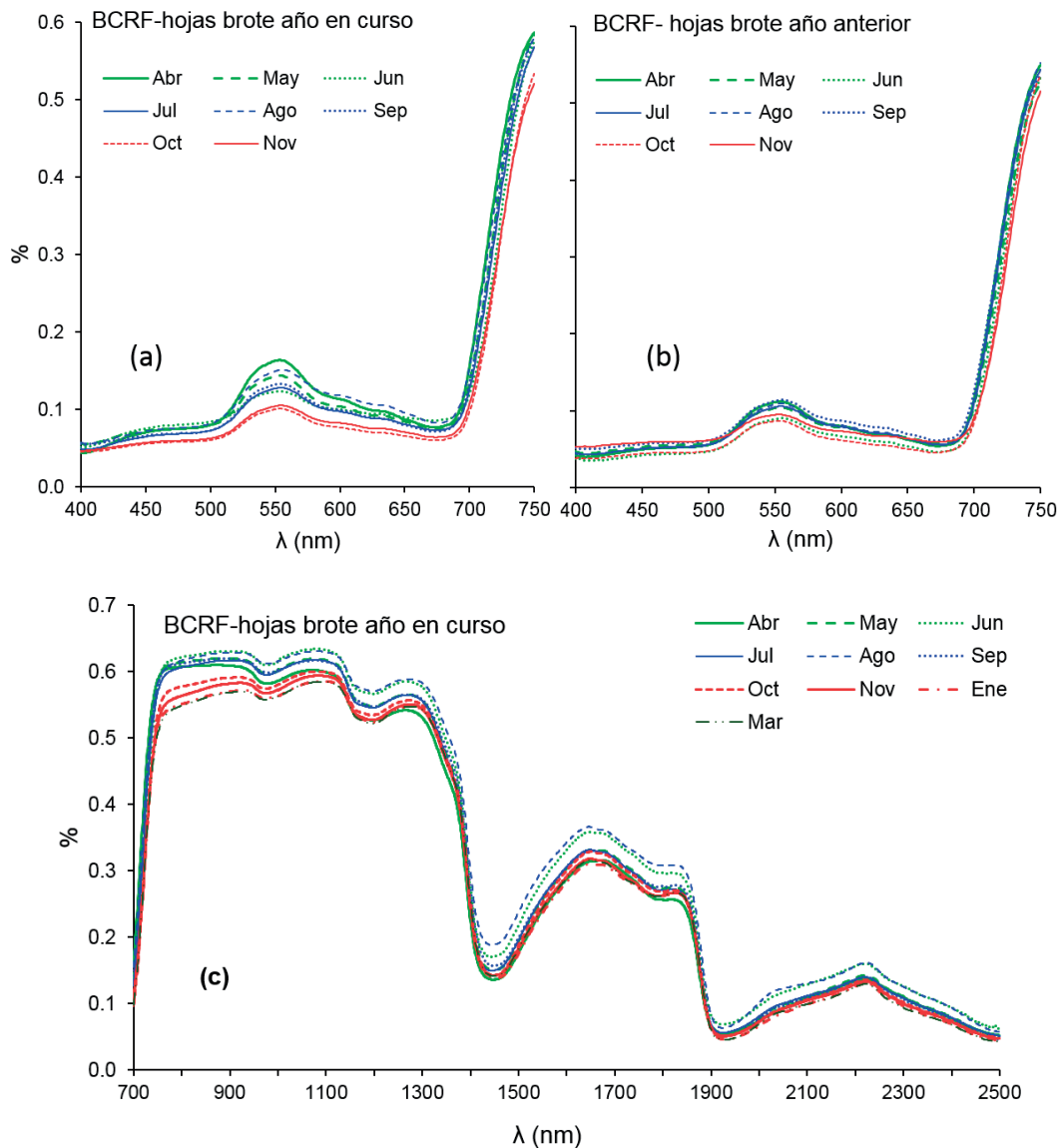


Figura 3. Detalle de la evolución temporal del BCRF en el visible y el límite del rojo en las hojas del brote anual (a) y en las hojas de brotes anteriores (b) desde abril hasta noviembre y en las regiones NIR y SWIR en las hojas anuales desde abril hasta marzo (c). Las tres figuras corresponden al segundo período vegetativo (2010-11).

año de vida (Figuras 4.b y 5.b). El LWC de las hojas maduras también refleja claramente los momentos de mínima disponibilidad de agua en el suelo (Figura 4.b). Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones foliares de nutrientes por unidad de superficie entre las dos clases de edad de hoja a lo largo de todo el período vegetativo para los elementos N y P ($\alpha < 0,05$), K ($\alpha < 0,01$), Ca, Mn y Fe ($\alpha < 0,001$).

3.2. Correlaciones entre variables foliares y espectrales

Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables foliares expresadas en peso seco (g/kg a 65°C), así como por unidad de superficie (g/m² a 65°C) y el BCRF para cada banda entre el visible y SWIR. Las correlaciones más altas se encontraron al analizar las variables expresadas en peso por unidad de superficie

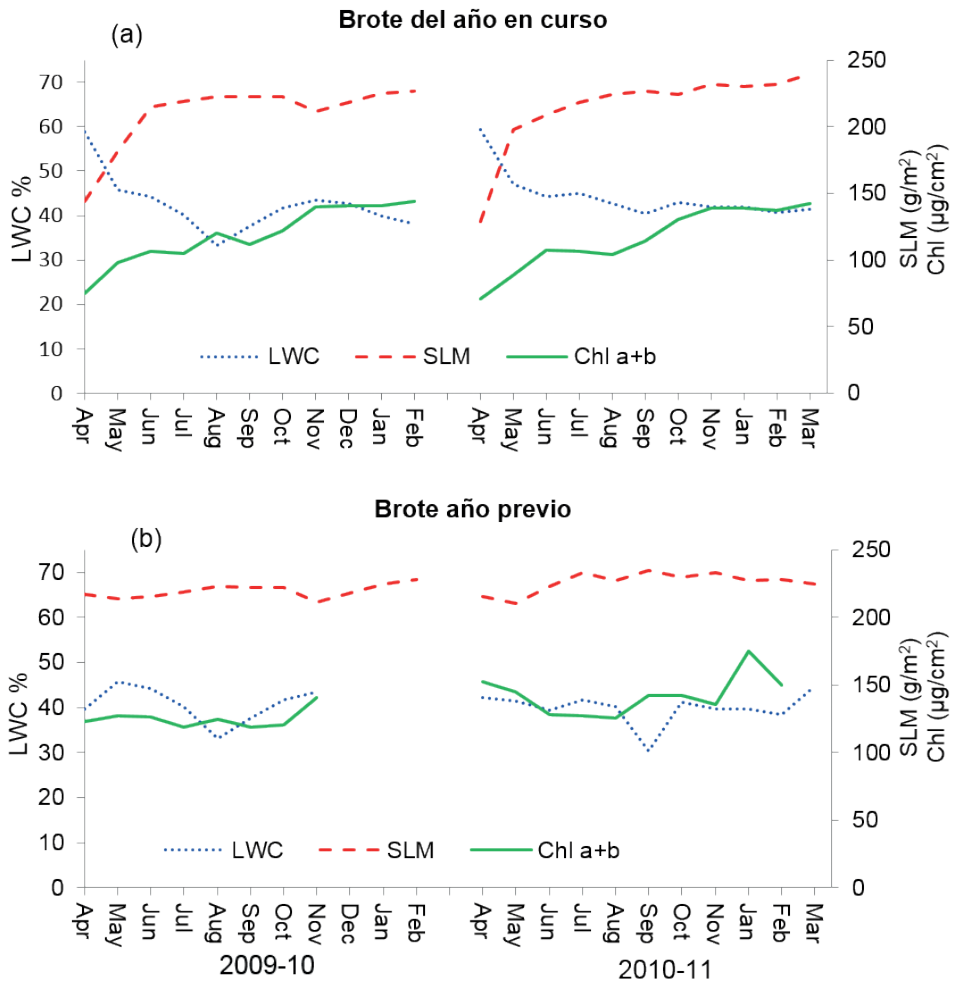


Figura 4. Variación temporal del contenido de agua (LWC), masa foliar específica (SLM) y clorofilas (Chl) en las hojas del año en curso (a) y del año previo (b) medidas durante los dos periodos vegetativos de estudio.

(g/m² a 65°C). Las concentraciones por unidad de superficie son además las más adecuadas para su estimación a nivel de dosel. Estas últimas presentan máximos negativos en la región del visible (con un pico centrado en 553 nm), y del límite del rojo (680-740 nm) para todas las variables estudiadas excepto el LWC, que tiene el coeficiente de correlación máximo en el SWIR a 1390 nm (Figura 6).

K es el único nutriente que presenta correlaciones elevadas y positivas a lo largo de todo el dominio óptico con excepción de dos zonas centradas en las bandas 1393 y 1873 en el SWIR

con coeficientes de correlación mínimos. Los coeficientes de correlación máximos corresponden a las concentraciones de N (R=-0,92), Chl (R=-0,89), Mn (R=-0,79) y Fe (R=-0,65) en la región del verde en torno a 553 nm; K (R=0,83) en el rojo, a 618 nm; Mn (R=-0,79), SLM (R=-0,75), C (R=-0,76), Ca (R=-0,68), Mg (R=-0,60) y Zn (R=-0,45) en el límite del rojo y por último y por último LWC (R=-0,71) en el SWIR a 1390 nm.

En la región del NIR los coeficientes de correlación se reducen, son inferiores a 0,4 para todas las variables (excepto el LWC y el K) y cambian

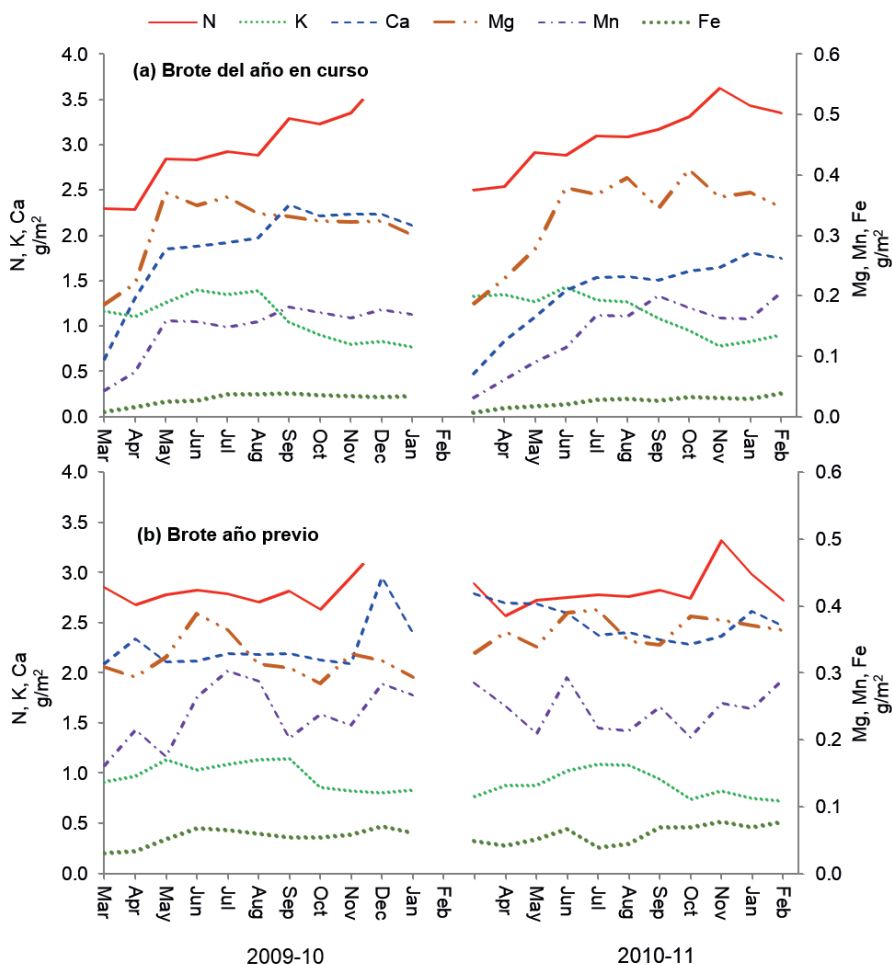


Figura 5. Variación anual de las concentraciones foliares de los nutrientes N, K, Ca, Mg, Mn, Fe en g/m² a 65°C en las hojas del año en curso (a) y de años previos (b).

de signo para la mayoría de las variables. En el SWIR las correlaciones son negativas excepto para el K y LWC. Hay cinco zonas de máximos coeficientes de correlación centradas en 1390 nm (todas las variables menos N, P y K), 1874 nm (LWC, Ca, Mg, Fe), 1950 y 2146 nm (todas las variables) y 2270 nm (C, Ca, Mn, Fe, SLM, LWC) (Figura 6).

Las bandas de correlación máxima son muy similares en el visible y límite del rojo para las concentraciones de nutrientes expresadas tanto en peso como por unidad de superficie, sin embargo para los elementos C y N difieren completamente en el SWIR.

3.3. Estimación de variables foliares

Para las 11 variables estudiadas (en unidades de superficie) la regresión PLSR ofreció coeficientes de determinación superiores y errores de calibración inferiores a la regresión SWR, para las variables clorofila, LWC, Mn, K y Zn (Tablas 1 y 2). Mediante PLSR, se obtuvieron coeficientes de determinación superiores a 70% para todas las variables estudiadas a excepción de los elementos Zn y P. Con la regresión SWR se obtuvieron modelos significativos ($\alpha < 0,05$) para todas las variables excepto para los contenidos foliares de Zn. Los dos métodos de regresión utilizados SWR y PLSR ofrecen resultados similares con excepción de las

Tabla 1. R², error cuadrático medio relativo (RMSE) y RMSE normalizado (NRMSE) para las variables bioquímicas estimadas por PLSR.

Variable	R ² (%)	RMSE (%)	NRMSE (%)
Clorofila _{a+b} (μg/cm ²)	0,95	4,09	6,36
SLM (g/m ²)	0,90	4,43	9,03
N (g/m ²)	0,88	4,89	10,26
C (g/m ²)	0,88	4,92	9,99
LWC (%)	0,84	5,92	9,82
Ca (g/m ²)	0,81	14,50	11,98
Fe (g/m ²)	0,80	16,79	13,77
Mn (g/m ²)	0,79	17,31	13,92
K (g/m ²)	0,77	9,31	16,02
Mg (g/m ²)	0,76	10,57	15,14
Zn (g/m ²)	0,49	16,08	20,78
P (g/m ²)	0,20	9,17	20,13

Tabla 2. R², error cuadrático medio relativo (RMSE) y RMSE normalizado (NRMSE) para las variables bioquímicas estimadas por el método SWR.

Variable	R ² (%)	RMSE (%)	NRMSE (%)
C (g/m ²)	0,99	1,20	2,32
Mg (g/m ²)	0,98	2,29	4,08
SLM (g/m ²)	0,95	2,95	5,64
N (g/m ²)	0,93	3,49	7,41
Clorofila _{a+b} (μg/cm ²)	0,93	4,89	7,82
Ca (g/m ²)	0,84	12,95	11,08
LWC (%)	0,81	6,27	10,37
Fe (g/m ²)	0,81	15,75	13,64
Mn (g/m ²)	0,77	17,47	14,21
K (g/m ²)	0,69	11,13	19,35
P (g/m ²)	0,34	8,23	18,14
Zn (g/m ²)			

concentraciones de Mg y Zn. Sin embargo las regresiones PLSR son más robustas al utilizar todo el rango espectral en lugar de bandas discretas.

En la Figura 7a se recogen las bandas seleccionadas en la regresión SWR para cada variable estimada y en la 7b los pesos de las regresiones

PLSR. Aunque hay bandas seleccionadas a lo largo de todo el rango espectral analizado, un gran número se encuentra en la zona del verde, del límite del rojo y en el SWIR (cercanas a las bandas de absorción de agua a 1450 nm y 1930 nm, y en el rango 2262-2272 nm). Las zonas que tienen una

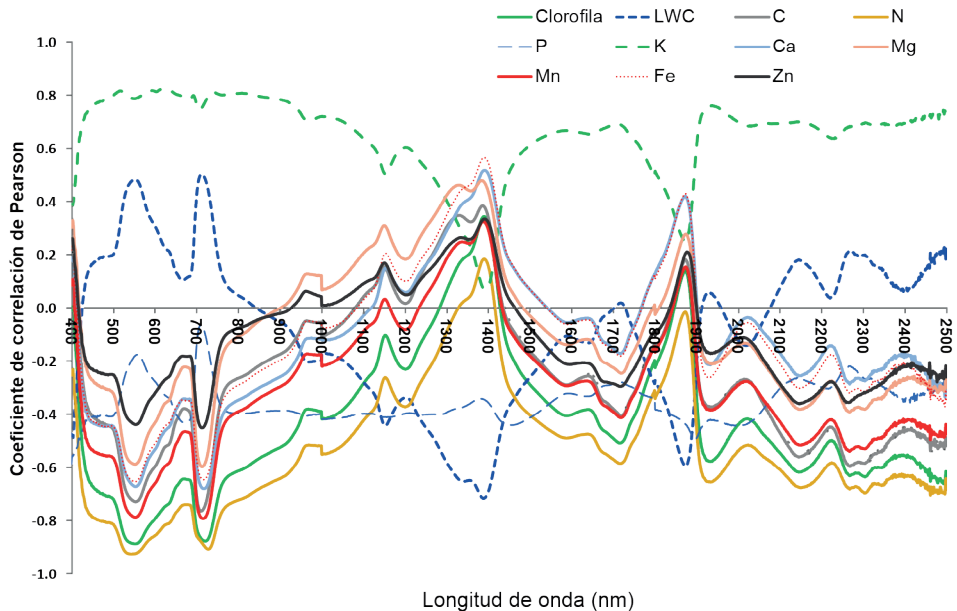


Figura 6. Coeficientes de correlación entre las variables foliares expresadas en g/m², clorofilas en μg/cm², LWC (%) y el BCRF en cada banda espectral a lo largo de dos periodos vegetativos.

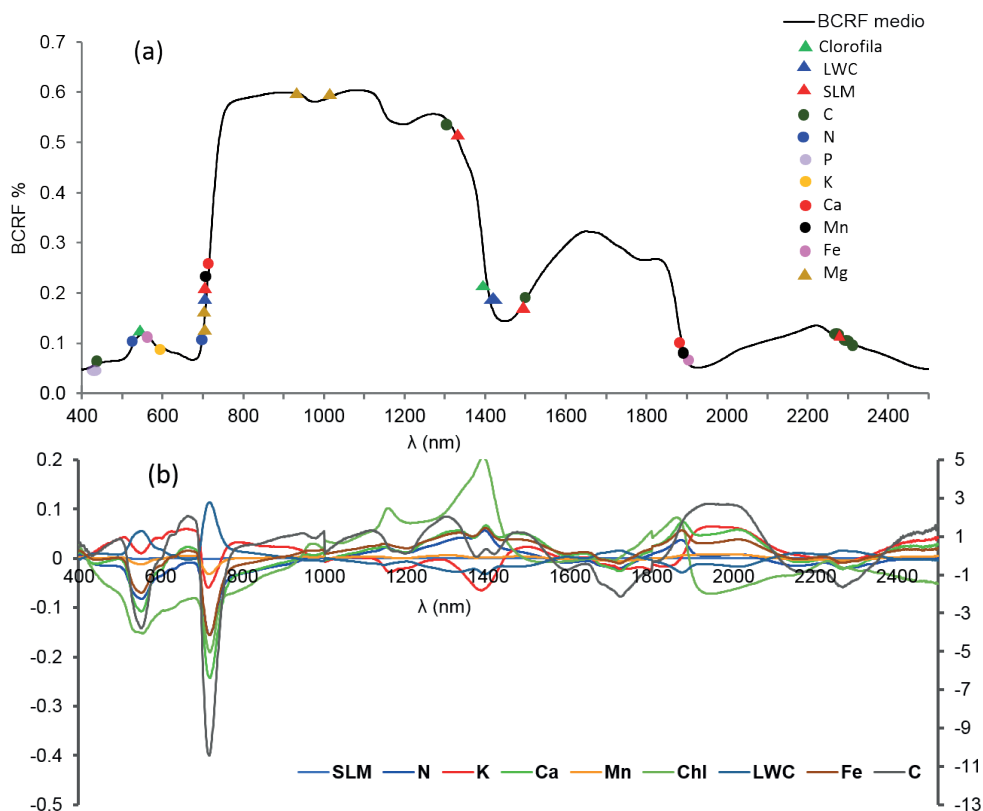


Figura 7. Bandas seleccionadas mediante la regresión SWR (a), y pesos del primer factor de la regresión PLSR (b) para las variables foliares estudiadas. Nutrientes foliares y SLM expresados en g/m^2 , clorofilas en $\mu g/cm^2$ y LWC en %.

mayor contribución en las regresiones PLSR son muy similares a las seleccionadas mediante SWR, siendo máximas en la zona del límite del rojo.

4. Discusión

Las mediciones de BCRF de hoja intacta capturaron los cambios morfológicos y bioquímicos que tienen lugar durante el proceso de maduración y esclerofilización de las hojas de encina. Las regiones espectrales más sensibles a las transformaciones durante el proceso de evolución de las hojas en la copa fueron el límite del rojo, especialmente en el rango 700-721 nm, la región verde centrada en la banda de 550 nm y el SWIR (Figura 7). En las dos primeras regiones se encuentran las máximas correlaciones entre las variables foliares estudiadas y la respuesta óptica de las hojas frescas y una mayoría de las bandas seleccionadas en la regresión SWR. Estas dos

áreas espectrales están estrechamente relacionadas con el nivel de pigmentos en hoja. El límite del rojo (680-740 nm) es la zona de absorción in-vivo de las clorofilas (Buschmann *et al.*, 2012), por lo que es muy sensible a la concentración de estos pigmentos. Al aumentar la concentración de clorofila en hoja, se produce un desplazamiento muy característico del inicio del límite del rojo hacia longitudes de onda más largas, y paralelamente un descenso de la reflectividad en el rango verde-naranja del espectro (500-650 nm) (Mutanga y Skidmore, 2007; Buschmann *et al.*, 2012). Estos dos efectos, el desplazamiento del límite del rojo hacia longitudes de onda más largas y la disminución de la señal en el rango 500-650 nm con el incremento de pigmentos en la hoja de encina durante el desarrollo (Figura 4.a), puede apreciarse en la Figura 3.a. Este efecto se enmascara sólo en los meses estivales, por la drástica disminución del contenido de agua en hoja que produce un

aumento de la reflectividad en todo el rango espectral (Ollinger, 2011), y no se aprecia en las hojas maduras (Figura 3.b) cuyo contenido en clorofilas apenas varía durante el segundo año en la copa (Figura 4.b).

Junto al incremento de pigmentos con la maduración de la hoja se producen cambios morfológicos en la superficie y en la estructura interna de la hoja, que también modifican la respuesta espectral. Durante el proceso de expansión, que culmina antes del período estival más seco, se incrementa en un 61% el espesor de la epidermis adaxial, se desarrolla la cutícula y el SLM se duplica en la hoja de encina (Gratani y Bonito, 2009). El aumento del espesor en la hoja de encina está relacionado principalmente con el aumento del mesófilo de empalizada y la epidermis superior (Ourcival *et al.*, 1999). Durante el proceso de engrosamiento del espesor de la hoja y el desarrollo de la cutícula a lo largo del período vegetativo, se produjo un descenso en la reflectividad en casi todo el rango espectral estudiado, especialmente en la región del visible (Figura 3a) y NIR (Figura 3c) y un incremento del 100 % del SLM (Figura 4a), como muestran los coeficientes de correlación negativos entre BCRF y SLM. Una correlación negativa entre el SLM y la reflectividad foliar encuentra también Ourcival *et al.* (1999) en hojas de encina, aunque sólo en el la zona del visible. Sullivan *et al.* (2012) también encuentran a nivel de hoja fresca una relación inversa entre la reflectividad en el NIR y SLM para un amplio rango de especies forestales (frondosas y coníferas). Sin embargo los resultados sobre la influencia de los rasgos morfológicos de la hoja en su comportamiento espectral son controvertidos. Buschmann *et al.* (2012) en el visible y Slaton *et al.* (2001) en la región del NIR, observan un incremento de la reflectividad en hojas con cutícula gruesa. Por otro lado, el aumento del espesor foliar puede producir un alargamiento del paso óptico en la hoja y un incremento de la radiación dispersada en su interior disminuyendo la reflectividad (Buschmann *et al.*, 2012) aunque otros autores no encuentran relación entre el espesor de la hoja y la reflectancia en el NIR (Slaton *et al.*, 2001). Sin embargo las diferencias en el comportamiento espectral en la hoja de encina se aprecian claramente al principio del período vegetativo, cuando en la copa conviven las hojas recién brotadas con

las brotadas el año anterior con características extremas en cuanto a su composición química y morfología. Las concentraciones mínimas de pigmentos y nutrientes, la ausencia de una cutícula gruesa y de una estructura interna bien desarrollada, generan una respuesta espectral caracterizada por una reflectividad muy superior en las regiones del visible y en el NIR (Figura 2).

La espectroscopía NIR ha permitido estimar N en tejido vegetal y específicamente en especies forestales (Richardson y Reeves, 2005; Sullivan *et al.*, 2012; Serbin *et al.*, 2014) con gran precisión debido a las características espectrales asociadas a los enlaces N-H de las proteínas principalmente en las regiones del NIR y SWIR. También la región del visible es sensible a la concentración de N (Mutanga y Skidmore, 2007). El clorénquima es un tejido muy rico en N (Castro-Diez *et al.*, 1997), por lo que la concentración de clorofila y N foliar están estrechamente relacionadas. La variación foliar de ambos sigue la misma tendencia en el proceso de maduración de las hojas de encina en la copa (Figuras 4a y 5a). Por ello la regresiones SWR y PLSR seleccionan bandas en la región del límite del rojo para el N y otros nutrientes directamente relacionados con los procesos fotosintéticos (Mg y Mn) (Figuras 7a y b). La posibilidad de obtener calibraciones NIRs para la estimación de otros nutrientes minerales parece posible por su asociación a compuestos orgánicos del tejido foliar con absorción en el NIR (Richardson y Reeves, 2005). En las hojas de encina estudiadas, la variación temporal de las concentraciones foliares por unidad de superficie de la mayoría de los nutrientes (excepto K) covaría con las variables SLM y la concentración de pigmentos, por este motivo los modelos seleccionaron la mayoría de bandas en el límite del rojo y el SWIR. La selección de bandas para SLM y el C es muy similar, lo que indicaría la correlación de la formación de compuestos estructurales con el SLM.

El K es el único nutriente cuyo contenido foliar es máximo en las hojas recién brotadas (10-12 g/kg), reduciéndose progresivamente a un 68% de su valor inicial en el otoño (3-4 g/kg). Este valor se mantiene o disminuye ligeramente en hoja hasta su abscisión. Los LWC máximos de las hojas de encina recién brotadas (Figura 4a) promueven los procesos de expansión foliar debido a cambios en su turgor (Gratani y Bonito, 2009).

Estos cambios en la presión osmótica celular están regulados por el K (Hawkesford *et al.*, 2012). La dinámica del K y el contenido de agua en la hoja están estrechamente ligadas, lo que podría explicar la capacidad predictiva de la respuesta espectral foliar para estimar este elemento. El descenso en paralelo de la reflectividad foliar y su contenido en K con la edad de la hoja explica los elevados coeficientes de correlación a lo largo de casi todo el rango espectral estudiado (Figura 6), alcanzando valores máximos en el límite del rojo y en el pico de absorción de agua centrado en 1930 nm. El descenso temporal de K foliar en unidades de masa es mucho más intenso que en unidades de superficie, por lo que el ajuste de los modelos es muy superior en unidades de masa ($R^2=0,97$ [PLSR] y $R^2=0,99$ [SWR]) que en unidades de superficie ($R^2=0,77$ [PLSR] y $R^2=0,69$ [SWR]).

El coeficiente de determinación obtenido para N foliar ($R^2=0,88$) es superior a los obtenidos en estudios previos con espectros de hoja intacta en especies forestales (Ourcival *et al.*, 1999; Asner *et al.*, 2009). Ourcival *et al.* (1999) alcanzaron una mejora considerable en el ajuste de la estimación de N mediante el pre-procesamiento de los espectros (segunda derivada), alcanzando un coeficiente de determinación de 0,95%. Una mejora importante se obtiene también trabajando con muestras foliares homogeneizadas, molidas y secas en las que se eliminan los efectos de radiación dispersa y de penetración debidos a la morfología y anatomía de la hoja y a las diferencias en el LWC ($R^2=0,97$ en Serbin *et al.*, 2014; $R^2=0,95$ en Richardson y Reeves, 2005). Sin embargo los ajustes obtenidos para los restantes macronutrientes (P, K, Ca y Mg) han sido superiores a los obtenidos por Richardson y Reeves (2005) en material foliar molido y seco en varias especies de coníferas.

Los buenos ajustes obtenidos para la mayoría de los nutrientes foliares (C, N, Ca, Fe, Mn, K y Mg) mediante espectro-radiometría de hoja intacta a partir un conjunto limitado de datos indican que sería posible su estimación a nivel de copa. La ampliación del estudio considerando relaciones a nivel de árbol individual y la mejora del ajuste de los modelos PLSR mediante la aplicación de transformaciones y filtros a los espectros foliares y un proceso de validación externa, permitirá

mejorar la estimación de estas variables foliares a nivel de copa y finalmente su escalado a nivel de ecosistema.

5. Conclusiones

Las transformaciones morfológicas y anatómicas que tienen lugar durante el proceso de maduración de las hojas de encina, que van acompañadas por cambios en su composición química, modifican sus propiedades ópticas y permiten la estimación de SLM, LWC, contenidos foliares de nutrientes y pigmentos por unidad de superficie en las hojas intactas mediante espectroscopia NIR. La diversidad recogida a lo largo del período de muestreo debida a la variación interanual y al grado de maduración de las hojas, ha permitido desarrollar modelos significativos para todas las variables estudiadas con excepción de los contenidos foliares de Zn, y P nutrientes cuya variabilidad temporal en la hoja es baja.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos BIOSPEC (CGL2008-02301/CLI, Ministerio de Ciencia e innovación) y FLUXPEC (CGL-2012 34383, Ministerio de Economía y Competitividad). Agradecemos a los equipos de investigación y trabajo que han participado en ambos proyectos su ayuda durante las campañas de muestreo y las mediciones de campo, así como al personal del Laboratorio de Ecología Forestal del CIFOR-INIA por su colaboración en los análisis foliares.

Referencias

- Asner, G.P., Martin, R.E., Ford, A.J., Metcalfe, D.J., Liddell, M.J. 2009. Leaf chemical and spectral diversity in Australian tropical forests. *Ecological Applications*, 19(1), 236-253. <http://dx.doi.org/10.1890/08-0023.1>
- Asner, G.P., Martin, R.E., Knapp, D.E., Tupayachi, R., Anderson, C., Carranza, L., Martinez, P., Houcheime, M., Sinca, F., Weiss, P. 2011. Spectroscopy of canopy chemicals in humid tropical forests. *Remote Sensing of Environment*, 115(12), 3587-3598. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rse.2011.08.020>
- Buschmann, C., Lenk, S., Lichtenthaler, H.K., 2012. Reflectance spectra and images of green leaves with different tissue structure and chlorophyll content. *Israel Journal of Plant Sciences*, 60(1-2), 49-64. <http://dx.doi.org/10.1560/IJPS.60.1-2.49>

- Casals, P., Gimeno, C., Carrara, A., Lopez-Sangil, L., Sanz, M.J. 2009. Soil CO₂ efflux and extractable organic carbon fractions under simulated precipitation events in a Mediterranean Dehesa. *Soil Biology & Biochemistry*, 41(9), 1915-1922. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.06.015>
- Castro-Diez, P., Villar-Salvador, P., Perez-Rontome, C., Maestro-Martinez, M., Montserrat-Marti, G., 1997. Leaf morphology and leaf chemical composition in three *Quercus* (*Fagaceae*) species along a rainfall gradient in NE Spain. *Trees-Structure and Function*, 11(3), 127-134. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00009662>
- Gratani, L., Bonito, A. 2009. Leaf traits variation during leaf expansion in *Quercus ilex* L. *Photosynthetica*, 47(3), 323-330. <http://dx.doi.org/10.1007/s11099-009-0052-1>
- Hawkesford, H.W., Kichey T., Lambers H., Schjoerring J., Skrumager Møller I., White P. 2012. Functions of Macronutrients 135-189. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (Third Edition). London: Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6>
- Mac Arthur, A., MacLellan, C.J., Malthus, T. 2012. The Fields of View and Directional Response Functions of Two Field Spectroradiometers. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 50(10), 3892-3907. <http://dx.doi.org/10.1109/TGRS.2012.2185055>
- Mutanga, O., Skidmore, A.K. 2007. Red edge shift and biochemical content in grass canopies. *Isprs Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 62(1): 34-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2007.02.001>
- Nicodemus, F.E., Richmond, J.C., Hsia, J.J., Ginsberg, I.W., Limperis, T. 1992. Geometrical Consideration and Nomenclature for Reflectance. In *U.D.o.C. National Bureau of Standards*. Washington, DC
- Ollinger, S.V. 2011. Sources of variability in canopy reflectance and the convergent properties of plants. *New Phytologist*, 189(2), 375-394. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03536.x>
- Ourcival, J.M., Joffre, R., Rambal, S. 1999. Exploring the relationships between reflectance and anatomical and biochemical properties in *Quercus ilex* leaves. *New Phytologist*, 143(2), 351-364. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00456.x>
- Pacheco-Labrador, J., González-Cascón, R., Martín, M.P., Riaño, D. 2014. Understanding the optical responses of leaf nitrogen in Mediterranean Holm oak (*Quercus ilex*) using field spectroscopy. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 26, 105-118. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jag.2013.05.013>
- Tamburini, E., Ferrari, G., Marchetti, M.G., Pedrini, P., Ferro, S. 2015. Development of FT-NIR Models for the Simultaneous Estimation of Chlorophyll and Nitrogen Content in Fresh Apple (*Malus Domestica*) Leaves. *Sensors* 15(2), 2662-2679. <http://dx.doi.org/10.3390/s150202662>
- Richardson, A.D., Reeves, J.B. 2005. Quantitative reflectance spectroscopy as an alternative to traditional wet lab analysis of foliar chemistry: near-infrared and mid-infrared calibrations compared. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne de Recherche Forestiere*, 35, 1122-1130. <http://dx.doi.org/10.1139/x05-037>
- Serbin, S.P., Singh, A., McNeil, B.E., Kingdon, C.C., Townsend, P.A. 2014. Spectroscopic determination of leaf morphological and biochemical traits for northern temperate and boreal tree species. *Ecological Applications*, 24(7), 1651-1669. <http://dx.doi.org/10.1890/13-2110.1>
- Slaton, M. R., Hunt, E.R., Smith, W.K. 2001. Estimating near-infrared leaf reflectance from leaf structural characteristics. *American Journal of Botany*, 88(2), 278-284. <http://dx.doi.org/10.2307/2657019>
- Stein, B.R., Thomas, V.A., Lorentz, L.J., Strahm, B.D. 2014. Predicting macronutrient concentrations from loblolly pine leaf reflectance across local and regional scales. *Geoscience & Remote Sensing*, 51(3), 269-287. <http://dx.doi.org/10.1080/15481603.2014.912875>
- Sullivan, F.B., Ollinger, S.V., Martin, M.E., Ducey, M.J., Lepine, L.C., Wicklein, H.F. 2013. Foliar nitrogen in relation to plant traits and reflectance properties of New Hampshire forests. *Canadian Journal of Forest Research*, 43(1), 18-27. <http://dx.doi.org/10.1139/cjfr-2012-0324>
- Wellburn, A.R. 1994. The spectral determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313. [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

