



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

FACULTAD DE FARMACIA

DOCTORADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA ANALÍTICA

**DESARROLLO DE ESTRATEGIA ANALÍTICA DE
DETECCIÓN DE *FUSARIUM CIRCINATUM* EN
MUESTRAS DE ORIGEN FORESTAL MEDIANTE
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al grado de Doctor en Ciencias y Tecnología Analítica

POR: MARTÍN DIEGO BRAVO ARREPOL

Profesor(a) Guía: Dr(a) Rosario del P. Castillo Felices

Profesor Co-guía: Dr. Eugenio Sanfuentes

Mayo 2025

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de investigación y desarrollo ANID, por financiar este proyecto a través de la Beca de Doctorado Nacional 21201971. Además de los proyectos FONDECYT 1221387 y FOVI 220172.

Agradecer a la Universidad de Concepción por su apoyo económico a pasantía de corta duración en Bilbao España.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Rosario Castillo por su apoyo, su liderazgo inspirador y la confianza depositada en mí durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco sinceramente al Decano Eugenio Sanfuentes por facilitar su laboratorio, haciendo posible la ejecución de gran parte del trabajo aquí presentado.

Mi gratitud también va dirigida a José Manuel Amigo, por su generosa ayuda y por compartir conmigo sus valiosos conocimientos en quimiometría, los cuales han sido fundamentales para mi formación y para el avance de esta investigación.

A mi familia, a mi madre, padre, hermano, y a Dania Saladrigas, les debo un agradecimiento muy especial. Su amor incondicional, apoyo constante y motivación han sido pilares fundamentales que me han permitido llegar hasta aquí.

Al laboratorio de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales, gracias por acogerme y brindarme un espacio de trabajo colaborativo y enriquecedor. En particular, agradezco a Angella Navarro, por su disposición, paciencia y enseñanzas en el trabajo de laboratorio

Extiendo mi agradecimiento a mis colegas del doctorado y del grupo BIOSPEC —Cristian, Macarena, Pamela y Mario— por los momentos compartidos, el compañerismo, las risas y las reflexiones que han hecho de estos años una experiencia inolvidable. Espero poder seguir colaborando con ustedes en el futuro.

A mis excompañeros de Ciencias Químicas, Claudio, Eimmy, Jonnathan y Marizú, gracias por su amistad y apoyo continuo. Espero que nuestras trayectorias sigan entrelazándose, junto al profesor J. Yáñez, en nuevos proyectos y desafíos.

I would also like to express my heartfelt gratitude to the international friends I met during my internship. I want to thank the Turkish community at the Faculty of Food Engineering at Middle East Technical University. I am especially grateful to Professor Mecit for his hospitality and trust. My sincere thanks also go to Sultan & Berk, Elif, Ozge, Dilara, Volkan, Hilmi and Eren, whose friendship and company I will deeply miss. To Esmá and her wonderful family, I am truly thankful. I would also like to thank Bodoor, my Palestinian friend, whose people will always stand on the right side of history. And finally, to Aymelek—thank you for your warmth,

generosity, and charisma, which made my stay an enriching experience, both personally and professionally.

Finalmente, gracias a todas las personas que, de una u otra manera, me ayudaron y colaboraron en la realización de este proyecto. Cada aporte ha sido valioso y significativo, y sin ustedes, este logro no habría sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDO.....	6
ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	18
1 INTRODUCCIÓN.....	20
1.1 Contexto general y relevancia del <i>Pinus radiata</i> en la industria forestal 20	
1.2 Principales amenazas a las plantaciones	21
1.3 Hongo patógeno <i>F. circinatum</i>	22
1.4 Taxonomía	22
1.5 Ciclo de vida	25
1.6 Síntomas de la enfermedad del cancro resinoso.....	28
1.7 Regulación.....	31
1.8 Métodos tradicionales de detección y sus limitaciones.....	31

1.9	Métodos de detección en etapas tempranas.....	33
1.10	Técnicas espectroscópicas aplicadas a la detección de patógenos... 37	
1.10.1	<i>Breve fundamento de la espectroscopia y su aplicación en la detección de enfermedades.....</i>	37
1.10.2	<i>Fundamentos generales de la teledetección espectral en plantas.</i>	42
1.10.3	<i>Tecnologías multiespectrales: fundamentos y características.....</i>	42
1.10.4	<i>Tecnologías hiperespectrales: fundamentos y características.....</i>	43
1.10.5	<i>Interacción luz-planta</i>	43
1.10.6	<i>Estudios previos sobre la detección de Fusarium spp. mediante técnicas espectrales y métodos multivariados.....</i>	46
1.11	Referencias	51
2	PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	67
2.1	Problema de investigación.....	67
2.2	Hipótesis.....	69
2.3	Objetivos.....	70
2.3.1	<i>Objetivo general</i>	70
2.3.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	70
3	ESTRATEGIA ANALÍTICA	72

3.1	Estrategia analítica análisis <i>in vitro</i>	72
3.2	Estrategia analítica análisis de sustrato.....	74
3.3	Estrategia analítica análisis de acículas de pino.	75
3.4	Estrategia analítica análisis de plántulas de pino	77
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
4.1	Light-driven incubation of <i>Fusarium</i> species and near-infrared spectroscopy for an early <i>in vitro</i> identification of <i>Fusarium circinatum</i>	81
4.1.1	Abstract	82
4.1.2	Introduction.....	83
4.1.3	Materials and methods	85
4.1.4	Results and discussion.....	92
4.1.5	Conclusions.....	112
4.1.6	Declaration of competing interests	113
4.1.7	Acknowledgements	113
4.1.8	References	114
4.2	Evaluación espectroscópica de sustratos inoculados con <i>Fusarium circinatum</i> : análisis hiperespectral y quimiometría para la detección temprana del patógeno.....	120
4.2.1	Resumen	120

4.2.2	Introducción	121
4.2.3	Materiales y métodos	123
4.2.4	Resultados y discusión.....	126
4.2.5	Conclusiones.....	131
4.2.6	Referencias.....	132
4.3	Aplicación de microespectroscopía FTIR-ATR y análisis multivariado para el estudio de alteraciones químicas en acículas de <i>Pinus radiata</i> infectadas con <i>Fusarium circinatum</i>	134
4.3.1	Resumen	134
4.3.2	Introducción.....	135
4.3.3	Materiales y métodos	142
4.3.4	Resultados y discusión.....	148
4.3.5	Conclusiones.....	161
4.3.6	Referencias	162
4.4	Early detection of <i>Fusarium circinatum</i> in <i>Pinus radiata</i> cuttings using hyperspectral imaging and multivariate analysis	169
4.4.1	Abstract	169
4.4.2	Introduction.....	171
4.4.3	Materials and methods	174

4.4.4	Results and discussion	183
4.4.5	Conclusions	203
4.4.6	Declaration of competing interest	205
4.4.7	Acknowledgement	205
4.4.8	References	206
5	CONCLUSIONES	212
5.1	Conclusión del primer objetivo específico (base de datos)	212
5.2	Conclusión del segundo objetivo específico (modelos desarrollados) 213	
5.3	Conclusiones del objetivo específico 3 (Localización)	214
5.4	Conclusiones del objetivo específico 4	215
5.5	Conclusión global	216

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.10-1 Regiones usadas en espectroscopia para detección de enfermedades en plantas.	38
Tabla 1.10-2 Resumen estado del arte en análisis de <i>Fusarium</i> spp.	48
Table 4.1-1 Summary of PLS-DA model performance metrics for <i>F. circinatum</i> at different hpc using warm light with various preprocessing methods in the test data set.	102
Table 4.1-2 Best PLS-DA models of the dichotomic strategies	107
Table 4.1-3 Best SVMDA models of the dichotomic strategies	108
Tabla 4.1-4 Comparison of classification models	111
Tabla 4.3-1 Asignación de bandas espectrales	149
Tabla 4.4-1 F-test with two tails for genotype A and B ($\alpha=0.05$). N/A: Not apply	196
Tabla 4.4-2 Figures of merit for cross-validation of ROIs for genotype A and B.	198

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.4-1 Evolución de la taxonomía de <i>Fusarium circinatum</i> desde su primer reporte en 1946.....	23
Figura 1.5-1 Ciclo de enfermedad de <i>Fusarium circinatum</i> modificado de [18]	28
Figura 1.6-1 Síntomas de la enfermedad del cancro resinoso del pino (Pine Pitch canker). Izquierda: resinación en cuello de la planta de seto. Derecha: marchitamiento apical a raíz cubierta [4]	30
Figura 1.9-1 Métodos tradicionales e innovadores. Se consideran cuatro estados de la enfermedad [26]	35
Figura 1.10-1 Interacción del tejido vegetal con la radiación.	45
Figura 3.4-1 Estrategia analítica para la detección de <i>F. circinatum</i> mediante técnicas espectroscópicas y análisis multivariado.	78
Figura 4.1-1 Different zones of the colony analyzed by reflectance spectroscopy: central colony (A), middle colony (B), and border colony (C).	88
Figure 4.1-2 Score plot of four <i>Fusarium</i> species at different hpc, labeled by zones of the fungal colony. A : samples incubated with warm light. B : samples incubated with NUV light. C : loading plot of PC2 at different hours post cultivation using NUV incubation light	97
Figura 4.1-3 PCA analysis for <i>Fusarium</i> species differentiation at different hpc A: Score plot of the first two principal components using warm light. B: Score plot of	

the first two principal components at different hours post cultivation using NUV.	99
Figura 4.1-4 An Illustration of index class matrix of the training set. According to Model A, Class One is defined as the set of samples of <i>F. circinatum</i> and <i>F. oxysporum</i> , and Class Two as the set of samples of <i>F. acuminatum</i> and <i>F. tricinctum</i> . Similarly, this classification applies to Models B and C.....	104
Figura 4.2-1 Espectros promedios de todos los sustratos después de aplicado el binning.	127
Figura 4.2-2 Espectros preprocesados con SNV de todas las muestras de sustrato.	128
Figura 4.2-3 Tres primeros componentes principales, en la zona superior están las matrices de scores de cada componente, las 5 primeras filas corresponden a los controles y las 5 filas siguientes a las infectadas, las columnas corresponde a los dpi's. En la zona inferior los loadings de ese componente.	129
Figura 4.3-1 Flujo de la metodología.	144
Figura 4.3-2 Proceso de resolución aplicado a varias imágenes extraído de [21]	147
Figura 4.3-3 Espectros en absorbancia promedios normalizados por imagen a través del tiempo.....	148
Figura 4.3-4 Imagen μ FTIR-ATR de <i>F. circinatum</i> aislado en PDA.....	151

Figura 4.3-5 Perfil espectral puro de <i>F. circinatum</i> en medio PDA.....	151
Figura 4.3-6 Gráfico de scores (superior) y loadings (inferior) utilizando los promedios de las imágenes.....	153
Figura 4.3-7 Mapas de scores de acículas de <i>P. radiata</i> . En la parte superior se ubica el primer componente principal y en la parte inferior el segundo componente principal	155
Figura 4.3-8 Loading del PC1 y PC2 obtenido del análisis de componentes principales de las imágenes.....	156
Figura 4.3-9 MCR de muestras de acículas de <i>P. radiata</i>	158
Figura 4.3-10 Espectros puros MCR con las bandas más relevantes.	160
Figure 4.4-1 images of Inoculation and control plants of genotype A. The first row shows the control sample without symptoms. The second row shows defoliation on day 44, and apical decline and chlorosis on day 57.....	184
Figura 4.4-2 Reference spectra of control and inoculated cuttings at 27 dpi for both genotypes.	185
Figura 4.4-3 Fast-PCA score distribution and spectral variability between genotypes. Top panel: map score distribution of genotype A and B. Bottom panel: Loading plot for PC1 (45,76% variance explained).	189
Figura 4.4-4 Top Panel: Score surface of PC1 from the ROIs of <i>P. radiata</i> obtained using fast-PCA. The top panel represents genotype A, while the middle panel	

corresponds to genotype B. In the score matrices, rows indicate the days post-inoculation, and columns represent the samples. The first five samples on the left correspond to controls, while the following seven samples correspond to inoculated specimens. Bottom panel: Loading plot of first principal component for genotype A and B..... 191

Figura 4.4-5 Percentages of stress-associated pixels of PC1 scores for genotype A (top) and genotype B (bottom) over time. 195

Figura 4.4-6 Prediction set for genotype A at different dpi with the percentages of stress-associated pixels in the ROI's. 201

Figura 4.4-7 Prediction set for genotype B at different dpi, with the percentages of stress-associated pixels in the ROI's 202

RESUMEN

La presente investigación aborda el desarrollo y la validación de metodologías innovadoras para la detección temprana de *Fusarium circinatum*, hongo fitopatógeno de relevancia mundial en la silvicultura de *Pinus radiata*. A lo largo del estudio, se caracteriza la complejidad biológica del patógeno y sus interacciones con el hospedero, subrayando la importancia de un diagnóstico precoz para minimizar las pérdidas económicas y ecológicas que ocasiona la enfermedad. Frente a las limitaciones de los métodos convencionales (como el cultivo en medios selectivos o la PCR), se propone la aplicación de técnicas espectroscópicas (NIR, FT-IR, y sistemas hiperespectrales) en combinación con análisis quimiométricos avanzados, demostrando su eficacia para discriminar de manera rápida, no destructiva y altamente sensible la presencia de *F. circinatum* en muestras de tejido fúngico, sustratos inoculados y plántulas, incluso antes de la aparición de síntomas visibles. El trabajo reveló que, a pesar de la imposibilidad de validar estos procedimientos en viveros forestales por restricciones logísticas y normativas asociadas al patógeno cuarentenario, las pruebas en condiciones controladas confirman su potencial como herramienta diagnóstica de amplio alcance. Asimismo, se destacan las diferencias espectrales observadas en distintos genotipos de *P. radiata*, lo que sugiere aplicaciones futuras en programas de mejoramiento genético y en la adaptación de estrategias de control. Con estos hallazgos, el estudio sienta las bases para la adopción de

métodos espectroscópicos en la sanidad forestal, ofreciendo una alternativa competitiva frente a las técnicas tradicionales y abriendo nuevas posibilidades de gestión preventiva en la industria maderera

ABSTRACT

This research addresses the development and validation of innovative methodologies for the early detection of *Fusarium circinatum*, a globally significant phytopathogen in *Pinus radiata* silviculture. Throughout the study, the biological complexity of the pathogen and its interactions with the host are characterized, highlighting the importance of early diagnosis to minimize the economic and ecological losses caused by the disease. Given the limitations of conventional methods (such as selective culture media or PCR), this work proposes the application of spectroscopic techniques (NIR, FT-IR, and hyperspectral systems) combined with advanced chemometric analyses, demonstrating their effectiveness in rapidly, non-destructively, and highly sensitively detecting the presence of *F. circinatum* in fungal tissue, inoculated substrates, and seedlings, even before visible symptoms appear. The study revealed that, despite the inability to validate these procedures in forest nurseries due to logistical and regulatory restrictions associated with the quarantined pathogen, tests conducted under controlled conditions confirm their potential as a powerful diagnostic tool. Furthermore, spectral differences observed among different *P. radiata* genotypes suggest future applications in genetic improvement programs and the adaptation of control strategies. These findings lay the foundation for the adoption of spectroscopic methods in forest health management, offering a competitive

alternative to traditional techniques and opening new possibilities for preventive management in the timber industry.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto general y relevancia del *Pinus radiata* en la industria forestal

Pinus radiata D. Don, conocido comúnmente como pino insigne o pino de Monterrey, es una especie arbórea originaria de la costa central de California, Estados Unidos. A pesar de su origen limitado, su adaptabilidad y rápido crecimiento han permitido su introducción y cultivo extensivo en diversas regiones del mundo, convirtiéndola en una de las especies forestales más importantes a nivel global [1]

En Chile, la introducción de *P. radiata* se remonta a finales del siglo XIX, adaptándose notablemente a las condiciones climáticas y edáficas del país. Actualmente, esta especie constituye la base de la industria forestal chilena, representando el 97,2% de la producción nacional de madera aserrada en 2020, con la Región del Biobío aportando casi el 40% de esta producción[2]. Este predominio ha impulsado significativamente la economía nacional, generando empleo y fomentando el desarrollo de infraestructuras en zonas rurales.

En Estados Unidos, aunque *P. radiata* es nativa de California, su cultivo comercial es limitado en comparación con otras especies de pino. No obstante, su importancia ecológica en su área de distribución natural es significativa, proporcionando hábitat para diversas especies y contribuyendo a la biodiversidad local [3].

1.2 Principales amenazas a las plantaciones

Las plantaciones de *P. radiata* enfrentan diversas amenazas que comprometen su sostenibilidad. Una de las más significativas es el hongo *F. circinatum*, agente causal del cancro resinoso, que afecta a numerosas especies de coníferas y ha sido reportado en países como Chile y España, representando un riesgo considerable para las plantaciones [4].

El cambio climático también plantea desafíos, ya que las variaciones en las condiciones climáticas pueden favorecer la proliferación de plagas y enfermedades, además de aumentar la frecuencia de eventos climáticos extremos que afectan el crecimiento y la supervivencia de las plantaciones [5,6].

Estudios previos han señalado la necesidad de implementar estrategias de manejo integrado que incluyan la selección de material genético resistente y prácticas silvícolas adecuadas para mitigar estos riesgos [7]. Asimismo, se han realizado estudios sobre la respuesta de los árboles a estrés biótico, utilizando enfoques multidisciplinarios para comprender mejor las interacciones entre *P. radiata* y patógenos como *F. circinatum* [8]

1.3 Hongo patógeno *F. circinatum*

Fusarium circinatum es el agente causal del cancro resinoso del pino (*Pitch Canker*), enfermedad que afecta a diversas especies del género *Pinus*, siendo *P. radiata* una de las más susceptibles. Su diseminación y severidad han generado grandes pérdidas en la silvicultura a nivel global [9]

1.4 Taxonomía

F. circinatum (teleomorfo *Gibberella circinata*) se distingue por producir hifas estériles en forma de espiral (“coiled hyphae”), característico de especies dentro del complejo *Gibberella fujikuroi*. Su taxonomía y nombres científicos han sido actualizados varias veces (Figura 1.4-1). Actualmente y de acuerdo con análisis genéticos, morfológicos y bioquímicos su taxonomía fue establecida por Nirenberg and O’Donnel (1998).

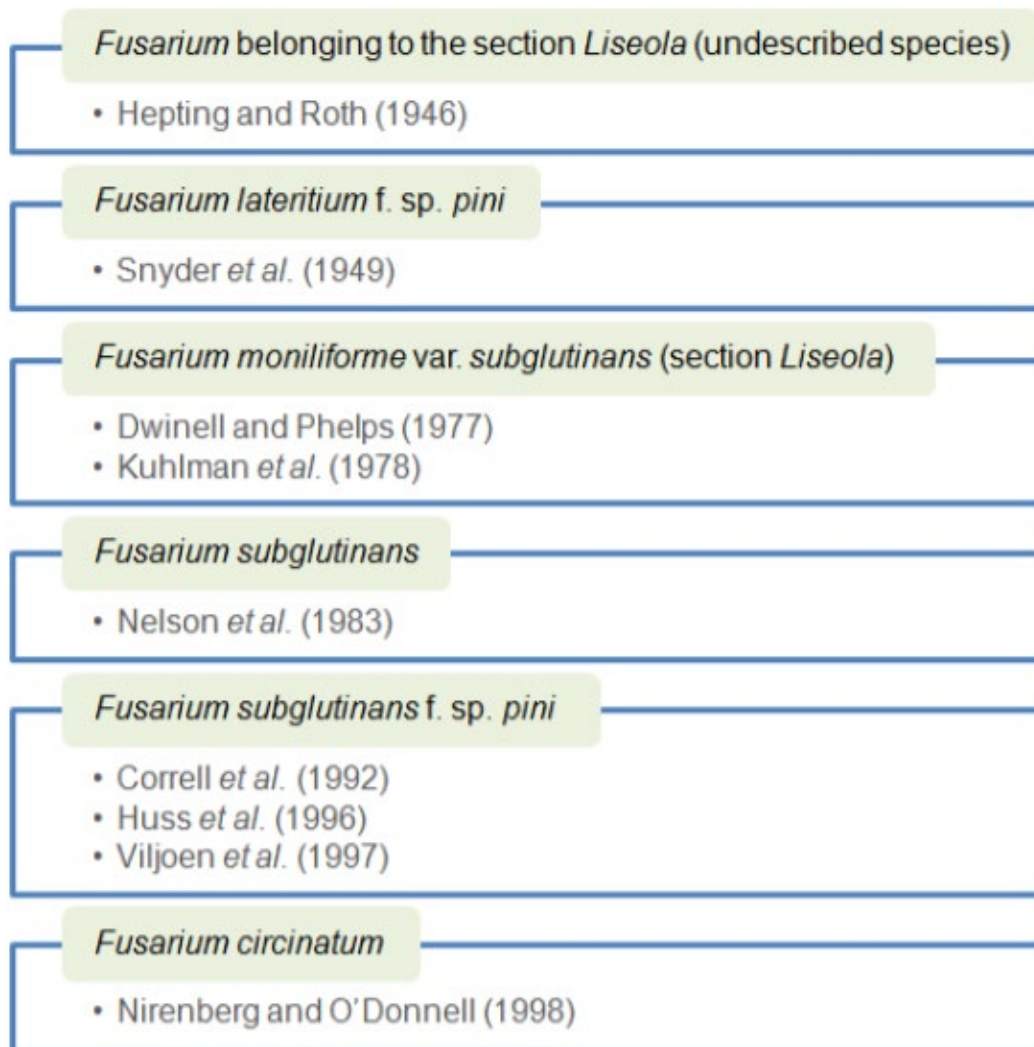


Figura 1.4-1 Evolución de la taxonomía de *Fusarium circinatum* desde su primer reporte en 1946.

A continuación, se describe de manera detallada la morfología de este hongo en diferentes medios de cultivo [10].

Características de crecimiento en SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar)

- Hifas en espiral: Son más fáciles de ver y más numerosas que en CLA, siendo esta una de las principales ventajas de SNA para la identificación de *F. circinatum*. Estas hifas estériles enrolladas constituyen el rasgo morfológico más distintivo de la especie.
- Macroconidios y microconidios: Se producen de forma similar a lo observado en CLA; sin embargo, el principal interés de este medio es la fácil detección de las hifas en espiral y la buena formación de microconidios [10].

Características de crecimiento en PDA (Potato Dextrose Agar)

- Produce micelio blanco con posible pigmentación violeta en el agar, variable entre cepas.
- El crecimiento suele ser relativamente rápido, aunque en este medio la formación de macroconidios puede ser limitada. El aspecto colonial (color y velocidad de crecimiento) puede complementar la identificación, pero no resulta tan diagnóstico como las hifas en espiral que se observan mejor en SNA [10].

Otras observaciones relevantes

- No produce clamidosporas. Algunas cepas pueden presentar hinchamientos en las hifas que se asemejan superficialmente a clamidosporas.
- Pertenece al complejo *G. fujikuroi*, por lo que sus macroconidios delgados y ligeramente curvados recuerdan a los de otras especies emparentadas, como *F. subglutinans*. Para su diferenciación, uno de los rasgos más útiles es precisamente la presencia de hifas en espiral, difíciles de observar en *F. subglutinans*, y la morfología de los macroconidios, que en *F. circinatum* tienden a ser algo más cortos y usualmente con tres septos.
- Existen técnicas moleculares (secuenciación de genes conservados) que confirman su identidad de forma más confiable, especialmente en caso de observar variabilidad morfológica. Además, cuando se dispone de las cepas tester adecuadas, la obtención de peritecios fértiles en cruces dirigidos constituye otra prueba diagnóstica para este hongo [10].

1.5 Ciclo de vida

Fusarium circinatum es un hongo ascomiceto que se reproduce tanto de forma asexual como sexual (*G. circinata*), aunque se considera que la reproducción asexual es más común. En la fase asexual, el hongo produce conidios agrupados en esporodoquios de color salmón a púrpura, los cuales suelen localizarse en ramas y tallos secos, pero son difíciles de detectar [11]. En cuanto a la

reproducción sexual, esta contribuye a la diversidad genética, pero sigue siendo menos común, especialmente en las primeras etapas de los brotes. No obstante, las estructuras sexuales no han sido observadas en el campo, posiblemente debido a que solo se desarrollan bajo condiciones ambientales específicas, como las que se dan durante el invierno[12].

Este patógeno puede dispersarse durante todo el año a través del viento, el agua, insectos, suelo y de materiales vegetales infectados [3,13–15]. El hongo invade cualquier herida fresca y, al hacerlo, desarrolla lesiones resinadas en las ramas y tallos infectados, provocando la descomposición de tejidos y la formación de esporas, que contribuyen a la propagación de la enfermedad [16]. Aunque *F. circinatum* no forma esporas de resistencia a largo plazo, sus conidios pueden sobrevivir temporalmente en el suelo y en restos de madera [3]. Es fundamental tener en cuenta que estos aspectos pueden variar según la especie hospedante y la región geográfica.

Las condiciones climáticas también ejercen un rol decisivo en los brotes de la enfermedad. Inman et al. (2008) demostraron en cultivos que la temperatura óptima para la germinación de las esporas es de alrededor de 20 °C, mientras que el crecimiento máximo del hongo se observa cerca de 25 °C [17]. Esto explicaría porque *F. circinatum* prospera mejor en algunas regiones durante los meses más cálidos de primavera. Sin embargo, incluso con temperaturas idóneas, la humedad resulta el factor más crítico para que se produzca la

infección [11]. Así, en ambientes con suficiente humedad y temperaturas dentro del rango óptimo, las probabilidades de infección aumentan significativamente.

Finalmente, en el campo es posible detectar *F. circinatum* en árboles infectados, y cuando un árbol muere, el hongo permanece en el material vegetal, pudiendo dispersarse y penetrar en otro hospedante a través de heridas abiertas. En los viveros, la transmisión se favorece cuando las esporas circulan por el aire, se introducen semillas contaminadas o se emplean herramientas infestadas (contaminadas), además de otras prácticas culturales que facilitan el movimiento del patógeno [11] (Figura 1.5-1).

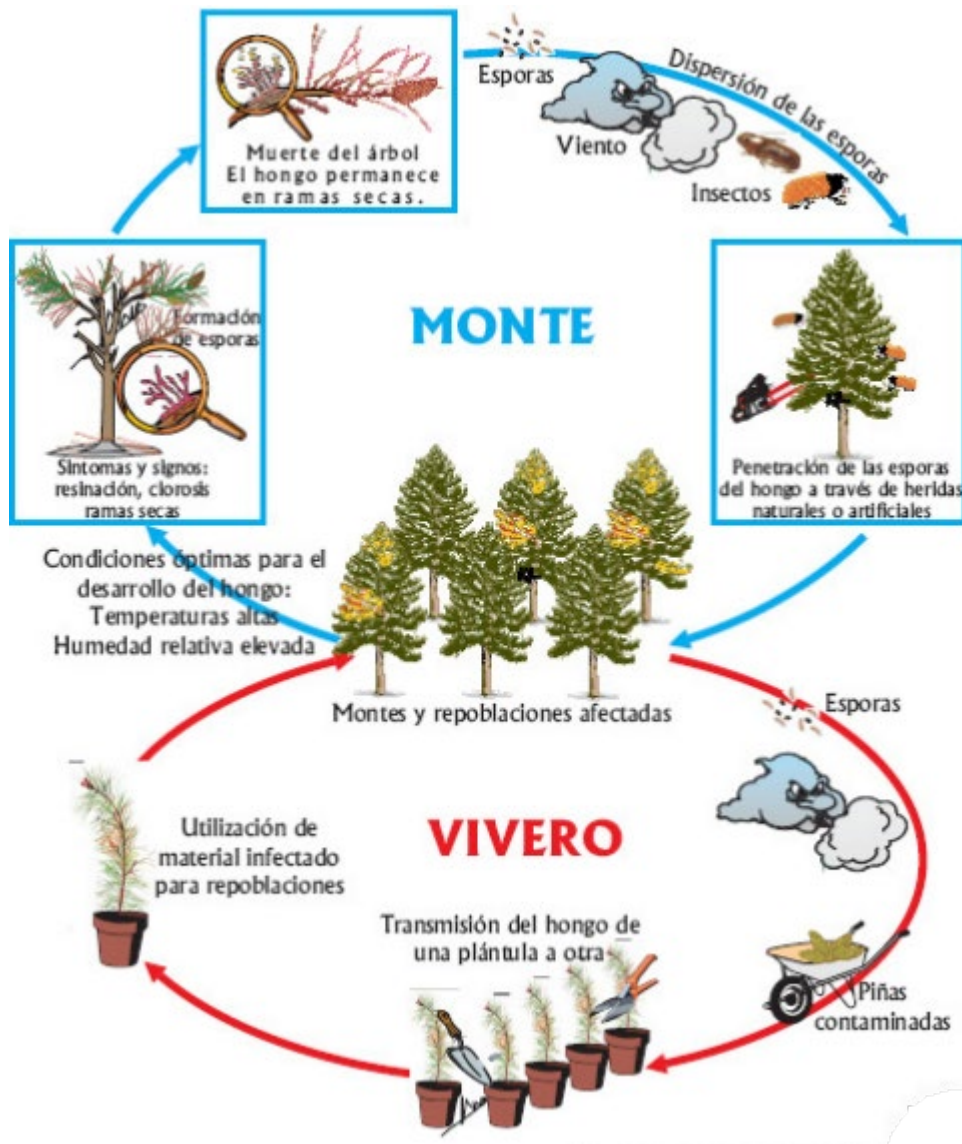


Figura 1.5-1 Ciclo de enfermedad de *Fusarium circinatum* modificado de [18]

1.6 Síntomas de la enfermedad del cancro resinoso

Los síntomas más característicos de la enfermedad conocida como "pitch canker" incluyen: (i) marchitamiento y decoloración de las acículas (ver Figura 1.6-1), que

seguido de necrosis (color rojizo) y defoliación; (ii) muerte regresiva de las ramas, resultado de la obstrucción del flujo de agua causada por canchos anulares; y (iii) canchos resinosos en el tronco o en las ramas [3,19]. Además, el hongo puede provocar deformación del tallo, reducir la tasa de crecimiento o provocar la muerte del árbol. En los viveros, puede causar “damping-off” de pre o post-emergencia, y en plantas con crecimiento secundario marchitamiento y clorosis del follaje, seguido de necrosis parcial y muerte de la planta [19,20].

Asimismo, *F. circinatum* infecta estructuras reproductivas (flores, conos y semillas), causando deterioro, menor crecimiento y mortalidad [21]. Las semillas infectadas o contaminadas pueden reducir de manera significativa la germinación o generar plantas asintomáticas, permaneciendo el patógeno en estado latente [22,23]. Estas plantas asintomáticas constituyen un serio riesgo para los programas de forestación, ya que, dependiendo de las condiciones del sitio, el patógeno podrá continuar colonizando los tejidos causando la muerte de la planta, y, por otro lado, diseminando el patógeno a nuevas áreas.

La detección temprana de *F. circinatum*, es crucial para mitigar su impacto en las plantaciones forestales, ya que la enfermedad se propaga rápidamente y puede afectar gravemente a los árboles. Identificar la infección en sus primeras etapas permite tomar medidas de control eficaces, reduciendo costos y evitando la propagación. Además, facilita el monitoreo de la salud de los árboles y la

implementación de prácticas como la poda de ramas infectadas o el uso de fungicidas.



Figura 1.6-1 Síntomas de la enfermedad del cancro resinoso del pino (Pine Pitch canker). Izquierda: resinación en cuello de la planta de seto. Derecha: marchitamiento apical a raíz cubierta [4]

1.7 Regulación

El Servicio Agrícola Ganadero (SAG) en Chile declara esta plaga bajo control oficial tanto para *P. radiata* como otras especies. Esta declaración se realiza a través de la resolución N°1742 2003 y sus modificaciones (resoluciones N°1424 de 2008, N°4310 de 2008 y N°1754 de 2011).

1.8 Métodos tradicionales de detección y sus limitaciones.

La detección de *F. circinatum* se lleva a cabo a través de dos enfoques complementarios: desde muestras de tejido vegetal en laboratorio y la cuantificación de esporas en el ambiente. En el ámbito del diagnóstico en plantas, el proceso inicia con la recepción, verificación y preparación de las muestras, asegurando que estas cumplan con los criterios establecidos de trazabilidad y conservación. Posteriormente, las raíces y el cuello de las plantas se desinfectan superficialmente con hipoclorito de sodio y se seccionan para su posterior cultivo en medios selectivos, como PDA (Agar Papa Dextrosa) y MSF (Medio Selectivo para *Fusarium*). Tras un periodo de incubación, las colonias sospechosas son evaluadas mediante microscopía, y aquellas que presenten características compatibles con *F. circinatum* se someten a extracción de ADN y posterior amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando partidores específicos. Este enfoque permite la confirmación molecular del patógeno con alta especificidad y sensibilidad, asegurando un diagnóstico confiable en el marco del control fitosanitario oficial [24]

En el ámbito epidemiológico, la cuantificación de *F. circinatum* en el ambiente se realiza mediante un método de captura de esporas utilizando papel filtro, seguido de análisis molecular por PCR en tiempo real. Esta metodología consiste en la instalación de trampas en áreas de interés para la recolección de esporas en suspensión, permitiendo un monitoreo más eficiente y prolongado en comparación con los métodos tradicionales de cultivo en medios selectivos. Posteriormente, las esporas atrapadas son sometidas a un proceso de extracción de ADN y cuantificación molecular, donde la medición del umbral de amplificación (Ct) permite estimar la concentración de inóculo presente en el aire. La implementación de PCR en tiempo real representa un avance significativo en la detección y vigilancia de *F. circinatum*, facilitando la toma de decisiones en programas de manejo y control de esta enfermedad [25].

A pesar de su alta especificidad y sensibilidad, PCR presenta diversas limitaciones que pueden afectar su aplicabilidad en estudios de diagnóstico fitopatológico y epidemiología molecular. En primer lugar, se trata de una técnica relativamente lenta y laboriosa, ya que requiere múltiples etapas, incluyendo la extracción y purificación del ADN, la preparación de mezclas de reacción, la amplificación térmica y la posterior interpretación de los resultados. Estas etapas deben ser realizadas bajo estrictas condiciones de control para evitar la contaminación cruzada y garantizar la confiabilidad del análisis. Además, la PCR no es adecuada para el procesamiento de grandes volúmenes de datos, ya que cada reacción se lleva a cabo de manera individual, lo que restringe la capacidad

de análisis masivo en comparación con otras tecnologías más recientes. Otro aspecto relevante es la necesidad de equipamiento sofisticado, como termocicladores de alta precisión y sistemas de detección específicos en el caso de la PCR en tiempo real, lo que eleva los costos operativos y restringe su accesibilidad a laboratorios con infraestructura avanzada. Asimismo, en la práctica, solo se analiza una fracción limitada de muestras en relación con el volumen total de material biológico disponible, lo que compromete la representatividad del ensayo y puede generar sesgos en la interpretación de la presencia o ausencia del patógeno en un determinado entorno. Esta limitación es particularmente crítica en estudios epidemiológicos y de monitoreo ambiental, donde la detección de inóculo en grandes áreas requiere un muestreo extensivo, el cual es difícil de abordar con técnicas que operan a pequeña escala. En este sentido, la aplicabilidad de la PCR en el contexto del diagnóstico fitosanitario y la vigilancia epidemiológica debe ser complementada con estrategias que optimicen la representatividad del muestreo y la eficiencia analítica, como el uso de métodos de detección paralela o técnicas de alto rendimiento.

1.9 Métodos de detección en etapas tempranas.

Las desventajas mencionadas anteriormente plantean el desafío de encontrar un método capaz de detectar la enfermedad de manera rápida y confiable en plantas asintomáticas como sintomáticas y ayuden a disminuir las pérdidas causadas en los cultivos y evitar la propagación del patógeno

La detección temprana de patógenos en plantas es fundamental en la agricultura moderna, ya que permitirá implementar estrategias de control para evitar la diseminación del patógeno y reducir las pérdidas económicas. Los métodos convencionales, como la inspección visual y las técnicas basadas en ADN y serología, aunque eficaces, presentan limitaciones en la identificación de infecciones en sus primeras fases, especialmente en aquellos patógenos de diseminación sistémica. En respuesta a estas limitaciones, han surgido enfoques innovadores basados en tecnologías avanzadas de detección, entre las que destacan los sensores de movilidad diferencial, los biosensores biotónicos y las técnicas de teledetección acopladas a espectroscopía. Estas herramientas permiten evaluar la respuesta fisiológica de las plantas ante el ataque de patógenos, incluso antes de la aparición de síntomas, facilitando una intervención temprana y precisa. La integración de estas metodologías con sistemas de inteligencia artificial y análisis de datos multivariados optimiza la precisión diagnóstica y favorece la toma de decisiones en el manejo fitosanitario. De este modo, la detección temprana no solo contribuye a la reducción del uso de agroquímicos, sino que también promueve una agricultura más eficiente, sostenible y resiliente frente a las amenazas de fitopatógenos [26].

En este contexto, resulta crucial comprender cómo diferentes metodologías se alinean con la progresión de una enfermedad en los cultivos. La relación entre los métodos de detección y las etapas de desarrollo de la infección (Figura 1.9-1) se distinguen cuatro fases principales: infección primaria, infección temprana,

infección avanzada y manifestación de síntomas [26]. Mientras que los métodos convencionales, como las pruebas serológicas y las técnicas de amplificación de ADN, resultan altamente eficaces para confirmar la presencia de patógenos una vez que la enfermedad está establecida, su capacidad para detectar infecciones en fases asintomáticas es limitada. Por el contrario, las estrategias emergentes, basadas en sensores de movilidad diferencial, biosensores y análisis de compuestos volátiles, permiten identificar infecciones desde sus primeras etapas, proporcionando una ventaja significativa en la prevención y contención de brotes [26].

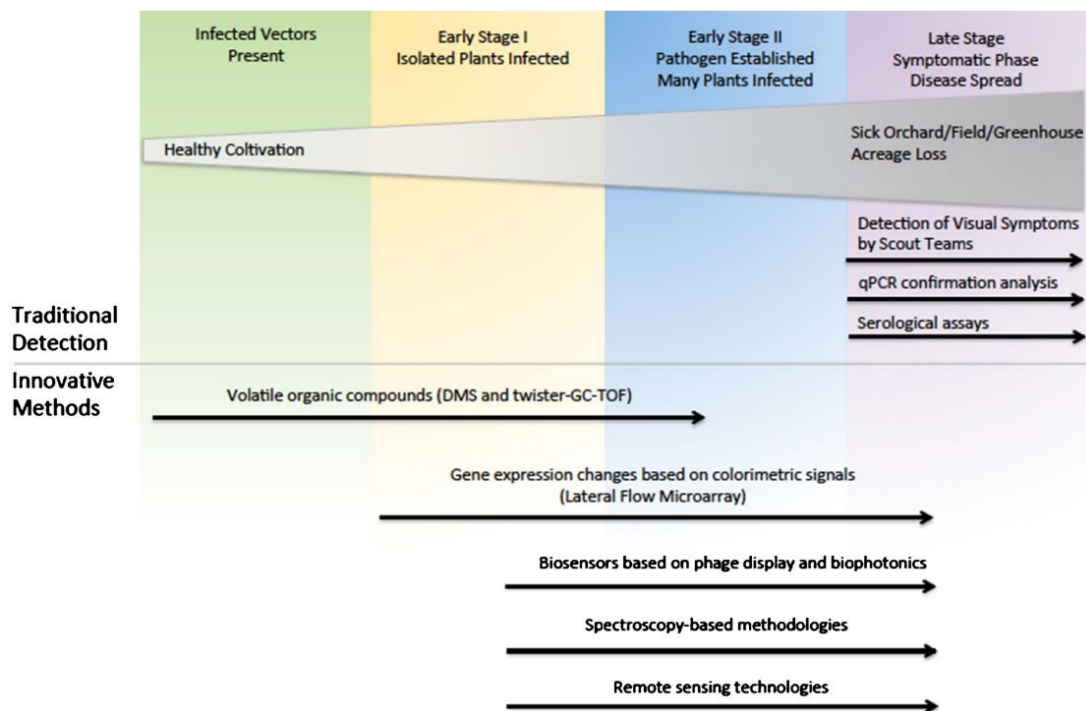


Figura 1.9-1 Métodos tradicionales e innovadores. Se consideran cuatro estados de la enfermedad [26]

Asimismo, las tecnologías de teledetección, combinadas con métodos espectroscópicos, posibilitan una evaluación remota y a gran escala del estado fitosanitario de los cultivos, facilitando el monitoreo continuo de extensas áreas agrícolas. Estas herramientas no solo permiten detectar anomalías en la fisiología de las plantas antes de que los síntomas sean evidentes, sino que también posibilitan la identificación de patrones espaciales de diseminación de enfermedades, lo que resulta esencial para la implementación de estrategias de control y mitigación basadas en modelos predictivos. En este sentido, la integración de técnicas tradicionales con innovaciones tecnológicas representa una estrategia clave para mejorar la precisión y rapidez en la detección de enfermedades, asegurando una gestión más eficiente y sostenible de la sanidad vegetal [26].

En este contexto, la agricultura de precisión adquiere relevancia al integrar datos de sensores, imágenes satelitales y drones con información georreferenciada y análisis avanzado. Esto optimiza la aplicación de insumos y la toma de decisiones basadas en condiciones locales y el comportamiento de los patógenos. Desde la perspectiva del artículo, estas tecnologías facilitan la acción temprana ante brotes iniciales y refuerzan la sostenibilidad de la producción. La convergencia de métodos clásicos con innovaciones en teledetección y análisis espectroscópicos impulsa intervenciones más eficaces, reduciendo costos, carga ambiental y garantizando cultivos saludables a gran escala [27].

1.10 Técnicas espectroscópicas aplicadas a la detección de patógenos

1.10.1 Breve fundamento de la espectroscopia y su aplicación en la detección de enfermedades

La espectroscopia es una disciplina científica que estudia la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Esta interacción permite identificar y caracterizar compuestos mediante el análisis de la absorción, emisión o dispersión de luz en diferentes longitudes de onda [28,29]. En términos físicos, la energía de una onda electromagnética está relacionada con su frecuencia a través de la ecuación de Planck:

$$E = h\nu$$

Donde:

- E es la energía del fotón.
- h es la constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34}$ J s)
- ν es la frecuencia de la onda electromagnética.

El espectro electromagnético cubre una amplia gama de longitudes de onda, desde los rayos gamma hasta las ondas de radio. Para la detección de patógenos en plantas y ecosistemas forestales, se utilizan principalmente las regiones del ultravioleta (UV), visible (VIS), infrarrojo cercano (NIR) e infrarrojo medio (MID-IR). Las energías y rangos se resumen en la Tabla 1.10-1.

Tabla 1.10-1 Regiones usadas en espectroscopia para detección de enfermedades en plantas.

Región	Longitud de onda λ (μm)	N° onda (cm^{-1})
Ultravioleta	0,10-0,38	50000-26000
Visible	0,38-0,78	26000-12800
IR-cercano	0,78-2,5	12800-4000
IR-medio	2,5-50	4000-200

La absorción de radiación electromagnética por parte de los materiales sigue la Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon cl$$

Donde:

- A es la absorbancia,
- ϵ es el coeficiente de absorción molar,
- c es la concentración de la sustancia,
- l es la longitud del camino óptico.

Esta ecuación es la base de diversas técnicas espectroscópicas, como la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), la espectroscopia Raman y la espectroscopia de reflectancia total atenuada (ATR) [30].

La espectroscopia ha emergido como una herramienta poderosa para la identificación rápida y precisa de patógenos en diversas matrices, incluyendo alimentos, plantas y fluidos biológicos. Entre las técnicas espectroscópicas más utilizadas se encuentra la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), la cual ha demostrado ser eficaz en la identificación de bacterias patogénicas tanto en medios de cultivo como en matrices vegetales [31]. Estudios recientes han confirmado la utilidad de FT-IR en la clasificación de microorganismos a partir de patrones espectrales únicos, comparables a huellas digitales, que son reproducibles y específicos para diferentes especies de bacterias y hongos [32,33]

El uso de regiones del visible e infrarrojo cercano (VIS-NIR) y del infrarrojo medio (MID-IR) ha sido ampliamente estudiado para la detección de enfermedades en plantas, lo que refuerza el potencial de estas herramientas para el monitoreo de fitopatógenos. Estudios recientes han demostrado que la espectroscopia hiperespectral y el uso de inteligencia artificial pueden mejorar significativamente la detección de enfermedades vegetales al ofrecer un enfoque no destructivo y de alto rendimiento [34,35]. Adicionalmente, la integración de dispositivos microfluídicos con técnicas espectroscópicas ha permitido desarrollar plataformas miniaturizadas para la detección rápida de microorganismos, abordando limitaciones como el tiempo de procesamiento y la preparación de muestras [36].

Otro método relevante es la reflectancia total atenuada (ATR), que permite analizar la composición de la superficie de muestras gruesas sin la necesidad de preparación exhaustiva. En este método, la muestra se coloca en contacto con un cristal de índice de refracción conocido, donde un haz de luz incide en un ángulo determinado, generando múltiples reflexiones internas y ondas evanescentes que penetran en la muestra. La absorción de esta energía por la muestra produce una atenuación de la onda evanescente, lo que se traduce en un espectro infrarrojo que puede ser analizado para determinar la composición química de la muestra. La combinación de ATR-FTIR ha sido utilizada con éxito en la detección de hongos fitopatógenos, demostrando su aplicabilidad en estrategias de control de enfermedades agrícolas [34]. estudios recientes han demostrado que el análisis espectral permite la identificación de infecciones por *Botrytis cinerea* en cultivos, diferenciando entre tejidos sanos e infectados en función de la absorción y la reflectancia espectral [37].

Además de FT-IR y ATR, otras técnicas espectroscópicas han mostrado gran potencial en la identificación de patógenos. La espectroscopia Raman, por ejemplo, ha sido utilizada para la identificación rápida de bacterias en laboratorios de microbiología clínica. Esta técnica permite obtener un "fingerprint" molecular de los microorganismos en menos de una hora, lo que la convierte en una alternativa prometedora frente a métodos convencionales que requieren tiempos prolongados de incubación [38]. Por otro lado, la combinación de espectroscopia Raman con análisis multivariante ha demostrado una alta precisión en la

clasificación de bacterias patógenas a nivel de cepa, alcanzando tasas de clasificación del 100% en modelos predictivos [39,40].

En el ámbito de la salud pública y la seguridad alimentaria, la detección de micotoxinas mediante espectroscopia se ha consolidado como un método no destructivo con gran precisión. Técnicas como la espectroscopia de fluorescencia, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) y la espectroscopia de absorción en el ultravioleta (UV) han sido utilizadas para la identificación de hongos y sus metabolitos tóxicos en productos agrícolas [41,42]. Estas técnicas han demostrado ventajas significativas sobre métodos tradicionales, especialmente en términos de rapidez y reducción de costos.

La integración de técnicas espectroscópicas con herramientas computacionales, como el aprendizaje automático y la inteligencia artificial, ha permitido optimizar el procesamiento de datos espectrales, facilitando la detección en tiempo real de patógenos en diversos entornos. Se ha reportado que el uso de espectroscopia de reflectancia y de Raman, en combinación con algoritmos de clasificación, puede mejorar notablemente la identificación de microorganismos en la industria alimentaria y en la vigilancia epidemiológica [43,44].

Las técnicas espectroscópicas ofrecen un enfoque altamente eficiente para la detección y clasificación de patógenos en diferentes matrices. Desde la FT-IR y ATR-FTIR hasta la espectroscopia Raman y la fluorescencia, estas metodologías han evolucionado para proporcionar soluciones rápidas, precisas y no

destruictivas en la microbiología clínica, la seguridad alimentaria y la agricultura. Con el avance de la nanotecnología y la inteligencia artificial, es previsible que estas técnicas continúen mejorando su sensibilidad y especificidad, permitiendo un monitoreo más efectivo de enfermedades infecciosas y contaminaciones en el futuro.

1.10.2 Fundamentos generales de la teledetección espectral en plantas.

En la teledetección aplicada a la fitopatología, se utilizan sensores capaces de capturar información espectral reflejada o emitida por el tejido vegetal [45]. Cuando la luz interactúa con las hojas, una parte se refleja, otra se transmite y otra es absorbida; dichas proporciones varían según la estructura interna de la planta, los pigmentos (clorofilas, carotenoides), el contenido de agua y la posible presencia de patógenos [46]. A medida que una enfermedad se desarrolla, los cambios en la anatomía o en la fisiología de la planta alteran la reflectancia, lo que puede ser detectado por sensores multiespectrales o hiperespectrales [26].

1.10.3 Tecnologías multiespectrales: fundamentos y características

Las imágenes multiespectrales se basan en un número limitado de bandas espectrales, normalmente en el orden de las decenas, distribuidas en regiones específicas del espectro electromagnético (por ejemplo, bandas en el visible, infrarrojo cercano y, en algunos casos, infrarrojo medio). Cada banda se elige para resaltar cierta propiedad del cultivo, como la cantidad de clorofila, el contenido de agua o la presencia de estrés [45]. Por su simplicidad, los sensores

multiespectrales pueden instalarse en drones o sistemas terrestres, ofreciendo un equilibrio aceptable entre costo, resolución y facilidad de manejo. Suelen usarse índices de vegetación (como NDVI, Normalized Difference Vegetation Index) para estimar vigor, pero también se diseñan índices más específicos para detectar cambios debidos a enfermedades [47].

1.10.4 Tecnologías hiperespectrales: fundamentos y características

Las imágenes hiperespectrales, también conocidas como espectroscopía de imágenes, dividen el espectro en decenas o cientos de bandas muy estrechas y contiguas [46]. En lugar de registrar únicamente unas pocas bandas, se capturan perfiles espectrales continuos, lo que permite un análisis muy detallado de la interacción luz-planta. Esta densidad de información hace posible detectar matices sutiles en la reflectancia de los tejidos, muchas veces imperceptibles al ojo humano y a los sensores multiespectrales. Este nivel de detalle permite diferenciar varios estados de infección o incluso distinguir entre distintos patógenos, siempre que existan firmas espectrales diferenciadas [26]. No obstante, los sistemas hiperespectrales suelen ser más costosos, generan mayores volúmenes de datos y requieren algoritmos de procesamiento avanzados.

1.10.5 Interacción luz-planta

El proceso de interacción luz-planta se basa en que, ante la radiación que incide en un tejido foliar, esta puede ser absorbida, transmitida o reflejada dependiendo

de la estructura y composición química de la hoja [48–56]. En términos generales, diversos compuestos foliares (como pigmentos, agua, azúcares y proteínas) generan firmas ópticas específicas; por ejemplo, la clorofila absorbe fuertemente la luz en la región visible, lo cual se relaciona con el color verde de las plantas, mientras que la reflectancia en la franja del infrarrojo cercano depende más de la estructura interna de la hoja [55,56] .

Paralelamente, la presencia de cutícula cerosa, paredes celulares y vacuolas, así como la distribución de pigmentos en la hoja, influyen en las proporciones en que la radiación se dispersa o se transmite [48,51,54]. De esta forma, alteraciones por enfermedades fúngicas o bacterianas pueden inducir cambios en la absorción y reflejo de la luz: tejidos con lesiones, clorosis o necrosis presentan una pérdida de pigmentos y afectaciones en su estructura, resultando en variaciones medibles en su espectro de reflectancia [50]. La Figura 1.10-1 representa distintos tipos de interacción que pueden ocurrir entre la luz y el material biológico.

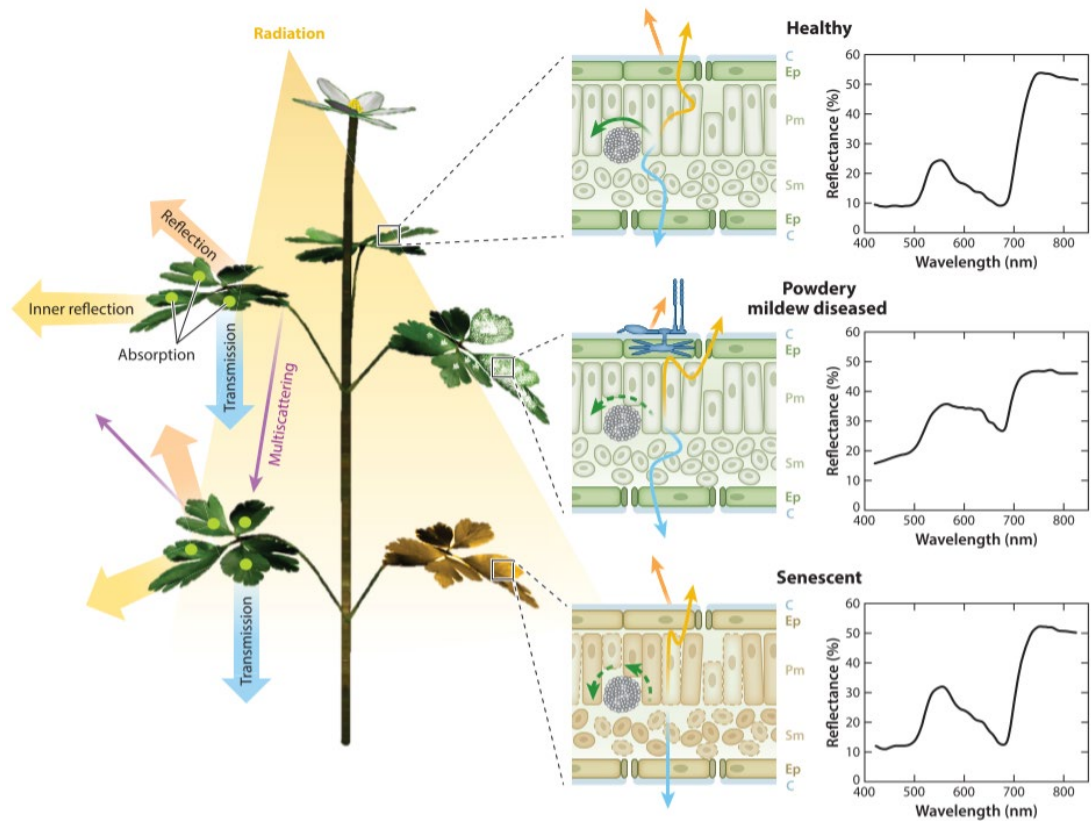


Figura 1.10-1 Interacción del tejido vegetal con la radiación. A la izquierda la luz artificial o natural puede ser transmitida, absorbida o reflejada. En el medio las proporciones e intensidades de luz que son reflejadas dependen de la condición de la hoja. Derecha: firmas de reflectancia espectral características pueden ser asignadas al estado de salud o manifestación de la enfermedad en el tejido vegetal. Abreviaciones: C: cuticula, Ep: epidermis, Pm: mesófilo en empalizada; Sm: mesófilo esponjoso. extraído de: [46]

1.10.6 Estudios previos sobre la detección de *Fusarium* spp. mediante técnicas espectrales y métodos multivariados

En los últimos años, diversos estudios han abordado tanto la detección del hongo patógeno *Fusarium* como la presencia de sus micotoxinas en muestras analizadas mediante métodos espectrales combinados con análisis multivariado de datos (ver Tabla 1.10-2) [57]. En la industria alimentaria, *Fusarium* representa un problema significativo debido a su capacidad de contaminar los granos de trigo con micotoxinas, lo que afecta negativamente el rendimiento y la calidad del producto [58]. La detección temprana de la micotoxina deoxinivalenol (DON), producida por *Fusarium graminearum*, constituye un desafío que ha sido abordado a través de diversas técnicas espectroscópicas e imágenes hiperespectrales (HSI) [59–62].

Por otro lado, Sankaran y colaboradores emplearon espectroscopía en el rango VIS-NIR para evaluar la enfermedad de Huanglongbing (HLB) en árboles cítricos. Mediante el uso de un espectroradiómetro con un rango operativo de 350-2500 nm, midieron plantas tanto sanas como infectadas con HLB. Posteriormente, aplicando métodos de clasificación, obtuvieron tasas de detección de infección superiores al 92% [63].

Asimismo, Marín-Ortiz y su equipo detectaron la presencia de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate utilizando espectroscopía VIS-NIR en combinación con métodos multivariados, demostrando la capacidad de identificar

la enfermedad en etapas iniciales, incluso antes de la manifestación de síntomas [64].

Otros investigadores, como Jongguk Lim, han utilizado espectroscopía NIR junto con modelos estadísticos como una herramienta analítica eficaz para discriminar granos de cebada contaminados con *Fusarium*. Los resultados obtenidos en su estudio sugieren que esta técnica podría ser una alternativa viable para la identificación y separación de granos afectados por patógenos [65].

María Vivas y su equipo emplearon espectroscopía ATR en un rango espectral de 4000-600 cm^{-1} para analizar las variaciones en el contenido de carbohidratos en *Pinus pinaster* inoculados con *F. circinatum*. Sus hallazgos sugieren que los carbohidratos desempeñan un papel clave en las interacciones transgeneracionales entre el árbol y el patógeno [66].

Tabla 1.10-2 Resumen estado del arte en análisis de *Fusarium* spp. PCA: análisis de componente principal. LDA: análisis discriminante lineal. RN: redes neuronales. PLS: Mínimos cuadrados parciales. PLSR: Regresión por mínimos cuadrados parciales. CDA: Análisis discriminante canónico. KNN: K-vecinos más cercanos. DFA: Análisis de la función discriminante. MLP: Perceptron multicapa. AUC: Area bajo la curva. RF: Random forest. J-M: Jeffries-Matusita distance.

Hongo o enfermedad	Muestra	Método	Rango espectral	Método quimiométrico	Referencia
Hongo oídio	Uvas infectadas	MID-IR-ATR	1800-800 cm ⁻¹	PCA, LDA	[67]
<i>Fusarium</i> spp.	Raíces	FT-IR	4000-400 cm ⁻¹	PCA, RN.	[68]
<i>F. graminearum</i>	Maíz	MID-IR	650 4500 cm ⁻¹	PCA, LDA	[69]
<i>Aspergillus</i> spp. <i>F. proliferatum</i>	Maíz	VIS-NIR	600-1600 nm	PCA, LDA	[70]
<i>F. oxysporum</i>	Plantas	ATR	4000-600 cm ⁻¹	PCA LDA	[71]
<i>F. oxysporum</i>	Plantas	UV-Vis-NIR	250-1500 nm	PCA, LDA	[72]
<i>F. proliferatum</i>	Ajo	NIR	1000-2500 nm	PLSR	[73]
<i>F. graminearum</i>	Avena	Vis-NIR	400-2350 nm	PLS	[74]
<i>F. graminearum</i>	Cebada y trigo	NIR	1175-2710 nm	PLS, PLS-DA	[75]
<i>F. graminearum</i>	Maíz	NIR	904-1685 nm	LDA, MLP (multi-layer perceptrón) RN	[76]
<i>F. culmorum</i>	Trigo	UV-Vis-NIR	375-970 nm	CDA	[77]
DON	Trigo	HSI-NIR	900-1700 nm	KNN	[78]
<i>Dothistroma septosporum</i>	<i>P. radiata</i>	RS- NIR	VIS- 400-1000 nm	-	[79]
Enfermedad <i>Cercospora</i>	Remolacha	HSI- Reflectancia	400-1050 nm	RELIEF Algorithm	[80]
DON	Trigo	HSI-NIR	900-170 nm	PCA, PLS	[81]

<i>F. circinatum</i>	<i>P. pinaster</i>	MID	4000-600 cm ⁻¹	PCA; DFA		[66]
Cancro resinoso	<i>P. radiata</i>	Quickbird	-	RN		[82]
<i>F. circinatum</i>	<i>P. radiata</i>	VIS-NIR	400-2500 nm	Boruta, RF		[83]
<i>F. circinatum</i>	<i>P. radiata</i>	VIS-NIR	400-2500 nm	Boruta AUC RFE RF		[84]
<i>F. circinatum</i>	<i>P. radiata</i>	VIS-NIR	400-2500 nm	Distancia Boruta, RF	J-M,	[85]

Las cuatro referencias finales de la tabla anterior emplean herramientas de machine learning para el diagnóstico de *F. circinatum* en plántulas de *P. radiata*. En Sudáfrica, el control de *Fusarium* en viveros de *P. radiata* ha sido limitado, lo que ha motivado a la comunidad científica a enfocar sus esfuerzos en la detección temprana de la enfermedad como una estrategia clave para reducir su propagación y mejorar las medidas de control [86].

En este contexto, Poona et al. desarrollaron una herramienta para la detección asintomática de la infección a partir de la tercera semana tras la inoculación con *F. circinatum*. A partir de la cuarta semana, las plántulas ya presentaban síntomas visibles, y la mortalidad se registraba en la quinta semana. Para su análisis, utilizaron un espectroradiómetro VIS-NIR con un rango operativo de 350-2500 nm. Con el objetivo de seleccionar las bandas espectrales más relevantes, emplearon el algoritmo Boruta, el cual permite reducir la dimensionalidad espectral y seleccionar un subconjunto óptimo de bandas. Estas bandas fueron

posteriormente utilizadas en la clasificación mediante bosques aleatorios (Random Forest). Como resultado, lograron reducir el conjunto total de bandas a solo 107, las cuales fueron utilizadas en la creación del modelo de clasificación. El error de predicción obtenido fue del 14%, mientras que el error de validación interna fue del 16%. Adicionalmente, el modelo fue capaz de diferenciar entre el estrés inducido por *F. circinatum* y aquel provocado por daños físicos naturales en las plántulas [87].

En un estudio posterior, Poona et al. (2019) desarrollaron un índice espectral optimizado para modelar el estrés inducido por *F. circinatum* en plántulas de *P. radiata* [88]. Los índices espectrales se construyen a partir de combinaciones lineales de dos o más bandas espectrales estrechas, empleando relaciones, sumas o diferencias entre ellas [89]. El objetivo del estudio fue comparar un índice espectral reportado en la literatura con un índice optimizado utilizando Boruta, mediante una evaluación uni y multivariada. Los resultados demostraron que el índice optimizado, en combinación con un método multivariado (Random Forest), alcanzó una precisión entre el 76% y el 96%, mientras que el índice convencional mostró una precisión entre el 83% y el 90%.

1.11 Referencias

- [1] FAO. El pino de Monterrey como especie exótica. FAO 1960. <https://www.fao.org/4/x5394s/x5394s03.htm#el%20pino%20de%20monterrey%20como%20especie%20ex%C3%B3tica> (accessed February 12, 2025).
- [2] INFOR. *Pino radiata* representa el 97,2% de la producción nacional de madera aserrada. Principal destino, el mercado local. INFOR 2021. <https://wef.infor.cl/index.php/destacados/industria-primaria/pino-radiata-representa-el-97-2-de-la-produccion-nacional-de-madera-aserrada-principal-destino-el-mercado-local> (accessed February 12, 2025).
- [3] Gordon TR, Storer AJ, Wood DL. The pitch canker epidemic in California. *Plant Dis* 2001;85:1128–39. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.11.1128>.
- [4] Carrasco A, Sanfuentes E, Durán Á, Valenzuela S. Cancro resinoso del pino: ¿una amenaza potencial para las plantaciones de *Pinus radiata* en Chile? *Gayana Bot* 2016;73:369–80. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432016000200369>.
- [5] Hódar JA, Zamora R, Cayuela L. Cambio climático y plagas: algo más que el clima. *Ecosistemas* 2012;21:73–8. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2012.21-3.09>.

- [6] Flores-Pacheco JA. Chancro Resinoso Del Pino (*Fusarium circinatum*) Historia, Evolución, Dispersión Y Estrategias De Manejo. Nexo Revista Científica 2017;30:19–42. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i01.5170>.
- [7] SAG. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell: conocimiento del patógeno y establecimiento de bases para su control en *Pinus radiata*. 2007.
- [8] Amaral J, Valledor L, Alves A, Martín-García J, Pinto G. Studying tree response to biotic stress using a multi-disciplinary approach: The pine pitch canker case study. Front Plant Sci 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.916138>.
- [9] Drenkhan R, Ganley B, Martín-García J, Vahalík P, Adamson K, Adamčíková K, et al. Global geographic distribution and host range of *fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker. Forests 2020;11. <https://doi.org/10.3390/F11070724>.
- [10] Leslie JF, Summerwell BA. The *Fusarium* laboratory manual. vol. 6. First edit. Publishing, Blackwell; 2006.
- [11] Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD, et al. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - A growing threat to pine plantations and forests worldwide. Australasian Plant Pathology 2008;37:319–34. <https://doi.org/10.1071/AP08036>.

- [12] Britz H, Coutinho TA, Wingfield BD, O Marasas WF, Wingfield MJ. Diversity and differentiation in two populations of *Gibberella circinata* in South Africa. *Plant Pathol* 2005;54:46–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01108.x>.
- [13] Blakeslee GM, Dorset RD, Oak SW. Inoculum dispersal of the pine pitch canker fungus, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Phytopathology* 1979;69.
- [14] Viljoen A, Wingfield MJ, Marasas W. First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on Pine Seedlings in South Africa. *Plant Dis* 1994;78:309–12.
- [15] Storer AJ, Gordon TR, Clark SL. Association of the pitch canker fungus, *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini*, with Monterey pine seeds and seedlings in California. *Plant Pathol* 1998;47:649–56. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00288.x>.
- [16] Barrows-Broadus J, Dwinell LD. Variation in Susceptibility to the Pitch Canker Fungus Among Half-Sib and Full-Sib Families of Virginia Pine. *Phytopathology* 1984;74:438. <https://doi.org/10.1094/Phyto-74-438>.
- [17] Inman AR, Kirkpatrick SC, Gordon TR, Shaw D V. Limiting effects of low temperature on growth and spore germination in *Gibberella circinata*, the cause of pitch canker in pine species. *Plant Dis* 2008;92:542–5. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0542>.

- [18] Pintos C, González B, Mansilla JP, Aguín O, Salinero. MC. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell: Teleomorfo *Gibberella circinata*. *Foresta* 2005;31:9–44.
- [19] Dwinell D, Barrows-Broadus J, Kuhlman G. Pitch canker: A disease complex. *Plant Dis* 1985;69:270–5.
- [20] Carey WA, Kelley WD. First report of *Fusarium subglutinans* as a cause of late-season mortality in Longleaf pine nurseries. *Plant Dis* 1994;78.
- [21] Barnard EL, Blakeslee GM, Jokela EJ, Hollis CH, Wilson DS, Lante WD, et al. Pitch canker of Southern pines. 2006.
- [22] Correll JC, Gordon TR, McCain AH. Pitch canker disease in California: pathogenicity, distribution and canker development on Monterey pine (*Pinus radiata*). *Plant Dis* 1991;75.
- [23] Storer AJ, Wood DL, Gordon TR. The Epidemiology of Pitch Canker of Monterey Pine in California. *Forest Science* 2002;48:694–700. <https://doi.org/10.1093/forestscience/48.4.694>.
- [24] SAG. Instructivo técnico para el diagnóstico de *Fusarium circinatum* en muestras de viveros bajo control oficial. Servicio Agrícola y Ganadero 2008:1–21.
- [25] Schweigkofler W, O'Donnell K, Garbelotto M. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch

canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:3512–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3512-3520.2004>.

- [26] Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, Panno S, Scuderi G, Ruisi P, et al. Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agron Sustain Dev* 2015;35:1–25. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1>.
- [27] Mahlein A-K. Present and Future Trends in Plant Disease Detection. *Plant Dis* 2016;100:1–11. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.
- [28] Lewis SW, Lim KF. Spectroscopy: Basic Principles. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Elsevier; 2013, p. 635–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382165-2.00256-7>.
- [29] Skoog D, Holler F, Crouch S. *Principios de análisis instrumental*. 2008.
- [30] Csuros M, Csuros C. *Fundamentals of Spectroscopy. Environmental Sampling and Analysis for Metals*. First, CRC Press; 2016, p. 110–9. <https://doi.org/10.1201/9781420032345-9>.
- [31] Naumann D, Fijala V, Labischinski H, Giesbrecht P. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. *J Mol Struct* 1988;174:165–70. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(88\)80152-2](https://doi.org/10.1016/0022-2860(88)80152-2).

- [32] Maquelin K. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Methods* 2002;14:255–71. <https://doi.org/10.5055/jem.2016.0281>.
- [33] Preisner O, Lopes JA, Menezes JC. Uncertainty assessment in FT-IR spectroscopy based bacteria classification models. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2008;94:33–42. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2008.06.005>.
- [34] Kumar R, Pathak S, Prakash N, Priya U, Ghatak A. Application of Spectroscopic Techniques in Early Detection of Fungal Plant Pathogens. *Diagnostics of Plant Diseases*, IntechOpen; 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.97535>.
- [35] Farber C, Mahnke M, Sanchez L, Kurouski D. Advanced spectroscopic techniques for plant disease diagnostics. A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2019;118:43–9. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.022>.
- [36] Hussain M, He X, Wang C, Wang Y, Wang J, Chen M, et al. Recent advances in microfluidic-based spectroscopic approaches for pathogen detection. *Biomicrofluidics* 2024;18. <https://doi.org/10.1063/5.0204987>.
- [37] Choi EG, Kim CH, Beak GY, Kim MH, Kim DE, Yoon YC, et al. Analysis of Spectrometric Properties Gray mold disease in the Greenhouse. *IFAC*

Proceedings Volumes 2013;46:166–70. <https://doi.org/10.3182/20130327-3-JP-3017.00038>.

- [38] Ramesh G, Paul W, Valparambil Puthanveetil V, Raja K, Embekkat Kaviyil J. Raman spectroscopy as a novel technique for the identification of pathogens in a clinical microbiology laboratory. *Spectroscopy Letters* 2022;55:546–51. <https://doi.org/10.1080/00387010.2022.2120899>.
- [39] Sil S, Mukherjee R, Kumar NS, S. A, Kingston J, Singh UK. Detection and classification of Bacteria using Raman Spectroscopy Combined with Multivariate Analysis. *Def Life Sci J* 2017;2:435. <https://doi.org/10.14429/dlsj.2.12275>.
- [40] Sil S, Mukherjee R, Kumar NS, Umapathy S. Potential and challenges of pathogen detection using Raman spectroscopy. In: Popp J, Gergely C, editors. *Biomedical Spectroscopy, Microscopy, and Imaging*, SPIE; 2020, p. 3. <https://doi.org/10.1117/12.2555814>.
- [41] Min H, Cho B-K. Spectroscopic Techniques for Nondestructive Detection of Fungi and Mycotoxins in Agricultural Materials: A Review. *Journal of Biosystems Engineering* 2015;40:67–77. <https://doi.org/10.5307/JBE.2015.40.1.067>.
- [42] Singh CB, Jayas DS. Spectroscopic techniques for fungi and mycotoxins detection. *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and*

Feed, Elsevier; 2011, p. 401–14.
<https://doi.org/10.1533/9780857090973.5.401>.

- [43] Potara M, Campu A, Maniu D, Focsan M, Botiz I, Astilean S. Advanced nanostructures for microbial contaminants detection by means of spectroscopic methods. *Advanced Nanostructures for Environmental Health*, Elsevier; 2020, p. 347–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815882-1.00008-2>.
- [44] Wang K, Pu H, Sun D. Emerging Spectroscopic and Spectral Imaging Techniques for the Rapid Detection of Microorganisms: An Overview. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2018;17:256–73. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12323>.
- [45] Sankaran S, Mishra A, Ehsani R, Davis C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Comput Electron Agric* 2010;72:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.02.007>.
- [46] Mahlein AK, Kuska MT, Behmann J, Polder G, Walter A. Hyperspectral sensors and imaging technologies in phytopathology: State of the art. *Annu Rev Phytopathol* 2018;56:535–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050100>.
- [47] Singh V, Sharma N, Singh S. A review of imaging techniques for plant disease detection. *Artificial Intelligence in Agriculture* 2020;4:229–42. <https://doi.org/10.1016/j.aiia.2020.10.002>.

- [48] Slaton MR, Raymond Hunt E, Smith WK. Estimating near-infrared leaf reflectance from leaf structural characteristics. *Am J Bot* 2001;88:278–84.
- [49] Merzlyak MN, Chivkunova OB, Solovchenko AE, Naqvi KR. Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves. *J Exp Bot* 2008;59:3903–11. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern230>.
- [50] Mahlein A-K, Steiner U, Hillnhütter C, Dehne H-W, Oerke E-C. Hyperspectral imaging for small-scale analysis of symptoms caused by different sugar beet diseases. *Plant Methods* 2012;8:3. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-3>.
- [51] Lillesaeter O. Spectral reflectance of partly transmitting leaves: Laboratory measurements and mathematical modeling. *Remote Sens Environ* 1982;12:247–54. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(82\)90057-8](https://doi.org/10.1016/0034-4257(82)90057-8).
- [52] Jacquemoud S, Ustin SL. LEAF OPTICAL PROPERTIES: A STATE OF THE ART. 2001.
- [53] Gay A, Thomas H, Roca M, James C, Taylor J, Rowland J, et al. Nondestructive analysis of senescence in mesophyll cells by spectral resolution of protein synthesis-dependent pigment metabolism. *New Phytologist* 2008;179:663–74. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02412.x>.
- [54] Gates DM, Keegan HJ, Schleter JC, Weidner VR. Spectral Properties of Plants. *Appl Opt* 1965;4:11. <https://doi.org/10.1364/AO.4.000011>.

- [55] Curran PJ. Remote sensing of foliar chemistry. *Remote Sens Environ* 1989;30:271–8. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(89\)90069-2](https://doi.org/10.1016/0034-4257(89)90069-2).
- [56] Carter GA, Knapp AK. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. vol. 88. 2001.
- [57] Twaruzek M, Błajet-Kosicka A, Kosicki R, Grajewski J. Mycotoxin Analytical Methods. *Environmental Mycology in Public Health: Fungi and Mycotoxins Risk Assessment and Management* 2015:363–86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411471-5.00021-1>.
- [58] Zhang D, Wang Q, Lin F, Weng S, Lei Y, Chen G, et al. New Spectral Classification Index for Rapid Identification of *Fusarium* Infection in Wheat Kernel. *Food Anal Methods* 2020;13:2165–75. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01829-w>.
- [59] Barbedo JGA, Tibola CS, Fernandes JMC. Detecting *Fusarium* head blight in wheat kernels using hyperspectral imaging. *Biosyst Eng* 2015;131:65–76. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2015.01.003>.
- [60] Delwiche SR, Kim MS, Dong Y. *Fusarium* damage assessment in wheat kernels by Vis/NIR hyperspectral imaging. *Sens Instrum Food Qual Saf* 2011;5:63–71. <https://doi.org/10.1007/s11694-011-9112-x>.

- [61] Dvořáček V, Prohasková A, Chrpová J, Štočková L. Near infrared spectroscopy for deoxynivalenol content estimation in intact wheat grain 2012;2012:196–203.
- [62] Femenias A, Gatus F, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S. Use of hyperspectral imaging as a tool for *Fusarium* and deoxynivalenol risk management in cereals: A review. Food Control 2020;108:106819. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106819>.
- [63] Sankaran S, Mishra A, Maja JM, Ehsani R. Visible-near infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing in citrus orchards. Comput Electron Agric 2011;77:127–34. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2011.03.004>.
- [64] Marín-Ortiz JC, Hoyos-Carvajal LM, Botero Fernandez V. Detección de plantas asintomáticas de *Solanum lycopersicum* L. infectadas con *Fusarium oxysporum* usando espectroscopia de reflectancia VIS. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 2018;12:436–46. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7293>.
- [65] Lim J, Kim G, Mo C, Oh K, Kim G, Ham H, et al. Application of near infrared reflectance spectroscopy for rapid and non-destructive discrimination of hulled barley, naked barley, and wheat contaminated with *Fusarium*. Sensors (Switzerland) 2018;18. <https://doi.org/10.3390/s18010113>.

- [66] Vivas M, Nunes C, Coimbra MA, Solla A. Maternal effects and carbohydrate changes of *Pinus pinaster* after inoculation with *Fusarium circinatum*. *Trees - Structure and Function* 2014;28:373–9. <https://doi.org/10.1007/s00468-013-0955-0>.
- [67] Petrovic T, Perera D, Cozzolino D, Kravchuk O, Zanker T, Bennett J, et al. Feasibility of discriminating powdery mildew-affected grape berries at harvest using mid-infrared attenuated total reflection spectroscopy and fatty acid profiling. *Aust J Grape Wine Res* 2017;23:415–25. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12291>.
- [68] Nie M, Zhang WQ, Xiao M, Luo JL, Bao K, Chen JK, et al. FT-IR spectroscopy and artificial neural network identification of *Fusarium* species. *Journal of Phytopathology* 2007;155:364–7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01245.x>.
- [69] Kos G, Lohninger H, Krska R. Development of a method for the determination of *Fusarium* fungi on corn using mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection and chemometrics. *Anal Chem* 2003;75:1211–7. <https://doi.org/10.1021/ac0260903>.
- [70] Shen F, Huang Y, Jiang X, Fang Y, Li P, Liu Q, et al. On-line prediction of hazardous fungal contamination in stored maize by integrating Vis/NIR spectroscopy and computer vision. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2020;229:118012. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.118012>.

- [71] Salman A, Lapidot I, Pomerantz A, Tsrer L, Hammody Z, Moreh R, et al. Detection of *Fusarium oxysporum* fungal isolates using ATR spectroscopy. *Spectroscopy* (New York) 2012;27:551–6. <https://doi.org/10.1155/2012/109708>.
- [72] Marín-Ortiz JC, Hoyos-Carvajal LM, Botero Fernandez V. Detección de plantas asintomáticas de *Solanum lycopersicum* L. infectadas con *Fusarium oxysporum* usando espectroscopia de reflectancia VIS. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 2018;12:436–46. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i2.7293>.
- [73] Tamburini E, Mamolini E, De Bastiani M, Marchetti MG. Quantitative determination of *Fusarium proliferatum* concentration in intact garlic cloves using near-infrared spectroscopy. *Sensors* (Switzerland) 2016;16. <https://doi.org/10.3390/s16071099>.
- [74] Gobena ST. *Fusarium* infection and its effects on germination and deoxynivalenol content of oats and screening for resistance by VIS-NIR spectroscopic methods. 2014.
- [75] Lim J, Kim G, Mo C, Oh K, Kim G, Ham H, et al. Application of near infrared reflectance spectroscopy for rapid and non-destructive discrimination of hulled barley, naked barley, and wheat contaminated with *Fusarium*. *Sensors* (Switzerland) 2018;18. <https://doi.org/10.3390/s18010113>.

- [76] Tallada JG, Wicklow DT, Pearson TC, Armstrong PR. Detection of fungus-infected corn kernels using near infrared reflectance spectroscopy and color imaging 2011;54:1151–8.
- [77] Jorgensen RJ, Shreshta S. Detection of *Fusarium* in wheat by multispectral imaging. Final COBRA Conference, 2015 2015:1–4. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2105.5121>.
- [78] Brown J. Examination of Wheat Kernels for the Presence of *Fusarium* Damage and Mycotoxins using Near-Infrared Hyperspectral Imaging. 2014.
- [79] Stone C, Chisholm LA, McDonald S. Spectral reflectance characteristics of *Pinus radiata* needles affected by dothistroma needle blight. Canadian Journal of Botany 2003;81:560–9. <https://doi.org/10.1139/b03-053>.
- [80] Mahlein AK, Rumpf T, Welke P, Dehne HW, Plümer L, Steiner U, et al. Development of spectral indices for detecting and identifying plant diseases. Remote Sens Environ 2013;128:21–30. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2012.09.019>.
- [81] Femenias A, Gatiús F, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S. Standardisation of near infrared hyperspectral imaging for quantification and classification of DON contaminated wheat samples. Food Control 2020;111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107074>.
- [82] Poona NK, Ismail R. Discriminating the occurrence of pitch canker fungus in *Pinus radiata* trees using QuickBird imagery and artificial neural

- networks. South For 2013;75:29–40.
<https://doi.org/10.2989/20702620.2012.748255>.
- [83] Poona NK, Ismail R. Using Boruta-selected spectroscopic wavebands for the asymptomatic detection of *Fusarium circinatum* stress. IEEE J Sel Top Appl Earth Obs Remote Sens 2014;7:3764–72.
<https://doi.org/10.1109/JSTARS.2014.2329763>.
- [84] Poona NK, Van Niekerk A, Nadel RL, Ismail R. Random Forest (RF) Wrappers for Waveband Selection and Classification of Hyperspectral Data. Appl Spectrosc 2016;70:322–33.
<https://doi.org/10.1177/0003702815620545>.
- [85] Poona NK, Ismail R. Developing optimized spectral indices using machine learning to model *Fusarium circinatum* stress in *Pinus radiata* seedlings. J Appl Remote Sens 2019;13:1. <https://doi.org/10.1117/1.jrs.13.034515>.
- [86] Mitchell RG, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield MJ. The pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*: Implications for South African forestry. South For 2011;73:1–13. <https://doi.org/10.2989/20702620.2011.574828>.
- [87] Poona NK, Ismail R. Using Boruta-selected spectroscopic wavebands for the asymptomatic detection of *Fusarium circinatum* stress. IEEE J Sel Top Appl Earth Obs Remote Sens 2014;7:3764–72.
<https://doi.org/10.1109/JSTARS.2014.2329763>.

- [88] Poona NK, Ismail R. Developing optimized spectral indices using machine learning to model *Fusarium circinatum* stress in *Pinus radiata* seedlings. *J Appl Remote Sens* 2019;13:1. <https://doi.org/10.1117/1.jrs.13.034515>.
- [89] Jackson RD, Huete AR. Interpreting vegetation indices. *Prev Vet Med* 1991;11:185–200. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(05\)80004-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(05)80004-2).

2 PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Problema de investigación

La detección de patógenos en *P. radiata* mediante metodologías convencionales presenta múltiples limitaciones que comprometen tanto la eficiencia del muestreo como la confiabilidad de los resultados. Estas técnicas se caracterizan por ser prolongadas, demandar personal altamente calificado e implicar un costo elevado debido a la necesidad de reactivos específicos y equipamiento especializado. En consecuencia, se dificulta el procesamiento de grandes volúmenes de muestras en períodos de tiempo adecuados.

La representatividad del muestreo se ve condicionada por la experiencia del profesional encargado, situación agravada por la presencia de plantas asintomáticas. Aunque estas pueden estar infectadas, no manifiestan síntomas bajo las condiciones controladas de los viveros forestales y solo evidencian la patología cuando experimentan situaciones de estrés (como falta de agua, carencias nutricionales o daños físicos). En la práctica, esto se traduce en la selección de un número reducido de plántulas para el análisis molecular (entre 5 y 10 de un total de 200.000), lo cual limita la probabilidad de detectar infecciones tempranas o subclínicas.

Por otra parte, el tiempo transcurrido desde que se toman las muestras hasta que se obtienen los resultados suele ser superior a una semana, dificultando una respuesta oportuna. Adicionalmente, el sustrato empleado en los viveros, que

podría albergar patógenos, no siempre es incluido en los protocolos de muestreo o análisis. Esta conjunción de factores desemboca en una incapacidad de detectar la infección de manera temprana y eficiente, con repercusiones negativas para la sostenibilidad futura del pino en Chile y, potencialmente, para la industria forestal del país en su conjunto.

2.2 Hipótesis

Es posible realizar una detección selectiva y característica de *F. circinatum* en plántulas de *P. radiata*, incluso en etapas asintomáticas y bajo diversas condiciones de sustrato y medio de cultivo, mediante la combinación de técnicas de espectroscopía molecular, imágenes hiperespectrales y análisis multivariado de datos, posibilitando así la identificación temprana de la enfermedad.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Generación de una herramienta de detección e identificación de *F. circinatum* basada en técnicas espectrales que sirvan como alternativa a las técnicas tradicionales y que permitan la detección en plantas asintomáticas.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Crear una base de datos espectrales, entre ellos *F. circinatum*, presentes en *P. radiata*, realizando mediciones de los hongos aislados y del hongo en material vegetal y sustrato, mediante un conjunto de técnicas espectrales, tales como:
 - a) Microespectroscopía FT-IR.
 - b) Espectroscopia VIS-NIR
 - c) Imágenes hiperespectrales VIS-NIR.
2. Desarrollar y aplicar modelos robustos de análisis multivariados basados en reconocimiento de patrones y métodos de resolución de curvas para la mejora de la selectividad de las técnicas espectrales usadas en la identificación de *F. circinatum* en plantas de *P. radiata* y en el sustrato usado en viveros forestales

3. Localizar la infección causada por el hongo patógeno en la planta y determinar su nivel de propagación mediante técnicas de imágenes hiperespectrales.
4. Validar la herramienta analítica en muestras de plantas de *P. radiata* inoculadas obtenidas desde viveros forestales, detectando la enfermedad en etapas asintomáticas permitiendo un mejor control de la propagación del patógeno.

3 ESTRATEGIA ANALÍTICA

Previo al desarrollo de la presente investigación, se realizó la actualización y regularización de los permisos necesarios para el manejo de muestras del patógeno *F. circinatum*, organismo clasificado como cuarentenario. El Laboratorio de Patología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción cuenta con las condiciones de bioseguridad adecuadas y con la autorización otorgada por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para la realización de diagnósticos de *F. circinatum*. En este contexto, todos los ensayos que involucraron el uso del patógeno fueron llevados a cabo exclusivamente en estas instalaciones, asegurando el cumplimiento de las normativas vigentes y garantizando un manejo seguro y controlado del material biológico.

3.1 Estrategia analítica análisis *in vitro*.

Esta investigación se desarrolló con el propósito de establecer una metodología para el análisis *in vitro* de especies de *Fusarium* (objetivos específicos 1, 2 y 4). Para ello, se utilizó espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) combinada con análisis multivariado para la identificación de cuatro especies de *Fusarium*; *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum*, *F. tricinctum* aislados desde plantas de *P. radiata*. Todas estas muestras se identificaron mediante análisis morfológico de estructuras somáticas y reproductivas y mediante secuenciación de ADN. Las cepas fueron cultivadas en medio PDA a 22 °C durante 96 horas bajo dos condiciones de iluminación: luz cálida y luz cercana al ultravioleta (NUV), con un

fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad, con el fin de evaluar su influencia en la diferenciación espectral.

La adquisición de datos espectrales se llevó a cabo mediante un espectrómetro portátil en modo de reflectancia (1300–2500 nm), obteniendo un total de 1080 espectros en tres tiempos de medición (48, 72 y 96 h post-cultivo) en tres zonas del micelio: central, media y borde, Este procedimiento permitirá identificar y localizar el perfil espectral característico del hongo en el medio PDA (objetivo específico 3). Para mejorar la calidad de los datos, se aplicaron técnicas de preprocesamiento como corrección de línea base y normalización

El análisis de datos incluyó el uso de Análisis de Componentes Principales (PCA) y modelos supervisados de clasificación, específicamente Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) y Máquinas de Vectores de Soporte (SVM-DA). Se evaluaron métricas de desempeño y se implementó una estrategia de clasificación en cascada basada en claves dicotómicas para optimizar la diferenciación entre especies. Finalmente, fue aplicada la prueba de McNemar para comparar la precisión de los modelos, a través de los parámetros de sensibilidad, especificidad, tasas de error y precisión.

3.2 Estrategia analítica análisis de sustrato.

La estrategia analítica del estudio se basó en la adquisición y procesamiento de imágenes hiperespectrales en el rango de 400-1000 nm para evaluar la presencia de *F. circinatum* en sustratos orgánicos provenientes de vivero forestal que se alinean con el cumplimiento de los objetivos específicos 1 y 2. Se realizaron mediciones espectrales en distintos momentos posteriores a la inoculación del sustrato (1, 8, 16 y 20 dpi) utilizando una cámara hiperespectral Resonon PIKA-L, aplicando posteriormente preprocesamientos como normalización estándar variada (SNV), corrección multiplicativa de señal (MSC) y primera derivada para mejorar la calidad de los datos. Se emplearon análisis de componentes principales (PCA) para identificar agrupaciones y patrones espectrales que permitieran diferenciar entre muestras inoculadas y controles.

3.3 Estrategia analítica análisis de acículas de pino.

En la identificación de *F. circinatum* en acículas de *P. radiata* se utilizó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) en la región del infrarrojo medio (objetivos específicos 1, 2 y 3). La metodología empleada integra técnicas espectroscópicas con análisis quimiométrico para detectar cambios en la composición química de los tejidos vegetales asociados a la infección, proporcionando una herramienta rápida y no destructiva para su detección.

Las muestras utilizadas en este estudio fueron plantas de *P. radiata* de un año obtenidas de viveros forestales, las cuales fueron aclimatadas bajo condiciones controladas antes del ensayo. Para la inoculación se realizaron incisiones en la base del cuello de cada planta y se depositaron 20 μL de inóculo de *F. circinatum* a una concentración de 1.6×10^6 esporas mL^{-1} . Luego, se procedió a sellar con film plástico el local de inoculación. Paralelamente, como grupo control las plantas fueron tratadas con agua destilada estéril en la herida del cuello.

El monitoreo de la infección se realizó mediante la recolección de acículas de plántulas control e inoculadas en distintos tiempos; 7, 21, 35, 43 y 57 días post-inoculación (dpi). Estas muestras fueron analizadas mediante microespectroscopía FT-IR con el equipo Spectrum-Frontier/Spotlight 400 (PerkinElmer). Para cada muestra, se adquirieron imágenes hiperespectrales con una resolución espacial de 32×32 píxeles y 1089 bandas espectrales dentro del rango de $4000\text{-}750 \text{ cm}^{-1}$, cubriendo un área de $100 \times 100 \mu\text{m}$.

Para el análisis de los datos espectrales, se aplicó análisis de componentes Principales (PCA) con el fin de reducir la dimensionalidad de la información y explorar la formación de agrupaciones diferenciadas entre las muestras control e inoculadas. Este análisis se realizó siguiendo dos enfoques complementarios: el primero basado en los promedios de las imágenes espectrales obtenidas y el segundo considerando la totalidad de las imágenes espectrales sin promediar.

3.4 Estrategia analítica análisis de plántulas de pino

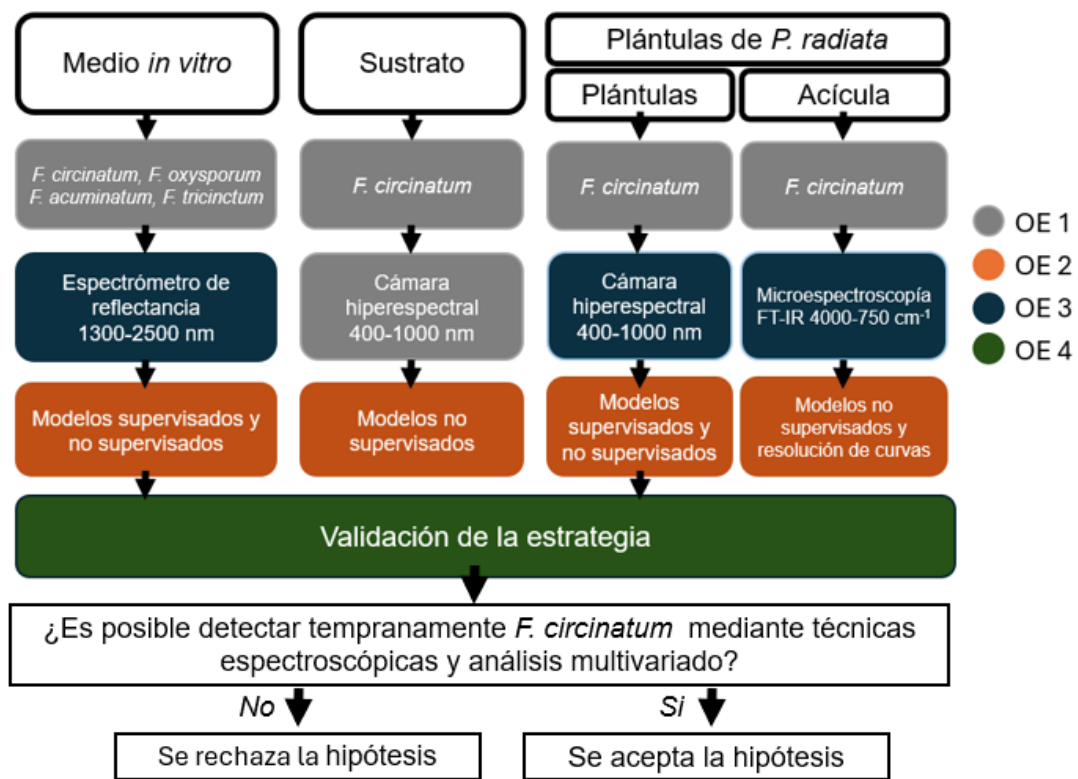
La estrategia analítica empleada en este estudio combina imágenes hiperespectrales y análisis multivariado para la detección temprana de *F. circinatum* en *Pinus radiata*. Se utilizaron dos genotipos de plantas de dos familias distintas, dividiéndolas en grupos control e inoculado. La inoculación se realizó mediante la aplicación de una suspensión conidial del hongo en incisiones en el tallo, mientras que las plántulas control recibieron solo agua estéril. Todas fueron mantenidas en condiciones ambientales controladas y, al final del experimento, se verificó la presencia del patógeno mediante PCR.

Las imágenes hiperespectrales fueron capturadas con una cámara RESONON PIKA-L en un rango de 400 a 1000 nm, con 300 bandas espectrales, en distintos momentos post-inoculación (0, 16, 27, 44 y 57 días). Se seleccionaron regiones de interés en el ápice de las plántulas, donde suelen aparecer los primeros síntomas, y se aplicaron técnicas de preprocesamiento como normalización espectral y corrección de dispersión para mejorar la calidad de los datos.

El análisis de los datos espectrales se realizó mediante análisis de componentes principales (PCA), utilizando el algoritmo Fast-PCA para reducir la dimensionalidad y detectar variaciones tempranas. Posteriormente, se implementó Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) para clasificar las plántulas según su estado de salud, evaluando métricas como sensibilidad, especificidad y precisión. Se calculó el porcentaje de píxeles

asociados a infección, lo que permitió un monitoreo cuantitativo de la progresión de la enfermedad.

El resumen de la estrategia analítica se presenta en la Figura 3.4-1, destacando las etapas clave del procedimiento y su correspondencia con los objetivos específicos de la investigación.



Estrategia analítica OE: Objetivo específico

Figura 3.4-1 Estrategia analítica para la detección de *F. circinatum* mediante técnicas espectroscópicas y análisis multivariado.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo expone los artículos científicos producto de esta tesis doctoral y esta primera sección aborda el análisis de *F. circinatum* en medio *in vitro* que corresponde al primer artículo publicado en *Microchemical Journal*.

La sección 4.2 y 4.3 aborda el análisis de sustrato y acículas de pino mediante técnicas de imágenes hiperespectrales en el VIS-NIR y microespectroscopía FT-IR respectivamente. La cuarta y última sección de este capítulo (4.4) corresponde a un artículo científico enviado a la revista que comprende el trabajo realizado para cumplir los tres primeros objetivos específicos propuestos.

La estructura de estas secciones presenta una organización interna similar, compuesta por los siguientes apartados: resumen, introducción, metodología, resultados y discusión, conclusiones y referencias.

Light-driven incubation of *Fusarium* species and near-infrared spectroscopy for an early *in vitro* identification of *F. circinatum*.

Estos resultados dieron origen a un artículo que fue publicado en la revista Microchemical Journal. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111168>.

4.1 Light-driven incubation of *Fusarium* species and near-infrared spectroscopy for an early *in vitro* identification of *Fusarium circinatum*

Martín Bravo-Arrepol^{1,2}, Eugenio Sanfuentes³, Rodrigo Hasbún⁴, Milena Smith³, Vanessa Sandoval-Santander³, Cristian A. Fuentes^{1,2}, Macarena Rojas-Rioseco^{1,2}, Angella Navarro³, José Ulloa-Fuentes⁵, Rosario del P. Castillo*^{1,2}

¹ *Laboratorio de Bioespectroscopía y Quimiometría, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Chile.*

² *Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile.*

³ *Laboratorio de Patología Forestal, Facultad de Ciencias Forestales & Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Chile.*

⁴ *Laboratorio de Epigenética Vegetal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción.*

⁵ *Laboratorio de Genómica Forestal, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Chile.*

Corresponding author*: Rosario del P. Castillo, rosariocastillo@udec.cl. Centro de Biotecnología, Barrio universitario s/n Concepción, Chile

4.1.1 Abstract

This study investigates the application of near-infrared (NIR) spectroscopy combined with multivariate techniques for the rapid and accurate identification of four *Fusarium* species, with a focus on *Fusarium circinatum*, the causative agent of "Pitch canker" disease in forestry. The impact of two different incubation conditions—near-ultraviolet (NUV) and warm light—on the spectral characteristics of cultures was assessed to enhance early fungal detection using spectroscopy. Spectral data were acquired using a portable NIR spectrometer at 48, 72, and 96 hours post-cultivation from various zones of mycelial growth.

The results demonstrated distinct spectral profiles among *Fusarium* species, with notable variations depending on incubation light conditions and growth zones. NUV light conditions significantly improved species differentiation, especially in the central and middle zones of mycelial growth at 72 hours post-cultivation (hpc). The PLSDA model under NUV light conditions provided the best identification strategy, achieving correct classification rates over 97% for all four species from 72 hpc. These findings underscore the effectiveness of the NIRS methodology combined with multivariate techniques for the early and rapid detection of *Fusarium* species in culture media, with potential implications for plant pathology diagnostics and disease management strategies.

Keywords: *Fusarium spp*, reflectance probe, near-infrared spectroscopy, near-ultraviolet light, *in vitro* detection

4.1.2 Introduction

Pitch canker, caused by the fungus *Fusarium circinatum*, poses a significant global threat to forestry. First identified in the southeastern United States in 1946, the disease has since spread to countries like Spain, South Africa, and Chile, severely impacting forest plantations and pine nurseries (1–3). *F. circinatum* affects various species, including *Pinus radiata*, causing symptoms such as excessive resin production, branch death, trunk cankers, and apical wilting in seedlings over six months old (4–6). Advanced infections lead to foliar wilting and plant death, compromising forest health and productivity (7).

The absence of an effective treatment exacerbates the issue, highlighting the need for preventive measures and management strategies. A major challenge is detecting asymptomatic seedlings, which can harbor the pathogen without visible signs (8). Traditional diagnostic methods like DNA-based techniques, serological analysis, and visual inspection are unreliable for asymptomatic plants. PCR, although widely used, is labor-intensive, costly, and requires specialized personnel, taking up to 15 days for pathogen detection (9–13).

Innovative methods, such as spectroscopy, offer potential for early disease detection even in asymptomatic stages. Spectroscopy-based techniques have been used to identify pathogens by analyzing unique spectral fingerprints. Studies have demonstrated the efficacy of visible and near-infrared (VIS-NIR) spectroscopy in detecting plant diseases (14–21). For instance, VIS-NIR

spectroscopy and multivariate methods have identified *Fusarium oxysporum* in tomato plants before visible symptoms appear (22). Spectral techniques have also been used to detect stress caused by *F. circinatum* in *P. radiata* seedlings, enhancing classification accuracy through feature selection algorithms and ensemble classifiers (23–26). In addition, studies have demonstrated that the type of lighting during the incubation period of *Fusarium* on a PDA medium can influence sporulation, with certain lighting conditions promoting increased sporulation, whereas excessive radiation may inhibit it (27,28). Hyperspectral imaging (HSI) has been employed to analyze *Fusarium* species, distinguishing between them (29–31).

This study proposes that light-driven behaviors during *Fusarium* culture incubation produce unique spectral fingerprints, facilitating species differentiation through chemometric analysis. The objective is to develop a spectroscopic methodology using NIR spectroscopy combined with multivariate techniques for early, rapid, and high-throughput identification of *Fusarium* species in culture media under two types of light: near-ultraviolet (NUV) and warm light. The analysis includes *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, and *F. acuminatum*, with a focus on distinguishing *F. circinatum* due to its forestry significance. The study aims to provide an alternative in vitro analysis method, reducing analysis time and reagent use and aiding farmers in assessing phytosanitary conditions for plant transplantation from nurseries to fields.

4.1.3 Materials and methods

4.1.3.1 *Fusarium* spp. Identification

Three strains of four *Fusarium* species, including *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, *F. circinatum*, and *F. acuminatum* were used for the experiments. Fungi were isolated from *P. radiata* samples and identified by morphological analysis and DNA sequencing as follows:

Morphological identification: Strains were characterized based on qualitative characteristics expressed on the PDA culture media, such as colony color on the obverse and reverse, growth form, and sporodochium formation. In addition, taxonomic aspects such as the presence or absence of macroconidia, microconidia, and chlamydospores were visualized using an optical microscope and documented through photographs (32)

DNA sequencing: The colony was collected in 2 mL Eppendorf tubes and homogenized for 30 seconds using ceramic matrices and 180 μ L of extraction buffer using a FastPrep instrument. Subsequently, the lysis and purification processes were conducted using the “GeneJet Genomic DNA Purification” kit from Thermo Scientific, following the protocol established for yeasts. The samples were evaluated using electrophoresis on a 1% agarose gel for 30 minutes, and the purity and concentration were also measured using a Nanodrop ND 1000 instrument. PCR was performed using the universal primers ITS1 and ITS4, with the corresponding reagents from the Thermo Scientific Platinum Taq kit, according

to the supplier's specifications, along with 0.1 ng of DNA from the sample. The reaction was subjected to an initial denaturation at 95°C for 10 minutes, 40 cycles of 95°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds, extension at 72°C for 1 minute, and finally, an elongation step at 72°C for 10 minutes and 4°C until storage. The products obtained were visualized by electrophoresis on a 1.5% agarose gel run for 45 minutes at 90 volts using a 1 kb weight marker (Fermentas) as a reference. The product was then purified using the "QIAquick PCR Purification" kit from Qiagen, and once the PCR product was verified, the samples were sent in triplicate to Macrogen Inc. for Sanger sequencing services. Once the sequences were obtained, they were processed using Geneious Prime 2023.0.1, a bioinformatics tool. A global alignment was performed between the files of each sample, selecting the sequence fragment with the highest identity and quality of above 70%. Then, a BLAST analysis was conducted using the NCBI nucleotide (nr/nt) database to identify the species of each fungal strain.

4.1.3.2 Cultivation in vitro

Three strains each of *F. circinatum*, *F. acuminatum*, *F. tricinctum*, and *F. oxysporum* were cultivated on PDA in 60-mm Petri dishes at 22°C until 96 hours. Three replicates were conducted for each strain, with a total number of 36 Petri dishes. To study the light's effect, the experiment utilized warm light, employing four 60-watt Dairu© lamps producing 780 lumens each, and four 25-watt Able

Hill© NUV lamps operating between 300 and 400 nm. These lamps were positioned 30 cm above the Petri dishes with a photoperiod of 12 h/12 h light/dark.

4.1.3.3 Spectral acquisition

The strains were analyzed by NIRS using a NanoQuest 2.5 (Ocean Insight) portable spectrometer connected to an OceanOptics HL-2000-FHSA halogen light source and an NIR reflectance optical fiber probe. Spectra were acquired in reflectance mode (1300–2500 nm), with a spectral resolution of 8 nm during a 0.5-seg scan time. A Spectralon plate was used as reference material for reflectance calibration. To analyze the samples with the reflectance probe, the Petri dish lid was removed, and each dish was placed inside a disinfected black box. The box was mounted on an Arduino-based platform that allowed remote control of the x, y, and z axes to prevent contamination of the Petri dish. The position of the probe was controlled using a camera in a made-at-laboratory system. The reflectance probe was also disinfected after each measurement to avoid contamination. Spectra were collected using NanoQuest software version 6.1 (Ocean Insight Inc.).

Three zones of the colony in the cultures were analyzed due to non-homogeneous mycelial growth: the central colony (A), the middle colony (B), and the border colony (C), (Figura 4.1-1). The probe was kept at a 0.5–0.8 cm height relative to the sample. Ten random spectra were obtained from each zone. Each zone was assessed separately to determine which colony region exhibited the most

distinctive characteristics between species. A total of 360 spectra per zone were acquired by sampling (considering three strains of four species, with three dishes for each strain with 10 spectra replicates). Sampling was performed at 48, 72, and 96 hours post-cultivation (hpc), obtaining a total matrix of 1080 spectra per sampling. The height of the spectrometer probe was kept constant across all the analyses.

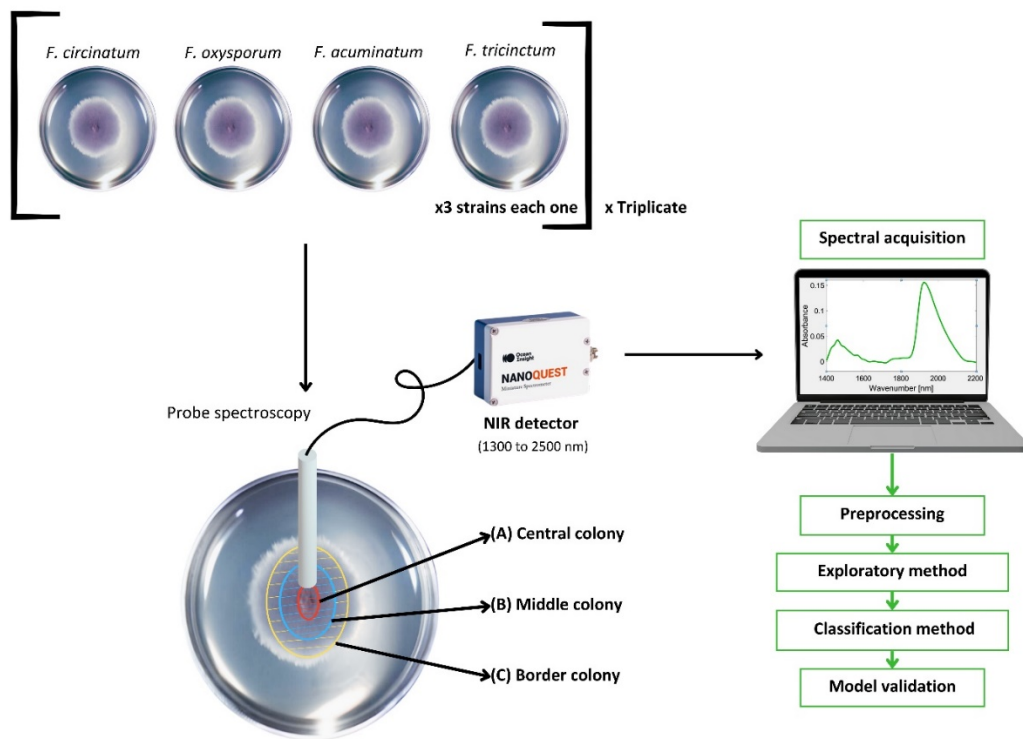


Figura 4.1-1 Different zones of the colony analyzed by reflectance spectroscopy: central colony (A), middle colony (B), and border colony (C).

4.1.3.4 Spectral preprocessing and multivariate analysis.

The acquired reflectance spectra were transformed to absorbance (A) using $A = -\log_{10}(R)$, where R is the measured reflectance on a scale of 0–100. Signals with wavelengths lower than 1400 nm and higher than 2200 nm were removed from the data due to noise. Various preprocessing techniques were employed to develop exploratory and supervised models, including Baseline correction, Standard Normal Variation (SNV), Multiplicative scatter correction (MSC), First derivative and mean center.

4.1.3.5 Exploratory data analysis.

Principal Component Analysis (PCA) was employed as an unsupervised method with baseline correction and mean centering applied to a matrix of dimensions 1080×150 , facilitating the spontaneous clustering of samples by zones and/or species at 48, 72, and 96 hours post-cultivation (hpc). This analysis was conducted to identify overarching data trends and to eliminate potential anomalies. Furthermore, it evaluates the regions and time points analyzed to determine the optimal conditions for future modelling efforts.

4.1.3.6 Supervised methods

Since the classes (species) are known in advance, this is a discrimination problem. The models trained will be used to predict future samples(33). Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) and support vector machine discriminant analysis (SVMDA) were supervised methods to classify the samples

by species. The models were evaluated according to the following parameters: confusion matrix, precision, correct discrimination rate, sensitivity, specificity and %non-error rate which are obtained from the following formulas(34,35):

$$Precision = \frac{TP}{(TP + FP)} \times 100$$

$$Correct\ discrimination\ rate\ (\%CCR) = \frac{Correctly\ classified}{Total} \times 100$$

$$Sensitivity\ (Sen) = \frac{TP}{(TP + FN)} \times 100$$

$$Specificity\ (Sp) = \frac{TN}{(TN + FP)} \times 100$$

$$\%Non\ error\ rate = \frac{Sp + Sen}{2} \times 100$$

where *TP* corresponds to true positive or the fungus is correctly classified as positive, *FN* denotes false negative and stands for the number of instances where a particular group is incorrectly identified as not belonging to that group, *TN* denotes true negative, where samples not belonging to a specific class are accurately classified, and *FP* corresponds to false positive or the number of non-member samples is incorrectly classified as a member of a given class or the fungus is incorrectly classified as positive. All this information can be obtained through the confusion matrix of the created models during the calibration and external validation stage.

In PLS-DA, the model's capability was assessed using Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis, which provides metrics such as the Area Under the Curve (AUC) to measure the model's discrimination ability. ROC analysis is essential for threshold selection, model comparison, and visual interpretation of model performance. Detailed parameters are presented in the supplementary material.

The data were divided into the calibration and validation sets, considering two Petri dishes of each strain for calibration and leaving one Petri dish of each strain for the external validation of models, obtaining 24 Petri dishes for cross-validation and 12 Petri dishes for the external validation step. In this study, sequential steps based on dichotomous keys were necessary for species classification, as will be discussed in the results section. All preprocessing methods and chemometric analysis have been applied in MATLAB 2022b using the PLS_Toolbox 9.2 version from Eigenvector Research Inc.

4.1.3.7 Comparison of classification models

The McNemar test is a statistical procedure used to determine if two methods have the same accuracy(36). In this study, Models A and B were trained and validated using the same set of samples. The null hypothesis established for both algorithms is that they exhibit the same error rate. The McNemar test is calculated using the following formula:

$$McNemar's\ value = \frac{(n_{01} - n_{10} - 1)^2}{n_{01} + n_{10}}$$

n_{01} corresponds to the number of samples incorrectly classified by Method A using the PLSDA model, while n_{10} represents the samples misclassified only by the SVMDA model. For sample sizes greater than 20, a chi-squared (χ^2) value with one degree of freedom is considered, with a critical value of 3.841 at a 5% significance level. The critical value is compared to the calculated value. If the calculated χ^2 value exceeds 3.841, the null hypothesis is rejected, indicating a significant difference between the two methods.

4.1.4 Results and discussion

The morphological analysis revealed distinctive growth and spore characteristics for the four *Fusarium* species on PDA. *F. circinatum* grows rapidly, forming pigmented colonies, with cylindrical macroconidia and obovoid microconidia. *F. oxysporum* shows moderate to fast growth, with purple to violet colonies, falcate macroconidia, and oval microconidia. *F. acuminatum* exhibits moderate growth with potential white or violet tints, curved macroconidia, and small round microconidia. Lastly, *F. tricinctum* demonstrates slow to moderate growth, with colonies that may turn white and purple, curved macroconidia, and small microconidia

4.1.4.1 Visual evaluation of *Fusarium* spp. Cultures

Figure S1 displays as example, images of *Fusarium* species colonies growing longitudinally under warm light conditions. Both *F. circinatum* and *F. oxysporum* exhibited similar coloration and growth rates, (average 4.7 mm/day at 20°C for *F.*

circinatum) [34]. For *F. acuminatum* and *F. oxysporum*, the growth starts to be aerial after 72 hpc. At 48 hpc all colony species appeared identical; however, at 72 hpc, *F. circinatum* and *F. oxysporum* exhibited light violet colors, whereas *F. acuminatum* and *F. tricinatum* remained white. The incubation outcomes were similar when grown under NUV light, yet the diameter of the mycelium was smaller than those incubated under warm light.

Spectral analysis of different zones of fungal cultures under warm and NUV light

Figure 2 shows the mean spectral profiles obtained from different zones of *F. circinatum* cultures maintained under warm and NUV light. For comparison of the spectral differences of these zones, baseline-corrected spectra were used. The raw spectra of *F. circinatum* and the other species are illustrated in Supplementary Figure S2 and the baseline corrected spectra of the different zones for the other species is shown in Figure S3. The discussion of these spectral profiles and the analysis of different zones of fungal cultures in this study will focus on the results of *F. circinatum*.

In Figure 2, the border zones of samples under warm light (Figura 4.1-1A) show notable or pronounced bands between 1900 and 2000 nm, after 96 hours, while band near to 1400 nm is observed during 48 and 72 hpc. The mycelial border shows the lowest intensity in most bands, especially in regions around 1923 nm under both illumination conditions. The border colony has a lower concentration of the fungus, which is in the early stages of growth and expansion, and contains

PDA, which is translucent and does not significantly reflect the signal to the detector despite having high carbohydrate concentrations.

Middle zone intensity is especially important for a larger hpc under NUV light (Figura 4.1-1B), where it is notably distinguished from the border zones, with intensities in the region near 1900 nm almost similar to the center of the colony. The band around 1450 nm is higher in the middle zone of NUV light in comparison with spectra obtained from the middle zone under warm light. The mycelium center shows the highest spectral intensity for all the cases, with the highest intensities of the band near 1450 nm under NUV light since the first days of incubation, while warm light shows the highest intensity of the center of the colony only in the band around 1900 nm at 96 hpc. Thus, spectral characteristics are dependent on two factors: the light conditions during culture incubation and the specific zone where the spectrum is acquired. To enhance the clarity and precision of the spectral analysis, it has been decided to focus on the region between 1400 and 2200 nm. This decision is informed by the observation that areas below 1400 nm and above 2200 nm are significantly impacted by high levels of noise in raw spectra. PCA was subsequently applied to differentiate the zones of the cultures under a multivariate overview.

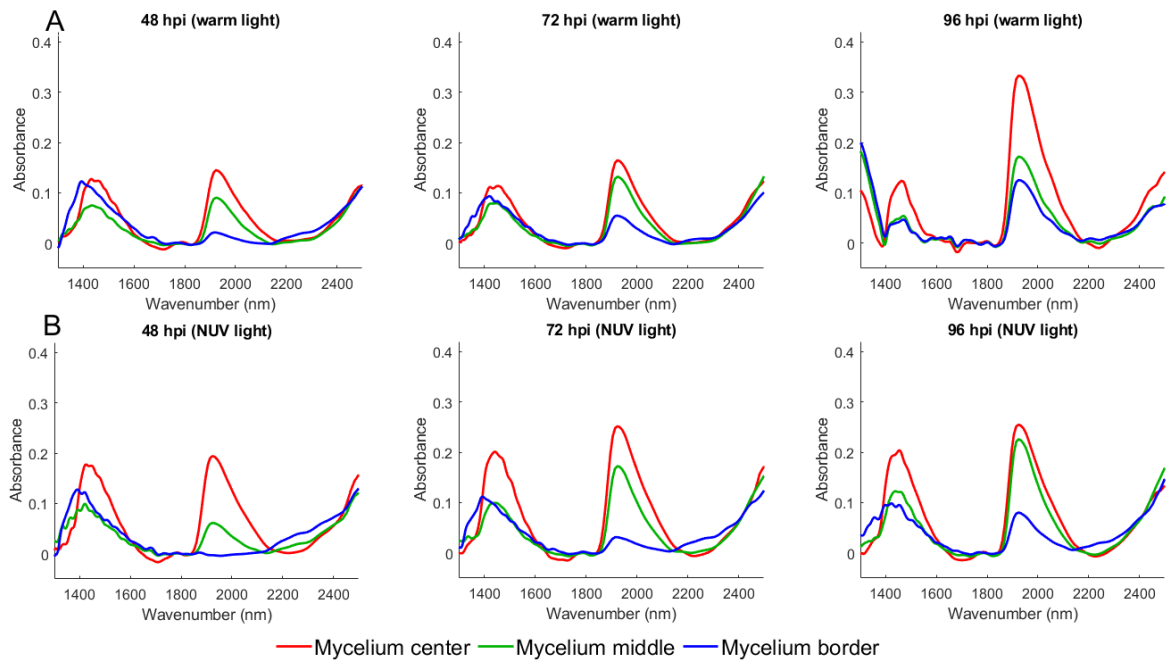


Figure 4.1-1 The mean of the baseline-corrected spectra of *F. circinatum* cultures obtained at different hours post-cultivation (hpc) and under two types of light. **A**: Warm light incubation, **B**: NUV light incubation.

4.1.4.2 PCA for evaluation of the influence of growth zone on spectral profiles in cultures

Although diverse spectral pretreatments were applied, the best PCA result was obtained with only with baseline correction and mean-centered spectra. Figure 4.1-2 illustrates the scores plot obtained in the analysis of samples at different hpc, under warm and NUV light (Figure 4.1-2 A and B, respectively), labeling the samples according to the zones of the colony. In Figure 3A (warm light), the scores at 48 hpc show that the central and border colony scores tend to be slightly

separated by the principal component 2 (PC2). Then, after 72 hpc, the cluster tends to overlap in the most analyzed zones. Finally, at 96 hpc, the scores of the zones at the central and border of the colony are distinguishable, but the separation of clusters is not observed by zones. In Figure 4.1-2 B (NUV light), at 48 hpc, the central and border colonies are well distinguished. Between both zones, the scores of the middle area of the colony are located. At 72 hpc, the scores of the central and middle zones tend to aggregate and differentiate from the border, with PC2 contributing to this differentiation. At 96 hpc, the spectra obtained from the border appear more dispersed, but still distinguishable from the middle and central zones. Since NUV light produces the best separation of spectra by zones, the loading of the PCA model obtained using NUV light was interpreted. According to the scores plot, PC2 is responsible for zone differentiation, and the loadings of this component are shown in Figure 4.1-2 C. The positive location of scores for the PC2 corresponds to the central or middle zones of the dishes and is directly correlated with the bands at 1923 nm and 1450 nm, respectively, whereas the border colony spectra are dominated by absorptions around the 1600–1800 nm region. This behavior is observed in the loadings of the three obtained PCAs, i.e., at different hpc.

After analyzing the data, the central and middle regions seem to be more useful for the future differentiation of *Fusarium* species since border spectra were detected as less intense and separated from the other zones. Differential incubation conditions, particularly at the 48 hpc, show a noticeable difference

between warm and NUV light. The NUV light irradiation promotes better separation and aggregation of the evaluated zones, which is sustained with minimal changes over time.

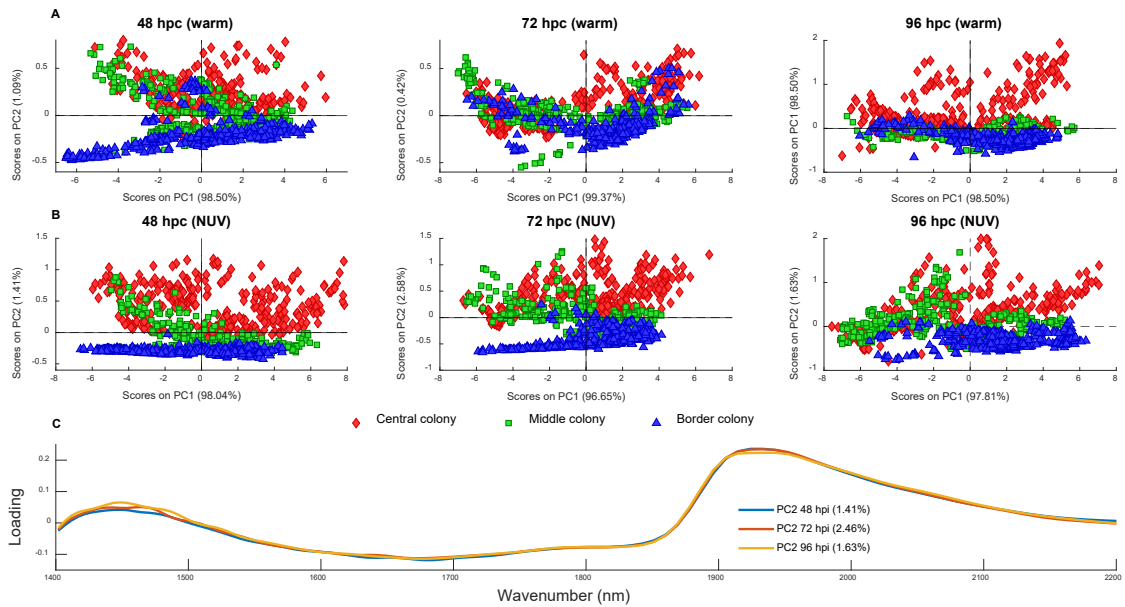


Figure 4.1-2 Score plot of four *Fusarium* species at different hpc, labeled by zones of the fungal colony. **A:** samples incubated with warm light. **B:** samples incubated with NUV light. **C:** loading plot of PC2 at different hours post cultivation using NUV incubation light

Differentiation of Fusarium species by PCA

For the differentiation of *Fusarium* species, PCA was applied to the spectra obtained only from the middle and central zones of the colony at 48, 72, and 96 hpc. Figura 4.1-3 illustrates the scores plots obtained in this analysis for samples under warm light (Figura 4.1-3 A) and NUV light (Figura 4.1-3 B), respectively, while loadings of these models are shown in the supplementary material (Figure S4). For incubation under warm light, scores of the two first PCs, shown in Figure 4A, reveal a tendency to cluster the samples by species at 48, 72, and 96 hpc, although at 96 hpc, *F. circinatum* samples are more dispersed, and several samples of *F. circinatum*, *F. oxysporum*, and *F. tricinctum* are overlapped. *F. acuminatum* distinguishes itself from the rest of the group, mainly by the PC1 at 48 hpc. At 72 hpc, separation produced by PC1 is evident, resulting in the formation of two groups: the first group comprising *F. circinatum* and *F. oxysporum*, which exhibit some overlapping of samples, and the second group consisting of *F. acuminatum* and *F. tricinctum*, with less overlapping. The loading profile of PC1 (Figure S4) indicates that the band near 1923 nm is associated with the *F. acuminatum* and *F. tricinctum* samples. Thus, the compounds absorbing in this region are predominantly found in higher proportions in *F. acuminatum* and *F. tricinctum* species and are less prevalent in *F. circinatum* and *F. oxysporum* species.

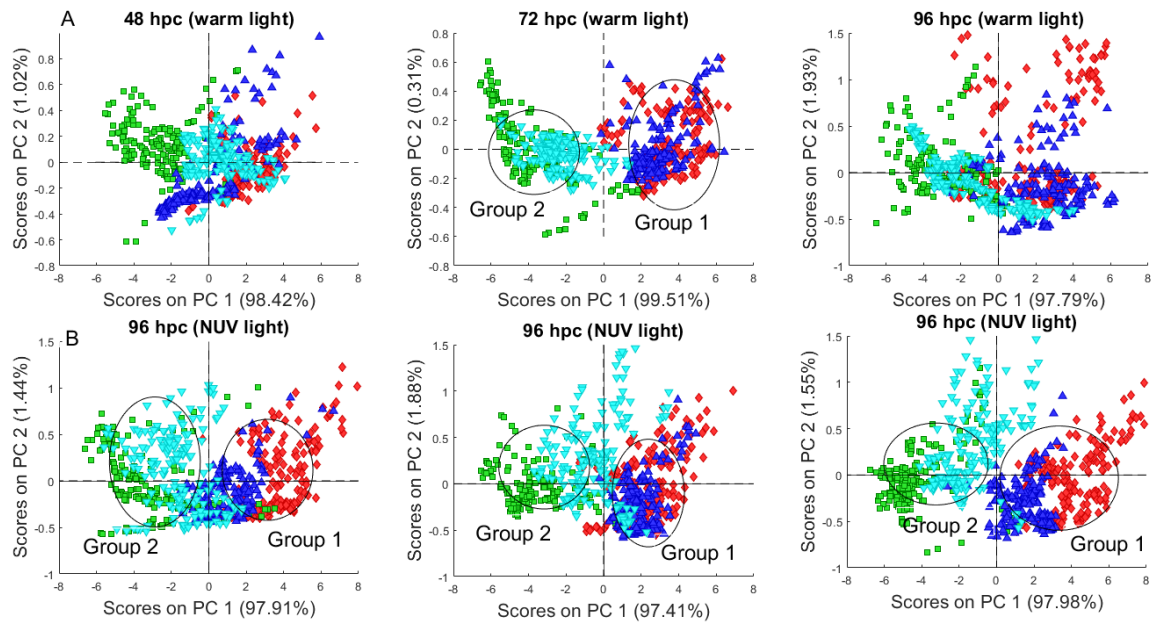


Figure 4.1-3 PCA analysis for *Fusarium* species differentiation at different hpc A: Score plot of the first two principal components using warm light. B: Score plot of the first two principal components at different hours post cultivation using NUV.

Figure 4.1-3 B illustrates the PCA scores of the four *Fusarium* species on different hpc under NUV light using spectra from the middle and central zones of the colony. In this figure, the score plot at 48 and 96 hpc show the best separations of *F. circinatum* samples from the other three species in comparison to those observed in the samples under warm light, indicating that spectral differences produced by NUV light could enhance the differentiation of this species from the others. However, at 72 hpc, several samples of *F. circinatum* and *F. oxysporum* become more overlapped, suggesting that the spectral differences between species diminish or that their spectral profiles become more similar in this period. The time series data analysis reveals two distinct groups among the four species

in all the cases, produced by the PC1: *F. circinatum* and *F. oxysporum* (group 1) is separated from *F. acuminatum* and *F. tricinctum* (group 2). The loading plot of PC1 (Figure S4) demonstrates that distinct peaks are observed at wavelengths between 1923 and 1940 nm during all three time points, exhibiting a correlation with *F. acuminatum* and *F. tricinctum* species and an inverse relationship with *F. circinatum* and *F. oxysporum* species. The band in this region is associated with the absorption of proteins in other *Fusarium* species (31) and water [36].

The utilization of NUV light enables the differentiation of spectral characteristics among different *Fusarium* species. Conversely, warm light, emitting radiation primarily from the visible spectrum during incubation, does not provide optimal conditions for species differentiation. Specifically, the central and middle zones of the colony emerge as crucial areas for delineating species boundaries. This meticulous examination forms the basis for developing an analytical methodology aimed at constructing predictive models.

4.1.4.3 Supervised methods

Following the exploratory analyses, classification models were devised to accurately discriminate among the four *Fusarium* species in vitro conditions using the middle and central area of the colony. The spectral preprocessing methods used to optimize the classification models are detailed in Table 4.1-1, which presents key performance metrics for *F. circinatum* using PLS-DA. In this approach, the response variable (Y) is transformed into dummy variables,

creating a binary matrix where each row represents class membership (e.g., for classes A, B, C, and D, the matrix would include columns such as (1, 0, 0, 0) for class A). The PLS algorithm then decomposes the predictor matrix (X) into latent components that capture the maximum variance related to Y. These latent components are modelled to maximize class separation. The optimal number of latent variables is determined by minimizing error rates and the proportion of unassigned samples. Performance metrics such as sensitivity and specificity, for *F. circinatum* were derived from test data collected at 48, 72, and 96 hpc, across four species. The ROC plot for all *Fusarium* species is presented in the supplementary materials."

Table 4.1-1 Summary of PLS-DA model performance metrics for *F. circinatum* at different hpc using warm light with various preprocessing methods in the test data set. L.V.: Latent variable, MSC: Multiplicative scatter correction, SNV: Standard normal variate, MC: Mean center. %Sen: sensitivity, Sp: Specificity and NER: Non-error rate.

48 hpc	L.V.	X cumulative	Variance	%Sen	%Sp	%NER
<i>Baseline + MC</i>	2	79.7		41.2	80.5	81.45
<i>MSC + MC</i>	2	25.8		31.7	77.2	70.3
<i>SNV + MC</i>	1	20.8		38.8	79.6	78.6
<i>MC</i>	3	99.5		76.7	92.2	122.8
<i>1st derivative</i>	5	89.0		54.2	84.7	96.55
72 hpc						
<i>Baseline + MC</i>	2	81.9		49.6	83.2	91.2
<i>MSC + MC</i>	1	11.3		40.4	80.2	80.5
<i>SNV + MC</i>	1	15.7		42.5	80.1	82.55
<i>MC</i>	1	98.9		66.7	88.9	111.15
<i>1st derivative</i>	2	85.5		45.0	81.7	85.85
96 hpc						
<i>Baseline + MC</i>	3	92.2		34.6	78.2	73.7
<i>MSC + MC</i>	3	33.5		38.8	79.6	78.6
<i>SNV + MC</i>	4	42.6		41.2	80.4	81.4
<i>MC</i>	3	99.8		48.4	82.8	89.8
<i>1st derivative</i>	3	92.4		41.3	80.4	81.5

PLS-DA effectively separates classes by determining the axes that best distinguish the groups within the data, utilizing binary values in the response matrix to indicate class membership. For instance, in differentiating between *Fusarium* species, the response matrix would have a value of 1 for samples of the target species (e.g., *F. circinatum*) and 0 for all other species.

Table 4.1-1 indicates that mean centering is the most effective preprocessing method, exhibiting high specificity and sensitivity and the lowest error rate across all time points. This method optimizes cumulative variance and minimizes errors, yielding the most reliable results for the PLS-DA model in this study. The performance of mean centering can be enhanced by employing a dichotomous key strategy, wherein models are developed for various pairwise classifications. In Model A, the classes correspond to four species grouped into two categories: *F. circinatum* and *F. oxysporum* (class 1 or logical value 1), and *F. acuminatum* and *F. tricinctum* (class 2 or logical value 0). In the second model, Model B, class 1 corresponds to *F. circinatum*, and class 2 corresponds to *F. oxysporum*. Finally, in Model C, class 1 corresponds to *F. acuminatum*, and class 2 to *F. tricinctum*. Consequently, three PLS models are constructed to classify the four fungal species (Figura 4.1-4 An Illustration of index class matrix of the training set. According to Model A, Class One is defined as the set of samples of *F. circinatum* and *F. oxysporum*, and Class Two as the set of samples of *F. acuminatum* and *F. tricinctum*. Similarly, this classification applies to Models B and C.).

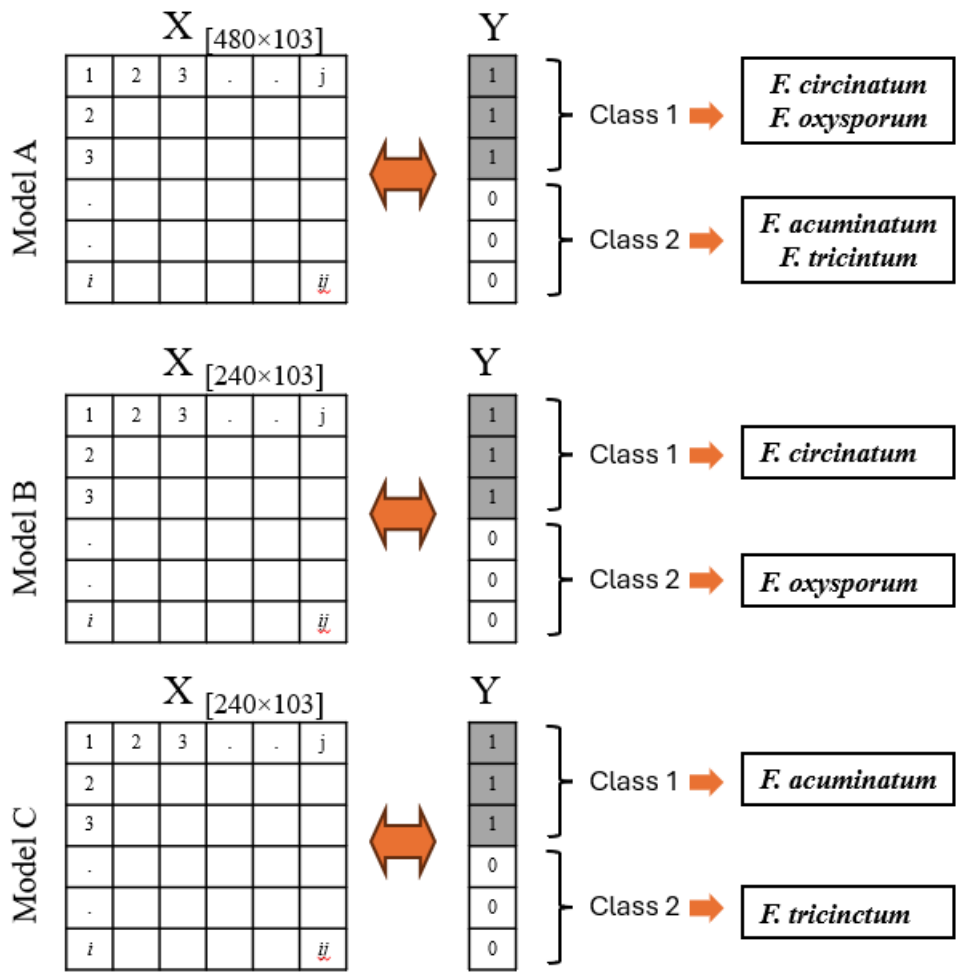


Figura 4.1-4 An Illustration of index class matrix of the training set. According to Model A, Class One is defined as the set of samples of *F. circinatum* and *F. oxysporum*, and Class Two as the set of samples of *F. acuminatum* and *F. tricinctum*. Similarly, this classification applies to Models B and C.

Table 4.1-2 and Table 4.1-3 present the best models for PLSDA and SVMDA, respectively. In the PLSDA model, distinctions can be made from 72 hpc using both types of light for incubation. Model A achieved maximum figures of merit in prediction models after 72 hours. *F. circinatum* and *F. oxysporum* could be spectrally distinguished from the other two species. However, distinguishing between *F. circinatum* and *F. oxysporum* required analysis after 96 hpc, achieving correct classification rates of over 73.4% in prediction values. The classification between *F. acuminatum* and *F. tricinctum* was unsatisfactory under these conditions. PLSDA models can identify and classify *F. circinatum* and *F. oxysporum* but not the other two species.

PLSDA models using NUV light for incubation in Model A allowed differentiation from 72 hpc, classifying the four species into two groups with correct classification rates over 97% in prediction tests. Model B differentiated between *F. circinatum* and *F. oxysporum* after 96 hours with correct classification rates over 82.5% in prediction samples. *F. acuminatum* and *F. tricinctum* could be identified in the prediction set, with correct classification rates over 87.5%. Models under these conditions proved more robust and effective over time compared to those obtained with warm light, identifying the four species through three distinct models.

In Table 4.1-3, the best classification for the SVMDA models using warm light for Model A was achieved from 72 hours, with correct classification rates over 88.9%.

However, Model B could not discriminate between *F. circinatum* and *F. oxysporum*, nor could Model C distinguish between *F. acuminatum* and *F. tricinctum*. SVMDA models A, B, and C with NUV light were efficient from 72 and 96 hours, achieving correct classification rates over 88.3% for *F. circinatum* and *F. oxysporum* in prediction sets. However, PLSDA models remained superior in terms of higher figures of merit. Generally, SVMDA models did not improve figures of merit values; they followed similar trends and interpretations as PLSDA models but with lower figures of merit.

Most developed models for both PLSDA and SVMDA (with some exceptions) showed high evaluation parameter values during cross-validation. However, these parameters tended to decrease when tested against an external set. The predictive ability of PLSDA models under NUV conditions was notable, identifying the four species after 96 hours of cultivation.

The complete table of other models created is provided in the supplementary material, including the confusion matrix and ROC curves for the final models.

Table 4.1-2 Best PLS-DA models of the dichotomic strategies L.V.: Latent variables, X and Y variance cumulative, RMSECV: root mean square error cross-validation, RMSEP: root mean square error prediction, CV: cross validation, EV: external validation, Sn: sensitivity, Sp: specificity, CCR: correct classification rate, P: precision and Non-error rate.

Figures of merit (CV / EV)												
Mode I	hpc	L.V	X Cumulative	Y Cumulative	RMSECV/RMSEP	Class	%Sn	% Sp	% CCR	P	%NER	
Warm light	A	72	3	99.76	78.88	0.234 / 0.164	Fc &Fo	99.6 / 100	97.1 / 100	98.4 / 100	97.1 / 100	98.35 / 100
							Fa & Ft	97.1 / 100	99.6 / 100	98.4 / 100	99.6 / 100	98.35 / 100
	B	96	1	99.35	40.52	0.400 / 0.266	Fc	77.5 / 73.3	79.2 / 73.3	78.4 / 73.4	78.8 / 73.3	78.35 / 73.3
							Fo	79.2 / 73.3	77.5 / 73.3	78.4 / 73.4	77.9 / 73.3	78.35 / 73.3
	C	96	1	98.17	33.45	0.408 / 0.579	Fa	89.2 / 0	60.0 / 75.0	74.6 / 37.5	68.6 / 0	74.6 / 37.5
							Ft	60.0 / 75.0	89.2 / 0	74.6 / 37.5	82.8 / 42.8	74.6 / 37.5
NUV light	A	72	2	99.26	60.92	0.313 / 0.219	Fc &Fo	94.2 / 99.2	88.3 / 94.2	91.3 / 97.0	88.9 / 94.4	91.25 / 96.7
							Fa & Ft	88.3 / 94.2	94.2 / 99.2	91.3 / 97.0	93.8 / 99.1	91.25 / 96.7
	B	96	3	97.42	55.73	0.343 / 0.355	Fc	85.0 / 81.7	93.3 / 83.3	89.2 / 82.5	92.7 / 83.1	89.15 / 82.5
							Fo	93.3 / 83.3	85.0 / 81.7	89.2 / 82.5	86.2 / 82.0	89.15 / 82.5
	C	96	4	99.83	75.77	0.256 / 0.344	Fa	91.7 / 100	95.8 / 75	93.4 / 87.5	95.7 / 80.0	93.45 / 87.5
							Ft	95.8 / 75	91.7 / 100	93.4 / 87.5	92.0 / 100	93.75 / 87.5

Table 4.1-3 Best SVMMDA models of the dichotomic strategies SV: support vector., CV: cross validation, EV: external validation, Sn: sensitivity, Sp: specificity, CCR: correct classification rate, P: precision and NER: Non-error rate.

		Figure of merit								
	Model	hpc	# SV	gamma	Class	%Sn	% Sp	% CCR	P	%NER
Warm light	A	72	23	0.1	Fc &Fo	99.6 / 95.6	98.3 / 82.2	92.6 / 88.9	100 / 98.4	98.95 / 88.9
					Fa & Ft	98.3 / 82.2	99.6 / 95.6	92.6 / 88.9	100 / 99.6	98.95 / 88.9
	B	72	174	0.316	Fc	79.2 / 57.8	65.8 / 64.4	72.5 / 61.1	74.2 / 64.4	72.5 / 61.1
					Fo	65.8 / 64.4	79.2 / 57.8	72.5 / 61.1	70.5 / 65.6	72.5 / 61.1
	C	96	170	3.162	Fa	91.7 / 0	95.8 / 94.4	93.8 / 47.2	95.6 / 0	93.75 / 47.2
					Ft	95.8 / 94.4	91.7 / 0	93.8 / 47.2	92.0 / 47.8	93.75 / 47.2
NUV light	A	72	142	1	Fc &Fo	93.8 / 71.7	95.0 / 82.5	94.4 / 77.1	94.9 / 80.3	94.4 / 77.1
					Fa & Ft	95.0 / 82.5	93.8 / 71.7	94.4 / 77.1	93.8 / 74.4	94.4 / 77.1
	B	96	95	1	Fc	85.8 / 86.7	95.8 / 90.0	90.8 / 88.3	95.4 / 90.6	90.8 / 88.4
					Fo	95.8 / 90.0	85.8 / 86.7	90.8 / 88.3	87.1 / 82.1	90.8 / 88.4
	C	96	37	0.316	Fa	96.7 / 74.4	95.0 / 68.9	95.8 / 71.7	95.1 / 69.0	95.85 / 71.7
					Ft	95.0 / 68.9	96.7 / 74.4	95.8 / 71.7	96.6 / 100	95.85 / 71.7

4.1.4.4 Comparison of methods

Comparisons of both models were conducted based on the best prediction model under optimal conditions, specifically comparing the PLSDA and SVMDA models on samples incubated with NUV light.

Tabla 4.1-4 presents a comparison of both classification methods in the validation sets. Models A, B, and C were compared in both cases. It was observed that for Models A and C, the null hypothesis was rejected, and the alternative hypothesis was accepted, indicating significant differences between the two models. Conversely, for Model B, the null hypothesis was accepted, suggesting that both models exhibit statistically similar error rates.

Tabla 4.1-4 Comparison of classification models

		PLS-DA		
		Model A	Model B	Model C
SVM DA	Model	Model A	Model B	Model C
	(%CCR)	%97.0	%82.5	%87.5
	Model A	19.9	N/A	N/A
	%77.1			
	Model B	N/A	1.0	N/A
	%88.3			
	Model C	N/A	N/A	8.1
	%71.7			

4.1.5 Conclusions

The combination of NIRS methodology and multivariate techniques has demonstrated remarkable efficacy for the early and rapid identification of various *Fusarium* species in culture media. This approach was particularly effective in detecting *F. circinatum*, a critical pathogen for the *P. radiata* forestry industry. Through exploratory analyses, the study emphasized the importance of spectral data acquisition zones, revealing significant differences between the central, middle, and border regions of colonies, with the central and middle regions being the most critical for accurate identification.

The classification models developed, particularly the PLS-DA model under NUV light conditions, proved to be the most effective strategy for identifying the four *Fusarium* species at 72 hours post-culture, with *F. circinatum* achieving an 82.5% correct classification rate under these conditions. This model consistently provided reliable and accurate results, making it a valuable tool for early pathogen detection in forestry applications.

4.1.6 Declaration of competing interests

The authors declare that they do not have any known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this study.

4.1.7 Acknowledgements

This research was conducted with the sponsorship of ANID project FONDECYT 1221387. Martín Bravo thanks the National Grant Number 21201971 from ANID Chile. The authors are grateful for the FOVI220172 project (ANID).

4.1.8 References

1. Iturrutxa E, Ganley RJ, Raposo R, García-Serna I, Mesanza N, Kirkpatrick SC, et al. Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea*. For Pathol. 2013 Dec 5;43(6):488–95.
2. Martínez-Álvarez P, Pando V, Diez JJ. Alternative species to replace Monterey pine plantations affected by pitch canker caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain. Plant Pathol. 2014 Oct 20;63(5):1086–94.
3. Mitchell RG, Steenkamp ET, Coutinho TA, Wingfield MJ. The pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*: Implications for South African forestry. South For. 2011;73(1):1–13.
4. Carrasco A, Sanfuentes E, Durán Á, Valenzuela S. Cancro resinoso del pino: ¿una amenaza potencial para las plantaciones de *Pinus radiata* en Chile? Gayana Bot. 2016;73(2):369–80.
5. Dwinell LD, Fraedrich SW, Adams D. Diseases of pines caused by the pitch canker fungus. *Fusarium*: Paul E Nelson Memorial Symposium. 2001;225–32.
6. Dwinell D, Barrows-Broadus J, Kuhlman G. Pitch canker: A disease complex. Plant Dis. 1985;69:270–5.
7. Martín-Rodríguez N, Espinel S, Sanchez-Zabala J, Ortiz A, González-Murua C, Duñabeitia MK. Spatial and temporal dynamics of the colonization

of *Pinus radiata* by *Fusarium circinatum*, of conidiophora development in the pith and of traumatic resin duct formation. *New Phytologist*. 2013 Jun 18;198(4):1215–27.

8. Vainio, Bezos, Bragança, Cleary, Fourie, Georgieva, et al. Sampling and Detection Strategies for the Pine Pitch Canker (PPC) Disease Pathogen *Fusarium circinatum* in Europe. *Forests*. 2019 Aug 22;10(9):723.
9. Burns Robert. *Plant Pathology: Techniques and Protocols*. Burns R, editor. Vol. 508. Totowa, NJ: Humana Press; 2009.
10. Schweigkofler W, O'Donnell K, Garbelotto M. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(6):3512–20.
11. Sylvain T, Cecile LG. *Disease Identification: A Review of Vibrational Spectroscopy Applications* [Internet]. 1st ed. Vol. 80, *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2018. 195–225 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.coac.2018.03.005>
12. SAG. Instructivo tecnico para el diagnóstico de *Fusarium circinatum* en muestras de viveros bajo control oficial. Servicio Agrícola y Ganadero [Internet]. 2008 [cited 2024 Mar 10];1–21. Available from: www.sag.cl

13. Zamora-Ballesteros C, Pire R, Diez JJ. Field and Laboratory Procedures for *Fusarium circinatum* Identification and Diagnosis. In: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2022. p. 51–73.
14. Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, Panno S, Scuderi G, Ruisi P, et al. Advanced methods of plant disease detection. A review. Agron Sustain Dev [Internet]. 2015 Jan 11;35(1):1–25. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13593-014-0246-1>
15. Naumann D, Fijala V, Labischinski H, Giesbrecht P. The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis. J Mol Struct. 1988;174(C):165–70.
16. Maquelin K. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. J Microbiol Methods. 2002;14(51):255–71.
17. Preisner O, Lopes JA, Menezes JC. Uncertainty assessment in FT-IR spectroscopy based bacteria classification models. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. 2008;94(1):33–42.
18. Kumar R, Pathak S, Prakash N, Priya U, Ghatak A. Application of Spectroscopic Techniques in Early Detection of Fungal Plant Pathogens. In: Diagnostics of Plant Diseases. IntechOpen; 2021.

19. Levasseur-Garcia C. Updated overview of infrared spectroscopy methods for detecting mycotoxins on cereals (corn, wheat, and barley). *Toxins (Basel)*. 2018;10(1).
20. Dvořáček V, Prohasková A, Chrpová J, Štočková L. Near infrared spectroscopy for deoxynivalenol content estimation in intact wheat grain. 2012;2012(Mesterházy 1995):196–203.
21. Twaruzek M, Błajet-Kosicka A, Kosicki R, Grajewski J. Mycotoxin Analytical Methods. *Environmental Mycology in Public Health: Fungi and Mycotoxins Risk Assessment and Management*. 2015;363–86.
22. Marín-Ortiz JC, Hoyos-Carvajal LM, Botero Fernandez V. Detección de plantas asintomáticas de *Solanum lycopersicum* L. infectadas con *Fusarium oxysporum* usando espectroscopia de reflectancia VIS. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 2018;12(2):436–46.
23. Poona N, van Niekerk A, Ismail R. Investigating the utility of oblique tree-based ensembles for the classification of hyperspectral data. *Sensors (Switzerland)*. 2016 Nov 15;16(11).
24. Poona NK, Van Niekerk A, Nadel RL, Ismail R. Random Forest (RF) Wrappers for Waveband Selection and Classification of Hyperspectral Data. *Appl Spectrosc*. 2016 Feb 1;70(2):322–33.

25. Poona NK, Ismail R. Developing optimized spectral indices using machine learning to model *Fusarium circinatum* stress in *Pinus radiata* seedlings. *J Appl Remote Sens.* 2019 Aug 24;13(03):1.
26. Poona NK, Ismail R. Using Boruta-selected spectroscopic wavebands for the asymptomatic detection of *Fusarium circinatum* stress. *IEEE J Sel Top Appl Earth Obs Remote Sens.* 2014;7(9):3764–72.
27. Ajmal M, Hussain A, Ali A, Chen H, Lin H. Strategies for Controlling the Sporulation in *Fusarium* spp. *Journal of Fungi.* 2022 Dec 21;9(1):10.
28. Leach CM. Sporulation of diverse species of fungi under Near-Ultraviolet radiation. *Canadian Journal of Botany.* 1962 Jan 1;40(1):151–61.
29. Williams PJ, Geladi P, Britz TJ, Manley M. Near-infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate image analysis to study growth characteristics and differences between species and strains of members of the genus *Fusarium*. *Anal Bioanal Chem.* 2012;404(6–7):1759–69.
30. Williams P, Manley M, Fox G, Geladi P. Indirect detection of *Fusarium verticillioides* in maize [*Zea mays* L kernels by near infrared hyperspectral imaging. *J Near Infrared Spectrosc.* 2010;18(1):49–58.
31. Williams PJ, Geladi P, Britz TJ, Manley M. Growth characteristics of three *Fusarium* species evaluated by near-infrared hyperspectral imaging and multivariate image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96(3):803–13.

32. Leslie JF, Summerwell BA. The *Fusarium* laboratory manual [Internet]. First edit. Publishing B, editor. Vol. 6, Blackwell. Publishing, Blackwell; 2006. 103 p. Available from: http://www.ghbook.ir/index.php?name=فرهنگ و رسانه های نوین&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chkhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component
33. Ballabio D, Consonni V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Analytical Methods*. 2013;5(16):3790–8.
34. Szymańska E, Gerretzen J, Engel J, Geurts B, Blanchet L, Buydens LMC. Chemometrics and qualitative analysis have a vibrant relationship. Vol. 69, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2015. p. 34–51.
35. Szymańska E, Saccenti E, Smilde AK, Westerhuis JA. Double-check: Validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*. 2012 Jun;8:3–16.
36. Roggo Y, Duponchel L, Ruckebusch C, Huvenne JP. Statistical tests for comparison of quantitative and qualitative models developed with near infrared spectral data. *J Mol Struct*. 2003 Jun 25;654(1–3):253–62.

4.2 Evaluación espectroscópica de sustratos inoculados con *Fusarium circinatum*: análisis hiperespectral y quimiometría para la detección temprana del patógeno

4.2.1 Resumen

El estudio evaluó el uso de imágenes hiperespectrales (400-1000 nm) para la detección de *Fusarium circinatum* en sustratos orgánicos de viveros forestales. Se inocularon muestras con el hongo y se adquirieron espectros en diferentes momentos post-inoculación utilizando una cámara hiperespectral. Se aplicaron técnicas quimiométricas como SNV y PCA para analizar diferencias espectrales entre muestras control e inoculadas. Los resultados mostraron un aumento generalizado en la reflectancia de los sustratos inoculados, posiblemente debido a la producción de metabolitos secundarios o degradación del material orgánico, sin evidenciar firmas espectrales específicas del hongo. El PCA indicó que las variaciones más relevantes estaban asociadas a factores del sustrato, como su contenido de humedad. Aunque la imagen hiperespectral demostró potencial para monitorear cambios en sustratos infectados, la identificación directa del patógeno sigue siendo un desafío. Se sugiere combinar este enfoque con modelos avanzados de aprendizaje automático y extender los periodos de monitoreo para mejorar la detección temprana del hongo

4.2.2 Introducción

El uso de tecnologías ópticas avanzadas, como la imagen hiperespectral en la región visible e infrarrojo cercano (400-1000 nm), ha demostrado ser una herramienta prometedora para la detección no invasiva de patógenos en plantas y sustratos. La imagen hiperespectral permite capturar información espectral en un amplio rango de longitudes de onda, lo que facilita la identificación de diferencias bioquímicas sutiles en los materiales analizados, incluyendo la presencia de infecciones fúngicas (Femenias et al., 2020)

En estudios previos, la imagen hiperespectral ha sido utilizada con éxito para detectar infecciones por *Fusarium* en cereales como trigo y maíz, permitiendo la clasificación de granos infectados con precisiones superiores al 90 % mediante análisis multivariados y aprendizaje automático [2]. Incluso patógenos de suelo o raíces pueden ser detectados vía reflectancia a mayor escala: Hillnhütter et al. (2011) emplearon sensores hiperespectrales montados en vehículo para discriminar en campo focos de nematodos (*Heterodera schachtii*) vs. hongos del suelo (*Rhizoctonia solani*) en cultivos de remolacha [3]. En poscosecha, la HSI también ha sido exitosa; p. ej., se logró la detección temprana de hongos toxigénicos (género *Fusarium*, productores de micotoxinas) contaminando granos de maíz, analizando la reflectancia multiespectral de los granos [4]. De igual forma, en cítricos, las lesiones causadas por el canker bacteriano (*Xanthomonas axonopodis*) en frutas mostraron espectros de reflectancia

característicos que permitieron separarlas de frutos sanos [5]. Estos estudios ilustran la versatilidad de la HSI para diversos fitopatógenos en hojas, frutos y semillas. No obstante, trabajar con hiperespectrales conlleva manejar grandes volúmenes de datos y requiere técnicas avanzadas de análisis (p. ej. SVM, análisis discriminante) para extraer variables relevantes [6]. Aun así, múltiples ensayos de los últimos años confirman que la HSI es una herramienta prometedora para la detección temprana y cuantificación de enfermedades en agricultura de precisión [6–8].

En un estudio reciente, Huleihel et al. (2018) evaluaron la capacidad de FTIR para diferenciar hongos fitopatógenos del suelo, incluyendo *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Verticillium* y *Rhizoctonia*, en muestras puras y mezclas. Se determinó que la región espectral más efectiva para la discriminación se encontraba entre $675\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$, y mediante el uso de análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante lineal (LDA), se alcanzaron precisiones de hasta 100% en mezclas con proporciones entre 40-60% de cada hongo y superiores al 85% en mezclas con variabilidad de 10-90% [9].

Estos resultados resaltan la viabilidad de la espectroscopía IR como una alternativa rápida, de bajo costo y sin reactivos para la identificación de hongos en suelos y sustratos orgánicos.

En el caso de *F. circinatum*, la detección en sustratos compuestos por materia orgánica, como restos de corteza, hojas y ramas, representa un reto adicional debido a la complejidad y heterogeneidad de los materiales involucrados.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la viabilidad del uso de cámaras hiperespectrales operando en el rango de 400-1000 nm para la detección de *Fusarium circinatum* en sustratos orgánicos. La aplicación de esta tecnología permitiría un monitoreo más preciso y eficiente, facilitando estrategias de manejo y control del patógeno en viveros y plantaciones forestales.

4.2.3 Materiales y métodos

4.2.3.1 Preparación de sustrato e inóculo

Las placas de petri, que contenían sustratos provenientes desde vivero previamente esterilizados en autoclave, fueron inoculadas con un medio líquido que contenía *F. circinatum* (Fc) a una concentración de 10^5 esporas mL^{-1} . Para este procedimiento, se emplearon cinco muestras inoculadas, mientras que otras cinco se mantuvieron como grupo control sin inoculación. En las muestras inoculadas, se aplicaron 3 mL del inóculo sobre la superficie del sustrato de manera homogénea. En el caso de las muestras control, se adicionó el mismo volumen de medio de cultivo, pero sin la presencia del inóculo.

4.2.3.2 Adquisición espectral

El monitoreo espectral de las muestras se realizó utilizando una cámara hiperespectral Resonon PIKA-L en cinco momentos distintos: 1, 8, 16 y 20 días

post-inoculación (dpi). Las imágenes fueron adquiridas en el rango de 400 a 1000 nm, con una resolución espectral de 3.3 nm.

Para mejorar la calidad de los datos, las imágenes fueron preprocesadas eliminando el fondo y realizando un binning espectral de 5 puntos reduciendo la dimensión espectral a 60 bandas.

4.2.3.3 *Análisis de datos*

Para el análisis espectral, se realizó un mosaico de cada placa petri con sustrato con y sin inóculo al transcurrir los días, permitiendo evaluar la evolución espectral del sustrato inoculado a lo largo del tiempo. El arreglo del mosaico se realizó de la siguiente manera; las primeras 5 filas corresponden a los controles y las 5 filas siguientes a las muestras inoculadas con *Fusarium*, las columnas corresponden a los días post inoculación de esta manera de izquierda a derecha están: 1, 8, 16 y 20 días. Asimismo, se realizó una erosión de 25 puntos por todo el borde de cada imagen de manera de mantener únicamente la información del sustrato.

Se probaron distintas combinaciones como preprocesamiento espectral, tales como corrección multiplicativa de señal, (MSC), normalización estándar variada (SNV) primera derivada y centrado a la media de manera de obtener el mejor modelo quimiométrico.

Se aplicaron distintos análisis de componentes principales para observar agrupaciones espontaneas entre grupos que permitan diferenciar entre muestras contro e inoculadas.

4.2.4 Resultados y discusión.

4.2.4.1 *Perfiles espectrales*

Como se observa en la Figura 4.2-1 no se observan diferencias entre las muestras control e inoculadas en ninguna región del espectro. Las muestras inoculadas presentan un aumento generalizado en la reflectancia en comparación con las muestras control, lo que podría indicar la presencia de metabolitos secundarios producidos por el hongo o una ligera degradación del sustrato. Asimismo, no hay picos específicos con diferencias extremadamente marcadas, lo que sugiere que la modificación química del sustrato debido a la infección ocurre de manera distribuida y no está concentrada en una sola región espectral.

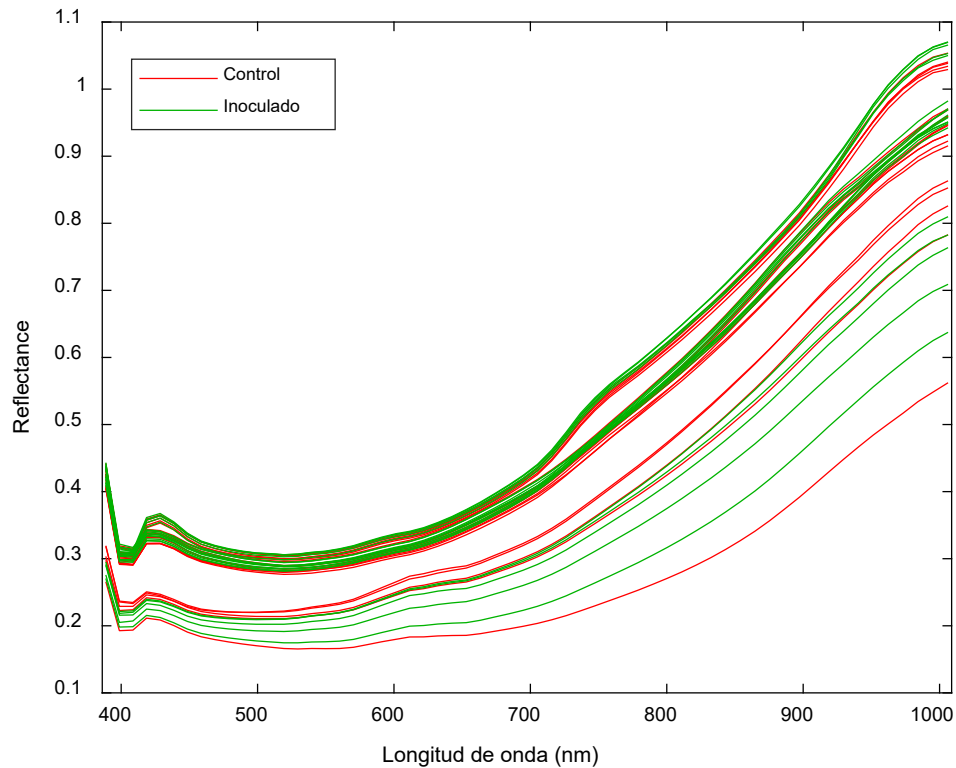


Figura 4.2-1 Espectros promedios de todos los sustratos a todos los días después de la inoculación después de aplicado el binning.

Tras la normalización con SNV, los espectros muestran modificaciones más evidentes en las muestras inoculadas con *F. circinatum* a partir de 8 dpi, lo que sugiere una alteración progresiva del sustrato (ver Figura 4.2-2). Estas variaciones podrían estar relacionadas con la degradación de la materia orgánica y la producción de metabolitos fúngicos, aunque las diferencias promedio entre controles e inoculados no son drásticas.

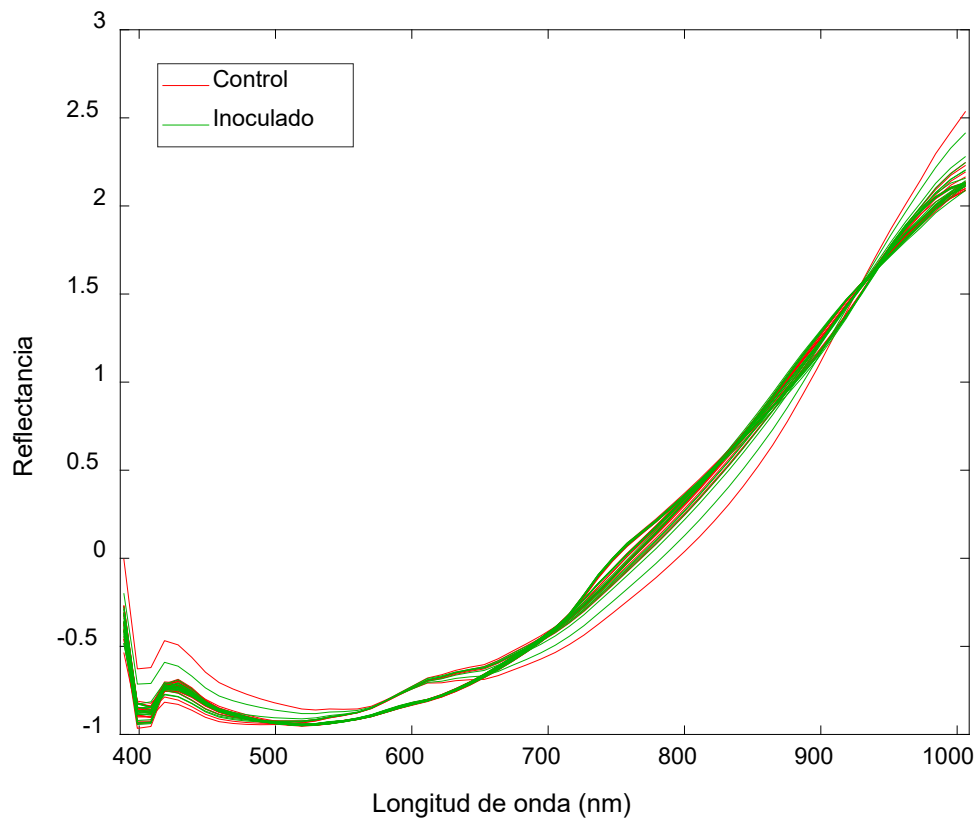


Figura 4.2-2 Espectros preprocesados con SNV de todas las muestras de sustrato a los diferentes dpi.

4.2.4.2 Análisis de componentes principales

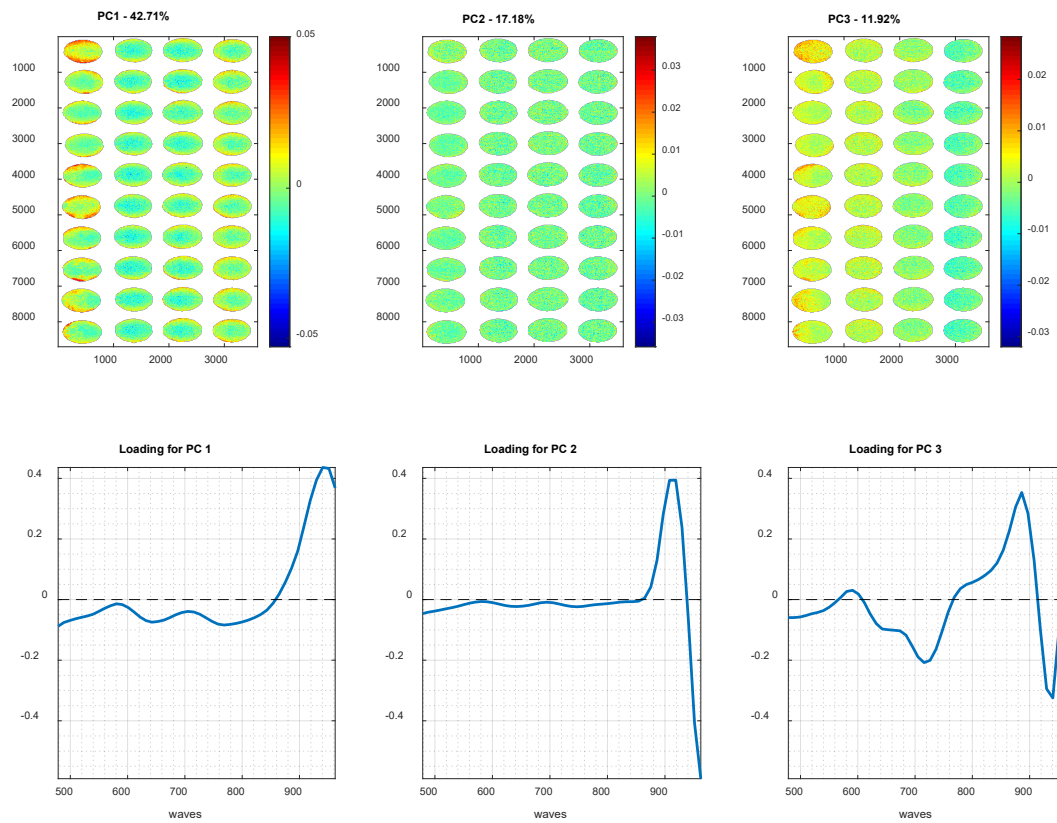


Figura 4.2-3 Tres primeros componentes principales, en la zona superior están las matrices de scores de cada componente, las 5 primeras filas corresponden a los controles y las 5 filas siguientes a las infectadas, las columnas corresponde a los dpi's. En la zona inferior los loadings de ese componente.

La imagen de la Figura 4.2-3 corresponde a los tres primeros componentes principales aplicado a muestras de sustrato, incluyendo controles e inoculadas. Para el preprocesamiento espectral, se aplicó SNV, primera derivada y centrado

a la media, lo que permite eliminar efectos de dispersión de la luz, resaltar diferencias espectrales sutiles y enfocar el análisis en las variaciones más relevantes entre las muestras.

Tanto para el componente principal 1 y 3 resalta una evolución temporal en el sustrato que no está directamente relacionada con la inoculación necesariamente. El gráfico de loading (Figura 4.2-3 inferior) indican que las regiones espectrales más influyentes se encuentran 800-900 nm (posiblemente relacionadas con compuestos secundarios o humedad).

4.2.5 Conclusiones

La presente investigación evaluó la viabilidad del uso de imágenes hiperespectrales en el rango de 400-1000 nm para la detección de *F. circinatum* en sustratos orgánicos. Si bien los análisis espectrales no revelaron diferencias marcadas entre los sustratos inoculados y los controles en una región espectral específica, se observó un aumento generalizado en la reflectancia de las muestras infectadas. Este fenómeno podría estar asociado a la presencia de metabolitos secundarios producidos por el hongo o a la degradación progresiva de la materia orgánica. Adicionalmente, el análisis de componentes principales mostró que las variaciones más influyentes en el tiempo no estaban directamente relacionadas con la infección, sino con otros factores del sustrato, como su contenido de humedad o la evolución de sus compuestos secundarios.

Los resultados indican que la identificación directa de *F. circinatum* en sustratos orgánicos mediante esta técnica es un desafío debido a la heterogeneidad del material y la falta de una señal espectral distintiva del patógeno. Para futuras investigaciones, se recomienda explorar estrategias complementarias, como la integración de modelos de aprendizaje automático más robustos o la combinación con otras técnicas espectroscópicas o extender los periodos de monitoreo, con el fin de mejorar la precisión en la detección y caracterización del hongo en ambientes complejos como los sustratos de viveros forestales.

4.2.6 Referencias.

- [1] Femenias A, Gatus F, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S. Use of hyperspectral imaging as a tool for *Fusarium* and deoxynivalenol risk management in cereals: A review. *Food Control* 2020;108:106819. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106819>.
- [2] Shahin MA, Symons SJ. Detection of *Fusarium* damaged kernels in Canada Western Red Spring wheat using visible/near-infrared hyperspectral imaging and principal component analysis. *Comput Electron Agric* 2011;75:107–12. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.10.004>.
- [3] Hillnhütter C, Mahlein A-K, Sikora RA, Oerke E-C. Remote sensing to detect plant stress induced by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* in sugar beet fields. *Field Crops Res* 2011;122:70–7. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.02.007>.
- [4] Del Fiore A, Reverberi M, Ricelli A, Pinzari F, Serranti S, Fabbri AA, et al. Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analysis. *Int J Food Microbiol* 2010;144:64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.001>.
- [5] Qin J, Burks TF, Kim MS, Chao K, Ritenour MA. Citrus canker detection using hyperspectral reflectance imaging and PCA-based image classification method. *Sens Instrum Food Qual Saf* 2008;2:168–77. <https://doi.org/10.1007/s11694-008-9043-3>.

- [6] Mahlein A-K. Present and Future Trends in Plant Disease Detection. *Plant Dis* 2016;100:1–11. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.
- [7] Sankaran S, Mishra A, Ehsani R, Davis C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Comput Electron Agric* 2010;72:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2010.02.007>.
- [8] Mahlein AK, Oerke EC, Steiner U, Dehne HW. Recent advances in sensing plant diseases for precision crop protection. *Eur J Plant Pathol* 2012;133:197–209. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9878-z>.
- [9] Huleihel M, Shufan E, Tsrer L, Sharaha U, Lapidot I, Mordechai S, et al. Differentiation of mixed soil-borne fungi in the genus level using infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J Photochem Photobiol B* 2018;180:155–65. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.02.007>.

4.3 Aplicación de microespectroscopía FTIR-ATR y análisis multivariado para el estudio de alteraciones químicas en acículas de *Pinus radiata* infectadas con *Fusarium circinatum*.

4.3.1 Resumen.

El cancro resinoso del pino, causado por *Fusarium circinatum*, representa una seria amenaza para las plantaciones de *Pinus radiata*. La detección temprana del patógeno es esencial, pero los métodos convencionales suelen ser lentos, costosos y poco prácticos en campo. Este estudio evaluó la aplicación de microespectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (μ FTIR-ATR) combinada con análisis multivariado para identificar alteraciones químicas en acículas de *P. radiata* inoculadas con *F. circinatum* en distintos días post-inoculación (dpi). Los resultados evidenciaron cambios significativos en bandas asociadas a ácidos grasos en las muestras infectadas, lo que sugiere una respuesta bioquímica del hospedero al estrés. Aunque no se observaron firmas espectrales específicas del hongo, la técnica demostró sensibilidad a los efectos inducidos por la infección a los 35 dpi. Estos hallazgos permiten posicionar a la μ FTIR-ATR como una herramienta complementaria para el monitoreo temprano y no destructivo de enfermedades forestales, con potencial de aplicación en campo mediante tecnología portátil y modelos predictivos.

4.3.2 Introducción.

Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell es un hongo fitopatógeno causante del cancro resinoso del pino (pitch canker). Afecta principalmente a coníferas del género *Pinus*, siendo *Pinus radiata* una de las especies más susceptibles. Esta enfermedad es considerada una de las más graves para coníferas a nivel mundial y ha provocado pérdidas económicas importantes en el sector forestal. Los árboles adultos infectados desarrollan canchros en ramas y tronco con abundante exudación de resina (trementina), que pueden anillar el árbol y eventualmente causarle la muerte. En plántulas y árboles jóvenes la agresividad del patógeno es alta, provocando marchitez y damping-off (colapso de plántulas), lo cual impacta viveros y programas de reforestación [1–4]

Desde el punto de vista ecológico, *F. circinatum* puede diezmar poblaciones de pinos, alterando la composición de bosques nativos y plantaciones. Su introducción en nuevas regiones genera preocupación por la falta de resistencia en las especies locales y por el potencial desequilibrio ecológico. De hecho, es un organismo cuarentenario de alto riesgo: la EPPO (Organización Europea de Protección Vegetal) lo incluye en la lista A2 de plagas de cuarentena debido a su potencial de daño [5,6]. Originario de Norteamérica, el hongo se ha dispersado a regiones de Sudamérica, Europa, Asia y África (incluyendo Chile, España, Japón, Sudáfrica, entre otros) a través del comercio de semillas, madera u otros vectores. Esta propagación conlleva restricciones comerciales y costos en

medidas fitosanitarias (inspecciones, cuarentenas y erradicación de focos) que impactan económicamente a los sectores forestales locales.

Los métodos convencionales (inspección visual, cultivo e identificación morfológica, PCR) han sido fundamentales en la detección de *F. circinatum*, pero adolecen de limitaciones en velocidad, requerimientos de laboratorio y posibilidad de resultados falsos. Dada la capacidad del patógeno de permanecer asintomático en hospedantes (incluso en semillas y plántulas), existe la necesidad de métodos más rápidos, sensibles y preferentemente *in situ* para la detección temprana [7].

4.3.2.1 Alternativas innovadoras basadas en espectroscopía

Nuevas tecnologías están emergiendo para detectar *F. circinatum* y otras enfermedades vegetales mediante firmas espectrales únicas, aprovechando que la infección provoca cambios en la química de los tejidos del hospedero. Las técnicas espectroscópicas (vibracionales) como la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), el infrarrojo cercano (NIR) y la espectroscopía Raman permiten obtener un “fingerprint” químico de muestras vegetales de forma rápida y no destructiva [8].

Estas tecnologías miden cómo los compuestos de la muestra absorben o dispersan la luz en diferentes longitudes de onda, generando espectros característicos que reflejan su composición molecular.

Un aspecto destacado es que la espectroscopía puede aplicarse directamente sobre tejido vegetal (hojas, acículas, corteza, etc.) sin necesidad de preparaciones complejas. Por ejemplo, FT-IR en modo ATR (reflectancia total atenuada) puede analizar una pequeña porción de aguja de pino obteniendo en segundos su espectro infrarrojo medio. Con ayuda de quimiometría (análisis multivariante de datos espectrales), es posible distinguir patrones sutiles asociados a la presencia del patógeno o a respuestas de defensa en el tejido. Estudios recientes han demostrado la viabilidad de estas aproximaciones: Vivas *et al.* (2014) aplicaron FT-IR y quimiometría para evaluar cambios químicos en plántulas de *Pinus pinaster* antes y después de la inoculación con *F. circinatum*. Observaron diferencias significativas en ciertas bandas del espectro del infrarrojo medio (MIR) asociadas a variaciones en carbohidratos y componentes de la pared celular inducidas por la infección [9]. Esto sugiere que FT-IR puede detectar huellas metabólicas de la enfermedad incluso desde etapas tempranas de la interacción planta-patógeno.

Otra técnica prometedora es la espectroscopía Raman, la cual detecta vibraciones moleculares complementarias al infrarrojo. Un estudio de 2022 empleó Raman para seguir la respuesta de pinos frente al cancro resinoso, comparando *P. radiata* (muy susceptible) con *P. pinea* (más resistente) [10]. Los resultados indicaron que la lignina (un polímero de la pared celular) juega un papel importante en la resistencia natural de los pinos, ya que los individuos más resistentes mostraban firmas Raman asociadas a mayor contenido lignificado.

Asimismo, esta técnica permitió detectar de forma precoz los cambios bioquímicos causados por *F. circinatum*: en pino radiata se observaron alteraciones en el espectro Raman desde 3 días después de la infección, mientras que los métodos tradicionales solo evidenciaron daño a los 6–9 días (histología y síntomas visibles). Esos cambios espectrales tempranos atribuibles a degradación de pared celular y síntesis de fenoles de defensa demuestran el potencial de Raman (y, por extensión, de otras espectroscopías) para acortar el tiempo de detección de la enfermedad. De hecho, los autores proponen que herramientas basadas en espectroscopía Raman podrían integrarse como métodos objetivos, no destructivos y rentables para selección de árboles resistentes y monitoreo temprano en viveros y plantaciones.

4.3.2.2 Ventajas de los métodos espectroscópicos

Los métodos basados en espectroscopía presentan múltiples ventajas frente a los métodos tradicionales de diagnóstico:

- Rapidez y alto rendimiento: La adquisición de un espectro es casi instantánea (segundos por muestra) y se pueden analizar muchas muestras por hora [8].
- No destructivos: Por lo general, no se requiere destruir la planta ni aislar el patógeno. Se puede analizar una hoja, aguja o pequeña porción de tejido sin dañar significativamente al organismo, permitiendo muestreos repetidos en el mismo individuo a lo largo del tiempo. Esto es ideal para

monitoreo en campo o para seleccionar plantas madre resistentes sin sacrificar muestras valiosas.

- Sin reactivos costosos ni cultivos: A diferencia de la PCR (que requiere kits de extracción, enzimas, etc.) o del aislamiento en agar (que requiere medios de cultivo estériles y tiempo de incubación), la espectroscopía utiliza directamente la interacción luz-materia. Tras la inversión inicial en el equipo, el costo por muestra es bajo y no genera residuos de químicos. Es por tanto un método relativamente económico y ecológico para diagnóstico una vez implementado [11].
- Detección temprana: Las señales espectrales pueden reflejar cambios fisiológicos antes de la aparición de síntomas visibles. Además, al tratarse de una huella global de la muestra, integran información de múltiples metabolitos y componentes celulares. Esto significa que pueden captar el estrés de la planta de manera integral, a diferencia de métodos altamente específicos (ej. PCR) que solo confirman la presencia del patógeno. En consecuencia, técnicas como FTIR y Raman podrían, con calibraciones adecuadas, alertar de infecciones incipientes, aunque el patógeno esté en niveles bajos, al detectar la reacción química temprana del hospedero.
- Aplicabilidad en campo: Actualmente existen equipos portátiles y de mano para espectroscopía FTIR, NIR y Raman. Estos dispositivos permiten llevar la tecnología fuera del laboratorio, realizando mediciones *in situ* en

viveros, bosques o almacenes. Si bien los equipos portátiles pueden tener resolución menor que los de banco, ofrecen la ventaja de analizar *in situ* sin necesidad de transportar muestras al laboratorio (Shen et al., 2022). Esto facilita diagnósticos en tiempo real en operaciones forestales, posibilitando una respuesta más rápida (por ejemplo, cuarentenas o tratamientos focalizados) ante detecciones positivas.

Estas ventajas posicionan a la espectroscopía infrarroja medio como un complemento o incluso alternativa a los métodos tradicionales, facilitando la detección temprana y el manejo más eficaz de enfermedades en cultivos agrícolas. Los trabajos de investigación más relevantes resaltan que la adopción de FTIR podría agilizar los diagnósticos en laboratorios de sanidad vegetal e incluso permitir dispositivos portátiles para monitoreo en campo [13,14].

La interpretación de los espectros obtenidos mediante espectroscopía FT-IR puede optimizarse mediante el uso de técnicas multivariadas, como el análisis de componentes principales (PCA) y la resolución de curvas multivariadas (MCR).

El PCA permite descomponer los datos espectrales en componentes principales (PCs), las cuales representan las direcciones de mayor variabilidad dentro del conjunto de datos [15,16]. Como resultado de este análisis, se generan dos matrices fundamentales: la matriz de puntuaciones (*scores*), que describe la contribución de cada componente principal en cada espectro original, y la matriz de cargas (*loadings*), que recoge las principales características espectrales. No

obstante, los PCs no representan necesariamente componentes químicos puros, ya que pueden incluir efectos físicos no deseados, como dispersión o ruido.

Por otro lado, el MCR es una técnica diseñada para la resolución de mezclas complejas sin necesidad de información previa sobre su composición química [17,18]. Se basa en un modelo matemático donde la matriz de datos original se descompone en dos matrices, una de concentraciones (C) y otra de espectros (S). Su objetivo principal es la extracción de los espectros correspondientes a los componentes puros y la estimación de sus respectivas concentraciones dentro de la muestra. Para ello, se basa en la descomposición de la matriz de datos original en dos matrices: una que representa las concentraciones de los distintos componentes (C) y otra que contiene los espectros puros (S) [17].

En comparación con el PCA, el MCR presenta la ventaja de proporcionar espectros reales de los compuestos presentes en la muestra. Sin embargo, para optimizar su desempeño y reducir las ambigüedades inherentes al método, se emplean restricciones matemáticas y fisicoquímicas a través de un proceso iterativo de mínimos cuadrados alternantes (ALS), lo que mejora la precisión y robustez del análisis [17].

Este estudio tuvo como objetivo identificar los cambios químicos inducidos por *F. circinatum* en acículas de *Pinus radiata* mediante microespectroscopía infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (μ -FTIR-ATR), evaluando su evolución espectral y espacial. Todo esto junto con análisis

quimiométrico como análisis de componentes principales y resolución multivariada de curvas.

4.3.3 Materiales y métodos

4.3.3.1 *Material vegetal*

Las plántulas de *P. radiata* utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por el vivero forestal Carlos Douglas, perteneciente a Forestal Mininco. Al momento del experimento, las plantas tenían una edad de un año y correspondían a un clon genético específico identificado como 0P00209.

4.3.3.2 *Preparación de plántulas e inoculación*

Antes de la inoculación, se sometieron a un periodo de aclimatación en el laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura. Se usaron 8 plantas control y 8 plantas para inocular.

Para la inoculación, se realizó una incisión en la base del cuello de cada plántula utilizando un bisturí estéril. Posteriormente, se depositaron 20 μL de un inóculo de *F. circinatum* previamente preparado en medio SNA, con una concentración de 1.6×10^6 esporas mL^{-1} . Con el fin de favorecer la penetración del inóculo en los tejidos de la planta, la lesión fue sellada con film. En el caso de las plántulas del grupo control, se aplicó agua estéril en la herida como tratamiento simulado.

Las plántulas fueron mantenidas en condiciones de laboratorio y regadas entre dos y tres veces por semana. Para el análisis mediante $\mu\text{-FTIR}$, se recolectaron

acículas de una misma plántula en distintos días post-inoculación (dpi), tanto de los tratamientos control como de los infectados. A su vez, también se realizó un cultivo de *F. circinatum* en medio PDA durante 3 semanas para analizar de manera aislada el hongo y observar su perfil espectral característico. El resumen de la metodología se puede observar en la Figura 4.3-1.

Adquisición de imágenes por μ -FTIR

Adicionalmente, de manera periódica a los 7, 21, 35, 43 y 57 días post-inoculación (dpi), se recolectaron acículas del ápice de las plántulas control e inoculadas. Estas muestras fueron analizadas mediante microespectroscopía FT-IR. Las mediciones se realizaron utilizando el equipo FT-IR Spectrum-Frontier/Spotlight 400 (PerkinElmer) en modo de reflectancia total atenuada (ATR), obteniéndose imágenes hiperespectrales 16 scan por pixel, $6,25 \times 6,25 \mu\text{m}$ tamaño de pixel y rango espectral entre $4000 - 750 \text{ cm}^{-1}$, con resolución espectral 16 cm^{-1} , intervalo 3 cm^{-1} correspondientes a un área de $200 \times 200 \mu\text{m}$ cristal de germanio 1 mm diámetro.

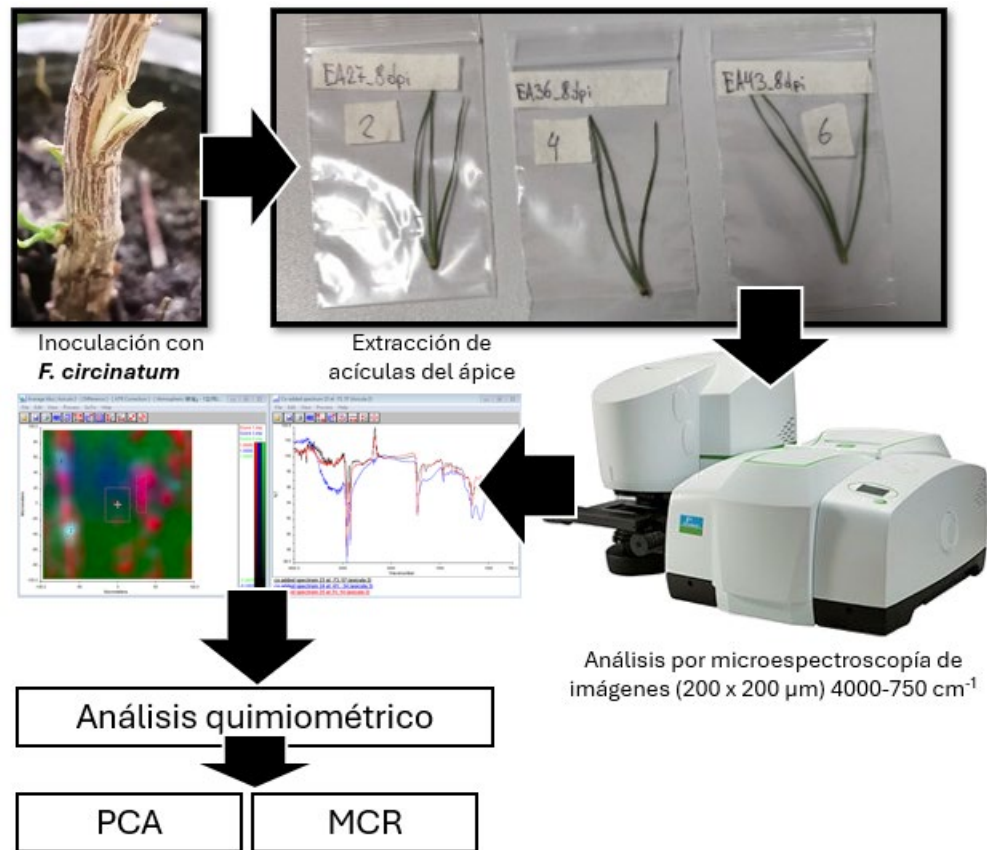


Figura 4.3-1 Flujo de la metodología.

4.3.3.3 Análisis de componentes principales (PCA)-

Este análisis de PCA se realizó con el propósito de reducir la dimensionalidad de la información y explorar la formación de agrupaciones espontáneas que permitan diferenciar entre la plántula control e inoculada. Adicionalmente, este análisis permitió identificar las bandas espectrales más relevantes en la discriminación entre ambos grupos.

El PCA se realizó mediante dos enfoques complementarios; la primera a partir de los promedios de las imágenes espectrales obtenidas y la segunda usando toda la imagen espectral directamente.

Estrategia basada en promedios: Se calculó el espectro promedio de cada imagen correspondiente a las muestras control e inoculadas a lo largo del tiempo, generando una matriz de datos de dimensión 10×1089 . Posteriormente, los espectros fueron transformados a absorbancia y normalizados respecto al área antes de ser interpretados y sometidos a un PCA. Esta estrategia permitió identificar cambios espectrales consistentes dentro del conjunto de datos, facilitando la interpretación de las bandas asociadas a las modificaciones químicas ocurridas en la acícula durante el proceso de infección.

Estrategia basada en imágenes: Las imágenes obtenidas fueron dispuestas en un mosaico de 2×5 cuya primera fila contiene las muestras control y la segunda fila las muestras inoculadas, las columnas corresponden a los monitoreos realizados. Finalmente, el mosaico tiene una dimensión de 64×160 píxeles. Esta estrategia permite visualizar cómo evoluciona la infección en diferentes regiones del tejido vegetal, lo que es crucial para la detección temprana y la evaluación de la progresión de la enfermedad.

4.3.3.4 Resolución multivariada de curvas

El análisis MCR es una técnica de quimiometría utilizada para descomponer datos espectrales complejos en contribuciones de componentes puros sin

necesidad de información previa sobre la composición de la muestra. Se basa en un modelo matemático bilineal que asume que la señal observada es una combinación lineal de espectros puros y sus respectivas concentraciones. MCR ha demostrado ser una herramienta poderosa para la caracterización de sistemas químicos multicomponente en diversas disciplinas, incluyendo la química analítica, la espectroscopia y la imagen hiperespectral [17–20].

El modelo bilineal se expresa generalmente como:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}$$

Donde:

- **D** es la matriz de datos espectrales (mosaico de imágenes μ FTIR-ATR de las acículas)
- **C** Es la matriz de concentraciones de los componentes puros en cada muestra
- **S^T** es la matriz de espectros puros.
- **E** representa el error o ruido experimental.

El proceso consiste en desdoblar la matriz original (pixel) en una matriz **D**, que luego se descompone en el producto de las dos matrices **C** y **S^T** que contienen los perfiles relacionados con las contribuciones de los componentes puros en la imagen, cuando se analizan varias imágenes juntas estas deben añadirse para formar una matriz de datos aumentada por columnas, como se observa en la Figura 4.3-2. Luego mediante un proceso iterativo, se optimizan alternadamente

aplicando restricciones como no negatividad y selectividad, hasta minimizar el error. Finalmente se validan los resultados revisando la varianza explicada y la distribución de los compuestos.

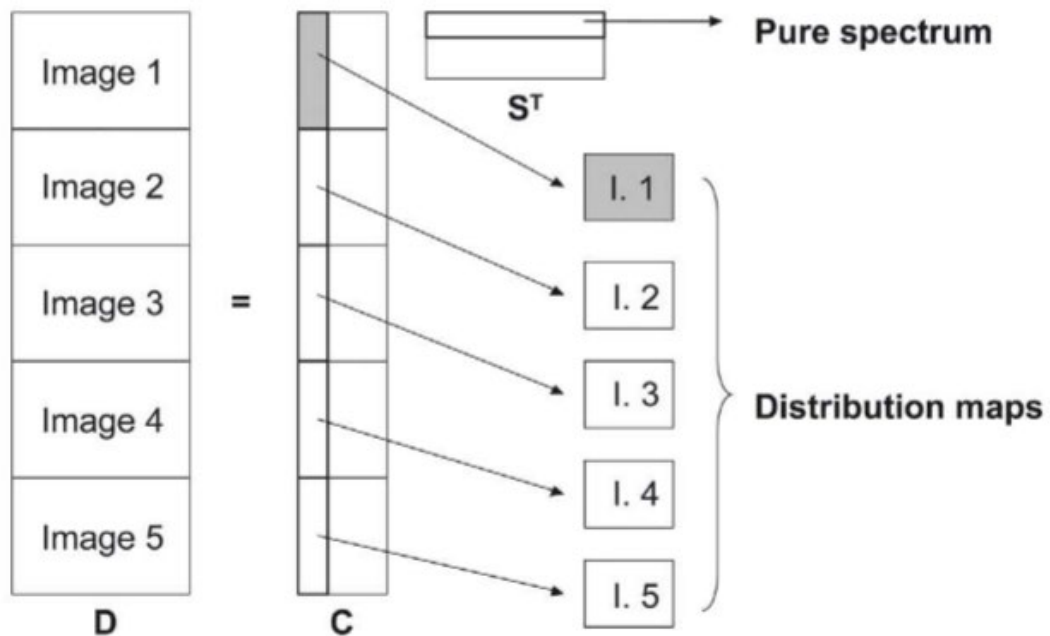


Figura 4.3-2 Proceso de resolución aplicado a varias imágenes extraído de [21]
MCR se utilizó para descomponer los espectros complejos obtenidos de acículas infectadas y control, identificando las firmas espectrales específicas asociadas con la presencia del hongo.

Para el tratamiento de datos se utilizó el software MATLAB versión 2022b y sus Toolbox; HYPERTOOLS versión 3.0 y PLS_TOOLBOX, Eigenvector versión 9.2.[22,23]

4.3.4 Resultados y discusión

4.3.4.1 Análisis de los espectros

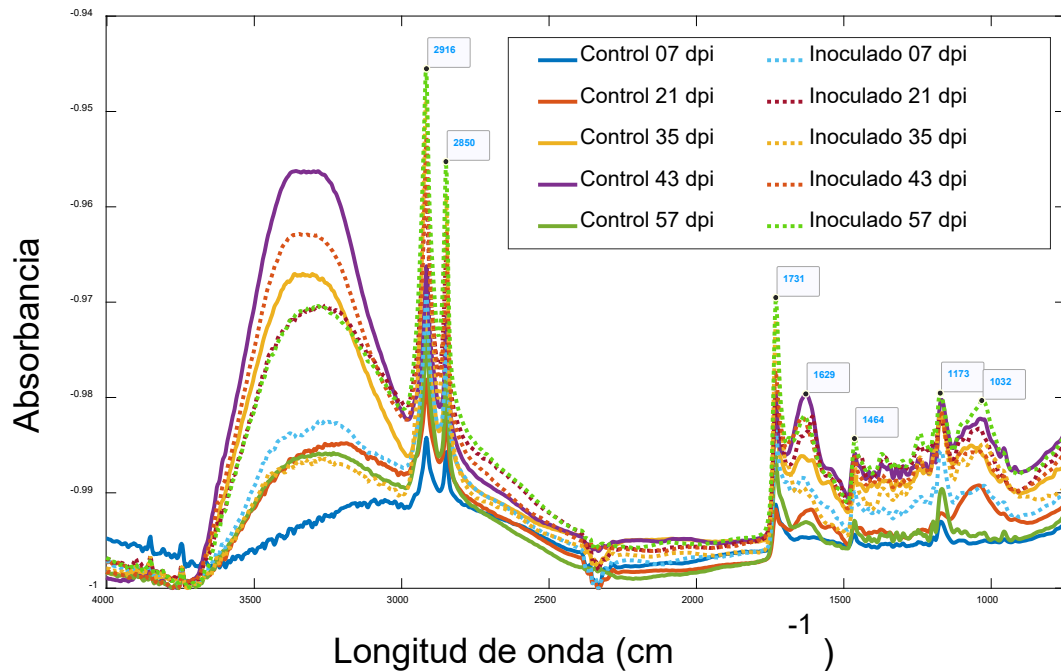


Figura 4.3-3 Espectros FT-IR en absorbancia promedios normalizados por imagen a través del tiempo.

En la Figura 4.3-3 se observan los espectros promedios normalizados de cada imagen espectral a los diferentes días luego de la inoculación. Los espectros FT-IR muestran diferencias claras entre las muestras control e inoculadas, indicando que la infección por *F. circinatum* afecta la composición química de las acículas de *P. radiata*. Las muestras inoculadas muestran variaciones en distintas regiones del espectro tales como; 1731, 2850 y 2916 cm⁻¹ posiblemente debido

a la presencia de ácidos grasos, Las regiones de 1032 cm^{-1} asociado a carbohidratos se encuentran en mayor medida en la mayoría de las muestras exceptuando las muestras control al día 7 y 57 que no se detectó presencia de este compuesto. Por otro lado, la banda asociada al grupo funcional -OH , localizada en la región de 3360 cm^{-1} , no mostró diferencias entre las muestras inoculadas y controles. Las asignaciones químicas de las bandas espectrales se pueden observar en la Tabla 4.3-1:

Tabla 4.3-1 Asignación de bandas espectrales

Banda (cm^{-1})	Asignación	Referencia
3360	Estiramiento del grupo -OH (asociadas a agua y compuestos fenólicos)	[24,25]
2919 2850	CH_2 estiramiento asimétrico y simétrico en lípidos y ceras de la cutícula	[24,26,27]
1728	Estiramiento grupo C=O asociadas a lípidos y compuestos carbonílicos	[28,29]
1635	Estiramiento C=C y C=O presentes en lignina y proteínas estructurales	[24,30]
1458	Flexión de grupos metilo y metileno en proteínas y lípidos	[26,31,32]

1239	Regiones asociadas con estructuras [25]
1179	de carbohidratos y lignina

4.3.4.2 Perfil puro de *F. circinatum* en medio *in vitro*

En la Figura 4.3-4 se observa la imagen microscópica de *F. circinatum* que fue aislado del medio PDA, mientras que la Figura 4.3-5 muestra su perfil espectral puro obtenido mediante μ FTIR-ATR., En dicho espectro se destacan bandas características atribuibles a proteínas, localizadas en 1650 cm^{-1} (Amida I) y 1551 cm^{-1} (Amida II). Asimismo, se observa una señal en 1073 cm^{-1} , la cual podría corresponder al estiramiento C–C de la quitina o al estiramiento del grupo fosfato presente en ácidos nucleicos [36]. Adicionalmente, se identifican bandas en 1156 cm^{-1} , asignadas al estiramiento simétrico y asimétrico de enlaces C–O–C, también asociados a estructuras de quitina[37].

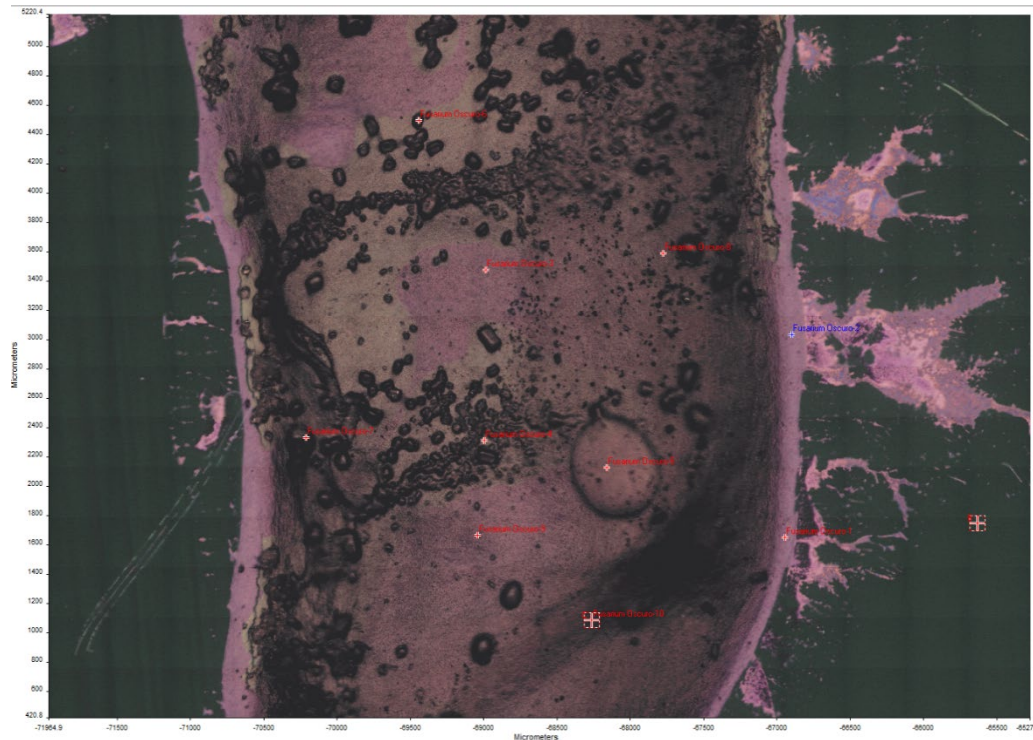


Figura 4.3-4 Imagen μ FTIR-ATR de *F. circinatum* aislado en PDA

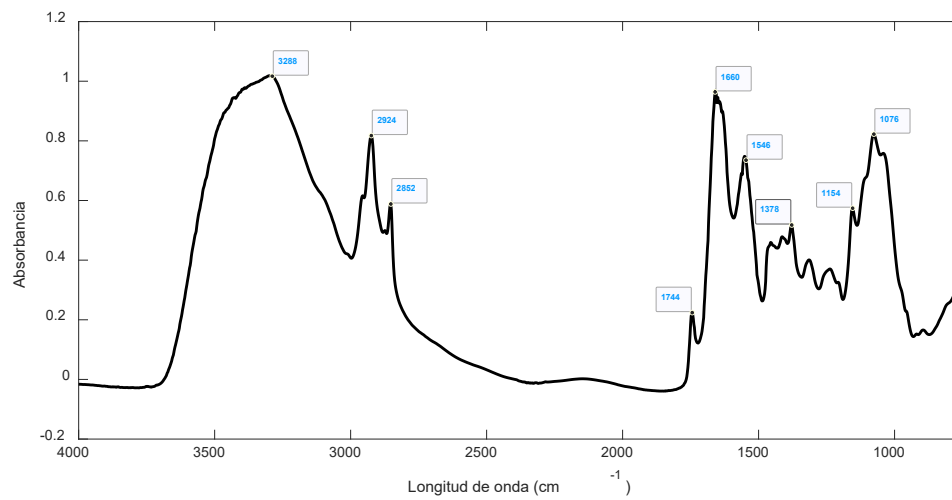


Figura 4.3-5 Perfil espectral puro de *F. circinatum* en medio PDA.

4.3.4.3 Análisis de componentes principales

La estrategia basada en componentes principales se abordó de dos maneras: primero, utilizando los promedios de los espectros de cada imagen ($n = 8$), como se realizó en el análisis anterior; y segundo, considerando la imagen completa de cada muestreo a lo largo del tiempo.

4.3.4.3.1 Estrategia de los promedios

En este análisis de componentes principales, los espectros fueron transformados a absorbancia y centrados a la media, y los dos primeros componentes principales explican el 96.5% de la varianza total. En la Figura 4.3-6 se presentan los gráficos de scores y loadings obtenidos a partir de los espectros promediados. En el gráfico de scores (Figura 4.3-6, superior), se observa que el segundo componente principal (PC2) contribuye a la separación entre las muestras inoculadas y las de control. Esta diferenciación es más evidente en los días 35 y 57 dpi, donde la distancia entre las clases aumenta considerablemente, con una contribución adicional del primer componente principal (PC1),

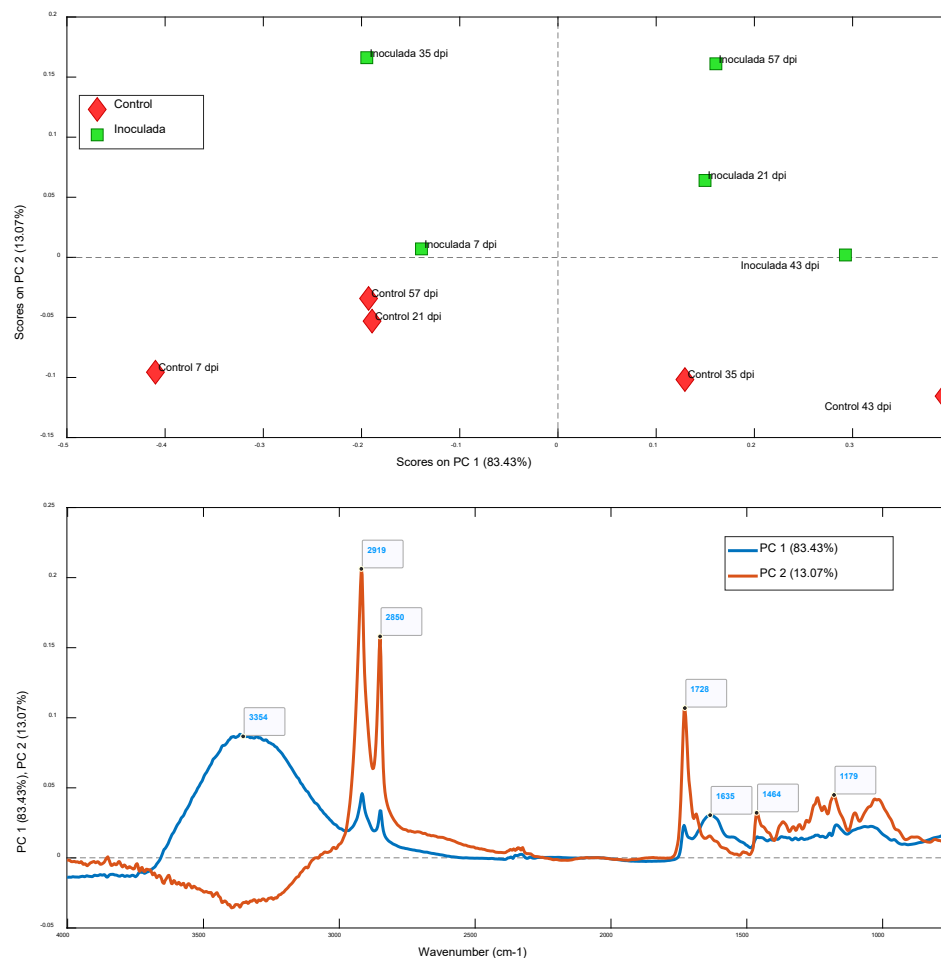


Figura 4.3-6 Gráfico de scores (superior) y loadings (inferior) utilizando los promedios de las imágenes.

En el gráfico de loadings (Figura 4.3-6 inferior) en el PC1 se identifica una gran banda de alta intensidad en la región de 3354 cm^{-1} , atribuida a la presencia del grupo funcional -OH también se observan dos bandas menos intensas a los $2919, 2850, 1635\text{ cm}^{-1}$. Asimismo, en el segundo componente principal (PC2) se observan bandas relevantes en las regiones de $2919, 2850, \text{ y } 1728\text{ cm}^{-1}$, las

cuales son responsables de la discriminación entre las muestras inoculadas y los controles. Las dos primeras bandas se asocian a ceras y lípidos mientras que la última banda se asocia a bandas de compuestos carbonílicos. Estas señales espectrales se asocian principalmente a vibraciones características de ácidos grasos, lo que sugiere una mayor concentración de estos compuestos en las muestras inoculadas en comparación con los controles.

A través de esta estrategia, la contribución de PC2 en la separación entre clases indica que existen firmas espectrales específicas asociadas con la infección, lo que puede ser clave para la detección temprana del patógeno. Este comportamiento sugiere una acumulación compuestos de defensa como parte de la respuesta de la planta al avance de la infección por *Fusarium*.

4.3.4.3.2 Estrategia de las imágenes

Se realizó un mosaico de imágenes de la muestra control e inoculada evaluada en el tiempo. Mediante esta estrategia, los dos primeros componentes principales explican el 85.08% de la varianza total de los datos. En la Figura 4.3-7 se presentan los mapas de scores correspondientes al primer componente principal (superior) y al segundo componente principal (inferior). En cada uno de estos mapas, la primera fila corresponde a la muestra control, mientras que la segunda fila representa la muestra inoculada, ambas evaluadas en distintos tiempos hasta los 57 días post-inoculación. Se observa que las diferencias entre inoculadas y

control son más evidentes a través del mapa de scores del PC2 cuya diferencia se destaca al día 35 y 57 después de la inoculación.

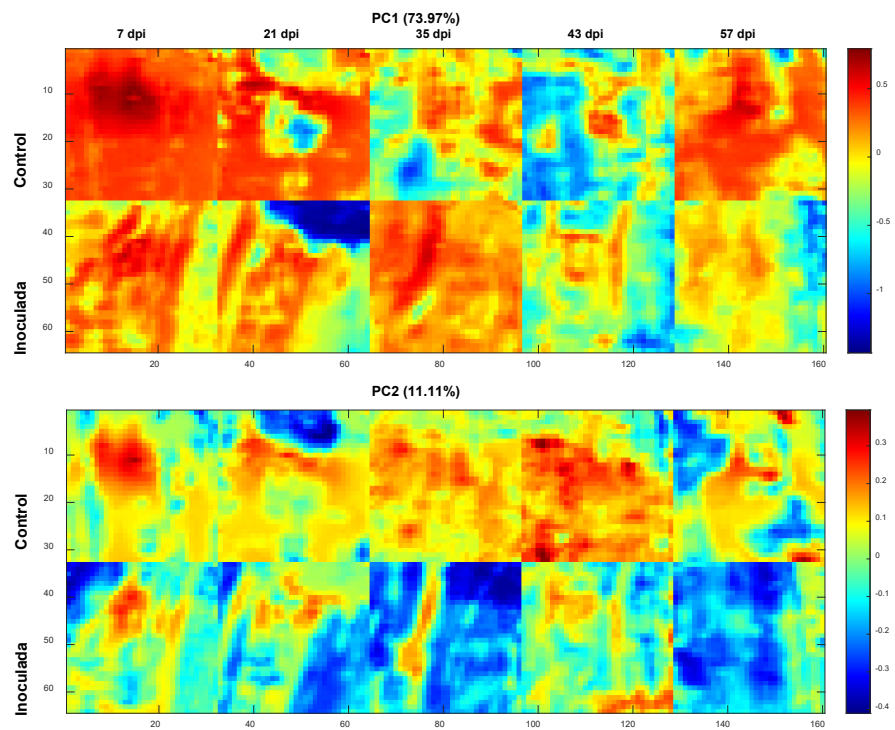


Figura 4.3-7 Mapas de scores de acículas de *P. radiata*. En la parte superior se ubica el primer componente principal y en la parte inferior el segundo componente principal

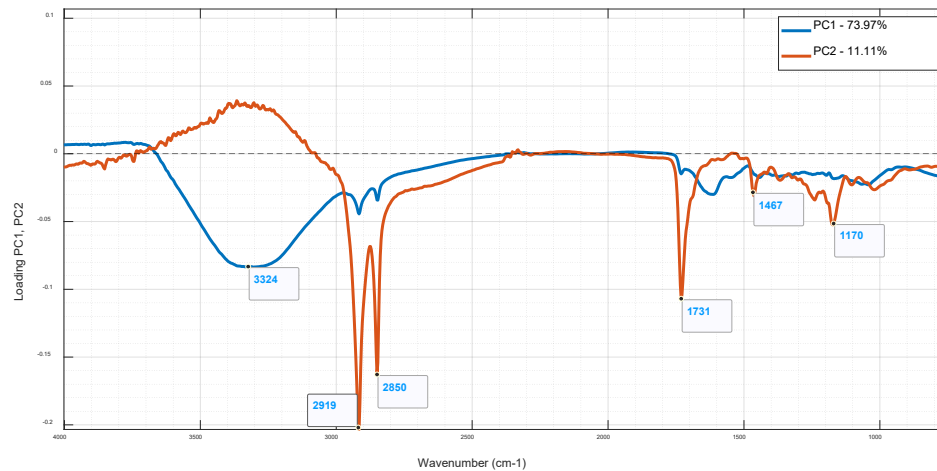


Figura 4.3-8 Loading del PC1 y PC2 obtenido del análisis de componentes principales de las imágenes.

Los gráficos de loadings presentados en la Figura 4.3-8 muestran la contribución de cada variable espectral a los primeros dos componentes principales (PC1 y PC2). En el PC1 las muestras control mantienen altos valores de scores a los 7, 21 y 57 dpi, mientras que las muestras inoculadas los scores tienden a decrecer con el tiempo. El segundo componente principal (PC2), que explicó el 11,11% de la varianza total, capturó variaciones bioquímicas localizadas, principalmente en las muestras inoculadas entre los 21 y 57 dpi, en las cuales se identificaron regiones espectrales asociadas a la presencia de ácidos grasos. En contraste, las muestras control no evidenciaron estas señales, lo que sugiere una ausencia o una concentración muy baja de dichos compuestos.

4.3.4.4 Análisis MCR

El análisis multivariado de curvas se presenta en la siguiente Figura 4.3-9 donde se presentan los 5 componentes MCR obtenidos en la dirección de los componentes puros y con una restricción de no negatividad en la dimensión espectral estos representan el 79,3% de la varianza explicada y presentan una falta de ajuste de 0,197. Los mapas de distribución de los componentes 2, 3 y 5 muestran una distribución homogénea, sin evidenciar diferencias entre las muestras inoculadas y el control a lo largo del tiempo. Sin embargo, el primer componente, la muestra inoculada presenta una evolución temporal diferenciada del control, siendo más evidente a los 35 dpi. El componente 4 la muestra inoculada presenta notorias diferencias a los 43 dpi. Este comportamiento del componente 1 y 4 sugiere una asociación con cambios inducidos por la presencia de *F. circinatum*, lo que podría indicar una respuesta fisiológica de la plántula frente a la infección.

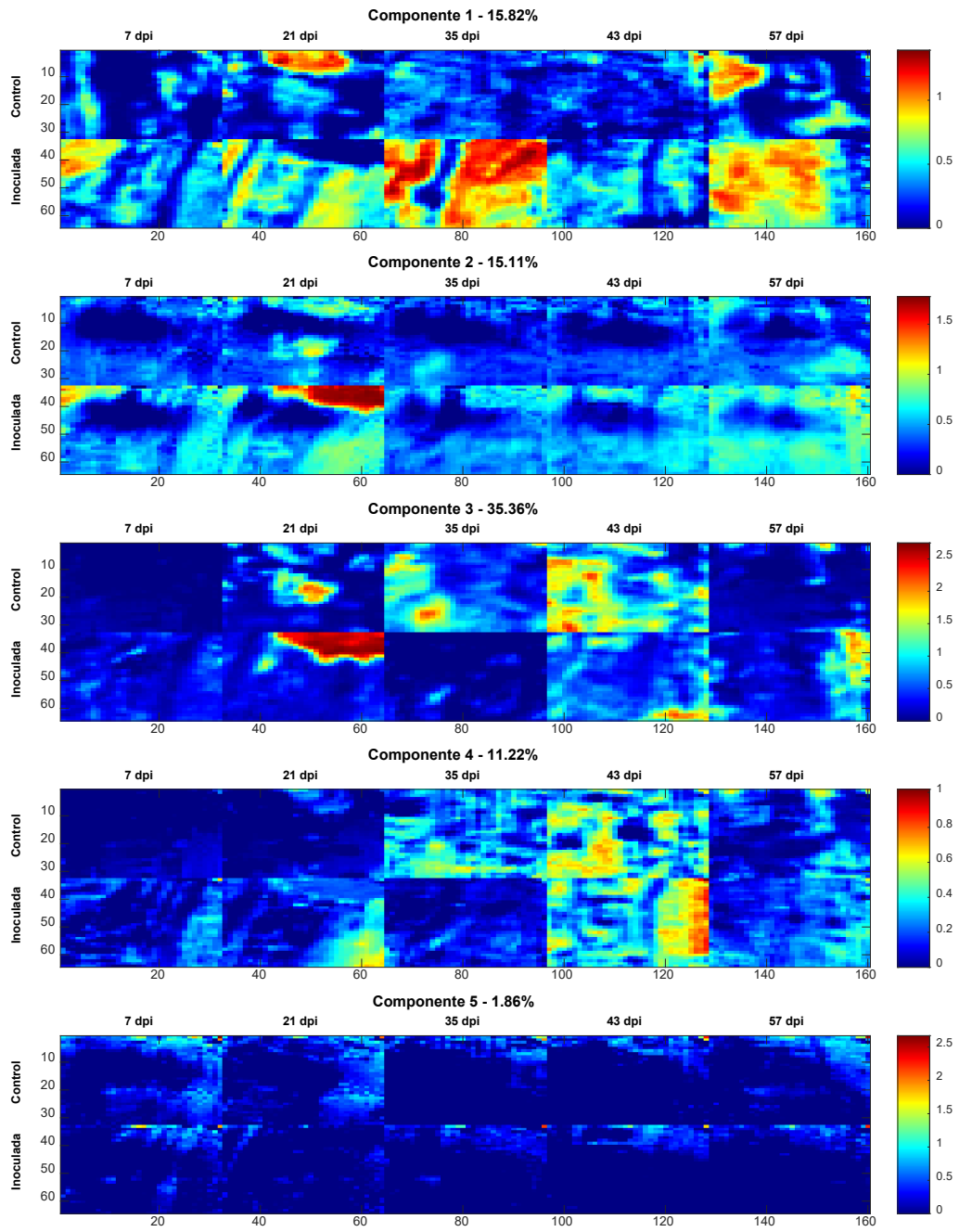


Figura 4.3-9 MCR de muestras de acículas de *P. radiata*.

El perfil puro de los cinco componentes se puede observar en la Figura 4.3-10. El Componente 1 presenta una banda ancha y poco intensa en la región de los 3390 cm^{-1} , atribuible a grupos hidroxilo ($-\text{OH}$), asociados principalmente a compuestos hidrofílicos de la matriz vegetal, además presenta bandas en las regiones de 2916 y 2847 cm^{-1} relacionado como compuestos grasos como ceras y en la región de 1731 cm^{-1} asociados a compuestos carbonílicos y las bandas 1173 y 1026 cm^{-1} posiblemente relacionado con polisacáridos estructurales. El Componente 2 exhibe bandas en 2916 cm^{-1} , correspondientes al estiramiento $\text{C}-\text{H}$ de grupos metilo y metileno, junto a una señal en 1605 cm^{-1} , posiblemente atribuida a estiramientos $\text{C}=\text{C}$ aromáticos, típicos de compuestos o ácidos fenólicos. El componente 3 presenta una banda en 3279 cm^{-1} , también asociada a grupos $-\text{OH}$, junto con una banda en 1608 cm^{-1} , nuevamente relacionada a posibles compuestos fenólicos. Además, muestra una señal en 1041 cm^{-1} , correspondiente a estiramientos $\text{C}-\text{O}-\text{P}$, comúnmente presentes en fosfolípidos de membranas celulares. El componente 4 es el que presenta mayor intensidad espectral, con bandas bien definidas en 2916 , 2847 , 1731 y 1464 cm^{-1} , todas características de ácidos grasos y lípidos. Asimismo, exhibe una banda en 1656 cm^{-1} , atribuible al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de enlaces amida, posiblemente relacionados con proteínas estructurales o de defensa. Finalmente, el componente 5 no muestra bandas relevantes de alta intensidad y no refleja ningún comportamiento en el mapa de distribución espacial.

No se encontró evidencia de la presencia directa del hongo en las acículas de *Pinus radiata*, ya que el perfil espectral característico del hongo, obtenido a partir del cultivo aislado, no fue detectado en las muestras inoculadas. No obstante, se observó una respuesta fisiológica por parte de la plántula frente al estrés biótico inducido por el patógeno, manifestada en un incremento en la producción de compuestos lipídicos, presumiblemente como parte de un mecanismo de defensa. Esta respuesta es especialmente notoria a partir de los 35 días post-inoculación (dpi), momento en el cual se evidencia una mayor concentración de ceras y otros lípidos en las acículas tratadas. Este hallazgo sugiere una reprogramación metabólica en la planta ante la infección, y puede ser complementado mediante otras técnicas analíticas que permitan la identificación específica de los compuestos generados bajo estas condiciones de estrés.

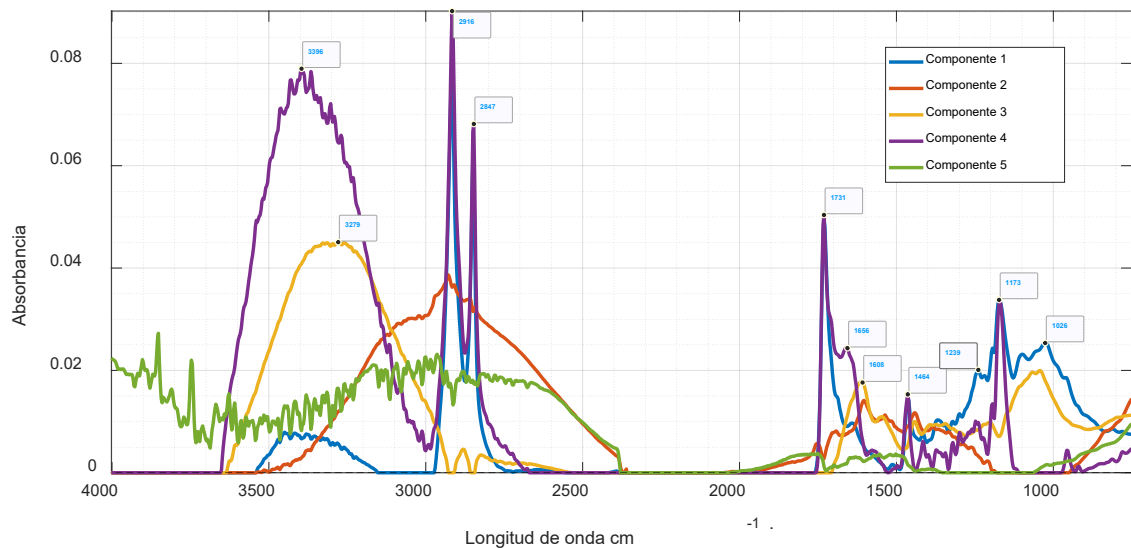


Figura 4.3-10 Espectros puros MCR con las bandas más relevantes.

4.3.5 Conclusiones

La aplicación de μ FTIR-ATR, combinada con análisis quimiométricos como PCA y MCR, permitió identificar cambios químicos relevantes en acículas de *P. radiata* inoculadas con *F. circinatum*. Uno de los hallazgos más destacados fue la presencia e incremento de señales espectrales asociadas a ácidos grasos en las muestras inoculadas, particularmente en las regiones de 2916, 2847, 1731 y 1464 cm^{-1} . Este patrón sugiere una posible acumulación de estos compuestos como parte de una respuesta fisiológica del hospedero, ya sea a nivel de reorganización estructural de membranas, síntesis de barreras lipídicas, o activación de mecanismos de defensa.

Aunque no se identificaron firmas espectrales específicas del patógeno, los resultados demuestran que μ FTIR-ATR es sensible a los efectos bioquímicos inducidos por la infección, lo que posiciona a esta técnica como una herramienta prometedora para el monitoreo temprano del estado fisiológico vegetal.

La validación futura del método, considerando su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, será clave para su implementación operativa en monitoreos fitosanitarios. Asimismo, su integración con plataformas portátiles y modelos predictivos podría facilitar el desarrollo de herramientas rápidas, no destructivas y costo-eficientes para la detección de enfermedades en sistemas forestales.

4.3.6 Referencias

- [1] Dwinell LD, Fraedrich SW, Adams D. Diseases of pines caused by the pitch canker fungus. *Fusarium*: Paul E Nelson Memorial Symposium 2001:225–32.
- [2] Dwinell D, Barrows-Broaddus J, Kuhlman G. Pitch canker: A disease complex. *Plant Dis* 1985;69:270–5.
- [3] SAG. *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell: conocimiento del patógeno y establecimiento de bases para su control en *Pinus radiata*. 2007.
- [4] Nirenberg HI, O'donnell K, Nirenberg' HI. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species comple. Source: *Mycologia* 1998;90:10458–5126.
- [5] EPPO. Data sheets on quarantine pests: *Gibberella circinata*. EPPO Bulletin 2005;35:383–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2005.00905.x>.
- [6] Oepp B, Bulletin E. PM 7/91 (2) *Fusarium circinatum* (formerly *Gibberella circinata*). EPPO Bulletin 2019;49:228–47. <https://doi.org/10.1111/epp.12587>.
- [7] IPPC. ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests DP 22: *Fusarium circinatum*. 2017.

- [8] Conrad AO, Bonello P. Application of infrared and raman spectroscopy for the identification of disease resistant trees. *Front Plant Sci* 2016;6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01152>.
- [9] Vivas M. Susceptibility of *Pinus pinaster* Ait . to *Fusarium circinatum* Nirenberg and O ' Donnell: variability and maternal effects GESTIÓN FORESTAL SOSTENIBLE TESIS DOCTORAL : SUSCEPTIBILIDAD DE *Pinus pinaster* Ait . ANTE *Fusarium circinatum* Nirenberg y O ' Donnel. 2014.
- [10] Martín D, Santos IP, Monteiro P, Amaral J, da Costa RMF, Martín-García J, et al. Unravelling pine response to *Fusarium circinatum* through Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 2022;53:2086–99. <https://doi.org/10.1002/jrs.6446>.
- [11] Neves MM, Guerra RF, de Lima IL, Arrais TS, Guevara-Vega M, Ferreira FB, et al. Perspectives of FTIR as Promising Tool for Pathogen Diagnosis, Sanitary and Welfare Monitoring in Animal Experimentation Models: A Review Based on Pertinent Literature. *Microorganisms* 2024;12:833. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040833>.
- [12] Shen G, Kang X, Su J, Qiu J, Liu X, Xu J, et al. Rapid detection of fumonisin B1 and B2 in ground corn samples using smartphone-controlled portable near-infrared spectrometry and chemometrics. *Food Chem* 2022;384:132487. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132487>.

- [13] Chai A, Wang Y, Zhu F, Shi Y, Xie X, Li B. Identification of Plant-Pathogenic Fungi Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy Combined with Chemometric Analyses. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 2016;36:3764–71.
- [14] Brandl H. Detection of fungal infection in *Lolium perenne* by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Plant Ecology* 2013;6:265–9. <https://doi.org/10.1093/jpe/rts043>.
- [15] Bro R, Smilde AK. Principal component analysis. *Analytical Methods* 2014;6:2812–31. <https://doi.org/10.1039/c3ay41907j>.
- [16] Wold S, Esbensen K, Geladi P. Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1987;2:37–52.
- [17] de Juan A, Tauler R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in concepts and applications. *Crit Rev Anal Chem* 2006;36:163–76. <https://doi.org/10.1080/10408340600970005>.
- [18] Budevskas BO, Sum ST, Jones TJ. Application of Multivariate Curve Resolution for Analysis of FT-IR Microspectroscopic Images of in Situ Plant Tissue. *Appl Spectrosc* 2003;57.
- [19] De Juan A, Jaumot J, Tauler R. Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Analytical Methods* 2014;6:4964–76. <https://doi.org/10.1039/c4ay00571f>.

- [20] Ruckebusch C, Blanchet L. Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges. *Anal Chim Acta* 2013;765:28–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.028>.
- [21] De Juan A, Tauler R, Dyson R, Marcolli C, Rault M, Maeder M. Spectroscopic imaging and chemometrics: A powerful combination for global and local sample analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 2004;23:70–9. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00101-3).
- [22] Mobaraki N, Amigo JM. HYPER-Tools. A graphical user-friendly interface for hyperspectral image analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2018;172:174–87. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.11.003>.
- [23] Eigenvector Research Inc. PLS_Toolbox 9.2 2023.
- [24] Diem M. *Introduction to Modern Vibrational Spectroscopy*. New York, Wiley; 1993.
- [25] Varma AK, Mondal P. Physicochemical characterization and kinetic study of pine needle for pyrolysis process. *J Therm Anal Calorim* 2016;124:487–97. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-5126-7>.
- [26] Koca N, Kocaoglu-Vurma NA, Harper WJ, Rodriguez-Saona LE. Application of temperature-controlled attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy for rapid estimation of butter adulteration. *Food Chem* 2010;121:778–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.083>.

- [27] Martin JA, Solla A, Woodward S, Gil L. Fourier transform-infrared spectroscopy as a new method for evaluating host resistance in the Dutch elm disease complex. *Tree Physiol* 2005;25:1331–8. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.10.1331>.
- [28] Kos G, Lohninger H, Krska R. Development of a method for the determination of *Fusarium* fungi on corn using mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection and chemometrics. *Anal Chem* 2003;75:1211–7. <https://doi.org/10.1021/ac0260903>.
- [29] Pleserova A L, Budinova A G, Haviro K, Ska Acel F, Volka K. Multivariate analysis of attenuated total reflection spectra of Norway spruce needles. 2000.
- [30] Tarasova, Khizhnyak SD, Meysurova F, Pakhomov P. FT-IR and UV-Spectroscopic Analyses of the Chemical Compositions of Needles from European *Spruce Picea abies* and Scots Pine *Pinus sylvestris* L. *J Appl Spectrosc* 2019;86:83–8. <https://doi.org/10.1007/s10812-019-00785-6>.
- [31] Conrad AO, Rodriguez-Saona LE, McPherson BA, Wood DL, Bonello P. Identification of *Quercus agrifolia* (coast live oak) resistant to the invasive pathogen *Phytophthora ramorum* in native stands using fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Front Plant Sci* 2014;5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00521>.

- [32] Martín JA, Solla A, Coimbra MA, Gil L. Metabolic distinction of *Ulmus minor* xylem tissues after inoculation with *Ophiostoma novo-ulmi*. *Phytochemistry* 2005;66:2458–67. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.08.004>.
- [33] Matas AJ, Sanz MJ, Heredia A. Studies on the structure of the plant wax nonacosan-10-ol, the main component of epicuticular wax conifers. *Int J Biol Macromol* 2003;33:31–5. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(03\)00061-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(03)00061-8).
- [34] Ni Y, Guo Y -J., Wang J, Xia R -E., Wang X -Q., Ash G, et al. Responses of physiological indexes and leaf epicuticular waxes of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Plant Pathol* 2014;63:174–84. <https://doi.org/10.1111/ppa.12060>.
- [35] Stariroka DV, Gorlova L. Epicuticular wax and its role in plant protection of the *Brassicaceae* family against biotic and abiotic stresses (review). *Oil Crops* 2022.
- [36] Salman A, Lapidot I, Pomerantz A, Tsrer L, Shufan E, Moreh R, et al. Identification of fungal phytopathogens using Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy and advanced statistical methods. *J Biomed Opt* 2012;17:017002. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.17.1.017002>.
- [37] Waśko A, Bulak P, Polak-Berecka M, Nowak K, Polakowski C, Bieganowski A. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from

Hermetia illucens. Int J Biol Macromol 2016;92:316–20.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.038>.

4.4 Early detection of *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* cuttings using hyperspectral imaging and multivariate analysis

M. Bravo-Arrepol, E. Sanfuentes, José Amigo, R. Hasbún, C. Fuentes, A. Navarro, P. Sanhueza, R. del P. Castillo.

4.4.1 Abstract

Pitch canker, caused by *Fusarium circinatum*, poses a significant threat to *Pinus radiata* plantations, resulting in both economic and ecological losses. Early detection is vital; however, conventional methods depend on late-stage visual symptoms. This study utilises hyperspectral imaging (HSI) and multivariate techniques for the early detection of *F. circinatum* in cuttings before the onset of symptoms. Spectral data collected throughout a 57-day monitoring period revealed pathogen-induced changes, particularly in the visible (VIS), and near-infrared (NIR) spectral regions. Principal Component Analysis (PCA) identified key spectral variations, while Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) demonstrated high classification accuracy in test sets. Notably, infected cuttings were successfully distinguished from healthy controls at 27 days post-inoculation (dpi), providing a critical early detection window. Additionally, genotypic variability influenced spectral responses, with genotype A exhibiting earlier and more pronounced spectral changes than genotype B, suggesting differences in resistance levels. These findings highlight the potential of VIS-NIR-

HSI not only for early disease detection but also for distinguishing genetic susceptibility reflected in the phenotype of the plants, which could aid in breeding programs for more resilient *P. radiata* strains. This research underscores VIS-NIR-HSI as a powerful, non-invasive tool for early pathogen detection, with applications in precision forestry and large-scale disease monitoring.

4.4.2 Introduction

Pitch canker, caused by the fungal pathogen *Fusarium circinatum*, is one of the most destructive diseases affecting pine plantations worldwide [1]. This disease impacts all developmental stages of trees, from cuttings in nurseries to mature trees in forest plantations, causing deformities, necrosis, and, in severe cases, the death of the host. *Pinus radiata*, one of the most widely used species in the forestry industry due to its fast growth and adaptability, is particularly vulnerable to this pathogen, compromising productivity and the sustainability of forest systems in countries like Chile, where this species holds a predominant position in the forestry sector [2–4].

In addition to its direct impacts on plantation health, pitch canker generates significant economic losses, including costs associated with the removal of infected trees, decreased wood yield, and phytosanitary measures to contain its spread. These consequences not only affect the forestry industry but also the stability of ecosystems that rely on pine plantations as habitat [3,5].

Early detection of *F. circinatum* is essential to mitigate the damage caused by pitch canker in *P. radiata* plantations. Typically, visible symptoms appear during advanced stages of the infection, when intervention options are limited and less effective. For this reason, tools that allow the pathogen to be identified in its early stages before symptoms become evident, are crucial for the preventive management of this disease [6,7].

Innovative detection systems based on molecular and spectral technologies have proven to be valuable tools for diagnosing *Fusarium* species [8–10]. These technologies can identify physiological and biochemical changes in plants that are characteristic of early infections, which is key to implementing timely management strategies and preventing the pathogen's spread [11,12].

In the forestry context, applying these technologies not only helps control the pathogen but also reduces economic losses associated with the replacement of infected trees and the use of phytosanitary measures. Additionally, these tools are promising for supporting breeding programs by identifying genotypes more resistant to the pathogen, ensuring the sustainability of plantations in countries like Chile, where *P. radiata* is one of the main forest species [13,14].

The early and accurate detection of plant diseases is crucial to ensure food security and the sustainability of forest ecosystems. Traditional diagnostic techniques, such as polymerase chain reaction (PCR) and serological assays, provide accurate identification but are often time-consuming, labor-intensive, and impractical for large-scale forest monitoring [15,16]. Therefore, there is a critical need for rapid, non-invasive methods that enable the early detection of *F. circinatum* before visible symptoms appear.

Another family of methods relying on visual observation of symptoms are often insufficient because visible manifestations of the disease usually appear in advanced stages when the damage is already considerable [17]. In this context,

spectral techniques have emerged as promising tools in the field of phytopathology, offering the possibility of detecting physiological and biochemical changes associated with diseases in early stages and in a non-destructive manner [18].

Hyperspectral (HSI) imaging has emerged as a powerful tool in plant disease detection, offering high spectral resolution across the visible-near infrared (VIS-NIR, between 380 and 1700 nm.) and shortwave infrared (SWIR, between 960 and 2600 nm.) regions [19–21]. This technique enables the identification of subtle biochemical and physiological changes in plant tissues that are often undetectable by the human eye or multispectral imaging (MSI) [22]. Previous studies have demonstrated the effectiveness of HSI in detecting various plant pathogens, including *Bursaphelenchus xylophilus* in pine species and *Dothistroma septosporum* in *P. radiata*, by analyzing spectral reflectance changes associated with chlorophyll degradation, water content loss, and cellular structure alterations [23].

Despite the proven potential of VIS-NIR and SWIR HSI, together with the appropriated multivariate techniques, in plant pathology, their application in the early detection of *F. circinatum* remains largely unexplored. This study aims to address this gap by integrating VIS-NIR HSI and multivariate methods for the early detection of *F. circinatum* in *Pinus radiata* cuttings. A monitoring period of up to 57 days post-inoculation (dpi) will be conducted using VIS-NIR HSI, allowing

the identification of spectral profiles associated with the initial stages of infection. These images will be combined with multivariate analysis techniques, such as Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), to enhance the selectivity of the detection strategy. This research seeks to develop a rapid, non-destructive diagnostic tool for forest nurseries, ultimately contributing to improved disease management and mitigation strategies.

4.4.3 Materials and methods

4.4.3.1 Compliance and certification laboratory procedures

All experiments and analyses were conducted in a certified laboratory of the Faculty of Forestry Sciences of the University of Concepción, ensuring compliance with the rigorous standards and requirements established by the Agricultural and Livestock Service (Servicio Agrícola y Ganadero). The procedures followed strict laboratory protocols to guarantee the reliability and validity of the results, adhering to national regulatory guidelines for the handling and identification of phytopathogenic fungi.

4.4.3.2 PCR Analysis and Molecular Identification of Fungal Species

The PCR analysis involved DNA extraction from fungal colonies using the *GeneJet Genomic DNA Purification* kit, followed by PCR amplification with universal primers ITS1 and ITS4 and the Thermo Scientific Platinum Taq kit. The reaction included an initial denaturation (95°C, 10 min), 40 cycles of

denaturation (95°C, 30 s), annealing (55°C, 30 s), extension (72°C, 1 min), and a final elongation (72°C, 10 min). The amplified products were visualized via electrophoresis on a 1.5% agarose gel (90 V, 45 min), purified with the *QIAquick PCR Purification* kit, and sequenced by MacroGen Inc. using Sanger sequencing. The sequences were processed and analyzed using *Geneious Prime 2023.0.1*, with BLAST comparison against the NCBI database for species identification.

4.4.3.3 *Plant Material*

A strain of *F. circinatum* was isolated and confirmed using molecular identification through PCR, based on previous studies conducted by the inoculum was prepared in synthetic nutrient agar (SNA) medium composed by KH_2PO_4 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, glucose and agar, all of which were of analytical grade, with a concentration of 10^6 spores mL^{-1} . The plant material consisted in cuttings approximately one year old, of two genotypes of *P. radiata* cuttings: genotype A and genotype B, which will be referred to as genotype A and B, respectively. These cuttings were provided from the Carlos Douglas nursery of Forestal Mininco, Chile. For each genotype cuttings, were divided into two groups: 5 control plants and 7 plants inoculated with the *F. circinatum* pathogen. Inoculated samples were labelled as "Inoculated 1," "Inoculated 2," etc., while control samples were labelled as "Control 1," "Control 2," etc., for tracking and analysis purposes. All cuttings were maintained under controlled

laboratory conditions with a stable temperature regime throughout the experiment to ensure uniform environmental parameters across both the inoculated and control groups by 60 days.

4.4.3.4 Inoculation process

The inoculation was carried out by making a sterile incision in the stem of each cuttings, approximately 2 cm above the substrate. For the inoculated group, 50 μL of the previous conidial suspension was applied to the incision, allowing the stem to absorb the drop before closing the wound. Control samples were inoculated with 50 μL of sterile water without the pathogen to consider the physical damage by the incision. At the end of the monitoring period, three randomly selected samples from each group were subjected to polymerase chain reaction (PCR) analysis to detect the presence of the pathogen. The diagnostic procedures followed the official protocol established by the agricultural and livestock service, which outlines a standardized methodology for the precise identification of *F. circinatum* [15].

4.4.3.5 Hyperspectral imaging acquisition

Hyperspectral images were obtained using a benchtop reflectance hyperspectral system (Resonon Inc.) equipped with a Pika-L camera, covering a spectral range of 400–1000 nm. The system captured 281 spectral channels with a resolution of 2.7 nm, an integration time of 25 ms, a frame rate of 30 Hz, and a scanning speed of 0.20 cm s^{-1} . The distance between the linear

platform and the camera was set at 45 cm. A standard Teflon® white plate was used to calibrate the camera's frame rate and integration time. Following image acquisition, the original hyperspectral intensity reflectance was converted to relative reflectance using equation 1:

$$R = \frac{R_0 - R_d}{R_w - R_d} \quad \text{Equation 1}$$

Where R represents the relative reflectance, R_0 corresponds to the sample intensity, R_d denotes the reflectance measured in a dark environment, and R_w refers to the reference intensity of the white plate. Images of the entire plant from the stem to the apex, with dimensions of dimensions of 1200×900 pixels (100×200 mm), were taken at specific days post-inoculation (dpi): 0, 16, 27, 44, and 57.

4.4.3.6 Chemometric analysis

4.4.3.6.1 Data preprocessing

To optimize processing time and improve computational efficiency, spectral binning was applied by grouping 6 adjacent spectral points, resulting in a total of 50 bands. The adjacent spectral bands are highly correlated, allowing information retention even with reduced resolution. Binning

minimizes redundancy while preserving key spectral variability for disease detection, enhancing model stability and generalization[24] . After binning, the background was removed, leaving only the complete seedling image. To remove the background from the image, a mask was applied based on principal component analysis using data that had been preprocessed with standard normal variate, first derivative transformation, and mean centering. The principal component that effectively differentiates the background from the cutting was then selected and removed. A threshold was established based on a histogram of scores, which was manually determined. All images were processed and corrected using the same approach.

One region of interest (ROIs) was selected manually from the processed image: the apex region, measuring 100×100 pixels. The selection of ROIs focused on the apex, where disease symptoms typically first appear. Several preprocessing techniques were evaluated to enhance exploratory and classification models performance, including standard normal variate (SNV), multiplicative scatter correction (MSC), first and second derivatives, smoothing, and mean-centering. Hyperspectral images of ROI's are represented as a data array \mathbf{X} ($M \times N \times \lambda$), where the spatial dimension corresponds to ($M \times N$) and λ represents the spectral dimension. In the exploratory and classification models, the mosaic dimensions were set to $500 \times 1200 \times 50$ for each genotype.

4.4.3.6.2 Fast-Principal Component Analysis (Fast-PCA)

In order to evaluate variation sources affecting the sample spectra, such as phenotype, days post-inoculation, and to distinguish spectral patterns between inoculated (infected) and control (healthy) samples, Fast-PCA was applied. Fast-PCA was performed for the entire set of monitoring days by creating a mosaic that included all ROIs together. The mosaic was constructed using five images of control samples and seven images of inoculated samples over time, generating a matrix of 500×1200 pixels per genotype. The Fast-PCA algorithm proposed by Cruz-Tirado was utilized due to its computational efficiency and ability to rapidly extract principal components that capture the maximum variance in hyperspectral data [25,26]. This approach facilitated the identification of spectral patterns distinguishing healthy and infected samples, as well as potential spectral differences between genotypes, allowing for the selection of an optimal principal component and the establishment of a spectral threshold to enhance differentiation.

4.4.3.6.3 Qualitative assessment of infection using Fast-PCA

To quantitatively assess infection progression, the first step involved scaling the PCA scores to ensure consistent interpretation. A threshold was then defined, where pixels with a score value above 0.5 were considered indicative of infection. The number of pixels exceeding this threshold was

quantified for each sample, allowing for the calculation of the percentage of infected pixels relative to the total number of pixels within a sample. This approach provided an objective qualitative metric for evaluating infection levels in the cuttings. The methodology was applied to both genotype A and genotype B, enabling a comparative analysis of infection dynamics between genetic backgrounds. The classification of infection-related pixels facilitated the identification of potential differences in disease response across genotypes. Finally, an F-test was performed to assess statistical differences between infected and healthy samples at a 95% confidence level.

4.4.3.6.4 Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)

PLS-DA models were developed for each post-inoculation day (0, 16, 27, 44, and 57 dpi) to classify samples into two categories: control (healthy) and inoculated (stressed), following established methodologies from previous studies [27,28]. PLS-DA, a supervised classification method, projects data into a lower-dimensional space to optimize the separation between these two classes. The response variable \mathbf{y} is numerically encoded (0 for healthy, 1 for stressed), and the algorithm identifies latent components that maximize covariance between the predictor matrix \mathbf{X} and \mathbf{y} . Classification is performed based on a threshold (e.g., 0.5), where samples with $\mathbf{y}_{\text{pred}} > 0$. are classified as stressed, while those with $\mathbf{y}_{\text{pred}} \leq$

0.5 are considered healthy. Additionally, separate models were constructed for each genotype to account for potential genetic variability in response to infection.

First, a cross-validation was performed using the venetian blinds method, partitioning the data into ten groups. To validate the models, an external set of samples was used, consisting of two control samples and three inoculated samples per genotype, resulting in a total of five validation samples per genotype. The model's predictive capability was assessed to determine the earliest day at which healthy and infected cuttings could be reliably distinguished. The performance of these models was assessed using key classification metrics, including sensitivity (S_n), specificity (S_p), error rate (Err), accuracy (Acc) and Non-error rate (NER) all derived from the confusion matrix. Sensitivity and specificity were particularly crucial in determining the model's ability to correctly classify infected and healthy samples, while error rate and accuracy provided insights into overall classification reliability[29]. The parameters are obtained through the following equations:

$$S_n = \frac{TP}{TP + FN}$$

Equation

2

$$Sp = \frac{TN}{TN + FP}$$

Equation

3

$$p = \frac{TP}{TP + FP}$$

Equation

4

$$Err = 100 - NER$$

Equation

5

$$NER (Non - error rate) = \frac{Sp + Sn}{2}$$

Equation

6

$$Acc = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

Equation

7

True Positives (TP) represent cases where the model correctly identifies a positive instance, such as accurately detecting the *Fusarium* stress. False Negatives (FN) occur when a sample that belongs to a particular group is mistakenly classified as not being part of that group. True Negatives (TN) refer to instances where samples that do not belong to a specific category are correctly identified as such. Conversely, False Positives (FP) arise when samples that do not belong to a given class are erroneously classified as members of that class, leading to incorrect identification, such as misclassifying the stress as present when it is not [30].

The total number of analyzed data points was determined by multiplying the 12 samples by the 5 monitoring days, the 100,000 total pixels per sample, and the 50 spectral bands per pixel, resulting in a total of 30,000,000 data points. The data analysis was conducted using MATLAB 2022b and the HYPER-Tools 3.0 toolbox, which is freely available at <http://www.hypertools.org> (last accessed: March 2025) [31].

4.4.4 Results and discussion

4.4.4.1 *Physical characteristics of samples and PCR analysis*

Figure 4.4-1 show the visual examination of control and infected samples obtained during the monitoring period of genotype A; the cuttings exhibited continuous growth, with no observable abnormalities in the control group throughout the entire experiment. Control cuttings remained asymptomatic, showing no signs of infection or stress. In contrast, inoculated cuttings began to develop visible disease symptoms starting at 44 dpi in some individuals. By 57 dpi, a significant number of inoculated cuttings exhibited characteristic symptoms of *F. circinatum* infection, including apical decline and needle discoloration, which became progressively more pronounced. All the images obtained on different days of both genotypes are presented in the supplementary material (Figures S1-S4).

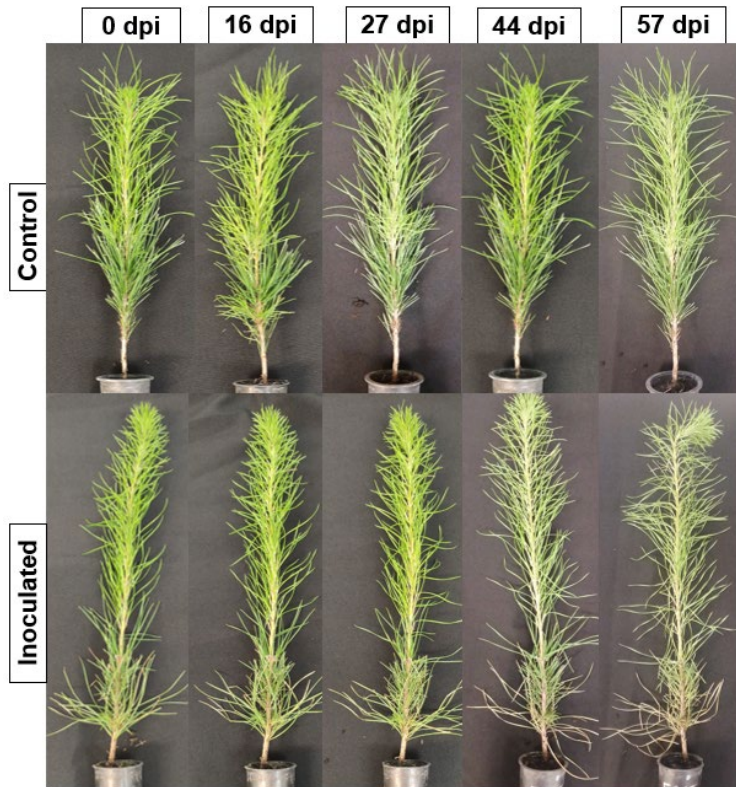


Figure 4.4-1 images of Inoculation and control plants of genotype A. The first row shows the control sample without symptoms. The second row shows defoliation on day 44, and apical decline and chlorosis on day 57.

At the conclusion of the experiment, PCR assays were performed on a randomly selected subset of samples, including two control and three inoculated specimens. The analysis was conducted on the collar region, 2 cm above the inoculation site. In this analysis, the presence of the pathogen was not detected in any of the control samples, whereas *F. circinatum* was identified in all the analysed inoculated samples.

4.4.4.2 Spectral patterns of samples

Figure 4.4-2 illustrates the reference reflectance spectra of *P. radiata* cuttings at 27 dpi of genotype A and B, categorized into two groups: healthy and inoculated cuttings. The observed spectral differences between these groups suggest significant physiological and biochemical alterations in the inoculated cuttings.

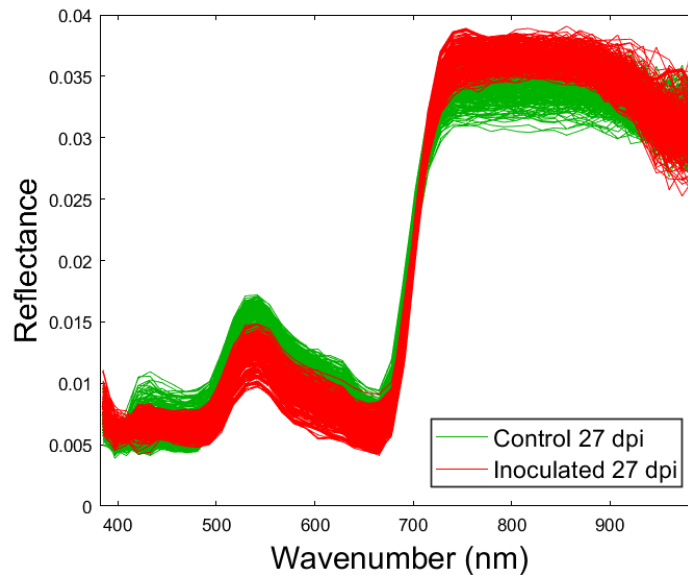


Figure 4.4-2 Reference spectra of control and inoculated cuttings at 27 dpi for both genotypes.

The composition of photosynthetic pigments is a crucial indicator of a plant's physiological status. Reflectance analysis provides a rapid and non-destructive method for assessing pigment composition, allowing the

evaluation of nutrient status, phenological variations, stress responses, and photosynthetic efficiency [32,33]. In the blue (400–500 nm) and green (500–600 nm) regions, inoculated cuttings display a slight reduction in reflectance compared to healthy cuttings. This decrease is likely attributed to the degradation of photosynthetic pigments, particularly chlorophylls and carotenoids. Conversely, in the red region (600–700 nm), inoculated cuttings exhibit an increase in reflectance, a phenomenon previously reported in the literature and associated with reduced red-light absorption due to chlorophyll degradation [18]. In the NIR region, which is closely linked to mesophyll cell structure, inoculated cuttings exhibit a marked decrease in reflectance, specifically in the 700–800 nm range. Moreover, a similar decline is observed between 900 and 1000 nm, suggesting potential structural alterations, possibly due to cell wall degradation or reduced water content within the needles.[23]. These findings confirm that *F. circinatum* infection induces spectral alterations that can be detected before the onset of visible symptoms. Notably, changes in the visible region, a decline in NIR reflectance, and a shift in the red-edge region have been identified as key spectral variables for classification models employing chemometric techniques.

4.4.4.3 Chemometric analysis

4.4.4.3.1 Fast-PCA for evaluating spectral variability and phenotypic differences.

Best results for PCA were obtained using SNV correction and first derivative transformation with a 7-point window, followed by mean-centering. Figure 4.4-3 top presents the score and loading plots from a PCA analysis of control samples for genotype A and B. The control samples exhibited the least variation throughout the experiment and were used to assess differences between the genotypes. The PCA score map reveals that PC1 accounts for 45.73% of the explained variance. In this analysis, genotype B exhibits higher PC1 scores, as indicated by the prevalence of red/yellow regions, compared to genotype A, which predominantly shows lower PC1 scores (blue/green regions). This suggests that the spectral variation captured by PC1 is more pronounced in genotype B.

The loading plot (Figure 4.4-3 bottom) provides insights into the spectral regions contributing to these differences. The peaks observed between 550–650 nm correspond to chlorophyll absorption features, indicating that pigment-related variations significantly influence the separation between genotypes. Additionally, the 720–750 nm region, associated with mesophyll and cellular structure, also contributes to the observed spectral differences.

The presence of more intense PC1 scores in genotype B suggests that structural or pigment-related characteristics might be more pronounced in

this genotype, possibly indicating differences in needle composition, pigment concentration, or overall reflectance properties. These findings align with the expected physiological and biochemical variations between genotypes, reinforcing the effectiveness of HSI combined with PCA in distinguishing spectral patterns associated with genotype-dependent phenotypic differences.

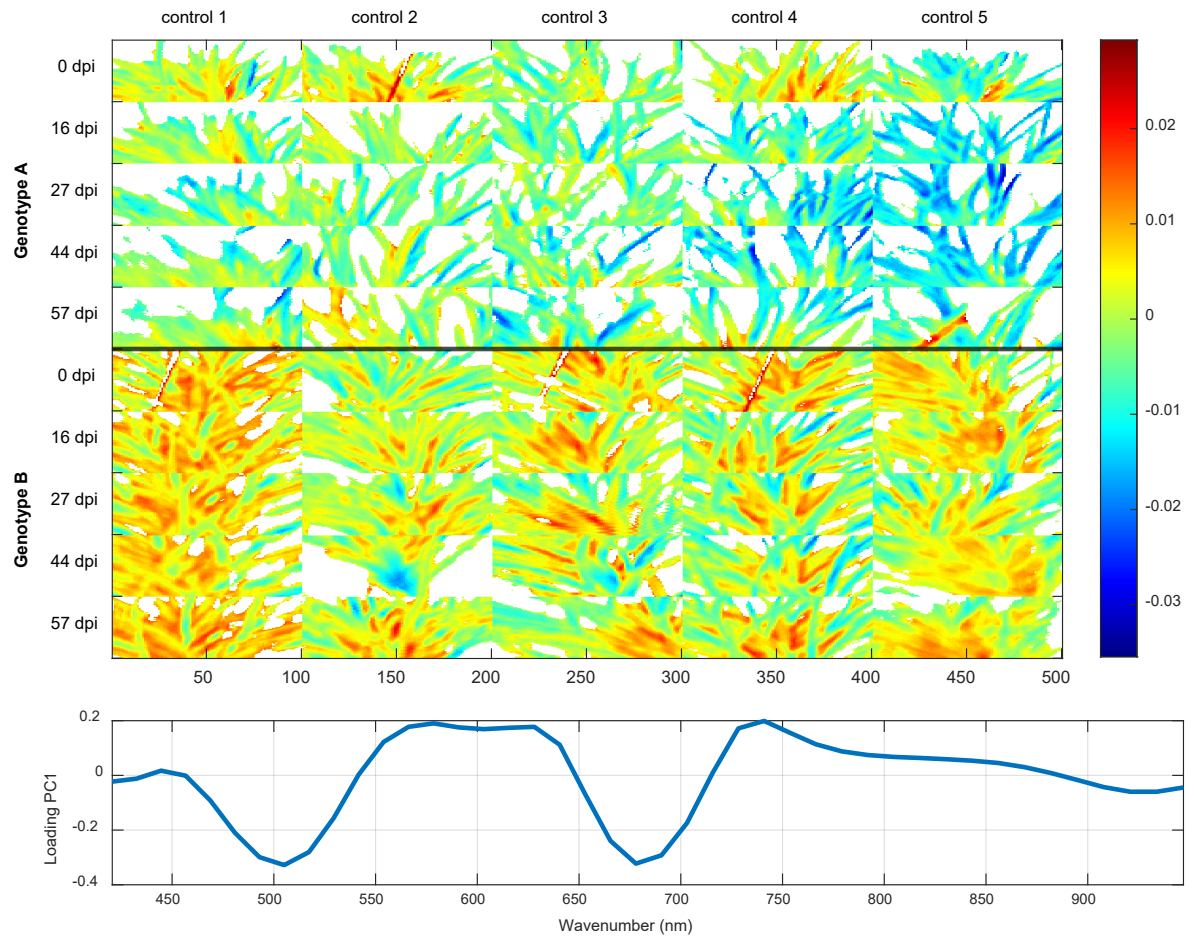


Figure 4.4-3 Fast-PCA score distribution and spectral variability between genotypes. Top panel: map score distribution of genotype A and B. Bottom panel: Loading plot for PC1 (45,76% variance explained).

4.4.4.3.2 Genotype A: Early spectral variability

Figure 4.4-4 (top panel) illustrates the results for genotype A, where the first principal component (PC1) explained 78.16% of the total variance. A clear trend emerges as some inoculated samples begin exhibiting spectral changes early in the experiment, suggesting an early response to

inoculation. The spectral differences become more pronounced at 44 dpi, coinciding with the onset of visual symptoms such as chlorosis and necrosis. By 57 dpi, several samples displayed apical decline, which affected the consistency of image capture angles.

The red/yellow areas in the score map at later dpi stages indicate increased spectral deviations, particularly in regions associated with pigment composition (550–650 nm) and cellular structure (720–750 nm), as confirmed by the loading plot. (Figure 4 bottom panel)

4.4.4.3.3 Genotype B: Delayed spectral response and gradual Changes

In contrast, genotype B (Figure 4.4-4: middle panel) exhibited a more stable spectral response, with PC1 accounting for 62.23% of the total variance. The score map shows that inoculated samples remained spectrally like control samples up to 44 dpi, reflecting a delayed response to inoculation. Unlike genotype A, where early spectral divergence was observed, most genotype B cuttings only began to show subtle spectral shifts at 57 dpi or slightly earlier. This aligns with visual symptoms, as most genotype B cuttings developed signs of stress at 57 dpi, though some exhibited changes a few days prior. The spectral patterns suggest that genotype B may possess a higher tolerance or slower response to the infection compared to genotype A.

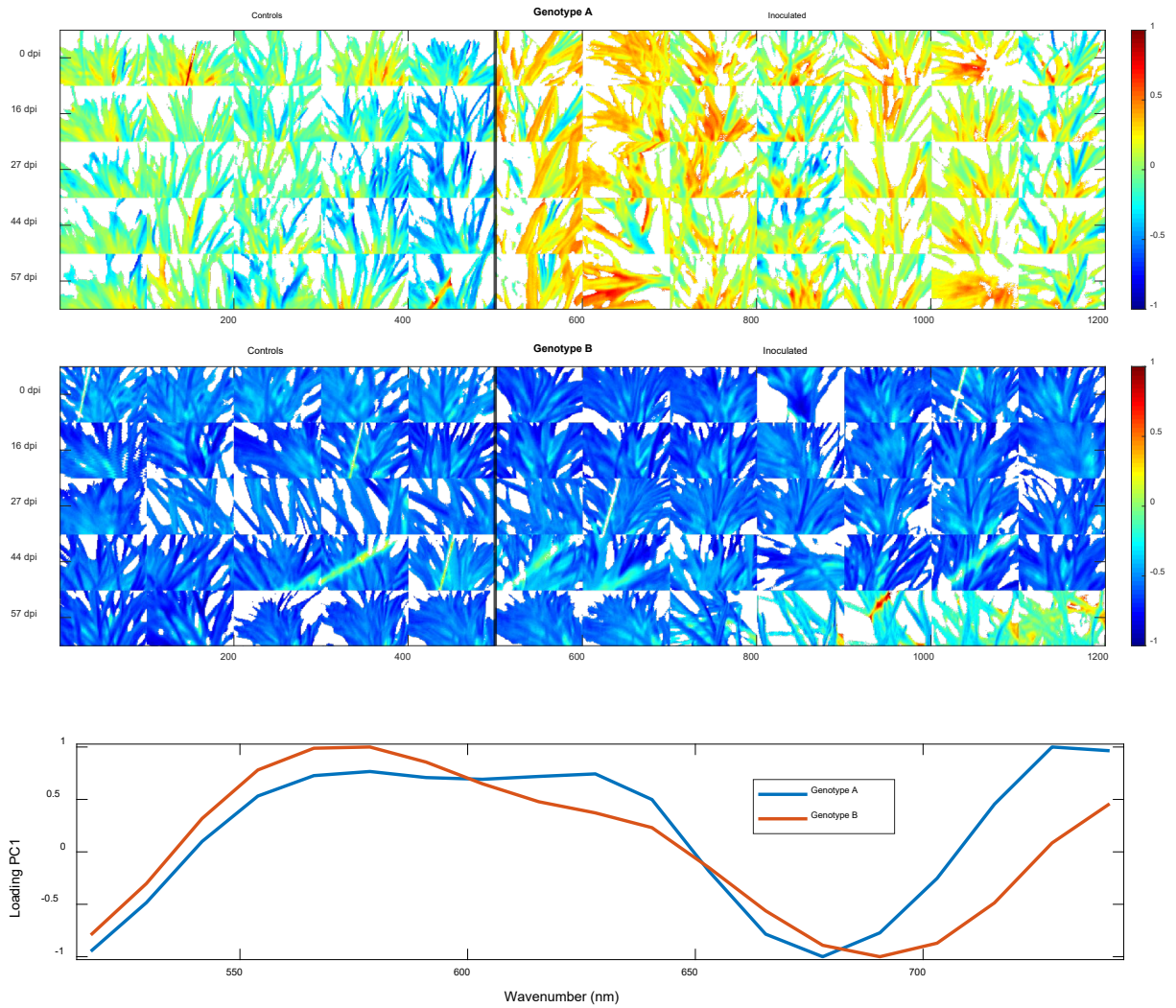


Figure 4.4-4 Top Panel: Score surface of PC1 from the ROIs of *P. radiata* obtained using fast-PCA. The top panel represents genotype A, while the middle panel corresponds to genotype B. In the score matrices, rows indicate the days post-inoculation, and columns represent the samples. The first five samples on the left correspond to controls, while the following seven samples correspond to inoculated specimens. Bottom panel: Loading plot of first principal component for genotype A and B.

4.4.4.3.4 Spectral contributions and PCA loadings

The loading plot further supports these findings by identifying key spectral regions contributing to PC1 variation in both genotypes. Figure 4.4-4 (Bottom panel) displays the PC1 loadings for each genotype, derived from separate PCA analyses, highlighting their distinct spectral contributions. The primary peaks in the 550–650 nm range correspond to chlorophyll absorption, indicating that pigment degradation plays a significant role in differentiating infected samples. Additionally, the 720–750 nm region, associated with mesophyll structure and cellular integrity, also contributes to PC1, suggesting structural alterations in response to infection.

The PCA results demonstrate a genotype-dependent response to inoculation, with genotype A exhibiting earlier spectral changes and stronger differentiation over time, while genotype B showed a more gradual response, with most variations becoming significant at 57 dpi. The combination of score distribution analysis and spectral loading interpretation provides valuable insights into the progression of infection and the physiological differences between genotypes. The delayed spectral response in genotype B suggests a higher resistance to *Fusarium* infection, making early detection more challenging. These findings reinforce the effectiveness of hyperspectral imaging and PCA as tools for early detection and characterization of plant stress responses

4.4.4.3.5 Qualitative assessment of infection using PCA-based pixel thresholding

To qualitatively visualize the data, the first step involved scaling the scores to facilitate better interpretation. A threshold was then established, where samples with a score value above 0.5 were predominantly associated with pixels corresponding to infection. Subsequently, pixel counts above this threshold were determined for each sample, allowing for the calculation of the percentage of infected pixels relative to the total number of pixels in the sample. This approach provides a quantitative criterion for assessing the infection level in the cuttings.

Another critical aspect to consider is that by 57 dpi, the apex of the cuttings had lost its original structure due to apical decay and needle loss in most inoculated samples. As a result, the proportion of infection may have been altered since the imaging conditions were not comparable to previous monitoring stages. This factor should be considered when interpreting the progression of the infection over time.

Figure 4.4-5 presents a summary of infection-related pixel values for both genotype A and genotype B. In genotype A (Figure 4.4-5 top), a clear differentiation due to *Fusarium* infection is evident. While variations among inoculated samples were already noticeable from day 0, by 27 days post-inoculation (dpi), infected pixels covered more than 12.5% of the apex, suggesting an ongoing progression of *Fusarium* infection. Notably, at this

stage (27 dpi), cuttings displayed no visible symptoms of infection, highlighting this time point as an early stage of pathogen detection.

In contrast, for genotype B (Figura 4.4-5 bottom), only three samples exhibited spectral signs of stress after 57 dpi. This suggests that under the applied methodology and within the analyzed timeframe, early stages of the disease could not be effectively detected. These findings indicate potential differences in susceptibility or symptom expression between genotypes, emphasizing the need for further investigation to optimize detection methods for *Fusarium* infection in different genetic backgrounds.

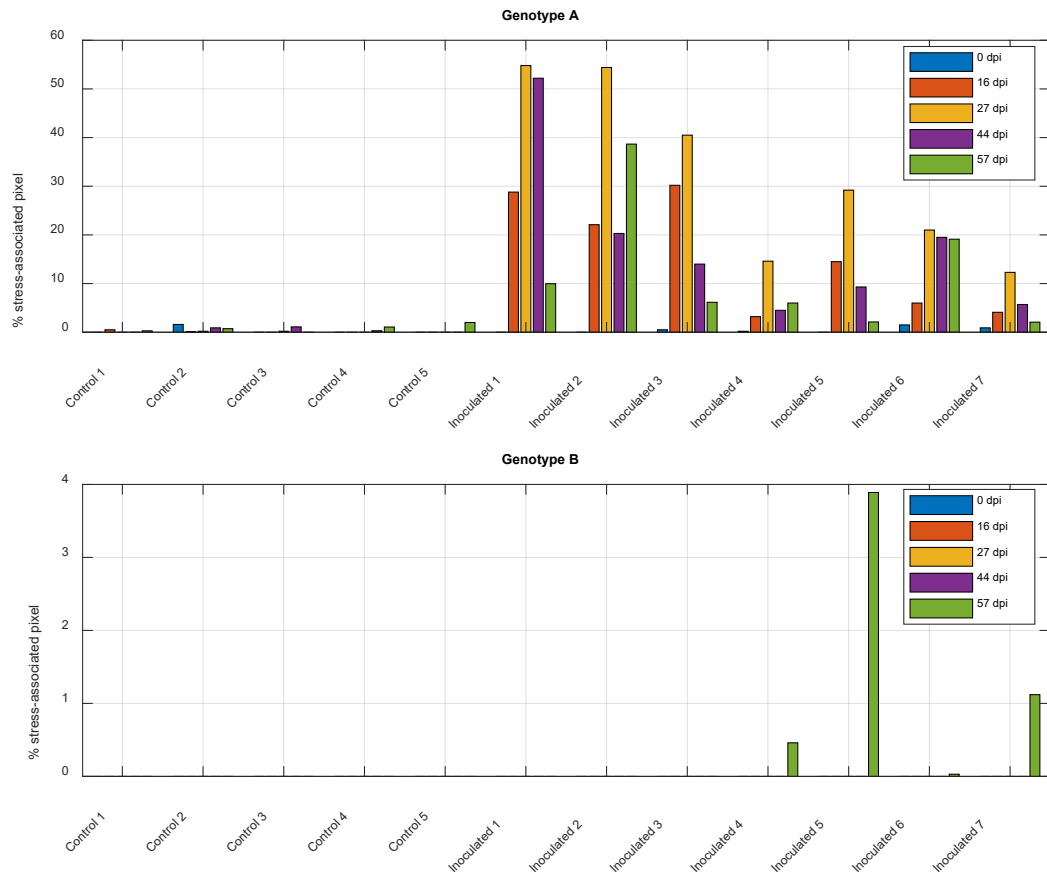


Figure 4.4-5 Percentages of stress-associated pixels of PC1 scores for genotype A (top) and genotype B (bottom) over time.

A two-tailed F-test with a 95% confidence level ($\alpha = 0.05$) was conducted to determine statistical differences between control and inoculated samples at different time points. The Table 4.4-1 presents the F and p-values for each time point, revealing the following trends: At 0 dpi, the p-value exceeds 0.05, indicating that the variances of the control and

inoculated groups are not statistically different. However, at 16, 27, 44, and 57 dpi, the p-value is less than 0.05, suggesting that the variances of the groups are significantly different. The F-test for genotype B was not satisfactory as no pixels associated with the disease were found.

Table 4.4-1 F-test with two tails for genotype A and B ($\alpha = 0.05$). N/A: Not apply

	Genotype A		Genotype B	
	<i>F-value</i>	<i>p</i>	<i>F-value</i>	<i>p</i>
0 dpi	1.83×10^0	5.17×10^{-1}	6.55×10^4	N/A
16 dpi	2.07×10^{-5}	2.97×10^{-7}	6.55×10^4	N/A
27 dpi	5.02×10^{-5}	1.12×10^{-6}	6.55×10^4	N/A
44 dpi	5.66×10^{-3}	1.33×10^{-3}	6.55×10^4	N/A
57 dpi	3.35×10^{-3}	6.10×10^{-4}	0	0

4.4.4.3.6 Classification models

Table 4.4-2 shows the figures of merit for cross-validation results of PLS-DA applied to ROIs for genotypes A and B at different days post-inoculation (dpi). A comparative analysis reveals that genotype A demonstrates superior overall performance, maintaining higher and more stable accuracy across all time

points. Additionally, genotype A achieves a well-balanced relationship between specificity and sensitivity, indicating a consistent ability to classify both positive and negative cases correctly. This is particularly evident at 27 dpi, where the error rate is lowest and accuracy is highest. In contrast, genotype B exhibits greater asymmetry between specificity and sensitivity and shows a higher error rate at multiple time points, further reinforcing the conclusion that genotype A is the more reliable and accurate option for sample classification.

Table 4.4-2 Figures of merit for cross-validation of ROIs for genotype A and B. L.V: Latent variable, Sp: specificity, Sn: sensitivity, p: precision, Err: Error rate, Acc: Accuracy.

Genotype	dpi	L.V.	type	Sp	Sn	p	Err	Acc
A	0	5	Control	0,78	0,75	0,66	0,24	0,76
			Inoculated	0,75	0,78	0,84		
	16	3	Control	0,74	0,77	0,68	0,25	0,75
			Inoculated	0,77	0,74	0,82		
	27	3	Control	0,82	0,76	0,70	0,21	0,80
			Inoculated	0,76	0,82	0,86		
	44	4	Control	0,73	0,74	0,64	0,26	0,74
			Inoculated	0,74	0,73	0,81		
	57	4	Control	0,73	0,80	0,64	0,24	0,76
			Inoculated	0,80	0,73	0,86		
B	0	3	Control	0,83	0,85	0,79	0,16	0,84
			Inoculated	0,85	0,83	0,88		
	16	4	Control	0,39	0,85	0,47	0,38	0,57
			Inoculated	0,85	0,39	0,80		
	27	4	Control	0,44	0,80	0,51	0,38	0,59
			Inoculated	0,80	0,44	0,75		
	44	3	Control	0,62	0,70	0,54	0,34	0,65
			Inoculated	0,70	0,62	0,77		
	57	3	Control	0,50	0,88	0,55	0,31	0,66
			Inoculated	0,88	0,50	0,86		

The external validation can be observed in Figure 4.4-6, where the predicted image was reconstructed based on the developed model using two trained classes: the “healthy” class, corresponding to pixels without *Fusarium*-induced stress, and the “stress” class, representing pixels associated with *Fusarium*-related stress. The predictive results show that control samples exhibit little to no stress-associated pixels, whereas inoculated samples predominantly consist of stress-associated pixels, even from the day of inoculation.

Each image that composes the Figure 4.4-6 show pixel count of stress-associated regions was performed, calculating the percentage relative to the total number of pixels in the ROI. This approach allows for tracking the progression of the disease over time. Control sample apices exhibited some degree of stress below 21%, which could be attributed to other pathogenic responses or even physical damage. However, since this behavior was not consistent over time, it is unlikely to be associated with *Fusarium* infection, even at 57 dpi. In contrast, inoculated samples exhibited stress levels that could be directly attributed to *Fusarium* infection.

Notably, in inoculated sample 1, an increase in stress-associated pixels was observed, culminating at 57 dpi, where apical decay hindered image

acquisition. The graphical representation further indicates that by 27 dpi, the infected samples exhibited stress-associated pixel percentages exceeding 25%. Although at 16 dpi, the percentage was already approaching this threshold, these samples could still be considered controls due to the similarity in pixel values. Therefore, at 27 dpi, if the apices contain more than 25% stress-associated pixels, there is a high probability of asymptomatic *Fusarium* infection.

Additionally, internal validation samples showed improved detection at 27 dpi, while external validation samples for the same time point also reflected early disease detection, further supporting the robustness of the model for identifying *Fusarium* infection before visible symptoms emerge.

The prediction results for genotype B are showed in the Figure 4.4-7 demonstrating satisfactory performance only on day 0 post-inoculation. However, as time progresses, the predictive accuracy of the models declines significantly. Notably, on day 0, the model successfully identifies that approximately 80% of the pixels correspond to stress indicators in the inoculated cuttings. Nevertheless, this high percentage does not necessarily imply that the stress is exclusively attributed to *F. circinatum* infection, as the proportion of stress-associated pixels does not remain consistent over subsequent days. PCR analysis confirmed the presence of *Fusarium* in three inoculated samples after 57 dpi, while no detection was

observed in control samples. These findings suggest that symptom development in this genotype takes longer than 57 days under the experimental conditions applied in this study.

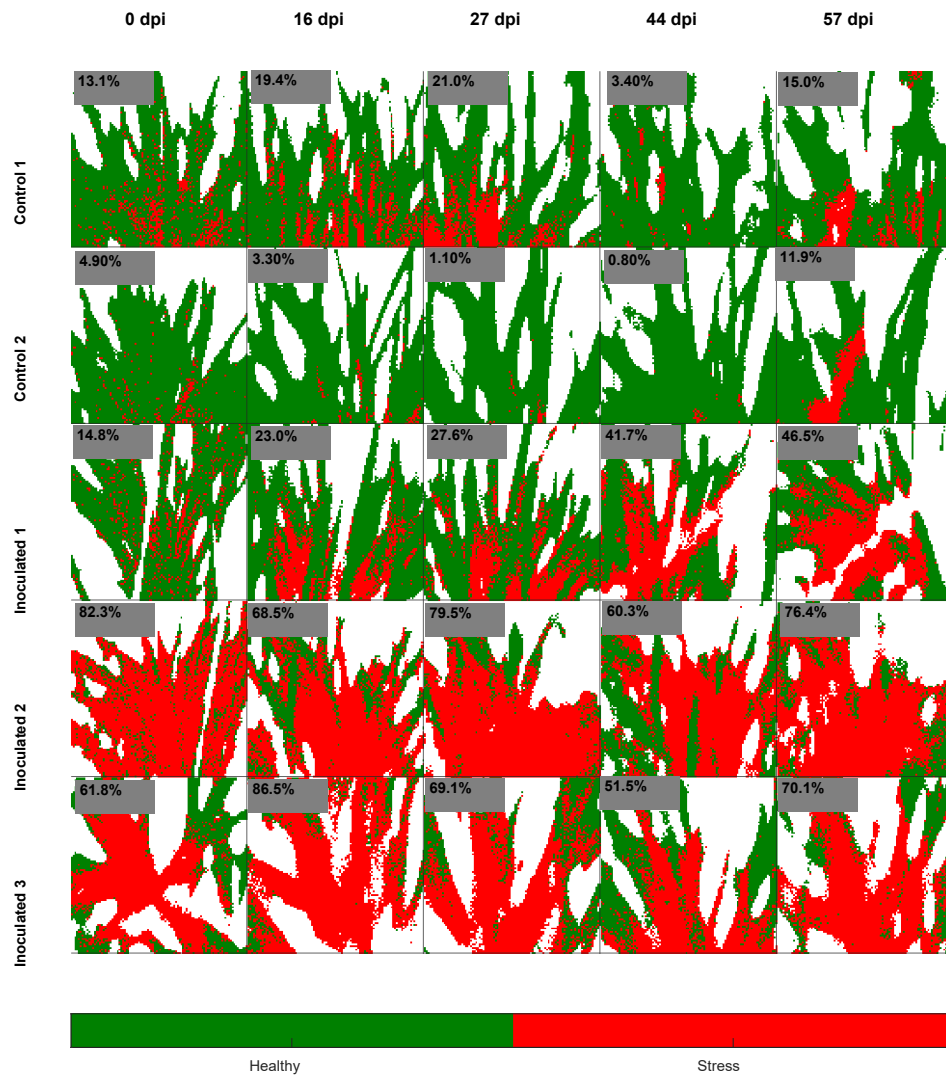


Figure 4.4-6 Prediction set for genotype A at different dpi with the percentages of stress-associated pixels in the ROI's.

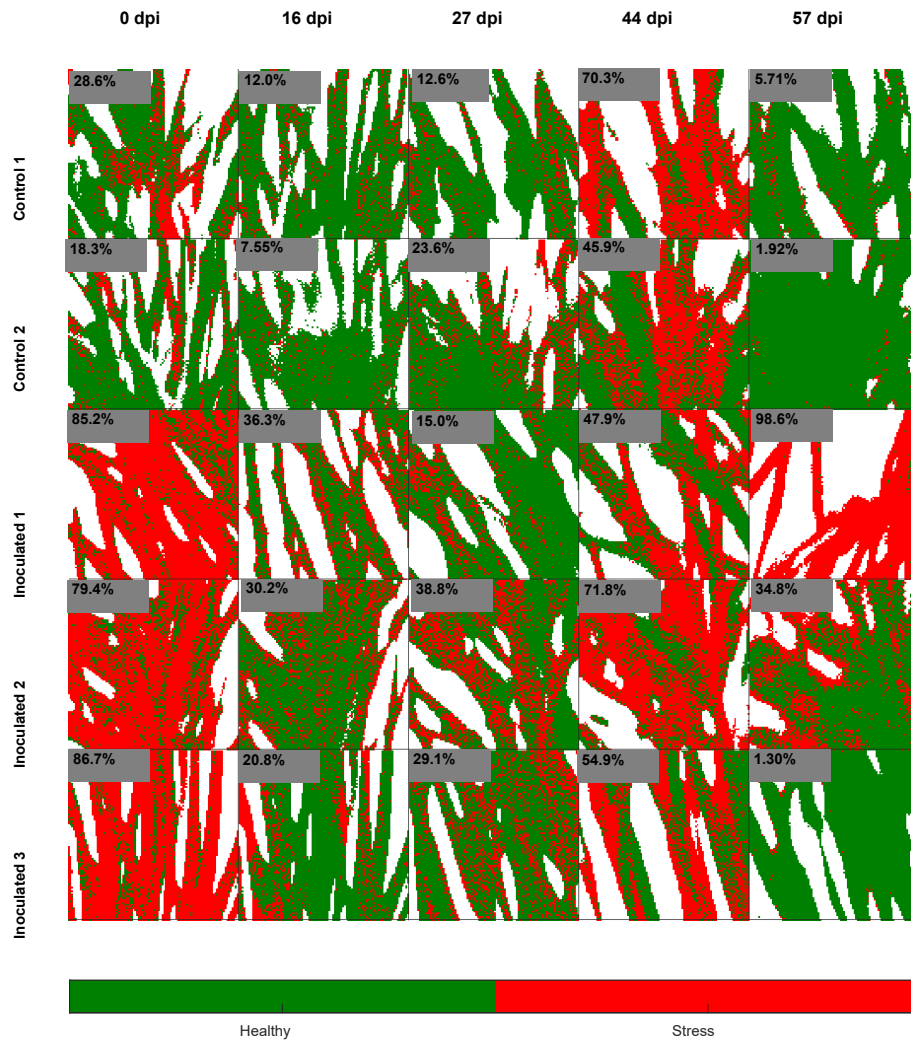


Figure 4.4-7 Prediction set for genotype B at different dpi, with the percentages of stress-associated pixels in the ROI's

4.4.5 Conclusions

This study highlights the potential of hyperspectral imaging (HSI) combined with multivariate statistical models as an effective tool for the early detection of *F. circinatum* infection in asymptomatic *P. radiata* cuttings. By identifying spectral profiles associated with the initial stages of infection, our approach enables rapid, non-destructive monitoring, addressing a critical gap in traditional diagnostic methodologies that rely on visible symptoms. Our findings demonstrate that spectral changes induced by *F. circinatum* infection can be detected well before the manifestation of visible symptoms, particularly through alterations in the visible, red-edge and near-infrared (NIR) regions of the spectrum. PCA effectively distinguished infected from control samples by capturing critical spectral variations, with genotype A exhibiting earlier and more pronounced spectral responses than genotype B. These differences suggest potential phenotypic and macroscopic compositional variability that is directly correlated with the genotypic variability in resistance, which should be further explored to refine detection strategies and improve disease management. The classification models developed using PLS-DA exhibited promising performance, with improved sensitivity and specificity after 27 days post-inoculation (dpi) for genotype A. The model's capability to identify infection in asymptomatic stages is particularly relevant for forest nurseries, where early intervention can significantly reduce pathogen spread and economic losses. Moreover, the external validation confirmed the robustness of our approach, reinforcing the potential for practical

implementation in large-scale forestry applications. Despite these promising results, some limitations should be considered. The delayed spectral response observed in genotype B suggests that genetic factors may influence disease progression and detection. Additionally, while our study successfully demonstrates the feasibility of HSI for disease monitoring, further research is needed to refine spectral models, integrate additional environmental variables, and explore real-time field applications. Overall, this research contributes to the development of precision forestry techniques for disease management, supporting the sustainability of *P. radiata* plantations. The integration of HSI with advanced data analysis techniques presents a valuable strategy for enhancing early detection protocols, potentially reducing the reliance on labour-intensive molecular diagnostics. Future studies should focus on expanding the dataset to include diverse genetic backgrounds and environmental conditions to optimize the detection framework for broader application in forest health monitoring.

4.4.6 Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

4.4.7 Acknowledgement

This research was conducted with the sponsorship of ANID project FONDECYT 1221387, FOVI 220172, Martin Bravo also thanks the National Grant N 21201971 and Carlos Douglas nursery of Forestal Mininco, Chile.

4.4.8 References

- [1] Wingfield MJ, Hammerbacher A, Ganley RJ, Steenkamp ET, Gordon TR, Wingfield BD, et al. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - A growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology* 2008;37:319–34. <https://doi.org/10.1071/AP08036>.
- [2] Ahumada R, Rotella A. Disease Management in the Forest Plantations in Chile. *Forest Pest and Disease Management in Latin America*, Cham: Springer International Publishing; 2020, p. 171–84. https://doi.org/10.1007/978-3-030-35143-4_11.
- [3] Drenkhan R, Ganley B, Martín-García J, Vahalík P, Adamson K, Adamčíková K, et al. Global geographic distribution and host range of *fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker. *Forests* 2020;11. <https://doi.org/10.3390/F11070724>.
- [4] Carrasco A, Sanfuentes E, Durán Á, Valenzuela S. Cancro resinoso del pino: ¿una amenaza potencial para las plantaciones de *Pinus radiata* en Chile? *Gayana Bot* 2016;73:369–80. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432016000200369>.
- [5] Fernandes L, Paiva D, Roxo I, Fernandes AR, Ribeiro D, Ribeiro H, et al. Development of New Preventive Strategies for Pine Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* in Irrigation Water and Evaluation in a Real Nursery Context. *Forests* 2023;14:443. <https://doi.org/10.3390/f14030443>.

- [6] Aguayo J, Fourrier-Jeandel C, Capdevielle X, Vétillard F, Piou D, Iturrutxa E, et al. Assessment of molecular detection of *Fusarium circinatum* in insects and passive spore traps in *Pinus radiata* plantations. For Pathol 2020;50. <https://doi.org/10.1111/efp.12574>.
- [7] Fariña-Flores D, Berbegal M, Iturrutxa E, Hernandez-Escribano L, Aguin O, Raposo R. Temporal and Spatial Variation in the Population Structure of Spanish *Fusarium circinatum* Infecting Pine Stands. Journal of Fungi 2023;9:159. <https://doi.org/10.3390/jof9020159>.
- [8] Bravo-Arrepol M, Sanfuentes E, Hasbún R, Smith M, Sandoval-Santander V, Fuentes CA, et al. Light-driven incubation of *Fusarium* species and near-infrared spectroscopy for an early in vitro identification of *Fusarium circinatum*. Microchemical Journal 2024;205. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.111168>.
- [9] Williams P, Manley M, Fox G, Geladi P. Indirect detection of *Fusarium verticillioides* in maize [Zea mays L kernels by near infrared hyperspectral imaging. J Near Infrared Spectrosc 2010;18:49–58. <https://doi.org/10.1255/jnirs.858>.
- [10] Williams PJ, Geladi P, Britz TJ, Manley M. Near-infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate image analysis to study growth characteristics and differences between species and strains of members of the genus

Fusarium. Anal Bioanal Chem 2012;404:1759–69.
<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6313-z>.

- [11] Chen Z, Yang X, Xia H, Wu C, Yang J, Dai T. A Frontline, Rapid, Nucleic Acid-Based *Fusarium circinatum* Detection System Using CRISPR/Cas12a Combined with Recombinase Polymerase Amplification. Plant Dis 2023;107:1902–10. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1234-RE>.
- [12] Stehlíková D, Luchi N, Aglietti C, Pepori AL, Diez JJ, Santini A. Real-time Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of *Fusarium Circinatum*. Biotechniques 2020;69:11–7. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0168>.
- [13] Visser EA, Kampmann TP, Wegrzyn JL, Naidoo S. Multispecies comparison of host responses to *Fusarium circinatum* challenge in tropical pines show consistency in resistance mechanisms. Plant Cell Environ 2023;46:1705–25. <https://doi.org/10.1111/pce.14522>.
- [14] Zamora-Ballesteros C, Pinto G, Amaral J, Valledor L, Alves A, Diez JJ, et al. Dual RNA-Sequencing Analysis of Resistant (*Pinus pinea*) and Susceptible (*Pinus radiata*) Hosts during *Fusarium circinatum* Challenge. Int J Mol Sci 2021;22:5231. <https://doi.org/10.3390/ijms22105231>.
- [15] SAG. Instructivo técnico para el diagnóstico de *Fusarium circinatum* en muestras de viveros bajo control oficial. Servicio Agrícola y Ganadero 2008:1–21.

- [16] Schweigkofler W, O'Donnell K, Garbelotto M. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:3512–20. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3512-3520.2004>.
- [17] Martinelli F, Scalenghe R, Davino S, Panno S, Scuderi G, Ruisi P, et al. Advanced methods of plant disease detection. A review. *Agron Sustain Dev* 2015;35:1–25. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1>.
- [18] Wan L, Li H, Li C, Wang A, Yang Y, Wang P. Hyperspectral Sensing of Plant Diseases: Principle and Methods. *Agronomy* 2022;12. <https://doi.org/10.3390/agronomy12061451>.
- [19] Yu R, Ren L, Luo Y. Early detection of pine wilt disease in *Pinus tabuliformis* in North China using a field portable spectrometer and UAV-based hyperspectral imagery. *For Ecosyst* 2021;8:44. <https://doi.org/10.1186/s40663-021-00328-6>.
- [20] Fang S, Cui R, Wang Y, Zhao Y, Yu K, Jiang A. Application of multiple spectral systems for the tree disease detection: A review. *Appl Spectrosc Rev* 2023;58:83–109. <https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1930552>.
- [21] Wu W, Zhang Z, Zheng L, Han C, Wang X, Xu J, et al. Research progress on the early monitoring of pine wilt disease using hyperspectral techniques. *Sensors (Switzerland)* 2020;20:1–16. <https://doi.org/10.3390/s20133729>.

- [22] Pan J, Lin J, Xie T. Exploring the Potential of UAV-Based Hyperspectral Imagery on Pine Wilt Disease Detection: Influence of Spatio-Temporal Scales. *Remote Sens (Basel)* 2023;15. <https://doi.org/10.3390/rs15092281>.
- [23] Li N, Huo L, Zhang X. Classification of pine wilt disease at different infection stages by diagnostic hyperspectral bands. *Ecol Indic* 2022;142. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109198>.
- [24] Mahlein AK, Rumpf T, Welke P, Dehne HW, Plümer L, Steiner U, et al. Development of spectral indices for detecting and identifying plant diseases. *Remote Sens Environ* 2013;128:21–30. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2012.09.019>.
- [25] Burger J, Gowen A. Data handling in hyperspectral image analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2011;108:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.04.001>.
- [26] Cruz-Tirado JP, Amigo JM, Barbin DF, Kucheryavskiy S. Data reduction by randomization subsampling for the study of large hyperspectral datasets. *Anal Chim Acta* 2022;1209. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339793>.
- [27] Brereton RG, Lloyd GR. Partial least squares discriminant analysis: Taking the magic away. *J Chemom* 2014;28:213–25. <https://doi.org/10.1002/cem.2609>.
- [28] Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J Chemom* 2003;17:166–73. <https://doi.org/10.1002/cem.785>.

- [29] Ballabio D, Consonni V. Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. Analytical Methods 2013;5:3790–8. <https://doi.org/10.1039/C3AY40582F>.
- [30] Brereton RG. Chemometrics for pattern recognition. 1st ed. 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470746462>.
- [31] Mobaraki N, Amigo JM. HYPER-Tools. A graphical user-friendly interface for hyperspectral image analysis. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 2018;172:174–87. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2017.11.003>.
- [32] Peñuelas J, Filella I. Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological status. 1998.
- [33] Lowe A, Harrison N, French AP. Hyperspectral image analysis techniques for the detection and classification of the early onset of plant disease and stress. Plant Methods 2017;13. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0233-z>.

5 CONCLUSIONES

5.1 Conclusión del primer objetivo específico (base de datos)

En los estudios descritos en la sección 4.1 del capítulo IV, se estableció la adquisición sistemática de espectros en la región del infrarrojo cercano (NIR), generándose así registros comparables de distintas cepas de *Fusarium*, tales como *F. circinatum*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum* y *F. tricinctum*, bajo dos condiciones lumínicas y en diferentes etapas de crecimiento micelial. Paralelamente, en el Capítulo VI se evaluó la factibilidad de incorporar en la base de datos mediciones hiperespectrales del sustrato inoculado, evidenciándose un aumento generalizado en la reflectancia de las muestras infectadas, aunque sin bandas espectrales específicas. Por su parte, los resultados del Capítulo VII demostraron la utilidad de la microespectroscopía FT-IR para caracterizar diferencias químicas en acículas de *P. radiata* infectadas, reforzando la pertinencia de incluir datos espectrales del material vegetal en la base de datos. Finalmente, en el Capítulo VIII se documentó la adquisición de imágenes hiperespectrales en plántulas de diferentes genotipos, contribuyendo al conjunto de información sobre la variabilidad espectral asociada a la presencia del patógeno en estadios tempranos. En conjunto, estos aportes consolidan una plataforma analítica diversa y robusta, capaz de incluir hongos aislados, tejido vegetal y sustrato, cumpliendo así con los lineamientos metodológicos planteados en el primer objetivo específico.

5.2 Conclusión del segundo objetivo específico (modelos desarrollados)

En el Capítulo IV parte I, el uso de espectroscopía NIR combinado con técnicas multivariantes (como PLS-DA) demostró un alto potencial para la identificación rápida y confiable de *F. circinatum* en cultivos *in vitro*, lográndose clasificaciones correctas superiores al 97%. Esto permitió validar un esquema inicial de reconocimiento fúngico basado en huellas espectrales.

Posteriormente, en el capítulo IV parte II se adaptó el análisis al estudio de sustratos con inoculación controlada, comprobándose que, si bien el cambio en la reflectancia no presentaba bandas distintivas altamente marcadas, las variaciones globales fueron suficientes para discriminar entre sustratos sanos e infectados. El Capítulo IV parte III reforzó la factibilidad de esta aproximación al evidenciar, mediante microespectroscopía FT-IR, diferencias químicas en acículas infectadas, lo que confirma que la infección puede ser identificada con metodologías basadas en espectroscopia IR y análisis quimiométrico. Finalmente, en el Capítulo IV parte IV se implementó la imagen hiperespectral en plántulas bajo condiciones más cercanas a la realidad de vivero, de modo que la combinación de reflectancia espectral y modelado estadístico permitió clasificar tempranamente plantas inoculadas con un alto nivel de exactitud, aún en fases asintomáticas.

De esta manera, la evidencia reunida en los capítulos IV consolida la validez de las metodologías analíticas basadas en espectroscopia (NIR, FT-IR, y sistemas

hiperespectrales) y quimiometría, cumpliendo el objetivo de instaurar procesos tempranos de identificación de *F. circinatum* en diferentes matrices (cultivo puro, sustratos y tejido vegetal).

5.3 Conclusiones del objetivo específico 3 (Localización)

En el Capítulo IV, Parte I, se determinó que, en condiciones *in vitro* utilizando medio de cultivo PDA, las regiones centrales e intermedias del micelio proporcionaron la información espectral más relevante para la diferenciación entre especies del género *Fusarium*.

En el Capítulo IV parte III se profundizó en la detección de cambios químicos en el tejido vegetal (acículas), determinándose que la infección produce alteraciones estructurales suficientes para ser rastreadas por microespectroscopía FT-IR

En el Capítulo IV parte IV proporcionó un escenario aún más representativo: la aplicación de la imagen hiperespectral en plántulas reales cuyo estrés fue localizado en el terminal superior de dos genotipos distintos de *P. radiata*. El nivel de propagación se realizó a través del conteo de píxeles scores del análisis de componente principal, que permitió establecer umbrales de detección o de infección en la plántula a través del tiempo. Los resultados demostraron que los cambios espectrales pueden variar entre genotipos, pero aun así se logró una clasificación temprana y robusta de las plantas inoculadas, validando el uso de estas metodologías en un contexto genéticamente diverso. Así, se concluye que la utilización combinada de sistemas espectroscópicos e inteligencia

computacional ofrece una estrategia versátil y adaptable a diferentes condiciones, posicionándose como un potencial recurso de diagnóstico precoz en viveros forestales y ensayos de mejoramiento genético.

5.4 Conclusiones del objetivo específico 4.

En los capítulos V y VI se evidencia que estos métodos tradicionales, pese a su efectividad y especificidad, conllevan tiempos de respuesta prolongados, requieren infraestructura y personal altamente especializado, y no resultan prácticos para un muestreo masivo

Por el contrario, las aproximaciones espectroscópicas analizadas (NIR, FT-IR y sistemas hiperespectrales) ofrecen la posibilidad de un análisis rápido, no destructivo y con gran capacidad de procesamiento de muestras, como se observa en los capítulos VII y VI.

La validación en viveros no se realizó por restricciones cuarentenarias y dificultades logísticas para trasladar muestras y equipos. Tales obstáculos limitaron la evaluación de los procedimientos en condiciones de campo o semi-campo, postergando una validación integral en entornos productivos reales. No obstante, la evidencia generada en laboratorio confirma el potencial de estas herramientas, posicionándolas como candidatas sólidas para su futura aplicación en el sector forestal, una vez superadas las barreras reglamentarias y técnicas que impidieron su despliegue en viveros.

5.5 Conclusión global

La evidencia reunida en los capítulos IV y sus respectivas secciones, confirma la factibilidad de aplicar técnicas espectroscópicas y análisis quimiométricos para la detección temprana de *F. circinatum* en el contexto forestal, reforzando la propuesta central de la tesis. Las metodologías evaluadas (NIR, FT-IR y sistemas hiperespectrales), respaldadas por modelos estadísticos avanzados, permitieron discriminar al patógeno de manera consistente en cultivos puros, sustratos inoculados y plántulas de *P. radiata*, aun antes de la manifestación de síntomas visibles. Si bien no se logró una validación en viveros forestales por motivos logísticos y regulatorios, los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio avalan la solidez de los procedimientos propuestos como alternativa o complemento a las técnicas tradicionales, sobre todo cuando se requiere un diagnóstico de alta capacidad y de menor tiempo de respuesta.

Por tanto, la hipótesis planteada al inicio de esta tesis queda confirmada en el ámbito de pruebas controladas: los métodos espectroscópicos, combinados con el tratamiento computacional adecuado, constituyen una herramienta efectiva para detectar y diferenciar *F. circinatum*, abriendo la puerta a futuras implementaciones prácticas una vez superadas las limitaciones en el traslado de equipamiento y material patógeno. Se espera que, con el desarrollo de dispositivos portátiles y la optimización de protocolos en campo, esta estrategia analítica se consolide como un aporte significativo a la sanidad forestal, tanto en

la prevención de nuevos brotes como en el apoyo a programas de mejoramiento genético de *P. radiata*.

