

Gómez Giráldez, P.; Aragonés, D.; Jiménez, M.; Cendrero-Mateo, M.; Muela, J.; Moncholi-Estornell, A.; Moreno, J.; Cobos, J. Estrategia de muestreo espacial multiescala para el diseño de campañas de validación dentro del proyecto SpaFLEX

# Estrategia de muestreo espacial multiescala para el diseño de campañas de validación dentro del proyecto SpaFLEX

**Gómez Giráldez, Pedro Jesús**<sup>1</sup> **Aragonés, David**<sup>1</sup> **Jiménez, Marcos**<sup>2</sup> **Cendrero-Mateo, M<sup>a</sup> Pilar**<sup>3</sup> **Muela, Jimmy**<sup>2</sup> **Moncholi-Estornell, Adrián**<sup>3</sup> **Moreno, José**<sup>3</sup> **Cobos, Joaquín**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), Sevilla, España

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Tecnología Aeroespacial (INTA), Torrejón de Ardoz, España

<sup>3</sup> Laboratory for Earth Observation, Universidad de Valencia, Paterna, España

**ORCID:** Gómez Giráldez [0000-0002-1247-7557](https://orcid.org/0000-0002-1247-7557) Aragonés [0000-0003-4989-9005](https://orcid.org/0000-0003-4989-9005) Jiménez [0000-0002-6852-2732](https://orcid.org/0000-0002-6852-2732) Cendrero-Mateo [0000-0001-5887-7890](https://orcid.org/0000-0001-5887-7890) Muela [0009-0002-9524-5483](https://orcid.org/0009-0002-9524-5483) Moncholi-Estornell [0000-0002-8832-2594](https://orcid.org/0000-0002-8832-2594) Moreno [0000-0002-5283-3333](https://orcid.org/0000-0002-5283-3333) Cobos [0000-0003-0285-7617](https://orcid.org/0000-0003-0285-7617)

**Correspondencia:** [pedro.gomez@ebd.csic.es](mailto:pedro.gomez@ebd.csic.es) [daragones@ebd.csic.es](mailto:daragones@ebd.csic.es) [jimenezmm@inta.es](mailto:jimenezmm@inta.es) [m.pilar.cendrero@uv.es](mailto:m.pilar.cendrero@uv.es) [jmuepil@inta.es](mailto:jmuepil@inta.es) [adrian.moncholi@uv.es](mailto:adrian.moncholi@uv.es) [jose.moreno@uv.es](mailto:jose.moreno@uv.es) [joaquin.cobos@ebd.csic.es](mailto:joaquin.cobos@ebd.csic.es)

## RESUMEN

La validación de los productos de la misión The Fluorescence Explorer (FLEX) requiere estrategias de muestreo estadísticamente robustas que garanticen la representatividad espacial de las mediciones de campo a la resolución del píxel de 300 × 300 m. Los requisitos de incertidumbre de la misión (<30% global, ~10% para fluorescencia y ~1% para reflectancia) exigen protocolos rigurosos. Este trabajo presenta una metodología integral de muestreo estratificado desarrollada en el marco del proyecto SpaFLEX, implementada en cuatro zonas correspondientes a dos sitios Cal/Val en España: dos encinares (Sarrión y Manzanera, Teruel) y dos matorrales mediterráneos en el Parque Nacional de Doñana (Monteblanco y Montenegro). La metodología integra: análisis de autocorrelación espacial mediante índice de Moran para selección de variables proxy, determinación del número óptimo de unidades de muestreo (Elementary Sampling Unit, ESU) a través de un muestreo estratificado y cuantificación de la variabilidad intra-ESU usando imágenes hiperespectrales de alta resolución (4 cm). Los resultados demuestran que se requieren 6-7 ESUs por zona y 5-12 puntos de medición por ESU para cumplir los umbrales FLEX.

**Palabras clave:** FLEX, muestreo estratificado, escalado, Sentinel-2, Dron

Fecha de recepción: 18 febrero 2026 · Fecha de aceptación: 18 febrero 2026

# Estrategia de muestreo espacial multiescala para el diseño de campañas de validación dentro del proyecto SpaFLEX

Gómez Giráldez, Pedro Jesús <sup>(1)</sup>, Aragonés, David <sup>(1)</sup>, Jiménez, Marcos <sup>(2)</sup>, Cendrero-Mateo, M<sup>a</sup> Pilar <sup>(3)</sup>, Muela, Jimmy <sup>(2)</sup>, Moncholi-Estornell, Adrián <sup>(3)</sup>, Moreno, José <sup>(3)</sup>, Cobos, Joaquín <sup>(1)</sup>




<sup>(1)</sup> Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), España.

 0000-0002-1247-7557, pedro.gomez@ebd.csic.es ;  0000-0003-4989-9005, daragones@ebd.csic.es  
 0000-0003-0285-7617, joaquin.cobos@ebd.csic.es.

<sup>(2)</sup> Instituto Nacional de Tecnología Aeroespacial (INTA), Torrejón de Ardoz, España.

 0000-0002-6852-2732, jimenezmm@inta.es ;  0009-0002-9524-5483, jmuepil@inta.es

<sup>(3)</sup> Laboratory for Earth Observation, Universidad de Valencia, España.

 0000-0001-5887-7890, m.pilar.cendrero@uv.es ;  0000-0002-8832-2594, adrian.moncholi@uv.es  
 0000-0002-5283-3333, jose.moreno@uv.es

**Resumen:** La validación de los productos de la misión *The Fluorescence Explorer* (FLEX) requiere estrategias de muestreo estadísticamente robustas que garanticen la representatividad espacial de las mediciones de campo a la resolución del píxel de 300 × 300 m. Los requisitos de incertidumbre de la misión (<30% global, ~10% para fluorescencia y ~1% para reflectancia) exigen protocolos rigurosos. Este trabajo presenta una metodología integral de muestreo estratificado desarrollada en el marco del proyecto SpaFLEX, implementada en cuatro zonas correspondientes a dos sitios Cal/Val en España: dos encinares (Sarrión y Manzanera, Teruel) y dos matorrales mediterráneos en el Parque Nacional de Doñana (Monteblanco y Montenegro). La metodología integra: análisis de autocorrelación espacial mediante índice de Moran para selección de variables proxy, determinación del número óptimo de unidades de muestreo (*Elementary Sampling Unit*, ESU) a través de un muestreo estratificado y cuantificación de la variabilidad intra-ESU usando imágenes hiperespectrales de alta resolución (4 cm). Los resultados demuestran que se requieren 6-7 ESUs por zona y 5-12 puntos de medición por ESU para cumplir los umbrales FLEX.

**Palabras clave:** FLEX, muestreo estratificado, escalado, Sentinel-2, Dron

## ***Multiscale spatial sampling strategy for the design of validation campaigns within the SpaFLEX project***

**Abstract:** Validation of products from the *Fluorescence Explorer* (FLEX) mission requires statistically robust sampling strategies that ensure the spatial representativeness of field measurements at the 300 × 300 m pixel resolution. The mission's uncertainty requirements (<30% global, ~10% for fluorescence and ~1% for reflectance) demand rigorous protocols. This work presents a comprehensive stratified sampling methodology developed within the framework of the SpaFLEX project, implemented across four zones corresponding to two Cal/Val sites in Spain: two holm oak woodlands (Sarrión and Manzanera, Teruel) and two Mediterranean shrublands in Doñana National Park (Monteblanco and Montenegro). The methodology integrates: spatial autocorrelation analysis using Moran's index for proxy variable selection, determination of the optimal number of Elementary Sampling Units (ESUs) through stratified sampling, and quantification of intra-ESU variability using high-resolution hyperspectral imagery (4 cm). Results demonstrate that 6–7 ESUs per zone and 5–12 measurement points per ESU are required to meet FLEX thresholds.

**Keywords:** FLEX, stratified sampling, Sentinel-2, UAV

## 1. INTRODUCCIÓN

La fluorescencia inducida por el sol (SIF) y la radiancia reflejada de la vegetación terrestre serán productos operativos clave de nivel 2 proporcionados por la misión

*FLuorescence EXplorer* (FLEX) de la Agencia Espacial Europea (ESA), cuyo lanzamiento está previsto para 2026 (ESA, 2017). La fiabilidad de estos productos debe evaluarse mediante un proceso de validación que compare los productos satelitales con datos de

referencia fiducial procedentes de mediciones in situ. La teledetección de SIF representa un campo en rápido avance, con capacidades emergentes para metodologías satelitales y diversas aplicaciones prospectivas (Mohammed *et al.*, 2019). La validación de productos FLEX sigue las recomendaciones del CEOS, que establecen un marco de muestreo anidado basado en Unidades Elementales de Muestreo (ESU) para conectar mediciones de campo con productos satelitales (Morissette *et al.*, 2006).

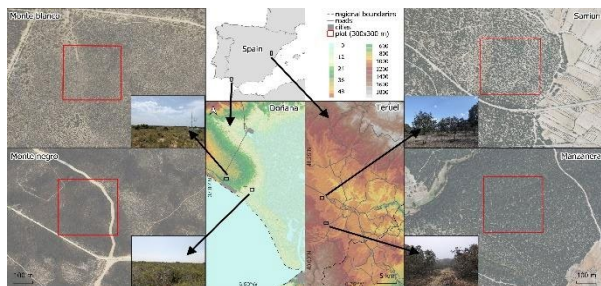
Según el Documento de Requisitos de la Misión FLEX (MRD), las incertidumbres deben ser inferiores al 30% globalmente, aproximadamente 10% para la eficiencia fotosintética mediante emisión de fluorescencia, 10% para la irradiancia solar y aproximadamente 1% para la incertidumbre aparente de reflectancia. El proyecto SpaFLEX, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España, tiene como objetivo desarrollar e implementar protocolos rigurosos de calibración y validación (Cal/Val) que conecten las observaciones in situ con las estimaciones satelitales a escala de píxel FLEX (300 × 300 m).

El objetivo de este trabajo es presentar el marco teórico-algorítmico para cuantificar la heterogeneidad espacial de las variables biofísicas proxy de SIF y extinción no fotoquímica (NPQ) dentro de un píxel FLEX, determinar el diseño muestral óptimo que garantice la representatividad estadística minimizando el esfuerzo de campo y establecer una base para los posteriores procedimientos de escalado espacial y propagación del error cumpliendo con los requisitos de la misión FLEX.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Área de estudio

El estudio se desarrolló en cuatro parcelas de dos zonas Cal/Val en España (Fig. 1): dos encinares en la provincia de Teruel (Sarrión, de baja densidad arbórea, y Manzanera, de alta densidad arbórea); y dos sitios en el Parque Nacional de Doñana (Monteblanco, matorral xerófilo mediterráneo, y Montenegro, matorral húmedo). Esta diversidad ecológica proporciona diferentes regímenes de heterogeneidad espacial para evaluar la adaptabilidad de la metodología.



**Figura 1.** Mapa de situación de las 4 parcelas de estudio. Izquierda zona de matorral (Doñana); derecha zona de encinar (Teruel).

### 2.2. Diseño muestral

El diseño muestral de este trabajo se desarrolla en 3 etapas: 1) análisis de la heterogeneidad de la parcela, 2)

determinación del número de ESUs (*Elementary Sampling Units*) mediante un muestreo estratificado y 3) la determinación del número de puntos de muestreo dentro de la ESU.

#### 2.2.1. Análisis de la heterogeneidad espacial.

Este apartado presenta dos análisis espaciales complementarios. Por un lado, se realizaron regresiones entre parámetros biofísicos derivados de imágenes Sentinel-2 y los correspondientes mapas de residuos mediante TerrSet, con el objetivo de evaluar la capacidad explicativa de cada variable y visualizar la distribución espacial de los errores del modelo. Por otro lado, se calculó la autocorrelación espacial de los valores originales de cada parámetro biofísico mediante el índice de Moran y su desviación estándar, utilizando Python, con el fin de cuantificar el grado de agrupamiento espacial inherente a cada variable. Este segundo análisis constituye el criterio principal para la selección de la variable más limitante sobre la que fundamentar la estratificación del área de estudio, bajo la premisa de que una mayor autocorrelación espacial indica una estructuración del paisaje más adecuada para definir unidades homogéneas.

#### 2.2.2. Determinación del número de ESUs.

La ESU se define con dimensiones de 20 × 20 m para coincidir con la resolución espacial de Sentinel-2, resultando en N = 225 ESUs candidatas por píxel FLEX. El tamaño muestral se determina mediante la fórmula integral de Cochran (1977) para muestreo aleatorio estratificado (Eq. 1):

$$n = \frac{\sum(N_h \times S_h)^2}{N^2 \times D + \sum(N_h \times S_h^2)} \quad (1)$$

donde D expresa la precisión deseada,  $N_h$  es el tamaño del estrato h, y  $S_h$  es la desviación estándar dentro del estrato. Esta fórmula optimiza la asignación considerando simultáneamente todos los estratos.

Una vez determinado n, se distribuye entre estratos mediante asignación óptima de Neyman (1934) (Eq. 2):

$$n_h = \frac{n \times (N_h \times S_h)}{\sum(N_h \times S_h)} \quad (2)$$

asignando más muestras a estratos con mayor variabilidad y tamaño. El número óptimo de estratos K se determinó mediante el índice de Calinski-Harabasz (Calinski & Harabasz, 1974).

Para que el muestreo estratificado sea operativamente válido, debe cumplirse  $n \geq 2 \times K$  (mínimo 2 ESUs por estrato para estimar varianza intra-estrato).

#### 2.2.3. Estimación del número de mediciones por ESU.

La caracterización de la variabilidad intra-ESU se realizó mediante datos hiperespectrales de muy alta resolución (~4 cm) obtenidos con la cámara Cubert S185 a bordo de un dron DJI Matrice 600, a una altura de vuelo de 120 m. Un aspecto metodológico crítico es la corrección por agregación espacial: el sensor de campo (FLOX) integra señal sobre un FOV de ~0.89 m de diámetro, correspondiendo a 495 píxeles por unidad FOV. Se

utilizaron índices de vegetación clave como proxies de medición: el *Photochemical Reflectance Index* (PRI) (Eq. 3, Peñuelas *et al.* 1995) para el NPQ, dado que refleja cambios en la reflectancia a 531 nm asociados a la conversión de violaxantina en zeaxantina en el ciclo de las xantofilas, el principal mecanismo de disipación térmica del exceso de energía luminosa subyacente al NPQ; y el índice de clorofila *Red Edge Chlorophyll Index* (ChIRE, Gitelson *et al.* 2005) (Eq. 4) para la fluorescencia, ya que el contenido de clorofila determina la cantidad de radiación absorbida disponible para la emisión de fluorescencia, siendo por tanto un indicador del potencial de emisión de la cubierta vegetal.

$$PRI = \frac{531 \text{ nm} - 570 \text{ nm}}{531 \text{ nm} + 570 \text{ nm}} \quad (3)$$

Donde 531 nm y 570 nm son los valores de reflectancia en longitudes de onda de 531 y 570 nanómetros respectivamente.

$$ChIRE = \frac{750 \text{ nm}}{710 \text{ nm}} - 1 \quad (4)$$

Donde 750 nm y 710 nm son los valores de reflectancia en longitudes de onda de 750 y 710 nanómetros respectivamente.

Se aplicó la fórmula de Cochran para poblaciones finitas (Eq. 5) :

$$m = \frac{Z^2 \times \sigma^2}{E^2 + \frac{Z^2 \times \sigma^2}{M}} \quad (5)$$

donde:

m es el número de puntos de medición requeridos, M la población de unidades de medición potenciales (función del FOV del sensor),  $\sigma^2$  la varianza intra-ESU de la variable (ChIRE o PRI), Z el nivel de confianza 95% y E el error máximo permitido (10% para Fluorescencia, 1% para Reflectividad).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis de heterogeneidad espacial

La Tabla 1 presenta el análisis de autocorrelación espacial y variabilidad para las variables biofísicas derivadas de Sentinel-2 (usando el programa SNAP): fracción absorbida de la radiación fotosintéticamente activa (FAPAR), fracción de cobertura de la vegetación (FVC) y contenido de clorofila en hoja (Cab). La selección de la variable proxy se basó en identificar aquella con máxima heterogeneidad (mayor  $\sigma$ ) y mínima autocorrelación espacial (menor índice de Moran), valores altos de desviación estándar combinados con baja autocorrelación indican una distribución más aleatoria que requiere mayor esfuerzo muestral (Moran, 1950).

Los valores del índice de Moran muestran un patrón diferenciado entre ecosistemas: los matorrales mediterráneos presentan índices elevados (0.60-0.83), indicando fuerte autocorrelación espacial, mientras que los encinares muestran valores menores (0.11-0.41).

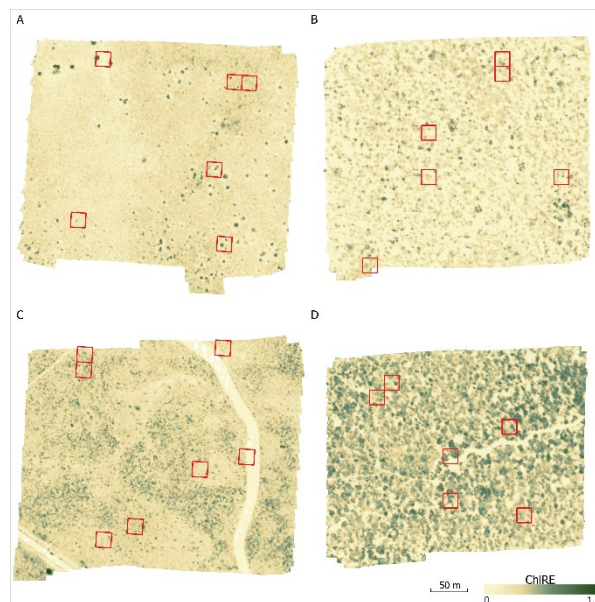
**Tabla 1.** Análisis de autocorrelación espacial y variabilidad por zona y variable biofísica

Variable	Parámetro	Sarrión	Manzanera	Monteblanco	Montenegro
Cab	$\sigma$	0.181	0.120	0.003	0.005
	Moran I	0.348	0.107	0.798	0.601
FVC	$\sigma$	0.002	0.001	0.002	0.003
	Moran I	0.368	0.459	0.827	0.608
FAPAR	$\sigma$	0.002	0.001	0.002	0.003
	Moran I	0.406	0.346	0.826	0.650

Esta diferencia refleja las características estructurales de cada ecosistema, donde los matorrales forman mosaicos de parches con alta conectividad espacial. Se seleccionó Cab como variable proxy atendiendo al balance entre heterogeneidad y autocorrelación espacial: en los encinares, Cab presenta la mayor variabilidad relativa ( $\sigma = 0.12-0.18$ ) con los menores índices de Moran (0.11-0.35), indicando una distribución espacial menos predecible que requiere mayor esfuerzo muestral. En los matorrales, aunque todas las variables muestran  $\sigma$  similares, Cab presenta valores de Moran ligeramente inferiores a FAPAR.

#### 3.2. Número de ESUs y mediciones por ESU.

La Tabla 2 presenta los resultados del muestreo estratificado. Todas las zonas requieren 6-7 ESUs tras aplicar la restricción de mínimos operativos ( $n \geq 2 \times K$  con  $K = 3$ ) (Fig. 2). Para el muestreo intra-ESU, la corrección por agregación espacial reduce el CV efectivo a ~1-2%, resultando en 1 punto por ESU para fluorescencia (ChIRE) y 5-12 puntos para reflectancia (PRI), siendo ésta la variable limitante



**Figura 2.** Distribución de las ESUs en las parcelas de estudio (A Monteblanco, B Sarrión, C Montenegro y D Manzanera) sobre la imagen de ChIRE tomado con la cámara hiperespectral.

**Tabla 2.** Resultados del muestreo estratificado y requerimientos intra-ESU.

Zona	CV Cab (%)	n ESUs	CV ChIRE (%)	m Fluo	CV PRI (%)	m Ref
Sarrión	10.0	6*	2.38	1	1.17	6
Manzanera	9.2	6*	1.68	1	1.07	5
Monteblanco	17.6	6*	1.81	1	1.17	6
Montenegro	32.6	7	1.59	1	1.72	12

\* Valores corregidos por restricción de mínimos operativos (mínimo 2 por estrato). CV: coeficiente de variación.

La convergencia hacia 6-7 ESUs independientemente del grado de heterogeneidad (CV 9-33%) indica que la restricción operativa mínima domina sobre el cálculo teórico de Cochran, resultado coherente con protocolos previos de validación de productos biofísicos (Baret *et al.*, 2006).

El PRI emerge como variable limitante, requiriendo 5-12 puntos frente a 1 punto para ChIRE. Esta asimetría refleja la mayor sensibilidad del PRI a la variabilidad espacial del NPQ a escala de dosel. Estudios previos han demostrado que el PRI correlaciona significativamente con el estado de de-epoxidación del ciclo de xantofilas, pero también está influenciado por la composición pigmentaria, lo que explica su mayor variabilidad espacial (Garbulsky *et al.*, 2011). La corrección por agregación espacial (495 píxeles/FOV) resulta esencial para reconciliar escalas de observación y hacer viables los umbrales FLEX MRD.

#### 4. CONCLUSIONES

El diseño establece un número manejable de ESUs y mediciones de campo para alcanzar el objetivo de errores inferiores al 10% en fluorescencia y 1% en reflectancia. El muestreo estratificado mediante la fórmula integral de Cochran con asignación óptima de Neyman resulta eficiente para todas las zonas analizadas, requiriendo 6-7 ESUs por zona independientemente del grado de heterogeneidad espacial (CV 9-33%).

La corrección por agregación espacial en el análisis intra-ESU es esencial para hacer viables los umbrales FLEX MRD. El PRI (reflectancia) es la variable limitante, determinando 5-12 puntos por ESU, mientras que fluorescencia (ChIRE) requiere solo 1 punto. El protocolo recomendado consiste en diseñar el muestreo según los requerimientos de reflectancia y obtener simultáneamente fluorescencia en los mismos puntos, garantizando cumplir ambos umbrales de incertidumbre con un único protocolo de campo. El escalado y los resultados de propagación de incertidumbre verificarán si estos errores permanecen dentro del límite permitido para un píxel FLEX de 300 × 300 m.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias a los proyectos SpaFLEXVal (PID2022-137022OB-C33) y SpaFLEXInt

(PCI2023-145988-2, PCI2023-145955-2, PCI2023-146023-2) financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Los autores participan en las Plataformas Temáticas Interdisciplinarias del CSIC PTI EcoBioDiv y PTI Teledetect. El apoyo logístico y técnico fue proporcionado por ICTS-RBD-CSIC.

#### 6. REFERENCIAS

- Baret, F., Morisette, J. T., Fernandes, R. A., Champeaux, J. L., Myneni, R. B., Chen, J., ... & Nickeson, J. E. (2006). Evaluation of the representativeness of networks of sites for the global validation and intercomparison of land biophysical products: Proposition of the CEOS-BELMANIP. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 44(7), 1794-1803.
- Calinski, T., & Harabasz, J. (1974). A dendrite method for cluster analysis. *Communications in Statistics*, 3(1), 1-27.
- Cochran, W. G. (1977). *Sampling Techniques* (3rd ed.). John Wiley & Sons.
- ESA (2017). Report for Mission Selection: FLEX. ESA SP-1330/2. European Space Agency.
- Garbulsky, M. F., Peñuelas, J., Gamon, J., Inoue, Y., & Filella, I. (2011). The photochemical reflectance index (PRI) and the remote sensing of leaf, canopy and ecosystem radiation use efficiencies: A review and meta-analysis. *Remote sensing of environment*, 115(2), 281-297.
- Gitelson, A. A., Viña, A., Ciganda, V., Rundquist, D. C., & Arkebauer, T. J. (2005). Remote estimation of canopy chlorophyll content in crops. *Geophysical Research Letters*, 32(8), L08403.
- Mohammed, G. H., Colombo, R., Middleton, E. M., Rascher, U., Van Der Tol, C., Nedbal, L., ... & Zarco-Tejada, P. J. (2019). Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence (SIF) in vegetation: 50 years of progress. *Remote sensing of environment*, 231, 111177.
- Moran, P. A. (1950). Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*, 37(1/2), 17-23.
- Morisette, J. T., Baret, F., Privette, J. L., Myneni, R. B., Nickeson, J. E., Garrigues, S., ... & Cook, R. (2006). Validation of global moderate-resolution LAI products: A framework proposed within the CEOS land product validation subgroup. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing*, 44(7), 1804-1817.
- Neyman, J. (1934). On the two different aspects of the representative method. *Journal of the Royal Statistical Society*, 97(4), 558-625
- Peñuelas, J.; Filella, I.; Gamon, J.A. Assessment of Photosynthetic Radiation-Use Efficiency with Spectral Reflectance. *New Phytol.* 1995, 131(3), 291–296.