

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 518**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/84 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2013 PCT/EP2013/069899**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15043623**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2013 E 13771432 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3049792**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para determinar un estado nutricional de una planta**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2020

73 Titular/es:
FOSS ANALYTICAL A/S (50.0%)
P.O. Box 260, Foss Allé 1
3400 Hilleroed, DK y
UNIVERSITY OF COPENHAGEN (50.0%)

72 Inventor/es:
CARSTENSEN, ANDREAS;
FRYDENVANG, JENS;
HUSTED, SØREN y
MAARSCHALKERWEERD, MARIE VAN

74 Agente/Representante:
GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 765 518 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para determinar un estado nutricional de una planta.

5 La presente invención proporciona un procedimiento para determinar el estado nutricional de una planta de acuerdo con la reivindicación 1. La presente invención proporciona un instrumento para determinar el estado nutricional de una planta de acuerdo con la reivindicación 12.

Antecedentes de la invención

10 La fotosíntesis es un proceso fisiológico que es fundamental para el funcionamiento de una planta. Por lo tanto, una medida del rendimiento de la fotosíntesis de una planta es una fuente valiosa de información para determinar el estado fisiológico de la planta. La fotosíntesis convierte la energía luminosa absorbida en energía química que puede ser utilizada por la planta, y se realiza a través de procesos complejos en los que la clorofila juega un papel esencial. Mientras que una gran parte de la energía de la luz absorbida por la planta se destina a la fotosíntesis, parte de ella sufre un enfriamiento no fotoquímico (en gran parte a través de la disipación de calor) o es re-emitida por la clorofila como fluorescencia. Dado que los tres mecanismos (fotosíntesis, enfriamiento no fotoquímico y fluorescencia de clorofila) son facilitados por la misma fuente de energía, una variación en el rendimiento de uno de estos procesos debido a factores bióticos o abióticos se reflejará en una variación en al menos uno de los otros procesos. Sin embargo, medir el balance energético completo para estos procesos no es posible en la práctica. No obstante, la señal de fluorescencia contiene una gran cantidad de información. Sin embargo, es una tarea muy desafiante descifrar esta información y derivar información de estudios de fluorescencia sobre el estado fisiológico de una planta, que es específica con respecto a la influencia de un parámetro en particular, como la deficiencia de un nutriente o grupo particular de nutrientes.

20 El proceso de fotosíntesis está sujeto a una cinética particular que se refleja en la dependencia del tiempo de la fluorescencia de la clorofila a. Tras la excitación con luz actínica, la fluorescencia de la clorofila a aumenta en una escala de tiempo de milisegundos hasta aproximadamente un segundo desde una intensidad de fluorescencia de fondo F_0 hasta una intensidad de fluorescencia máxima F_m , y a continuación, cae en una escala de tiempo de minutos. Este fenómeno se llama inducción de fluorescencia y puede observarse con mayor claridad en las hojas que inicialmente se han adaptado a la oscuridad para permitir el mayor aumento posible en el rendimiento de la fotosíntesis. La porción ascendente de la curva de inducción de fluorescencia exhibe una serie de mesetas, comúnmente denotadas por las letras O-J-I-P y, por lo tanto, puede denominarse aumento OJIP. Debido al vínculo entre los transitorios de fluorescencia de clorofila a y el proceso de fotosíntesis, el análisis de estos transitorios, y el aumento OJIP en particular, pueden utilizarse para proporcionar una prueba de referencia sobre el rendimiento general de una planta determinada. Sin embargo, generalmente es muy difícil aislar la influencia específica de un parámetro particular en el transitorio de inducción de fluorescencia de una planta determinada y derivar cualquier información específica sobre el estado de la planta, por ejemplo, con respecto a un nutriente específico. Excepcionalmente, se ha demostrado que es posible vincular directamente la relación de la diferencia entre la intensidad máxima y mínima (F_v) y la intensidad máxima (F_m) con el estado nutricional del manganeso, debido al papel muy directo que desempeña el manganeso en la fotosíntesis (Husted et al., *Plant Physiology*, 2009, pp. 825-833). Otros enfoques sugieren un análisis teórico detallado de los mecanismos físicos involucrados en los procesos de fotosíntesis para recuperar información sobre la salud general de la planta a partir de un análisis de los transitorios de inducción de fluorescencia (Stirbet et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biología*, 2011, pp. 236-257). Si bien se justifica en estudios científicos dirigidos a comprender los detalles de los procesos de fotosíntesis, los mencionados modelos físicos aún no están disponibles para su implementación en un instrumento destinado a determinar el estado nutricional específico de nutrientes de una planta. Además del procedimiento mencionado anteriormente con respecto al manganeso, los procedimientos disponibles por lo general no son adecuados para distinguir al menos hasta cierto nivel las influencias de diferentes nutrientes en una etapa temprana del desarrollo de la planta, en el campo y con resultados en el acto. Este tipo de información sería deseable, por ejemplo, para facilitar la micro-gestión de la fertilización para mejorar los cultivos agrícolas mientras se evita su uso excesivo. Si está disponible en una etapa temprana, esta información permitiría tomar medidas correctivas antes de que el daño al cultivo sea permanente.

45 Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento para determinar el estado nutricional de una planta con respecto a uno o más nutrientes, que aborde o supere al menos algunos de los desafíos mencionados anteriormente. El procedimiento debería ser capaz de distinguir al menos en cierta medida entre las influencias de diferentes nutrientes. Preferiblemente, el procedimiento debería ser adecuado para su implementación en un instrumento de medición móvil adecuado para su uso en el campo.

El documento WO 03/081217 A1 divulga un procedimiento y un aparato para investigar una o más deficiencias nutricionales, por ejemplo, deficiencias de manganeso o boro, en base a la medición de resolución temporal de la fluorescencia de la clorofila y la comparación de parámetros de fluorescencia como, por ejemplo, los valores máximos de fluorescencia con valores de referencia.

50 En "Evaluación del estado nodulado de *Vigna unguiculata* examinado por la prueba JIP en base al aumento de la fluorescencia de la clorofila a", *Science Access* 3(1), 2001, Schmitz et al. Se presenta la evaluación de la deficiencia de nitrato en base a la detección de la altura del pico K en la curva O-K-J-I-P de la fluorescencia de la clorofila a. El procesamiento de datos incluye la doble normalización seguida por la resta de una curva de referencia.

En "La deficiencia latente de manganeso en la cebada puede diagnosticarse y remediarse en base a las mediciones de la fluorescencia de la clorofila a", Plant Soil 372:417-429 (2013), Schmidt et al. Se presenta la caracterización de las deficiencias de Mn de las plantas de cebada a través del análisis de la cinética de inducción de fluorescencia de clorofila a.

5 Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar un estado nutricional de una planta con respecto a uno o más nutrientes de acuerdo con la reivindicación 1. El procedimiento comprende los pasos de:

- 10 - registrar una serie de tiempo de una señal de inducción de fluorescencia de una muestra de tejido de la planta al usar un dispositivo fluorómetro para obtener una serie temporal de datos de señal, en la que la serie temporal de datos de señal comprenda al menos datos de señal dentro de la porción de aumento de la señal de inducción de la fluorescencia de la clorofila a, y
- 15 - determinar el estado nutricional a partir de un modelo empírico aplicado a la serie temporal de datos de señal, en el que el modelo empírico se basa en series temporales de datos de referencia pre-registrados pre-procesados para mejorar los componentes no lineales de los mismos al suprimir los componentes de orden inferior de los mismos y relaciona estados nutricionales con cambios en componentes no lineales de los mismos de la progresión de dependencia temporal de las series temporales de datos de señal pre-procesados de manera similar.

20 En el contexto de la presente solicitud, el término 'nutriente' se refiere a un elemento químico que se considera esencial para que una planta complete un ciclo de vida completo. El término 'nutriente' incluye los elementos oxígeno (O), hidrógeno (H), carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), azufre (S), magnesio (Mg), boro (B), cloro (Cl), manganeso (Mn), hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y níquel (Ni).

25 El estado nutricional de una planta con respecto a uno o más nutrientes puede describirse como saludable, cuando la planta contiene cantidades suficientes de estos nutrientes para funcionar correctamente. Si la planta solo contiene cantidades insuficientes de uno o más nutrientes, la falta de nutrientes afecta la salud de la planta y el estado nutricional se describe como deficiente. El procedimiento según la presente invención controla el funcionamiento del proceso de fotosíntesis al registrar el transitorio de fluorescencia y al relacionar las variaciones en la forma de la curva transitoria de la fluorescencia con las variaciones en las concentraciones de nutrientes en la planta. En consecuencia, el procedimiento detecta la parte 'bioactiva' de la concentración de nutrientes, que es la parte que tiene un efecto en el funcionamiento de la planta, en este caso la fotosíntesis. Una planta a cualquier edad dada está deficiente en nutrientes, si la concentración bioactiva es insuficiente para que la planta funcione correctamente. Como tal, este procedimiento es capaz de detectar estados nutricionales deficientes con respecto a uno o más nutrientes.

30 Los datos de inducción de fluorescencia de resolución temporal pueden obtenerse al usarse un fluorómetro de excitación continua como, por ejemplo, el "Handy PEA" disponible comercialmente de Hansatech Instruments; o cualquier dispositivo de medición de inducción de fluorescencia que proporcione una curva de inducción de fluorescencia de resolución temporal con una resolución temporal suficiente para resolver la forma de las propiedades de O-J-I-P en la porción de aumento del transitorio de inducción de la fluorescencia. En el mencionado instrumento, se ilumina con luz actínica una muestra de tejido, como, por ejemplo, una hoja, lo que activa y satura el fotosistema II de la muestra de tejido. La fluorescencia resultante es recogida a continuación por un detector capaz de medir la intensidad de fluorescencia emitida por la muestra de tejido en función del tiempo. En el instrumento "Handy PEA", la luz actínica es provista por una fuente LED con un máximo espectral a una longitud de onda de alrededor de 650nm y una intensidad de 3000 micro-moles de fotones/(m²*s), y al utilizar filtros ópticos para bloquear la fuente de LED, la fluorescencia de la clorofila a se recoge a longitudes de onda superiores a 650nm al utilizar un fotodiodo PIN como detector. El rango espectral de detección debe incluir una porción significativa del rango espectral de la emisión de fluorescencia de clorofila a para proporcionar una representación confiable de la cinética de inducción. La fluorescencia de la clorofila a tiene un máximo pronunciado a una longitud de onda de alrededor de 680nm y, por lo tanto, un intervalo típico de detección incluiría este máximo, como hasta 700nm, o incluso hasta 800nm.

35 El inicio de la luz actínica define el origen del eje del tiempo, y la respuesta de fluorescencia de la muestra de tejido se registra en función del tiempo con respecto a este origen. Por lo general, la fluorescencia se registra a intervalos que aumentan con el tiempo para dar cuenta de la naturaleza logarítmica de la curva transitoria de la fluorescencia que exhibe un aumento rápido y una disminución lenta. Los intervalos de tiempo típicos entre las mediciones fluorescentes posteriores varían en el intervalo de 10µs (microsegundos) al comienzo a alrededor de 10ms (milisegundos) al máximo del transitorio, y pueden aumentar aún más de forma logarítmica a lo largo de la lenta disminución del transitorio.

40 El procedimiento se basa en datos de referencia pre-registrados. Los datos de referencia son un conjunto de transitorios de fluorescencia obtenidos de plantas preparadas con una variedad de estados nutricionales de referencia con respecto a uno o más nutrientes. Los estados de referencia deben reflejar el intervalo de estados nutricionales que se analizarán. Por diseño, los datos de referencia contienen, por lo tanto, la información sobre cómo los diferentes estados nutricionales de la planta afectan la señal de inducción de fluorescencia. Como se mencionó anteriormente, la fluorescencia de la clorofila a puede verse afectada por numerosos factores bióticos y abióticos simultáneamente y la gran cantidad de

información contenida en la señal de fluorescencia tiende a ocultar cualquier información específica sobre la influencia de un nutriente en particular. La presente invención resuelve esto al identificar que las diferencias en las propiedades en cuanto a forma en la progresión de dependencia temporal de los datos de la señal están asociadas a diferentes estados nutricionales, y al utilizar un modelo empírico para interpretar estas diferencias. El término 'relacionado con la forma' se refiere a estructuras en la progresión de la señal de inducción de fluorescencia de dependencia temporal; Las "propiedades en cuanto a forma" son estructuras que transportan información relevante, en el presente documento en forma de cambios en la forma del transitorio de inducción de la fluorescencia que se producen en función de diferentes estados nutricionales. El modelo empírico se basa en los datos de referencia pre-registrados obtenidos para los diversos estados nutricionales de referencia, y se construye a partir de los datos de referencia utilizados, por ejemplo, técnicas de análisis multivariante. Basado en este modelo empírico, es posible predecir el estado nutricional de una planta con respecto al nutriente a partir de los datos de la señal.

Uno de los méritos importantes de la presente invención es que las propiedades en cuanto a forma del transitorio de inducción de fluorescencia, en particular, durante el rápido aumento de OJIP, pueden analizarse para obtener información sobre el estado nutricional de una planta con respecto a un nutriente particular o a un grupo de nutrientes. Otro mérito adicional de la presente invención es que, al analizar la forma del transitorio de inducción de fluorescencia, esta información sobre el estado nutricional de una planta puede incluso ser independiente del genotipo y las especies de plantas. Como consecuencia, los datos de referencia de un genotipo o especie pueden validarse como referencia para datos de señal de plantas de otra diferente. Sin embargo, un mérito adicional de la presente invención es que un análisis de las propiedades en cuanto a forma en el transitorio de inducción de fluorescencia produce información específica de nutrientes sobre el estrés nutritivo latente de una planta en una etapa muy temprana, lo que permite un tratamiento específico de nutrientes de la planta. La detección temprana de una deficiencia de nutrientes seguida por un tratamiento específico adecuado permite la corrección con un mínimo de daño al cultivo y, por lo tanto, una pérdida de rendimiento, en comparación con otros procedimientos. Aún otro mérito de la presente invención es que se puede lograr un análisis cuantitativo específico de nutrientes del nivel bioactivo.

Para algunos nutrientes, el modelo empírico puede permitir una identificación directa y única del estado nutricional con respecto a un nutriente particular con un alto nivel de fiabilidad. Los ejemplos de este tipo de nutrientes son fósforo (P), cobre (Cu), manganeso (Mn) y azufre (S). Para otros nutrientes, el modelo empírico puede al menos proporcionar una predicción de que una planta tiene una deficiencia de nutrientes, en donde el nutriente puede ser uno de un grupo de nutrientes. Los ejemplos de este tipo de nutrientes son nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y hierro (Fe). No obstante, para estos otros nutrientes, la predicción proporciona información sobre el estado nutricional de la planta, y reduce la ambigüedad en la identificación de los nutrientes relevantes. La ambigüedad restante puede eliminarse al proporcionarse información adicional. Esta información adicional puede estar disponible de antemano y permitir eliminar algunos de los otros nutrientes en ese grupo. Alternativamente, esta información adicional puede buscarse en análisis complementarios.

El procedimiento permite proporcionar un resultado del análisis rápido, confiable y preciso de una medición óptica no destructiva / no invasiva que se puede realizar directamente en la planta. Preferiblemente, el modelo empírico está 'pre-construido' y fácilmente disponible en el momento de la prueba, es decir, cuando se determina el estado nutricional de la planta bajo prueba. En este caso, solo los parámetros del modelo empírico y no el intervalo completo de datos de referencia deben almacenarse para la prueba. Solo es necesario volver a acceder a los datos de referencia cuando el modelo empírico necesite ser revalidado / reconstruido. Esto reduce aún más la necesidad de potencia de procesamiento y capacidad de almacenamiento de datos, y por lo tanto es particularmente ventajoso para la implementación en dispositivos móviles y para proporcionar un resultado de prueba rápido.

El procedimiento comprende además el paso de pre-procesar los datos de la señal para mejorar los componentes no lineales de los mismos, en el que el modelo empírico se construye a partir de datos de referencia pre-procesados correspondientemente.

Las características no lineales de la progresión de dependencia temporal de los datos de la señal se mejoran al eliminar un fondo de componentes de orden inferior, de este modo se mejora el modelado de las diferencias dependientes de nutrientes entre muestras en estas características no lineales al usarse técnicas de análisis lineal multivariante. Antes del análisis, se aplica el mismo pre-procesamiento a los transitorios de inducción de fluorescencia de dependencia temporal de los datos de la señal que el aplicado a los transitorios de inducción de fluorescencia de dependencia temporal de los datos de referencia al construir el modelo empírico. El procedimiento se basa para el análisis de las propiedades en cuanto a forma en la información contenida en las características no lineales. Las variaciones en los niveles bioactivos de nutrientes en la planta, y, por lo tanto, los cambios en el estado nutricional de la planta, se detectan como variaciones en los componentes no lineales de los transitorios de inducción de fluorescencia correspondientes. De este modo, se logra un análisis ampliamente mejorado de las "propiedades en cuanto a forma".

Además, de acuerdo con una realización del presente procedimiento, el pre-procesamiento puede comprender la corrección de dispersión multiplicativa (MSC), la transformación de la variante normal estándar (SNV) y/o la diferenciación. Los componentes no lineales en la progresión de dependencia temporal de la señal de inducción de fluorescencia se mejoran al suprimirse los componentes de orden inferior. Por ejemplo, esto puede lograrse a través de la diferenciación con respecto al tiempo para suprimir componentes lineales y sub-lineales. La primera derivada elimina un fondo constante. La segunda derivada elimina cualquier fondo lineal. De este modo, los componentes no lineales de

la progresión de dependencia temporal de la señal de inducción de la fluorescencia se hacen más prominentes, es decir, mejorados. Del mismo modo, MSC y SNV tienden a suprimir las diferencias en los componentes de orden inferior entre las series de tiempo. Como consecuencia, los componentes no lineales se vuelven más prominentes, es decir, se mejoran.

5 Además, de acuerdo con una realización del presente procedimiento, determinar el estado nutricional comprende clasificar la muestra en un esquema de clasificación con respecto al uno o más nutrientes en base al modelo empírico. De este modo, el presente procedimiento se adapta para proporcionar una clasificación de la planta bajo prueba con respecto a su estado nutricional como un resultado. Este resultado es particularmente ventajoso en la microgestión agrícola, por ejemplo, para detectar cualquier estado insalubre, identificar los nutrientes particulares o el grupo de nutrientes en cuestión, y decidir las medidas correctivas que se tomarán en función a ese resultado.

10 El esquema de clasificación puede comprender diferentes niveles de detalle, por ejemplo, en junción al poder predictivo del modelo empírico con respecto a los nutrientes particulares o a un grupo de nutrientes. Una clasificación puede ser específica para un nutriente en particular y/o comprender una ambigüedad restante al determinar una deficiencia para al menos uno de un grupo de nutrientes. La clasificación puede realizarse de acuerdo con información cuantitativa o semi-cuantitativa, como, por ejemplo, un número representativo de una fiabilidad de la predicción, o clases de deficiencia (por ejemplo, leve / moderada / muy deficiente), en donde el esquema de clasificación puede calibrarse con respecto a datos de referencia pre-registrados, por ejemplo, por técnicas de análisis multivariante.

15 Además, de acuerdo con una realización del presente procedimiento, determinar el estado nutricional comprende proporcionar una predicción cuantitativa representativa de una concentración bioactiva de uno o más nutrientes en la planta en base al modelo empírico. De este modo, el presente procedimiento se adapta para proporcionar un resultado cuantitativo con respecto al estado nutricional de la planta bajo prueba. La predicción cuantitativa se calibra con respecto a los datos de referencia pre-registrados obtenidos en muestras de tejido de referencia con una concentración bioactiva conocida / medida de uno o más nutrientes en la planta. La calibración puede realizarse al utilizar cualquier técnica adecuada, como las técnicas de análisis multivariante. El resultado cuantitativo puede ser consolidado en un valor que represente el nivel bioactivo de uno o más nutrientes. Un resultado cuantitativo es ventajoso para proporcionar un diagnóstico detallado de la planta con respecto a su estado nutricional. Además, un resultado cuantitativo tiene la ventaja de que cualquier medida de corrección puede ajustarse para evitar el exceso de suministro de nutrientes, y que la absorción de los nutrientes disponibles por parte de la planta pueda ser monitoreada.

20 Además, de acuerdo con una realización del presente procedimiento, el modelo empírico se construye a partir de los datos de referencia al utilizar una técnica de análisis multivariante seleccionada del grupo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) o el análisis de componentes principales (PCA). En una variante, la regresión de mínimos cuadrados parciales puede ser un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).

25 Además, de acuerdo con una realización del presente procedimiento, el modelo empírico se construye al entrenar una red neuronal artificial al utilizar los datos de referencia como un conjunto de entrenamiento. La red neuronal artificial puede ser entrenada para reconocer cualquier patrón presente en los datos de referencia, que relacionen los cambios en las propiedades en cuanto a forma con los cambios en el estado nutricional con respecto a un nutriente o a un grupo de nutrientes en particular.

30 Además, de acuerdo con una realización, el presente procedimiento comprende además el paso de seleccionar un subconjunto de la referencia registrada y de los datos de señal de uno o más intervalos de tiempo. El presente procedimiento puede optimizarse con respecto a un nutriente en particular o a un grupo de nutrientes en particular al seleccionarse un subconjunto de los datos de referencia y de señal de uno o más intervalos de tiempo. El subconjunto se selecciona con respecto a las propiedades en cuanto a forma en la señal de inducción de la fluorescencia de dependencia temporal que se espera que lleven información sobre el estado nutricional de la planta con respecto a un nutriente o grupo de nutrientes en particular, o con respecto a las propiedades en cuanto a forma que se han identificado de antemano para llevar esta información, por ejemplo, al estudiar la forma de los transitorios de inducción de fluorescencia en los datos de referencia con respecto a las variaciones en el estado nutricional de este nutriente particular o grupo de nutrientes. Preferiblemente, la selección se realiza para mejorar la influencia de las propiedades en cuanto a forma para este nutriente particular o grupo de nutrientes en el modelo empírico. De este modo, el modelo empírico se configura para determinar un estado nutricional para un nutriente en particular o un grupo de nutrientes en particular al seleccionarse un subconjunto de datos.

35 Una forma de identificar propiedades en cuanto a forma en la serie temporal de las curvas de inducción de fluorescencia es registrar un conjunto de datos de referencia en muestras de tejido que se han cultivado para contener concentraciones bioactivas variables de uno o más nutrientes (los nutrientes de interés), e identificar cambios en la forma al comparar trazas de muestras de tejido con diferentes concentraciones bioactivas. Los cambios relacionados con la forma pueden mejorarse a través del pre-procesamiento para mejorar la prominencia de las funciones, por ejemplo, la diferenciación previa a la comparación. Los subconjuntos se seleccionan a partir de intervalos de tiempo particulares donde estas propiedades en cuanto a forma son prominentes.

40 Además, de acuerdo con una realización del presente procedimiento, los datos de referencia y señal se seleccionan en el intervalo de entre 10ms y 1s, alternativamente entre 15ms y 100ms, o entre 20ms y 50ms.

- De acuerdo con una realización ventajosa, los datos de señal y los datos de referencia correspondientes se seleccionan del intervalo de tiempo entre 0s y 10s, lo que cubre el aumento completo de OJIP y el pico en P, lo que incluye el comienzo de la disminución lenta.
- 5 De acuerdo con una realización ventajosa adicional, los datos de señal y los datos de referencia correspondientes se seleccionan del intervalo de tiempo de entre 0s y 3s, lo que cubre el aumento completo de OJIP.
- De acuerdo con una realización preferida, los datos de la señal y los datos de referencia correspondientes se seleccionan de un intervalo de tiempo que cubre el denominado "paso I" en el aumento de OJIP del transitorio de inducción de fluorescencia. El paso I es una propiedad en cuanto a forma que comprende información sobre el estado nutricional con respecto a una serie de nutrientes. Por ejemplo, se observa un cambio pronunciado en la forma de esta característica para la deficiencia de fósforo latente. Los intervalos de tiempo adecuados que cubren el paso I están, por ejemplo, en el intervalo de entre 10ms y 1s, alternativamente entre 15ms y 100ms, o entre 20ms y 50ms.
- 10 Para algunos nutrientes, como, por ejemplo, el fósforo (P), el cobre (Cu) y el azufre (S), se observa un alto nivel de fiabilidad de las predicciones del estado nutricional, en particular alrededor del paso I. La información transmitida por esta propiedad en cuanto a forma, por lo tanto, permite la determinación directa y única del estado nutricional con respecto a estos nutrientes, incluida una predicción cuantitativa de la concentración bioactiva de estos nutrientes en base a los mismos datos.
- 15 Además, de acuerdo con una realización del presente procedimiento, el uno o más nutrientes se seleccionan del grupo de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), azufre (S), magnesio (Mg), boro (B), manganeso (Mn), hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu).
- 20 Además, de acuerdo con una realización del presente procedimiento, el uno o más nutrientes se seleccionan del grupo de fósforo (P), cobre (Cu), manganeso (Mn) y azufre (S). Sorprendentemente, se observa un alto nivel de confiabilidad para la predicción específica de nutrientes para estos nutrientes, lo que conlleva un bajo riesgo de confusión con otros nutrientes.
- Se proporciona un instrumento configurado para realizar el presente procedimiento de acuerdo con cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente. A continuación, se citan realizaciones adicionales de instrumentos para determinar un estado nutricional de una planta con respecto a uno o más nutrientes. Se logran las mismas ventajas mencionadas anteriormente con respecto al presente procedimiento para determinar un estado nutricional. En particular, el instrumento permite proporcionar un resultado del análisis rápido, confiable y preciso de una medición óptica no destructiva / no invasiva que se puede realizar directamente en la planta. Además, el instrumento puede ser un dispositivo móvil adecuado para su uso en el campo.
- 25 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un instrumento para determinar un estado nutricional de una planta con respecto a uno o más nutrientes de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende:
- un dispositivo fluorómetro configurado para registrar una serie de tiempo de una señal de inducción de clorofila a de una muestra de tejido de la planta para obtener una serie temporal de datos de señal, en la que la serie temporal de datos de señal comprenda al menos datos de señal dentro de la porción de aumento de la señal de inducción de la fluorescencia, y
 - un dispositivo de análisis configurado para determinar el estado nutricional de una planta al aplicar un modelo empírico a la serie temporal de datos de señal, en el que el modelo empírico se basa en series temporales de datos de referencia pre-registrados pre-procesados para mejorar los componentes no lineales de los mismos al suprimir los componentes de orden inferior de los mismos y que relaciona estados nutricionales con cambios en componentes no lineales de los mismos de la progresión de dependencia temporal de las series temporales de datos de señal pre-procesados de manera similar.
- 30 Además, de acuerdo con una realización del instrumento, el dispositivo de análisis genera un resultado representativo del estado nutricional de la planta. El resultado puede mostrarse directamente para presentar a un usuario datos sobre el estado nutricional de la planta bajo prueba. El resultado puede usarse para derivar un índice de salud para la planta, en el que el índice de salud puede ser específico de un nutriente o específico de un grupo de nutrientes. El instrumento puede proporcionar el resultado en una interfaz para su uso por un dispositivo posterior, como, por ejemplo, un dispositivo para diagnosticar y/o tratar la planta bajo prueba. Para niveles de umbral críticos, es decir, si se determina un estado crítico de la planta, el instrumento puede generar una alarma activada por el resultado.
- 35 Además, de acuerdo con una realización del instrumento, la generación específica de nutrientes es una clasificación de acuerdo con un esquema de clasificación en base al modelo empírico.
- 40 Además, de acuerdo con una realización del instrumento, el resultado es una predicción cuantitativa representativa de una concentración bioactiva de uno o más nutrientes en la planta en base al modelo empírico.
- 45 Además, de acuerdo con una realización del instrumento, el uno o más nutrientes se seleccionan del grupo de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), azufre (S), magnesio (Mg), boro (B), manganeso (Mn), hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu).
- 50

Ventajosamente, de acuerdo con una realización adicional del instrumento, el uno o más nutrientes se seleccionan del grupo de fósforo (P), cobre (Cu), manganeso (Mn) y azufre (S).

Breve descripción de los dibujos

5 A continuación, la presente invención se explica adicionalmente a modo de ejemplos y con referencia a los dibujos. Los dibujos muestran en

Fig.1 Series temporales de la señal de inducción de fluorescencia registrada a partir de cuatro muestras de tejido con diferentes estados nutricionales de fósforo,

10 Fig.2 Los datos de la Fig.1 después del pre-procesamiento por diferenciación por secciones en cada una de las ventanas de tiempo A-F para mejorar las propiedades en cuanto a forma,

Fig.3 Series temporales medianas de la señal de inducción de fluorescencia registrada a partir de múltiples muestras de tejido con una deficiencia de nutrientes específica, así como plantas de control saludables.

15 Fig.4 Los datos de la Fig.3 después del pre-procesamiento por diferenciación por secciones en cada una de las ventanas de tiempo A-E para mejorar las propiedades en cuanto a forma,

Fig.5 una predicción PLS de la concentración de fósforo (ppm) con respecto a la concentración de fósforo medida independientemente (ppm),

Fig.6 un gráfico de PCA score para los dos primeros componentes principales PC1 y PC2 de un modelo de PCA en base a datos pre-procesados de MSC alrededor del paso I.

20 **Descripción detallada / Ejemplos**

Registro de transitorios de inducción de fluorescencia

25 En todos los ejemplos, se realizaron mediciones transitorias de fluorescencia de la clorofila a al utilizar el instrumento Hansatech "Handy PEA" disponible en el mercado. Al utilizar los clips de adaptación oscuros que se ajustan a este instrumento, las muestras de tejido a analizar se adaptaron inicialmente a la oscuridad por al menos 20 minutos, y de este modo se detiene efectivamente toda actividad de fotosíntesis y se maximiza el aumento de intensidad del aumento de OJIP. Al medir, la unidad del sensor del Handy PEA se coloca en el clip de adaptación oscuro, lo que permite que la muestra de tejido se exponga al sensor y a los diodos sin dejar entrar la luz. Inicialmente, se determinó un nivel de fondo al utilizar un destello corto de luz no actínica y al medir la respuesta de la muestra de tejido, y la toma del detector se ajustó en consecuencia.

30 Después de este ajuste inicial, la medición real se realizó al iluminar la hoja expuesta con tres LED rojos que se filtran ópticamente a una longitud de onda máxima de 650nm. Esta luz permanece encendida mientras dura la medición e irradia la muestra de tejido con un flujo de fotones de al menos 3000µmol m⁻² s⁻¹ para saturar efectivamente la muestra de tejido con luz actínica durante la medición.

35 Encender la luz actínica induce una señal de inducción de fluorescencia de la clorofila a con un aumento rápido de la intensidad de fluorescencia, seguido por una disminución lenta. La señal de fluorescencia se produce a longitudes de onda superiores a la longitud de onda de la luz actínica. La intensidad del transitorio de fluorescencia se registró al utilizarse un fotodiodo PIN como detector. El filtrado óptico se utiliza para garantizar que solo se registre la señal de fluorescencia de longitud de onda más larga (>650nm), y de este modo se evitan los artefactos derivados de la luz actínica que llega al detector. El detector PIN integra la intensidad de la señal de fluorescencia inducida en todo el rango espectral que llega al detector.

40 Se registró una serie temporal de mediciones de intensidad de fluorescencia a intervalos crecientes entre mediciones sucesivas en función del tiempo total desarrollado, en el que el origen del eje de tiempo total se define como el punto cuando se enciende la luz actínica. A continuación, se ofrece una descripción general del número de puntos de datos registrados para un conjunto de datos de señal, y los intervalos entre los puntos de datos sucesivos en diferentes ventanas de tiempo del tiempo total desarrollado después de encender la luz actínica. La distribución escogida de los intervalos de tiempo es un ejemplo de un aumento algo logarítmico de los intervalos de tiempo con el tiempo total desarrollado. Sin embargo, la persona experta puede concebir fácilmente otras distribuciones para adaptar la resolución temporal de los datos de la señal registrada con respecto a la naturaleza logarítmica general de la progresión de la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo total desarrollado.

50

Número de puntos de datos	Intervalo/s	Tiempo/s total/es	Ventana de tiempo
1-30	10 x 10 ⁻⁶	(0,0-0,30) x 10 ⁻³	A
31-57	0,10 x 10 ⁻³	(0,40-3,0) x 10 ⁻³	B
58-84	1,0 x 10 ⁻³	(4,0-30) x 10 ⁻³	C

85-111	10×10^{-3}	0,04-0,30	D
112-138	0,10	0,40-3,0	E
139-145	1,0	4,0-10	F

5 Para el propósito de los presentes ejemplos, cada conjunto de datos de inducción de fluorescencia consta, por lo tanto, de 145 mediciones individuales, y proporciona una curva de fluorescencia de dependencia temporal que se visualiza mejor al utilizarse una escala de tiempo logarítmica. Los conjuntos de datos cubren los primeros 10 segundos del transitorio de inducción de fluorescencia, incluido el aumento rápido de la fluorescencia, la intensidad máxima y el comienzo de la disminución lenta. Cuando solo se estudia el aumento de la fluorescencia y se incluye el pico de intensidad, solo se registran los primeros aproximadamente 3 segundos, de los cuales el primer segundo puede ser suficiente.

10 Estados nutricionales de referencia

Se realizaron dos experimentos que proporcionaron dos conjuntos de estados nutricionales de referencia, cada uno cubre un rango de los estados fisiológicos de la cebada de primavera (cv. Quench) con diferentes niveles de deficiencia de fósforo. En ambos casos, las plantas de cebada se cultivaron de forma hidropónica, lo que permitió un control claro de los niveles de nutrientes disponibles para cada planta. Las plantas fueron divididas en cuatro tratamientos diferentes que variaron ligeramente entre los dos experimentos, pero en ambos casos consistieron en un tratamiento de control (P0) y tres tratamientos de P (P1-P3) con disminución de la concentración de P.

20 En ambos experimentos, la cebada de primavera, cv. Quench, se germinó durante ocho días en vermiculita empapada de Sorbix en un invernadero con temperaturas mínimas de día / noche a 18/15°C y 16 horas de luz cada día (mínimo 250-300mmol de fotones $m^{-2} s^{-1}$), y posteriormente cultivada de forma hidropónica en unidades de cultivo opacas de 4L. La solución nutritiva en las unidades de cultivo se basa en un tratamiento de control estándar con: 200µM KH_2PO_4 , 200µM K_2SO_4 , 300µM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100µM NaCl, 300µM $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 900µM $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 600µM KNO_3 , 50µM Fe(III)-EDTA-Na, 0.8µM $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1µM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.7µM $ZnCl_2$, 0.8µM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2µM H_3BO_3 . Sin embargo, para evitar el envenenamiento por EDTA, las concentraciones de micronutrientes se redujeron a la mitad en la primera semana de cultivo después de la transferencia a las unidades de cultivo.

25 Cada unidad de cultivo se aireó continuamente con aire filtrado y la solución de nutrientes se renovó semanalmente para garantizar la disponibilidad óptima de nutrientes de todos los nutrientes esenciales, excepto el fósforo para las plantas en las que se induce la deficiencia de fósforo. El pH se mantuvo constante a 6.0 ± 0.3 al usar HCl ultra puro.

30 El tratamiento de Control tuvo amplias cantidades de todos los nutrientes durante todo el experimento, y los tratamientos P1, P2 y P3 recibieron cantidades decrecientes de P. En ambos experimentos, la intención del nivel P1 era estimar el nivel P, de modo que P1 solo cumpla con el requisito de P de las plantas, mientras se evita la alta absorción que tiene lugar en las plantas de Control. En base a la experiencia previa, la concentración de fósforo en las unidades P1 se estableció en 89µM (es decir, 89µM de KH_2PO_4). Los niveles de P2 se establecieron en el 50% del nivel de P1 en ambos experimentos, y el nivel de P3 se estableció en el 10% y el 25% del nivel de P1 en el experimento 1 y 2, respectivamente. Específicamente para el experimento 2, el potasio eliminado al reducir la concentración de KH_2PO_4 se reemplazó al agregar KCl adicional, y de este modo se mantuvo un nivel constante de potasio a lo largo de todo el experimento en los cuatro tratamientos.

35 **Experimento 1 - Cámara climática**

40 Las plantas germinadas se transfirieron a 32 unidades de cultivo, cada una contenía 10 plantas, y se dividieron en dos grupos (A y B) con 16 unidades cada una (día 1). El grupo A se cultivó en una cámara climática en condiciones de luz normal (400µmol de fotones $m^{-2} s^{-1}$) y una temperatura constante de 20°C durante todo el experimento. El grupo B se cultivó en una cámara climática con los mismos ajustes iniciales que A, sin embargo, cuando se indujeron los niveles reducidos de P, los ajustes fueron modificados a alta intensidad de luz (750µmol de fotones $m^{-2} s^{-1}$) y una temperatura constante a 15°C. Dos veces a la semana, las posiciones de las unidades fueron cambiadas aleatoriamente dentro de cada cámara.

45 Las 16 unidades en cada cámara climática se dividieron en los cuatro diferentes tratamientos de P (Control, P1, P2 y P3). Durante los primeros 10 días, a las unidades P1, P2 y P3 se les suministró la solución nutritiva P1, para evitar una alta absorción de P en la fase de pre-cultivo, pero permitir la producción de biomasa saludable. Después de 10 días, se indujeron los tres niveles limitados de P descritos anteriormente. En el día 21, los tres tratamientos con limitación de P fueron reemplazados por una solución nutritiva que no contenía fósforo.

50 Se tomaron muestras de las plantas dos veces en cada cámara climática durante el período experimental. El primer muestreo se realizó el día 21 y el último muestreo el día 28, en el que las plantas P1-3 habían estado completamente privadas de fósforo durante siete días. En cada muestreo, se analizó la hoja más joven completamente desarrollada de cinco plantas diferentes (que se recolectaron posteriormente) en cada unidad de cultivo al utilizarse Handy PEA, y las hojas de cada unidad de cultivo separada se agruparon juntas como una muestra y se analizaron a través del uso de

Espectroscopia de emisión óptica por plasma acoplado por inducción (ICP-OES). De esta manera, se obtiene el contenido promedio de fósforo de la hoja más joven completamente madura de cada unidad de cultivo, y esto se usó como un valor de referencia para cada una de las cinco mediciones de fluorescencia de clorofila a en plantas individuales en esa unidad de cultivo.

5 **Experimento 2 – Invernadero**

Las plantas germinadas se transfirieron a 16 unidades de cultivo, cada una contenía 4 plantas (día 1), y se cultivaron en las mismas condiciones de invernadero que para el período de germinación. Las 16 unidades de cultivo se dividieron en los cuatro diferentes tratamientos de fósforo (Control, P1, P2 y P3), y sus posiciones fueron cambiadas aleatoriamente dos veces por semana.

10 Los cuatro tratamientos diferentes recibieron suministro de nutrientes a nivel de control durante los primeros diez días. El día 10, se indujeron los niveles de P1, P2 y P3 al utilizarse sus respectivas soluciones de nutrientes. El día 21, el fósforo se eliminó por completo de los tratamientos P1-3. El día 28, todas las unidades de cultivo recibieron concentraciones de nutrientes a nivel de control para observar un efecto potencial del reabastecimiento de fósforo.

15 Se tomaron muestras de las plantas cuatro veces durante el período experimental, en el día 21, día 23, día 28 y día 30. Se recolectó una planta de cada unidad de cultivo y se realizaron mediciones de clorofila en la hoja más joven completamente desarrollada y en la segunda hoja más joven completamente desarrollada. A diferencia del experimento 1, cada hoja se analizó posteriormente por separado al usarse ICP-OES, y de este modo se dio un valor de referencia específico para cada medición de fluorescencia de clorofila a.

Procesamiento de datos

20 Uno de los méritos centrales de la presente invención radica en el concepto de que un análisis apropiado de las propiedades en cuanto a forma de la progresión del transitorio de inducción de fluorescencia, y en particular, de la porción de aumento, proporciona información específica de nutrientes sobre el estado de deficiencia con respecto a un nutriente específico. Con ese fin, se detectan y analizan las modificaciones en las propiedades en cuanto a forma en comparación con el estado sin estrés con respecto al nutriente específico. De acuerdo con la presente invención, el estado nutricional se determina a partir de estas modificaciones a través de la construcción de un modelo empírico, que, sobre la base de datos de referencia, relaciona estados nutricionales de referencia específicos con propiedades en cuanto a forma en los transitorios de inducción de fluorescencia y al aplicar este modelo empírico a los datos de señal obtenidos de una planta bajo prueba. Los datos de referencia son series temporales de inducción de fluorescencia pre-registradas obtenidas de plantas de referencia, es decir, plantas que están preparadas para estar en un estado nutricional particular con respecto al nutriente específico como se describió anteriormente. Los datos de la señal son series temporales de inducción de fluorescencia obtenidas de una planta bajo prueba. El modelo empírico se construye al utilizarse técnicas de análisis multivariadas.

Pre-procesamiento

35 El pre-procesamiento se aplicó a los datos de inducción de fluorescencia para mejorar las propiedades en cuanto a forma. Para un análisis dado, tanto los datos de señal como los datos de referencia correspondientes usados para construir el modelo empírico se pre-procesaron al utilizar la misma técnica de pre-procesamiento. Se pueden emplear varias técnicas de pre-procesamiento diferentes. En el presente documento se presentan dos de estas técnicas de pre-procesamiento. En un análisis, el mismo algoritmo que se usa comúnmente para la corrección de dispersión multiplicativa de los espectros infrarrojos se aplicó a un subconjunto de datos de inducción de fluorescencia de dependencia temporal seleccionados de un intervalo de tiempo alrededor del paso I (entre 2,6ms y 100ms). El algoritmo de corrección de dispersión multiplicativa funcionó sorprendentemente bien como pre-procesamiento con el fin de mejorar las propiedades en cuanto a forma en la progresión de los datos de inducción de fluorescencia. En un análisis adicional, se aplicó la diferenciación numérica al tomarse la diferencia en la señal de fluorescencia de dos puntos de datos posteriores. La diferenciación se realiza por secciones para cada una de las ventanas de tiempo A-F mencionadas anteriormente.

45 La Fig. 1 y la Fig. 2 ilustran la mejora de las propiedades en cuanto a forma a través de la diferenciación para diferentes concentraciones bioactivas de un nutriente particular, en este caso, fósforo. La Fig. 1 muestra la señal de inducción de fluorescencia registrada en función del tiempo para cuatro muestras de tejido con diferente concentración de fósforo en una escala log/lineal. Los datos cubren el aumento de OJIP y el comienzo de la posterior disminución en el intervalo de tiempo entre 0s-10s. La Fig. 2 muestra los datos correspondientes después del pre-procesamiento por diferenciación por secciones aplicada a la señal de inducción de fluorescencia en cada una de las ventanas de tiempo A-F. Tenga en cuenta, por ejemplo, el cambio pronunciado en la propiedad en cuanto a forma alrededor del paso I a alrededor de 50ms para las plantas con deficiencia de fósforo (tratamientos P1-P3) en comparación con el estado saludable (tratamiento P0).

50 La Fig. 3 y la Fig. 4 ilustran la mejora de las propiedades en cuanto a forma a través de la diferenciación para diferentes especies nutritivas. La Fig. 3 muestra la señal de inducción de fluorescencia en función del tiempo de las muestras de tejido con una deficiencia específica de nutrientes en una escala log/lineal. Los datos cubren el aumento de OJIP e incluyen el pico en 'P' en el intervalo de tiempo entre 0s-3s. Tres de las trazas de inducción de fluorescencia mostradas son de múltiples muestras de tejido en estados deficientes de nutrientes con respecto al fósforo, azufre y cobre,

respectivamente. La cuarta traza de inducción de fluorescencia es de muestras de tejido sano. La Fig. 4 muestra los datos correspondientes después del pre-procesamiento por diferenciación por secciones aplicada a la señal de inducción de fluorescencia en cada una de las ventanas de tiempo A-E. Se observan claramente diferencias específicas de nutrientes en la forma en diferentes muestras de tejido.

5 Modelo empírico

En un análisis, se construye un modelo empírico a partir de transitorios de inducción de fluorescencia registrados en el intervalo de tiempo entre 0s-10s para el conjunto de estados nutricionales de referencia del Experimento 1 y del Experimento 2, pre-procesados por diferenciación. La diferenciación se obtiene por sección de acuerdo a lo descrito anteriormente. El modelo empírico se construye por la regresión de mínimos cuadrados parciales. Una concentración de fósforo de aproximadamente 3000ppm-4000ppm es el umbral utilizado comúnmente en la agricultura práctica para cuando una planta se considera "saludable". Por lo tanto, una mayor concentración de fósforo no es "bioactiva" en la planta, y esta "alta absorción" se almacenará en su lugar como una reserva para posibles necesidades posteriores. Por lo tanto, el modelo empírico se construye para todas aquellas plantas que tienen una concentración de fósforo medida independientemente de menos de 4000ppm. La Fig. 5 muestra un gráfico de la concentración de fósforo predicha (ppm) con validación cruzada con respecto a la concentración de fósforo medida (ppm) para el Experimento 1 y el Experimento 2. La línea diagonal indica la relación 1:1 deseada de una predicción perfecta. La validación cruzada se realizó al utilizarse cuatro subconjuntos seleccionados aleatoriamente, y se escogió el número de variables latentes para minimizar la diferencia entre el error cuadrático medio de calibración (RMSEC) y el RMSE de validación cruzada (RMSECV). Los valores atípicos fueron eliminados en base a la estadística T-cuadrado de Hotelling frente a gráficos residuales. La fiabilidad de la predicción se caracteriza por un valor R^2 de alrededor de 0,8 que indica una buena correlación entre la concentración de fósforo medida y la predicha. Además, se observa que las concentraciones de fósforo superiores a 3000ppm (medidas) están ligeramente por debajo de las predicciones. Este 'corte' de la concentración de fósforo predicho sobre la base de los datos de inducción de fluorescencia en comparación con la concentración de fósforo total en la planta medida por un procedimiento independiente, está de acuerdo con el hecho de que la inducción de fluorescencia es sensible a la fracción bioactiva de los nutrientes contenidos en la planta en lugar de la concentración total. Como el umbral para la cebada está entre 3000-4000ppm, está totalmente de acuerdo con la teoría de que las muestras deben ser subestimadas cuando la concentración de fósforo es superior a 3000ppm.

En un análisis adicional, se construye un modelo empírico a partir de una colección de transitorios de inducción de fluorescencia registrados para el conjunto de estados nutricionales de referencia del Experimento 1 y del Experimento 2 con respecto al fósforo y de una biblioteca de transitorios de inducción de fluorescencia registrados para estados nutricionales deficientes con respecto a nutrientes del grupo de fósforo (P), manganeso (Mn), boro (B), nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), azufre (S), magnesio (Mg), hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu). Un subconjunto de los datos en la colección se selecciona al tener en cuenta solo las señales de inducción de fluorescencia alrededor del paso 1, en el intervalo de tiempo entre 2,6ms y 100ms. El modelo empírico se construye al utilizarse el análisis de componentes principales (PCA). Antes de realizar el PCA y construir el modelo empírico, los transitorios de inducción de fluorescencia se pre-procesaron al aplicarse el algoritmo de corrección de dispersión multiplicativa (MSC), que se usa comúnmente para el pre-procesamiento de espectros infrarrojos. Este algoritmo está disponible comercialmente, por ejemplo, en el software PLS_toolbox 7.3.1 de Eigenvector Research para Matlab. El algoritmo actúa sorprendentemente bien para mejorar las propiedades en cuanto a forma de los transitorios de inducción de fluorescencia al suprimir los artefactos de orden inferior en la señal de inducción de la fluorescencia de dependencia temporal. PCA es un procedimiento de análisis multivariado no supervisado. Por lo tanto, cualquier patrón detectado en los datos puede dar una indicación confiable de la presencia de dependencias sistemáticas en los datos. La Fig. 6 muestra un gráfico de PCA score para los dos primeros componentes principales PC1 y PC2, en donde PC1 explica el 74,5% de la variación en el conjunto de datos mencionado anteriormente, y PC2 explica el 18,7% en estos datos. Juntos, PC1 y PC2 explican más del 90% de la variación en los datos. El gráfico muestra una gran cantidad de transitorios individuales de inducción de fluorescencia en el conjunto, cada uno representado por un punto con los coeficientes PC1 y PC2 como las coordenadas x e y, respectivamente. Cada punto representa, por lo tanto, un estado nutricional en particular con respecto a un nutriente en particular. Los diferentes símbolos representan transitorios de inducción de fluorescencia para diferentes nutrientes. Se observa claramente una agrupación de estados deficientes de fósforo en la porción inferior derecha del gráfico (triángulos huecos). Además, los estados deficientes de azufre se agrupan en una región en la parte superior del gráfico (cuadrados huecos), y los estados deficientes de cobre parecen aglomerarse a la izquierda (círculos huecos). Este gráfico subraya la capacidad del presente procedimiento de acuerdo con la presente invención, al menos para algunos nutrientes, para identificar de forma única un estado de deficiencia nutricional y posiblemente incluso cuantificar el nivel de deficiencia.

En otro análisis adicional, se realiza una regresión de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLSDA) en la misma biblioteca de transitorios de inducción de fluorescencia que se usó para el PCA anterior. Sin embargo, a diferencia del anterior, la totalidad de los transitorios de inducción de fluorescencia en el intervalo de tiempo de 0s-3s se pre-procesa por diferenciación por secciones. Como PLSDA es un procedimiento supervisado a diferencia de PCA, los resultados se validan de manera cruzada al dividir los datos en diez subconjuntos aleatorios. Después de eliminar los valores atípicos, se realiza un modelo PLSDA al utilizarse 9 variables latentes; lo que da la matriz de confusión mostrada en la Tabla 2, y la tabla de confusión mostrada en la Tabla 3. Estos resultados corroboran aún más la capacidad de este procedimiento para proporcionar predicciones específicas de nutrientes basadas en propiedades en cuanto a forma en los transitorios de inducción de fluorescencia.

Tabla 2

Clase:	TP	FP	TN	FN
Ctrl	0,53	0,14	0,86	0,47
Ca	0,27	0,03	0,97	0,73
Cu	0,82	0,04	0,96	0,18
Fe	0,15	0,04	0,96	0,85
K	0,19	0,01	0,99	0,81
Mg	0,13	0,01	0,99	0,87
Mn	0,76	0,01	0,98	0,24
N	0,40	0,04	0,96	0,60
P	0,74	0,04	0,96	0,26
Zn	0,29	0,04	0,96	0,71
S	0,75	0,10	0,90	0,25
B	0,69	0,04	0,96	0,31

La Tabla 2 muestra la matriz de confusión con validación cruzada para el modelo PLSDA (9 variables latentes) que muestra el número relativo de verdadero positivo (TP), falso positivo (FP), verdadero negativo (TN) y falso negativo (FN) para cada clase/nutriente. Los nutrientes que parecen ser prometedores en términos de especificidad se destacan en negrita.

Tabla 3

Predicho frente a lo real	Ctrl	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	N	P	Zn	S	B
Previsto como Ctrl	204	0	7	56	8	54	3	0	25	9	17	0
Previsto como Ca	2	13	6	5	3	14	1	10	7	1	1	0
Previsto como Cu	26	7	129	10	4	2	4	1	4	2	1	0
Previsto como Fe	17	1	7	29	2	9	0	3	10	2	6	0
Previsto como K	5	2	0	1	9	5	0	0	2	1	1	2
Previsto como Mg	9	0	0	4	0	28	0	0	4	0	3	0
Previsto como Mn	7	3	0	4	0	3	55	0	6	0	0	0
Previsto como N	0	9	0	28	2	22	0	19	3	2	1	1
Previsto como P	9	8	1	9	0	13	5	8	213	4	2	0
Previsto como Zn	29	4	1	1	13	8	0	4	7	14	0	2
Previsto como S	58	0	7	39	0	48	2	0	1	0	95	0
Previsto como B	16	1	0	8	7	3	6	2	6	13	0	11

Tabla 3: Tabla de confusión que muestra las clases predichas más probables validadas de forma cruzada frente a las clases de referencia. Se destacan los nutrientes que parecen ser prometedores en términos de especificidad. El PLSDA además respalda la capacidad del presente procedimiento de acuerdo con la presente invención para proporcionar información específica de nutrientes sobre el estado nutricional de una planta, que al menos para algunos nutrientes puede ser incluso una identificación única de uno o más nutrientes relacionados con un estado de deficiencia con un alto grado de fiabilidad.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar el estado nutricional de una planta con respecto a uno o más nutrientes, el procedimiento comprende los pasos de
 - 5 - registrar una serie temporal de una señal de inducción de fluorescencia de clorofila a de una muestra de tejido de la planta al usar un dispositivo fluorómetro para obtener una serie temporal de datos de señal, en la que la serie temporal de datos de señal comprenda al menos datos de señal dentro de la porción de aumento de la señal de inducción de la fluorescencia de la clorofila a, y
 - determinar el estado nutricional a partir de un modelo empírico aplicado a la serie temporal de datos de señal, **caracterizado en que** el modelo empírico se basa en series temporales de datos de referencia pregrabados pre-procesados para mejorar los componentes no lineales de los mismos al suprimir los componentes de orden inferior de los mismos y relaciona estados nutricionales con cambios en componentes no lineales de los mismos de la progresión de dependencia temporal de las series temporales de datos de señal pre-procesados de manera similar.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pre-procesamiento comprende una de las siguientes, diferenciación, corrección de dispersión multiplicativa y la transformación de la variante normal estándar.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que determinar el estado nutricional comprende clasificar la muestra en un esquema de clasificación con respecto al uno o más nutrientes en base al modelo empírico.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que determinar el estado nutricional comprende proporcionar una predicción cuantitativa representativa de una concentración bioactiva de uno o más nutrientes en la planta en base al modelo empírico.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 3 o 4, en el que el modelo empírico se construye a partir de los datos de referencia al utilizar una técnica de análisis multivariante seleccionada del grupo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) o el análisis de componentes principales (PCA).
- 25 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que comprende además el paso de seleccionar un subconjunto de las series temporales de datos de referencia y de los datos de señal de uno o más intervalos de tiempo.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la serie temporal de datos de referencia y la serie temporal de datos de señal se seleccionan en el intervalo entre 10ms y 1s después del inicio de la luz actínica.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la serie temporal de datos de referencia y la serie temporal de datos de señal se seleccionan en el intervalo entre 15ms y 100ms después del inicio de la luz actínica.
9. Procedimiento según la reivindicación 6 en el que la serie temporal de datos de referencia y la serie temporal de datos de señal se seleccionan en el intervalo entre 20ms y 50ms después del inicio de la luz actínica.
- 35 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el uno o más nutrientes se seleccionan del grupo de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), azufre (S), magnesio (Mg), boro (B), manganeso (Mn), hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu).
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el uno o más nutrientes se seleccionan del grupo de fósforo (P), cobre (Cu), manganeso (Mn) y azufre (S).
- 40 12. Instrumento para determinar el estado nutricional de una planta con respecto a uno o más nutrientes, el instrumento comprende
 - un dispositivo fluorómetro configurado para registrar una serie temporal de una señal de inducción de fluorescencia de clorofila a de una muestra de tejido de la planta para obtener una serie temporal de datos de señal, en el que la serie temporal de datos de señal comprende al menos datos de señal dentro de la porción de aumento de la señal de inducción de la fluorescencia de la clorofila a, y
 - 45 - un dispositivo de análisis configurado para determinar el estado nutricional de una planta al aplicar un modelo empírico a la serie temporal de datos de señal, **caracterizado en que**, el modelo empírico se basa en series temporales de datos de referencia pregrabados pre-procesados para mejorar los componentes no lineales de los mismos al suprimir los componentes de orden inferior de los mismos y que relaciona estados nutricionales con cambios en componentes no lineales de los mismos de la progresión de dependencia temporal de las series temporales de datos de señal pre-procesados de manera similar.
- 50 13. Instrumento según la reivindicación 12, en el que el dispositivo de análisis genera un resultado representativo del estado nutricional de la planta.
14. Instrumento según la reivindicación 13, en el que el resultado es una clasificación de acuerdo con un esquema de clasificación, en el que la clasificación es en base al modelo empírico.

15. Instrumento según la reivindicación 13, en el que el resultado es una predicción cuantitativa representativa de una concentración bioactiva de uno o más nutrientes en la planta en base al modelo empírico.

5 16. Instrumento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el uno o más nutrientes se seleccionan del grupo de nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), azufre (S), magnesio (Mg), boro (B), manganeso (Mn), hierro (Fe), zinc (Zn) y cobre (Cu).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

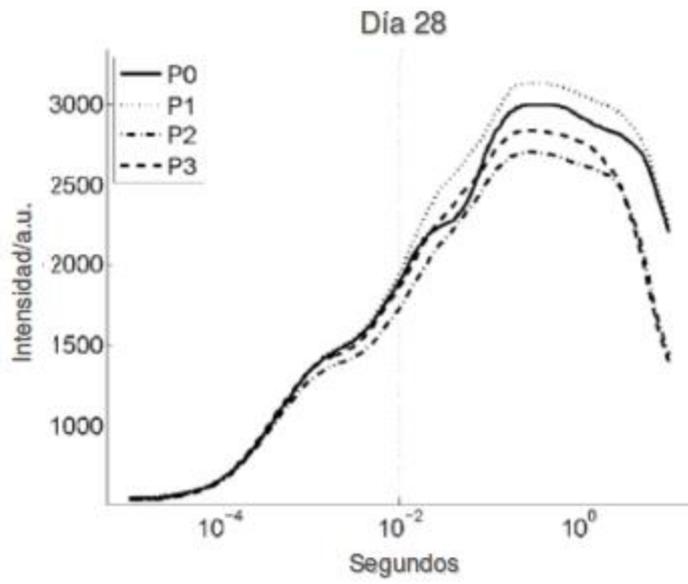


Fig.1

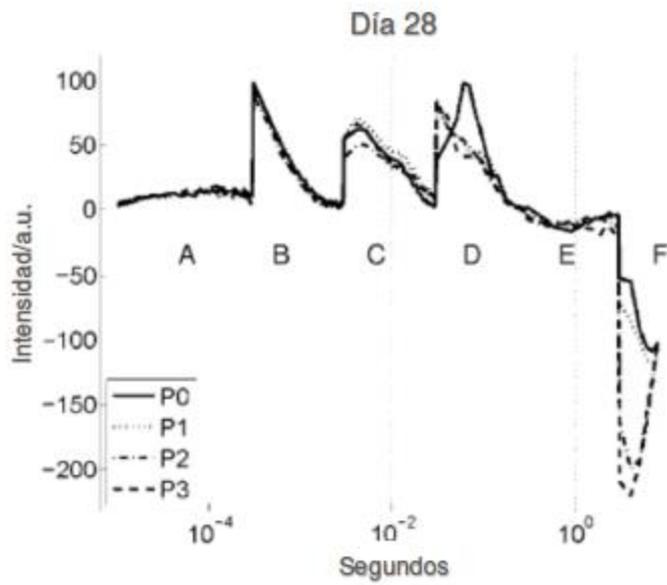


Fig.2

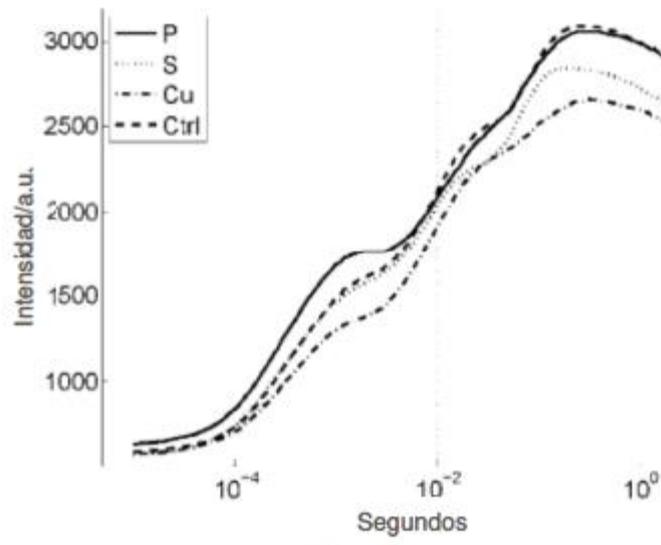


Fig.3

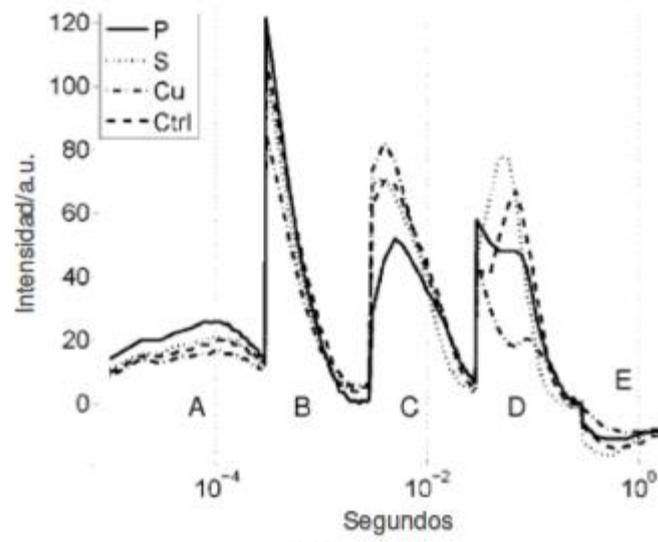


Fig.4

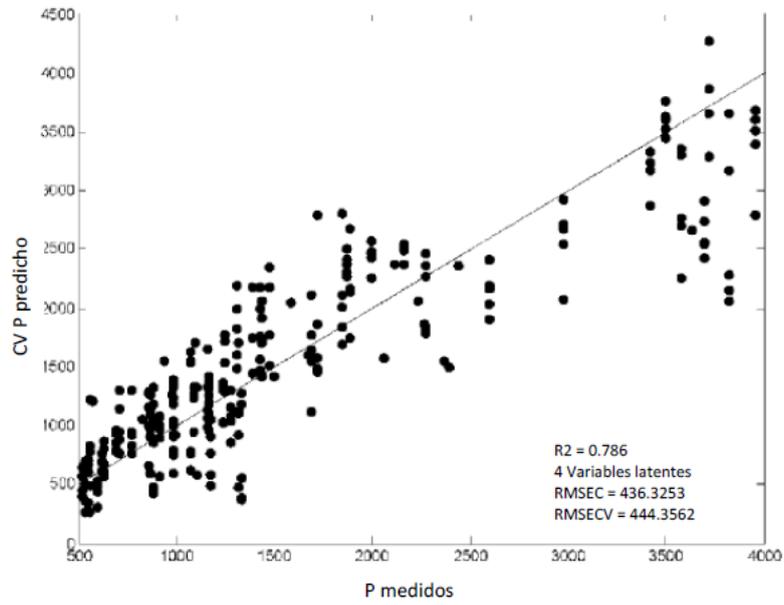


Fig.5

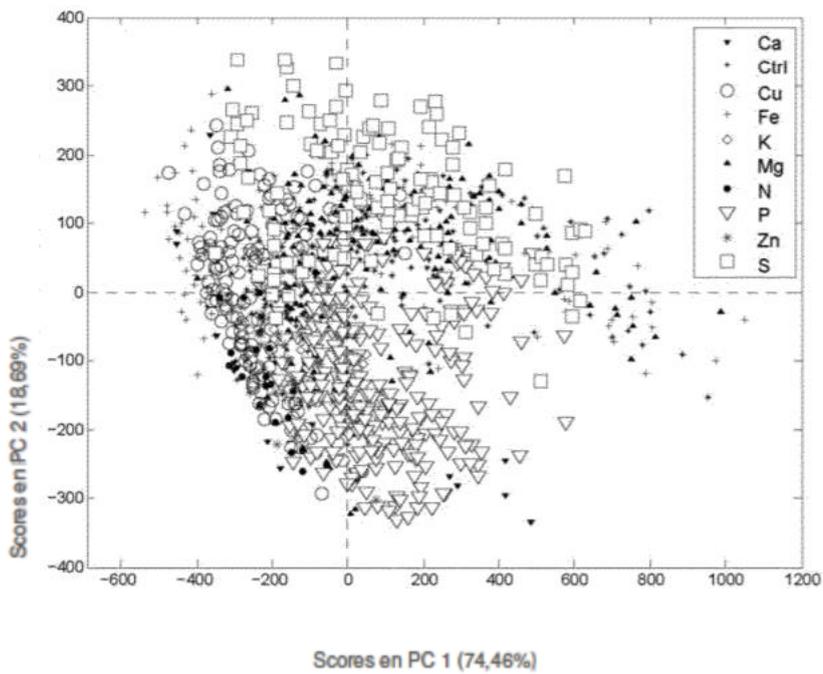


Fig. 6