

Redes neuronales artificiales para estimar el contenido de nitrógeno en plantas leguminosas

Artificial neural networks for evaluating nitrogen content in leguminous plants

Pérez, Anna Gabriela ^{1*}; Rodríguez Maldonado, Ronald ²; Pavlov, Stancho ³; Rivas Echeverría, Francklin ⁴

¹ Departamento de Estadística, Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, Universidad de Los Andes, Mérida - Venezuela.

² Fluoromatics, 10, Rue du Vieux Molin, CH – 1213 Onex, Ginebra, Suiza.

³ Departamento de Matemáticas, Universidad Prof. Dr. Assen Zlatarov, Prof. Jakimov Blvd. 8010, Burgas, Bulgaria.

⁴ Laboratorio de Sistemas Inteligentes, Facultad de Ingeniería, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

*gabipm@ula.ve

Resumen

En este trabajo se presenta una aplicación en reconocimiento de patrones, utilizando redes neuronales artificiales para analizar señales de fluorescencia clorofílica (FC), con el fin de identificar y clasificar grupos de plantas de Vigna unguiculata (L.) Walp (fríjol) cultivadas en medios hidropónicos que contenían diferentes cantidades de nitrógeno (N) y las señales de fluorescencia de otro grupo de plantas cuyas semillas fueron inoculadas antes de su germinación con la bacteria Rhizobium variedad NGR232. Previo al entrenamiento neuronal se realizó un exhaustivo análisis estadístico multivariante, con la finalidad de detectar diferencias en los vectores de medias de los medios de cultivo y reducir el número de variables o puntos de las curvas de fluorescencia. El objetivo principal de este trabajo es desarrollar una herramienta para identificar la carencia de N en plantas de fríjol y otras leguminosas de mayor producción en agricultura.

Palabras clave: Vigna unguiculata, fluorescencia, redes neuronales, Rhizobium, NGR232

Abstract

In this work it's presented a pattern recognition application using artificial neural networks (ANN) for analyzing signals of chlorophyll fluorescence (CF) in order to identify and classify groups of Vigna unguiculata (L) Walp (cowpea) plants grown in hydroponic media containing different amounts of nitrogen (N) and fluorescence signals from another group of plants whose seeds were inoculated prior to germination with the NGR232 variety Rhizobium bacteria. Before the ANN training, it was held an exhaustive multivariate statistical analysis for identifying differences among the means vectors of the growth media and reducing the numbers of variables or fluorescence curve points. The main objective of this work is to develop a tool for identifying N deficiency in pea's plants and other legumes with high production in agriculture.

Key words: Vigna unguiculata, fluorescence, artificial neural networks, Rhizobium, NGR232.

1 Introducción

Uno de los objetivos en el desarrollo de técnicas de detección a distancia de vegetación es incrementar la capacidad para diferenciar e identificar los diferentes tipos de grupos taxonómicos de plantas, su cantidad de biomasa o su rendimiento productivo. Actualmente, se están llevando a cabo nuevas investigaciones dirigidas a extender la aplicación de estas técnicas para su utilización en la detección por satélite de los patrones de crecimiento de áreas vegetales,

cultivos, bosques, áreas verdes urbanas. Estos estudios incluyen la detección de los diferentes estados de salud o vitalidad de árboles y cultivos de mayor interés económico. Diversos factores ambientales, como la sequía, la deficiencia de sales minerales en el suelo, las enfermedades de origen biológico, la temperatura, la alta concentración de sales contaminantes en el suelo o la concentración de gases contaminantes en la atmósfera, entre otros, pueden afectar el desarrollo normal de la vegetación.

El nitrógeno (N) es un nutriente esencial para la formación de proteínas y tejidos vegetales. Las plantas asimi-

lan N del suelo en forma de nitratos. Los iones de nitrato son altamente solubles en agua, y cuando los nitratos del suelo no son absorbidos por las raíces de las plantas, estos pasan directamente a las aguas subterráneas contaminándolas; causando problemas graves de salud y del medio ambiente (Lawlor 2002, Addiscott y col., 1991, Forman y col., 1985), y, también se ha descubierto que los nitratos en exceso pueden causar un efecto negativo en la actividad fotosintética de plantas de soya (Zhou y col., 2006). Los fertilizantes inorgánicos representan una mayor fuente de nitratos en el suelo (FREEP Fertilizer Research and Education Program 1990, 1992), y se hace necesario reducir la contaminación del suelo por nitratos, controlando óptimamente la cantidad de fertilizantes inorgánicos, sobre todo en cultivos de importancia comercial y alimenticia. Nuevos métodos para monitorear la carencia de sales minerales son una necesidad urgente.

La técnica de medición directa de FC se perfila como un método óptimo para monitorear cultivos en tiempo real, ya que puede ser utilizada para idear mecanismos automatizados de aplicación de fertilizantes de manera local, lo que contribuiría a disminuir de manera considerable el impacto de los nitratos en el medio ambiente (Genty y col., 1989, Lázár 1999, Bredemeier y Schmidhalter 2001).

En este trabajo presentamos una técnica original de análisis de señales de fluorescencia clorofílica (FC) utilizando redes neuronales artificiales (RNA), para identificar y clasificar grupos de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (fríjol) que han crecido en medios de cultivo hidropónicos que contienen diferentes cantidades de nitratos como fuente o suministro de nitrógeno (N), así como también de un grupo muy particular de plantas de fríjol cultivadas con una solución nutriente que no contenía N en ninguna forma y cuyas semillas fueron previamente inoculadas con la bacteria *Rhizobium* tipo NGR232. Esta bacteria forma una asociación simbiótica con la planta suministrándole todo el N necesario para su desarrollo (Golinowski y col., 1998, Pueppke y col., 1999, Day y col., 2000, Wanek y col., 2002, Chen 2008).

En trabajos previos hemos aplicado la técnica de FC para diferenciar y clasificar diferentes grupos de plantas, identificar especies de plantas y para detectar la deficiencia de nutrientes en especies vegetales usando métodos de análisis estadístico y redes neuronales artificiales (Maldonado Rodríguez y col., 2003, Maldonado Rodríguez y col., 2001, Pérez Méndez y col., 2005).

En la presente investigación se demuestra que el monitoreo no destructivo del contenido de nitrógeno en plantas leguminosas es viable y detectable usando medidas de FC inducida. Esta investigación incluye la evaluación del impacto que tiene la bacteria de suelo *Rhizobium* en la fijación de nitrógeno para la planta huésped cuando esta bacteria de suelo ha sido inoculada en plantas de *Vigna unguiculata*.

2 Materiales y Métodos

Material Vegetal y Condiciones de Inoculación y Crecimiento

El material vegetal estudiado son plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Red Caloona (Wrighton Seeds, AUS), una leguminosa de la sub-familia de las *Faboideas*. Esta planta es conocida con el nombre de guisante o fríjol, cornille, haricot à œil noir y monguette en Europa; niébé en África; catjang en India; cowpea en los países de habla inglesa (Ehlers y Hall 1997). La planta *Vigna unguiculata* (fríjol) es una leguminosa muy importante desde el punto de vista nutricional por su alta resistencia a la sequía y a su habilidad para adaptarse a condiciones climáticas adversas. Esta planta ha sido propuesta como una solución para mejorar la agricultura sostenible en países de clima difícil (Odee y col., 2002, Arun y col., 2004, Zhang y col., 2008).

En este trabajo hemos medido la fluorescencia y la reflectancia de plantas de fríjol cultivadas en condiciones hidropónicas. Las soluciones nutrientes contenían diferentes cantidades de nitratos como fuente de nitrógeno. Se hicieron mediciones de la señal de fluorescencia inducida de plantas de fríjol cuyo medio de cultivo contenía diferentes concentraciones de nitrato. Estos grupos fueron marcados respectivamente [0 mM KNO₃], [1 mM KNO₃], [5 mM KNO₃], [10 mM KNO₃] y [20 mM KNO₃]. También se midió un grupo de plantas en cuyo medio de cultivo no había nitratos y cuyas raíces fueron previamente inoculadas con bacterias *Rhizobium* del genotipo NGR 232. Este grupo fue marcado como [NGR232]. Todas las plantas fueron expuestas a las mismas condiciones de crecimiento, en un mismo fitotrón, en el que la luz y la temperatura fueron mantenidas constantes.

Desde el momento en que las primeras hojas aparecen, aproximadamente una semana después de la germinación, la inoculación se efectúa a nivel de las raíces con 10⁹ bacterias/plántula en un volumen de 200 µl. Luego de la inoculación, las plantas son colocadas en una cámara de cultivo (fotoperíodo de 16 horas luz, 20-28°C, 50 % de humedad). Las plántulas son regadas rellenando a 2/3 el recipiente con la solución B&D que contiene las diferentes concentraciones de nitrato que van desde 0 mM KNO₃ (para las plantas inoculadas y plantas control) hasta 20 mM KNO₃. Por cada tratamiento se cultivaron 10 plantas en 10 jarras Magenta y se hicieron 3 réplicas experimentales.

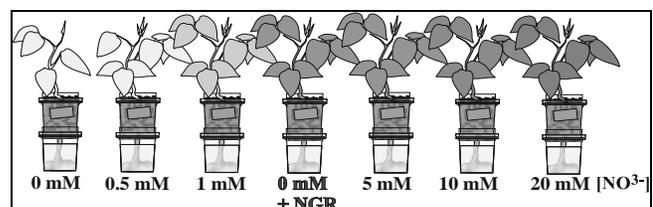


Fig. 1. Esquema experimental para la medición del efecto del contenido de nitratos en el desarrollo foliar de plantas.

3 Redes Neuronales Artificiales

En esta etapa de la investigación, donde el objetivo es obtener los modelos de redes neuronales que mejor discriminan los medios de cultivo, se hace necesario la distinción de ciertas actividades que garanticen una optimización en el entrenamiento neuronal y validación de los modelos obtenidos:

- **Análisis estadístico:** se realiza con la finalidad de explorar las mediciones de los puntos de la curva de fluorescencia y describir la estructura de interrelación de dichos puntos. Se desea obtener un nuevo conjunto de variables pero más pequeño usando componentes principales. Ahora con dos conjuntos de datos (los originales y los componentes principales) el objetivo radica en comparar la clasificación o asignación de las mediciones a los diferentes medios de cultivo con esos dos tipos de datos.
- **Entrenamiento neuronal:** En esta etapa se ajustan y seleccionan las topologías de redes neuronales que mejor discriminan o separan los diferentes medios de cultivo utilizando diferentes datos de entrada: las mediciones originales y los componentes principales
- **Discusión de resultados:** se analiza la clasificación o discriminación de los modelos neuronales en cuanto a la asignación correcta de las mediciones a los diferentes medios de cultivo; tomando en cuenta el tipo de datos de entrada a estos modelos, es decir, si tienen las mediciones originales de la curva de fluorescencia o los componentes principales.

4 Análisis Estadístico

Para los tres conjuntos de datos generados a partir de la medición en las hojas de las plantas, se realizó el análisis exploratorio de datos utilizando el software S - Plus 2000. En este caso, el análisis de los 20 puntos de la curva de fluorescencia reveló que existe multicolinealidad entre algunos puntos y en otros casos mediciones idénticas, por lo que se eliminan 6 puntos de la curva de fluorescencia en cada conjunto de datos.

Para el entrenamiento de las redes neuronales es necesario realizar la partición de cada conjunto de mediciones en dos conjuntos: uno para entrenar o ajustar las redes y obtener los modelos; y otro conjunto más pequeño para validar la clasificación de los modelos obtenidos. En tal sentido, se considera el 80% de cada conjunto de mediciones para entrenar y el 20% para validar los modelos neuronales. La selección de las observaciones se hace mediante el uso de muestreo aleatorio estratificado con el criterio de fijación proporcional, los estratos corresponden a los diferentes medios de cultivo.

Como el objetivo del trabajo es realizar la separación y clasificación de los diferentes medios de cultivo, se utiliza el Análisis de Varianza Multivariado o MANOVA (Anderson 2003, Johnson y col., 2001) para determinar si existen diferencias entre los vectores de medias de las curvas de

fluorescencia en los diferentes medio de cultivo, y se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 1, los cuales revelan que para los tres conjuntos de mediciones existen diferencias entre los vectores de medias, concluyendo así que tiene sentido realizar la separación y clasificación de los diferentes medios de cultivo de la *Vigna unguiculata*.

Tabla 1. MANOVA

	1° Medición	2° Medición	3° Medición
Lambda Wilks (F)	26.26 (p = 0.000)	38.28 (p = 0.000)	48.93 (p = 0.000)
Traza de Pillai (F)	15.27 (p = 0.000)	22.06 (p = 0.000)	22.57 (p = 0.000)
Traza de Hotelling Lawley (F)	41.78 (p = 0.000)	70.67 (p = 0.000)	125.72 (p = 0.000)
Mayor Raíz de Roy (F)	156.42 (p = 0.000)	304.38 (p = 0.000)	569.35 (p = 0.000)

Fuente: Elaboración propia

Al detectarse diferencias entre los vectores de medias de las curvas de fluorescencia en los distintos medios de cultivo, se realizan las comparaciones por pares de vectores usando la prueba T^2 de Hotelling (Anderson 2003, Johnson y col., 2001) resultando todas las comparaciones significativas registrando valores p por debajo de 0.000539. Como existen diferencias entre pares de vectores de medias se debe revisar en cuáles puntos de la curva de fluorescencia se detectan esas diferencias, y para ello se revisan los intervalos de 95% de confianza simultáneos usando el método de Bonferroni (Anderson 2003, Johnson y col., 2001) que muestran numerosos puntos de la curva para los cuales se evidencian diferencias entre las medias y es de interés señalar lo siguiente:

- Al comparar el grupo control con los grupos que tienen distintas concentraciones de nitrato, se observa que la mayoría de los intervalos tienen límites positivos lo que indica que el promedio en los puntos de la curva del grupo control es mayor al promedio de los puntos de la curva en los grupos que tienen nitrato ($\mu_{control} - \mu_{nitrato} > 0$).
- Al comparar el grupo control con el grupo NGR, se observa que la mayoría de los intervalos tienen límites negativos, lo que indica que el promedio de los puntos de la curva del grupo NGR es superior al promedio de los puntos de la curva del grupo control ($\mu_{control} - \mu_{NGR} < 0$).

La curva de fluorescencia tiene 14 puntos, se realiza un análisis de componentes principales para cada conjunto de medición con el objetivo de reducir el número de puntos de la curva de fluorescencia y obtener unas pocas combinaciones lineales de ellos, que son los componentes principales a partir de la descomposición de la matriz de correlaciones. En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de variación explicada por los tres primeros componentes que son los que se van a retener para cada conjunto de mediciones y generar así los conjuntos de datos que serán utilizados para el entrenamien-

to neuronal.

Tabla 2 Variación Explicada por los tres Primeros Componentes Principales

	1° Medición	2° Medición	3° Medición
Porcentaje de variación explicada	99,537	99,17	99,274

Fuente: Elaboración propia

5 Entrenamiento Neuronal

Para el entrenamiento de las redes neuronales (Hagan y col., 1996)], se utilizó el programa computacional *Statistica Neural Networks* (Statsoft Incorporated 2002) con el algoritmo de retro-propagación y se analizaron dos esquemas:

- Entrenamiento con los valores originales de las mediciones de la curva de fluorescencia.
- Entrenamiento con los componentes principales retenidos.

En la Tabla 3, se presenta un resumen del error de clasificación en las dos fases de entrenamiento neuronal y para cada conjunto de medición. Se observa que el error de clasificación es menor cuando se utilizan los componentes principales como datos de entrada que cuando se utilizan las mediciones originales de la curva de fluorescencia para el primer y segundo conjunto de mediciones, ya que en el tercer conjunto de medición el error de clasificación es el mismo en la etapa de entrenamiento y en la etapa de validación independientemente del tipo de dato de entrada a la red neuronal.

Tabla 3. Errores de clasificación de acuerdo a la etapa y tipo de datos

Conjunto de Medición	Etapas	Mediciones Originales	Componentes Principales	Disminución Porcentual del Error
1	Entrenamiento	0,0525	0,047	10.4761905
	Validación	0,1904	0,166	12.8151261
2	Entrenamiento	0,1537	0,1453	5.46519193
	Validación	0,1849	0,1603	13.3044889
3	Entrenamiento	0,0942	0,0942	0
	Validación	0,0476	0,0476	0

Fuente: Elaboración Propia

Es de interés resaltar la disminución del error al utilizar los componentes principales como variables de entrada a las redes neuronales que los valores originales de la curva de fluorescencia. El hecho de que con los tres primeros componentes principales retenidos se logre explicar el 99% de la variación total de las mediciones originales, hace que la capacidad de representación sea apropiada. A nivel de arquitectura de las redes neuronales, las redes neuronales ali-

mentadas con los datos originales de la curva de fluorescencia necesitan una arquitectura más compleja en relación a la topología de las redes neuronales alimentadas con los componentes principales.

Otro hallazgo de interés tiene que ver con el segundo conjunto de medición, el error de clasificación es mucho mayor que en los otros dos conjuntos independientemente si se utilizan las mediciones originales o los componentes principales. Esto puede atribuirse a que este conjunto contiene mediciones de las primeras y segundas hojas de las plantas, mientras que los otros conjuntos tienen mediciones sólo de las primeras o sólo de las segundas hojas, lo que sugiere controlar esta fuente de variación, es decir, introducir otro criterio de clasificación basado en un muestreo de hojas pertenecientes a un mismo grupo de edad o estado de maduración.

Otra medida que es de interés analizar es la sensibilidad, la cual se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un objeto cuyo estado real sea la presencia o pertenencia a esa condición o grupo de interés. Se denota S y su estimador \hat{S} , representa la proporción de casos clasificados correctamente. Para muestras grandes la sensibilidad tiende a distribuirse de acuerdo a una distribución normal (Franco 2007), y el error estándar se expresa mediante:

$$Se(\hat{S}) = \sqrt{\frac{NCC * NCI}{(NCC + NCI)^3}} \quad (1)$$

donde NCC representa el número de casos clasificados correctamente y NCI el número de casos clasificados incorrectamente. La expresión resultante para estimar intervalos de confianza está dada por:

$$P[\hat{S} - Z_{\alpha/2} Se(\hat{S}) \leq S \leq \hat{S} + Z_{\alpha/2} Se(\hat{S})] = 1 - \alpha \quad (2)$$

La sensibilidad se estimó para todos los modelos en la etapa de entrenamiento, y se calcularon intervalos del 95% de confianza. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Intervalos de 95% de Confianza para la Sensibilidad en los Conjuntos de Medición de la Etapa de Entrenamiento

Variables Originales	\hat{S}	LIC	LSC
1° Medición	0,9405	0,9047	0,9702
2° Medición	0,8393	0,8000	0,8786
3° Medición	0,9177	0,8755	0,9599
Componentes Principales			
1° Medición	0,9524	0,9202	0,9846
2° Medición	0,8542	0,8165	0,8919
3° Medición	0,9177	0,8755	0,9599

Fuente: Elaboración Propia

LIC es el límite inferior de confianza
LSC es el límite superior de confianza

De esta sensibilidad estimada puede comentarse lo siguiente:

- La probabilidad de clasificar correctamente un medio de cultivo es en general mayor al usar los modelos neuronales entrenados con los componentes principales, que en aquellos modelos en los que se usaron los puntos de la curva de fluorescencia.
- En todos los intervalos estimados la probabilidad de clasificación correcta es igual o superior a 0,8.
- En la primera medición es donde se obtiene la mayor probabilidad de clasificar correctamente y es superior a 0,9. En la segunda medición se observa la menor probabilidad de clasificación correcta, hecho que puede atribuirse al estado de maduración de las hojas, ya que esta segunda medición contiene primeras y segundas hojas. En la tercera medición esta probabilidad es la misma al utilizar modelos neuronales con los valores de la curva de fluorescencia que al utilizar los componentes principales.

Se estimó la sensibilidad para los conjuntos de validación, y los resultados se muestran en la Tabla 5. Se espera que esta estimación se encuentre dentro de los límites de confianza presentados en la tabla 4; lo que ocurrió en la segunda y tercera medición independientemente si el conjunto de datos corresponde a los puntos de la curva o a los componentes principales. Sin embargo, la sensibilidad estimada en la primera medición no se encuentra dentro de los límites de confianza independientemente del conjunto de medición; siendo en este caso menor.

Tabla 5. Sensibilidad Estimada en los Conjuntos de Medición de la Etapa de Validación

Medición	Variables Originales	Componentes Principales
1°	0,8095	0,8333
2°	0,8171	0,8415
3°	0,9500	0,9500

Fuente: Elaboración Propia

La media de las curvas de fluorescencia (curvas O-K-J-I-P) de plantas de *Vigna* que crecieron en diferentes medios de cultivo que contenían diferentes concentraciones de KNO_3 y la media de las curvas de plantas inoculadas con *Rhizobium* (NGR234) se muestran en la figura 2.

Cada curva media ha sido calculada usando aproximadamente 72 curvas de fluorescencia por cada tratamiento. Las curvas experimentales de FC han sido normalizadas en el primer intervalo O-J (eventos single-turnover) usando la relación:

$$W_{(t)} = \frac{F_{(t)} - F_{50\mu s}}{F_{2ms} - F_{50\mu s}} \quad (3)$$

donde $F_{(t)}$ es el nivel de fluorescencia de cada punto de la curva, $F_{50\mu s}$ es el nivel de fluorescencia en el primer punto de la curva que ocurre a $50 \mu s$ y F_{2ms} es el nivel de fluorescencia que se registra al tiempo 2 ms.

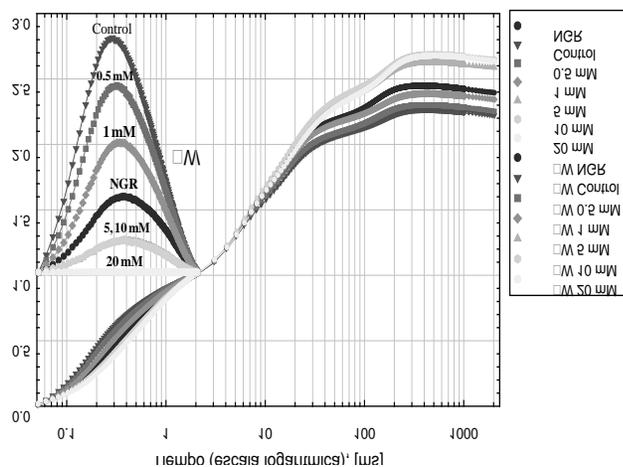


Fig. 2. Curvas de emisión de fluorescencia clorofílica variable a la curva media de fluorescencia emitida por plantas de *Vigna* creciendo en un medio que contenía 20 mM de KNO_3 en la solución de cultivo.

La Figura 2 muestra la diferencia entre las curvas normalizadas de FC o $\Delta W = (W [\text{del tratamiento } x] - W [\text{del tratamiento con } 20 \text{ mM } KNO_3])$ donde x corresponde al tratamiento (campanas o curvas parabólicas orientadas de arriba a abajo) que contenía 0 (Control), 0,5, 1, NGR, 5, y 10 mM KNO_3 . Estos resultados cuantifican el potencial fotosintético en función de la concentración de nitratos o potencial de fijación de nitrógeno de la planta.

Usando los datos de la Figura 2, fue posible determinar que la presencia de *Rhizobium* NGR232 suministra a la planta huésped una concentración de N equivalente a la concentración de N suministrada por una solución de cultivo que contiene aproximadamente 3 mM KNO_3 . El N fijado gracias a la asociación simbiótica *Vigna-Rhizobium* (NGR232) corresponde a un 70% de la concentración de saturación de KNO_3 bajo la cual las plantas muestran una curva de FC O-J-I-P con un pico K más pronunciado y que aparece cuando las plantas son expuestas a condiciones de stress severo.

6 Conclusiones

En este trabajo se presenta una aplicación de redes neuronales en el reconocimiento de patrones, en este caso al reconocimiento de distintos medios de cultivo de *Vigna unguiculata*. Gracias a la técnica aquí desarrollada, ha sido posible determinar que la presencia de *Rhizobium* NGR232 suministra a la planta huésped una concentración de N equivalente a la concentración de N suministrada por una solución de cultivo que contiene aproximadamente 3 mM KNO_3 .

El uso de técnicas estadísticas univariantes y multivariantes contribuyen a mejorar la calidad de la clasificación. Estas técnicas se perfilan como muy útiles para detectar patrones y variables significativas. El uso de los tres primeros componentes principales permite reducir la cantidad de da-

tos de entrada en la red neuronal con una pérdida mínima de información. Técnicas formales de estadística multivariante como el Análisis de Varianza Multivariante o MANOVA, y la prueba T^2 de Hotelling son de gran utilidad en aplicaciones de reconocimiento de patrones, para decidir la pertinencia del procedimiento de separación o clasificación, así como para detectar aquellas variables relevantes que aportan a la separación o clasificación de los grupos.

Para este estudio en particular, se compara el error de clasificación al entrenar las redes neuronales cuyas entradas corresponden a los puntos de la curva de fluorescencia con las redes que han sido entrenadas utilizando los componentes principales como variables de entrada. Es importante señalar, que el error de clasificación disminuye en promedio 8.55% cuando se utilizan los componentes principales como datos de entrada a las redes neuronales que cuando se utilizan las mediciones originales de la curva de fluorescencia para el primer y segundo conjunto de mediciones, y en el tercer conjunto de medición el error de clasificación es el mismo en la etapa de entrenamiento y en la etapa de validación independientemente del tipo de dato de entrada a la red neuronal.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que el análisis de señales de FC por medio de redes neuronales artificiales puede ser empleado para cuantificar el suministro de N en plantas de *Vigna unguiculata*. Este es el primer estudio que presenta datos que permiten establecer una relación directa entre la cantidad de N fijado y la emisión de fluorescencia clorofílica en plantas de *Vigna unguiculata*.

Para estudios posteriores y siguiendo la línea de investigación aquí presentada, se recomienda controlar la fuente de variación atribuida a la edad de las hojas. Nuestras observaciones muestran una influencia importante del estado de maduración o edad de las hojas sobre la respuesta medida con las curvas de fluorescencia. Planeamos una posible extensión de este estudio para investigar el efecto que ejercen concentraciones mayores de nitratos en el suelo y que podrían provocar un efecto inhibitorio en la fijación de N por asociación simbiótica leguminosa-*Rhizobium* (Zhou y col., 2006). En una perspectiva a largo plazo, buscamos extender este método para diagnosticar la carencia de N en otras leguminosas y otras especies de plantas combinando la variación en suministro de N con diferentes factores causantes de estrés en plantas (temperatura, luz, presencia de metales pesados y sequía, entre otros).

Agradecimientos

Ronald Maldonado Rodríguez agradece al Laboratorio de fisiología de plantas y al laboratorio de bioenergética y microbiología de la Universidad de Ginebra, Suiza, dirigidos respectivamente por el Prof. Dr. W. J. Broughton y Prof. Dr. R. J. Strasser. Este trabajo fue financiado con fondos de investigación otorgados por la Swiss National Foundation (Grant No. 3100-057040.99) y el Programa Europeo INTERREG II Rhin-Sud Project.

Referencias

- Addiscott T, Whitmore A, Powlson D, 1991, Farming, Fertilizers and the Nitrate Problem. C.A.B. International, UK, 170 pp.
- Anderson TW, 2003, An Introduction to Multivariate Statistical Analysis. Wiley Series in Probability and Statistics. Third Edition. John Wiley & Son. United States.
- Arun A, Sridhar K, 2004, Symbiotic performance of fast-growing rhizobia isolated from the coastal sand dune legumes of west coast of India. *Biology and Fertility of Soils*, Vol.40, No.6, pp. 435-439. Springer.
- Bredemeier C, Schmidhalter U, 2001, Laser-induced chlorophyll fluorescence to determine the nitrogen status of plants. Serie de textos: Developments in plant and soil sciences, food security and sustainability of agro - ecosystems. Editores W. J. Horst y col., "Plant Nutrition", Vol. 92, pp. 726-727, ISBN 978-0-7923-7105-2.
- Day D, Poole P, Tyerman S, Rosendahl L, 2000, Ammonia and Amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cellular and Molecular Life Sciences* Vol.58, pp.61-71.
- Ehlers J, Hall A, 1997, Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crop Research* Vol. 53, pp. 187-204.
- Fellay R, Hanin M, Montorzi G, Frey J, Freiberg C, Golinowski W, Staehelin C, Broughton W, Jabbouri S, 1998, Free Content nodD2 of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the nodABC operon, *Molecular Microbiology*, Vol.27, No.5, pp.1039-1050 (12), Blackwell Publishing.
- Franco M, Vivo J, 2007, Análisis de Curvas ROC. Editorial La Muralla. Madrid – España.
- Forman D, Al-Dabbagh S, Doll R, 1985, Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain. *Nature* Vol. 313, pp. 620-625.
- FREEP (Fertilizer Research and Education Program). A Progress Report. California Department of Food and Agriculture, 1990, 1992.
- Genty B, Briantais J – M, Baker N, 1989, The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* Vol.990, pp.87-92.
- Hagan M, Demut H, Beale M, 1996, Neural Network Design. Thompson Publishing Company.
- Johnson R, Wichern D, 2001, Applied Multivariate Statistical Analysis. Prentice Hall. United States.
- Lawlor D, 2002, Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: Mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany. Inorganic Nitrogen Assimilation Special Issue*, Vol. 53, No.370, pp. 773-787.
- Lazár D, 1999, Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1412, pp. 1-28. 1999.
- Maldonado Rodríguez R, Biolyzer Software © 1998-2014 by Fluoromatics. Programa informático para

el análisis de señales de fluorescencia clorofílica.

Se encuentra en: <http://www.fluoromatics.com>, Fecha de consulta 10 enero 2014.

Maldonado - Rodríguez R, Pavlov S, Gonzalez A, Okaurom A, Strasser R, 2003, Can Machines Recognize Stress in Plants? Environmental Chemistry Letters. Vol. 1, pp. 201-205. DOI 10.1007/s10311-003-0034-7. Springer-Verlag.

Maldonado - Rodríguez R, Schmitz P, Strasser R, 2001, Self-Organization Maps and Chlorophyll *a* Fluorescence: Monitoring the evolution of *Rhizobium* nodulation and nitrogen fixation in leguminous plants. Proceedings of the 12th Photosynthesis Congress. Brisbane, Australia, August 18-23.

Odee D, Haukka K, McInroy S, Sprent J, Sutherland J, Young J, 2002, Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. Soil Biology & Biochemistry, Vol. 34, No.6, pp.801-811. Elsevier.

Pérez-Méndez A, Torres E, Rivas F, Maldonado - Rodríguez R, 2005, A Methodological Approach for Pattern Recognition System using discriminate analysis and artificial neural networks. 6th WSEAS International Conference on Neural Networks. Lisbon, Portugal.

Pérez-Méndez A, Torres E, Rivas F, Maldonado - Rodríguez R, 2005, *Pisum sativum* classification based on a methodological approach for pattern recognition using discriminant analysis and artificial neural networks. 6th WSEAS International Conference on Neural Networks. Lisbon, Portugal.

Pueppke S, Broughton W, 1999, *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. Mol. Plant Microbe Interact. Vol. 12, No. 4, pp. 293-318.

Skillman, J. Osmond, C. 1998. Influence of nutrient supply and growth irradiance on photoinhibition and recovery in *Heuchera americana* (Saxifragaceae). Physiol. Plant. Vol. 103, pp. 567-573.

Statsoft Incorporated. 2002. *Statistica Neural Networks*, Statsoft Incorporated (Ed.) CD-ROM.

Strasser R, Srivastava A, Govindjee, 1995, Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. Photochemistry and Photobiol. Vol.61, No.1, pp. 32-42.

Wanek W, Arndt S, 2002, Regulation of Growth, Development and Whole Organism Physiology Difference in $\Delta^{15}\text{N}$ signatures between nodulated roots and shoots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic N₂ fixation to plant N, Journal of Experimental Botany, Vol.53, No.371, pp.1109-1118, Oxford University Press.

Zhang Y, Wang E, Tian C, Wang F, Han L, Chen W, Chen W, 2008, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanningense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and

Vigna radiata in the subtropical region of China. FEMS Microbiology Letters, Vol. 285, No. 2, pp.146-154. Blackwell Publishing.

Zhang W, Yang J, Yuan T, Zhou J, 2007, Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Biology and Fertility of Soils, Vol. 44, No.1, pp. 201-210. Springer. Zhou X, Liang Y, Chen H, Shen S, Jing Y, 2006, Effects of rhizobia inoculation and nitrogen fertilization On photosynthetic physiology of soybean. Photosynthetica. Vol. 44, No.4, pp. 530-535. Springer, Netherlands.

Recibido: 05 de abril de 2014

Aceptado: 15 de enero de 2015

Pérez, Anna Gabriela: Licenciada en Estadística. Magister en Estadística Aplicada y Computación. Candidata a Doctora en Formación, Empleo y Desarrollo Regional. Profesora de la Escuela de Estadística de la Universidad de Los Andes. Miembro Titular del Laboratorio de Sistemas Inteligentes de la Universidad de Los Andes.

Maldonado Rodríguez, Ronald: Ingeniero químico, Master de Ciencias en Ingeniería química Universidad Prof. Dr. Assen Zlatarov, Burgas, Bulgaria. Doctorado interdisciplinario en Ciencias. Investigador del laboratorio de Microbiología y Bioenergética de la Universidad de Ginebra. Desarrollo de Software científico. Especialista en Inteligencia Artificial (reconocimiento de patrones). Correo electrónico: ronaldmr@yahoo.com

Pavlov, Stancho: Profesor del Departamento de matemáticas de la Universidad de Burgas "Dr. Assen Zlatarov". Director de la unidad de desarrollo de software científico. Especialista en Inteligencia Artificial (reconocimiento de patrones). Correo electrónico: stancho.pavlov@btu.bg

Rivas Echeverría, Francklin: Ingeniero de Sistemas. Magister en Ingeniería de Control. Doctor en Ciencias Aplicadas. Profesor de la Escuela de Ingeniería de Sistemas de la Universidad de Los Andes. Coordinador y Miembro Titular del Laboratorio de Sistemas Inteligentes de la Universidad de Los Andes. Correo electrónico: rivas@ula.ve

