

Técnica de biospeckle para estudiar la dependencia de la viabilidad de semillas de lupino con la temperatura

Marcia García[†], Robert Guzmán y Asticio Vargas

Depto. de Ciencias Físicas, Universidad de La Frontera, Ave. Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile; mgarcia@ufro.cl; rguzman@ufro.cl; avargas@ufro.cl.

[†]autor para la correspondencia

Recibido el 15/04/2009. Aprobado en versión final el 10/06/2010.

Sumario. La técnica basada en el fenómeno conocido como speckle dinámico o biospeckle es aplicada para determinar la viabilidad de semillas de *Lupinus albus* producidas en la Región de la Araucanía, Chile y analizar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la viabilidad de las mismas. El sistema experimental utilizado para la obtención de los THSP (Time History of the Speckle Pattern) de cada muestra consta fundamentalmente de: una cabina aislante térmica provista de un circuito de establecimiento y control de la temperatura; un láser de He-Ne random, de 7 mW y una cámara CCD AVT PIKE F-032B con digitalizador de imágenes. Se presentan los resultados obtenidos con diferentes conjuntos de 100 semillas de lupino albus (en grupos de 20) comparando los cálculos de los momentos de inercia (MI) de la matriz de co-ocurrencia de los THSP con la prueba standard usando una solución acuosa de Tetrazolium (TZ) al 0,5% en el rango de temperaturas entre 5 y 25 °C, apreciándose una buena correlación entre ambos métodos.

Abstract. The dynamic speckle or biospeckle technique is applied to determine the viability of *Lupinus albus* seeds produced in The Araucanía Region, Chile and to analyze the effect of the storage temperature in the viability of the same ones. The experimental setup used for the obtaining of the THSP (Time History of the Speckle Pattern) of every sample consists fundamentally of: an insulating thermal cabin provided with a circuit of establishment and control of the temperature; a 7 mW laser of He-Ne random, and a CCD AVT PIKE F-032B camera with frame grabber. The results obtained with different sets of 100 *Lupinus albus* seeds (in lots of 20) are presented, comparing the inertia moment (MI) of the THSP co-occurrence matrix values with the standard test using Tetrazolium (TZ) 0,5% solution, in the temperature range between 5 and 25 °C. A good correlation between both methods is appreciated.

Palabras clave. speckle dinámico o biospeckle, 42.30.Ms, viabilidad

1 Introducción

Una semilla viable es aquella que es capaz de germinar y producir una planta nueva. El problema de qué tiempo pueden permanecer latentes las semillas y aún ser viables ha interesado a los botánicos, naturalistas, reforestadores y jardineros por muchos años y aún es materia de investigación. En la práctica muchas semillas son notoriamente de vida corta. Las de corteza dura son viables a más largo plazo que las de corteza suave¹.

Debido a las necesidades de comercialización y de

desarrollo de las semillas es necesario seleccionarlas de acuerdo a su actividad y mantenerlas en condiciones apropiadas de almacenamiento que garanticen la viabilidad por un largo período de tiempo. Sin embargo, la viabilidad de las semillas puede verse afectada por factores tan diversos como los insecticidas y fertilizantes usados en el proceso de obtención de la misma, así como de la temperatura, humedad, presión, etc. en la etapa de almacenamiento².

La importancia de la viabilidad radica en el aseguramiento de los resultados de producción y comercializa-

ción. Esto ha hecho que las organizaciones internacionales y locales se dediquen a la selección y almacenamiento de semillas, tanto para la producción de alimentos como para la preservación de las diversas especies. Estas organizaciones se dedican también al estudio de formas de garantizar la viabilidad de las semillas. Las prácticas más usadas para la determinación de viabilidad de las semillas son: la prueba del porcentaje de germinación³ y la prueba topográfica del Tetrazolium (o TZ test)⁴. Esta última consiste en la reacción bioquímica de las semillas al ser embebidas en una solución acuosa de cloruro o bromuro de trifetil tetrazolio al 0,5 ó 1%; las semillas viables se tiñen de un color rojo intenso y las inviables permanecen incoloras o rosa pálido.

Las pruebas utilizadas para determinar el vigor y la viabilidad de una semilla no siempre dan resultados consistentes entre sí y la confiabilidad y equivalencia de las distintas pruebas han sido objeto de estudios en los últimos años. En publicaciones recientes se han considerado nuevas técnicas basadas en interferometría láser como herramienta para el análisis de semillas⁵. Una de ellas se basa en las propiedades del speckle dinámico. El origen del fenómeno speckle se presenta cuando luz coherente con $\lambda \approx 10^{-7}$ m incide sobre un objeto que presenta una superficie rugosa para la longitud de onda del láser y se produce una interferencia aleatoria que se traduce en regiones brillantes y oscuras. El speckle dinámico o bio-speckle se manifiesta por el movimiento aleatorio o el cambio de propiedades de: fuente, dispersores, índice de refracción, detector, etc. Por ser un fenómeno que ocurre cuando la luz coherente es dispersada por objetos que presentan algún grado de actividad⁶ constituye una técnica apropiada y no destructiva para la prueba y el monitoreo sin contacto de algunos fenómenos industriales y biológicos de interés práctico^{7, 8}. Entre los trabajos encontrados se destacan aquellos que han sido aplicados a la investigación de fenómenos temporales con el fin de caracterizar cuantitativamente la actividad biológica de especímenes botánicos⁹, el secado de pintura¹⁰, etc. Al aplicarla al estudio de la viabilidad de semillas se pretende generar un mapa de cada semilla, identificando áreas con diferente actividad, de modo similar a la prueba del Tetrazolium. La información usualmente se obtiene usando estadística de primero y segundo orden en el speckle de Fresnel obtenido; por propagación libre se registra un número grande de muestras de intensidad simultáneas, que representan virtualmente el mismo estado¹¹.

Oulamara¹² propuso el uso de una cámara CCD para registrar y almacenar una columna individual de la imagen en pasos consecutivos de tiempo en un display y construir la historia temporal de un patrón de speckle (THSP, Time History of Speckle Pattern). Así la información espacial y temporal se almacena simultáneamente. Durante la última década se han desarrollado dos métodos: uno para medir la actividad dinámica usando la matriz de co-ocurrencia de la historia temporal del patrón de speckle¹³ y otro para visualizar la actividad di-

námica local de la muestra¹⁴. En este trabajo se estudia la evolución temporal del patrón de speckle de cada semilla (del conjunto de control seleccionado) a temperatura ambiente y a diferentes temperaturas en el rango comprendido entre 5 y 25 °C, considerando el método propuesto por Oulamara et al.

2 Materiales y método

El método utilizado consiste en registrar una alta cantidad (entre 256 y 512) de imágenes sucesivas digitalizadas del patrón de speckle dinámico para cada estado del fenómeno a evaluar. De cada una de las imágenes se selecciona una columna y se construye una nueva imagen juntando lado a lado las columnas extraídas de los patrones sucesivos. La imagen resultante constituye la historia temporal del patrón de speckle o THSP; sus filas representan diferentes puntos en el patrón de speckle y las columnas, sus intensidades en una secuencia de pasos temporales regularmente espaciados. La actividad de la muestra aparece como cambios de intensidad en la dirección horizontal a lo largo de las filas.

Cuando la semilla presenta baja actividad, las variaciones del patrón de speckle son lentas y el THSP muestra una forma horizontalmente alargada. En el límite, cuando la semilla está muerta, el THSP no muestra variaciones en su patrón de actividad. Por el contrario, cuando la semilla tiene alta actividad, el THSP muestra variaciones rápidas de intensidad, tal como el propio patrón espacial de speckle (ver Figura 1). De este modo se asume que el THSP es representativo del estado de la muestra que está siendo evaluada cuando fue registrado.

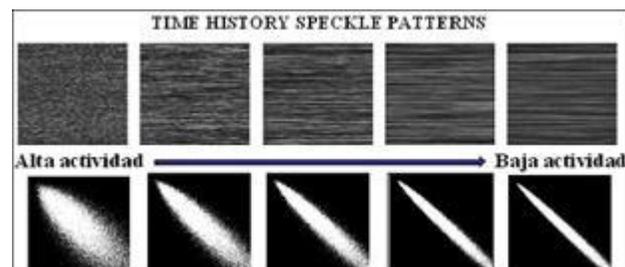


Figura 1. Comparación entre los THSP y la matriz de co-ocurrencia de muestras con diferente actividad.

Momento de Inercia y Matriz de Co-ocurrencia.

La matriz de co-ocurrencia M_{co} es una matriz cuadrada definida como $M_{co} = [N_{ij}]$, donde sus elementos son los números N_{ij} de la ocurrencia de cierto valor de intensidad i , que es seguido inmediatamente de una intensidad de valor j ; esto es un caso especial de la llamada matriz de dependencia del nivel espacial de grises que se usa para caracterizar texturas en imágenes. En el caso espacial, su diagonal principal está relacionada con regiones homogéneas y los elementos distintos de cero que están alejados de la diagonal principal representan ocurrencias de alto contraste. En este caso, la variable de interés es el tiempo y los valores involucrados son la ocurrencia de

un cierto valor de gris y en el próximo paso temporal por un valor j en el THSP. Cuando la intensidad no cambia, los únicos valores distintos de cero de la matriz pertenecen a la diagonal principal. La presencia de ruido en la fuente de iluminación y en la detección excluye esta situación.

En la medida que la muestra presente actividad los valores de intensidad cambiarán en el tiempo, el número de valores fuera de la diagonal se incrementa y la matriz pierde densidad en la zona de la diagonal principal, aunque la matriz está mayoritariamente compuesta de valores nulos. Para obtener una medida cuantitativa a partir de esta matriz es necesario normalizarla; para esto se divide cada fila de la matriz por el número de veces que el primer nivel de gris aparece, así la suma de los componentes en cada fila de la matriz resultante M con valores M_{ij} es igual a 1.

$$M_{ij} = \frac{N_{ij}}{\sum_j N_{ij}} \quad (1)$$

Esta matriz modificada es llamada la matriz de co-ocurrencia modificada y ésta corresponde a cierta generalización del histograma. Es una aproximación experimental de la matriz de probabilidad de transición entre valores de intensidad en el THSP.

Una medición de la propagación de los valores de M alrededor de la diagonal principal puede ser construida como la suma de los productos entre los valores de la matriz y la distancia entre la posición del elemento en una fila de la matriz hasta la diagonal principal al cuadrado. Éste es un momento particular de segundo orden llamado momento de inercia M_I de la matriz con respecto a la diagonal en la dirección de las filas. El nombre es sugerido por la analogía mecánica de esa operación.

$$M_I = \sum_{ij} M_{ij} |i - j|^2 \quad (2)$$

Las ocurrencias en la diagonal no contribuyen a incrementar el valor de M_I , mientras las entradas más lejanas de la diagonal de M agregan sus valores M_{ij} más altos. Por tanto, el valor de M_I es una medida de la variación de intensidad o del contraste a lo largo de las filas del patrón THSP y por tanto de la bioactividad de la muestra.

Aunque el biospeckle ya ha sido utilizado por otros autores para la determinación de la viabilidad de algunas semillas, sin embargo a partir de la revisión bibliográfica realizada, cada experimento ha sido hecho con muestras específicas y por tanto nuestro primer objetivo fue validar esta técnica para las semillas producidas en nuestra Región; además, los estudios solamente han considerado la variable humedad durante el almacenamiento, la que sin duda es importante pero ésta a su vez está íntimamente ligada a la temperatura de almacenamiento, variable relevante en la viabilidad de las semillas, por lo cual nuestro estudio se encaminó a desarrollar un sistema de medición de los THSP con control de temperatura, con el fin de establecer una correlación entre este parámetro y

el nivel de actividad de las semillas estudiadas.

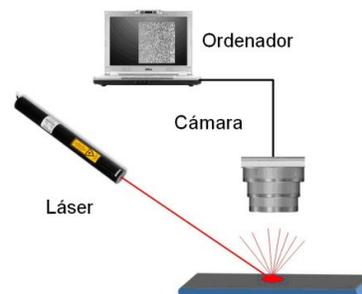


Figura 2. Esquema simplificado del sistema experimental.

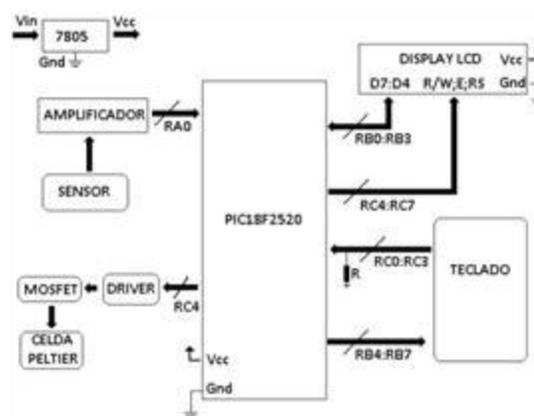


Figura 3. Esquema del circuito de establecimiento y control de la temperatura de las semillas.

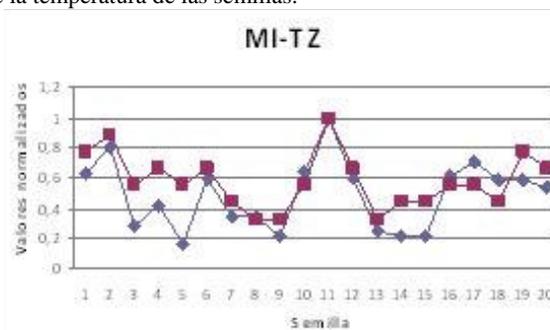


Figura 4. Comparación entre los valores calculados del momento de inercia (MI) de la matriz de co-ocurrencia de los THSP (♦) con la prueba standard del Tetrazolium (TZ) (■) obtenidos para 100 semillas de *Lupinus albus*, separadas en grupos de 20.

Entre las semillas de interés para este estudio seleccionamos el lupino blanco (*Lupinus albus*) que es cultivado en el sur de Chile, en particular por pequeños agricultores en la Región de La Araucanía (37° 30' - 39° 30') y que es exportado para consumo humano a países europeos y árabes¹⁵. Entre los factores que pueden afectar el rendimiento de los cultivos de estas semillas es un hongo que origina la antracnosis, así como la gran variación de temperatura y humedad que caracteriza a esta región durante las diferentes épocas de cada año.

Preparación de las muestras. Un lote de 100 semillas de *Lupinus albus* se embebieron en agua durante

24 horas; posteriormente fueron cortadas con bisturí, conservando la mitad del embrión en cada cotiledón. Después 100 mitades se sumergieron en una solución de Tetrazolium al 0.5 % dentro de un calorímetro, manteniendo la temperatura constante de 35 °C durante 3 horas y después de colocadas en papel absorbente se clasificaron en distintos niveles de viabilidad según la tinción, utilizando los criterios de la bibliografía consultada. Las otras 100 mitades fueron analizadas mediante la técnica de biospeckle.

Experimento. El sistema experimental utilizado para la obtención de los THSP de cada semilla consta fundamentalmente de: un láser de He-Ne random, de 7 mW, $\lambda = 633$ nm y una cámara CCD AVT PIKE F-032B con digitalizador de imágenes. Un esquema simplificado se muestra en la Figura 2.

El soporte de la semilla y parte de la óptica utilizada (espejo y cámara) se encuentran en el interior de una cabina aislante térmica provista de un circuito de establecimiento y control de la temperatura; éste consta de un microcontrolador PIC18f2520 y un sensor de temperatura LM35. El establecimiento de cada valor de temperatura se realiza mediante una celda Peltier PE-071-08-15, regulando el voltaje DC aplicado a sus terminales mediante una fuente estabilizada y un PWM (Pulse-Width Modulation) y utilizando un MOSFET de potencia, manejado por su respectivo driver. Inicialmente se coloca una temperatura como set-point y ésta puede modificarse on-line mediante una interfaz provista de un panel LCD y un teclado numérico. El esquema del controlador de temperatura diseñado específicamente para este trabajo se presenta en la Figura 3.

3 Resultados

Del cuidadoso análisis topográfico realizado con las 100 mitades de las semillas sometidas a la solución de Tetrazolium, éstas se clasificaron en diferentes niveles de viabilidad en un orden creciente entre los valores 0 y 9; la mayor cantidad de semillas del lote estudiado quedaron clasificadas entre los niveles 4 y 8 (13 semillas en el nivel 4, 18 en 5, 12 en 6, 13 en 7, 16 en 8).

Las otras 100 mitades fueron analizadas por la técnica de biospeckle y, mediante el código Matlab elaborado para el procesamiento de los patrones temporales, se efectuó el cálculo de los momentos de inercia de la matriz de co-ocurrencia correspondiente a cada semilla. Posteriormente se efectuó la clasificación de la respectiva viabilidad (entre 0 y 9) en orden creciente del valor del momento de inercia normalizado. Para cada grupo de 20 semillas se realizó la comparación entre la clasificación hecha por ambos métodos utilizados, apreciándose una buena correspondencia. Un ejemplo de ello se aprecia en la Figura 4.

A partir de los resultados obtenidos con todas las semillas de lupino estudiadas, se efectuó una correlación entre los valores calculados del momento de inercia de la matriz de co-ocurrencia de cada semilla con la clasificac-

ción efectuada de cada una por el test del Tetrazolium, lo que permitió validar la técnica del biospeckle como método alternativo y no destructivo para el estudio de la viabilidad de estas semillas. Esta correspondencia se presenta en la Figura 5.

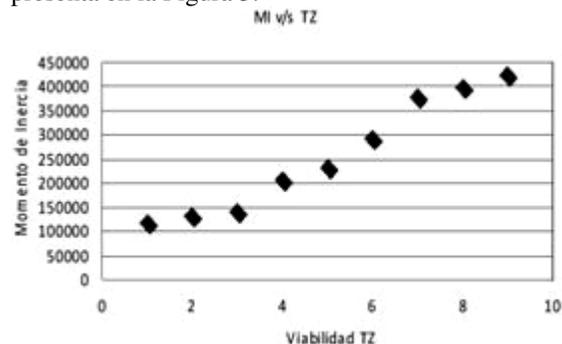


Figura 5. Correlación entre los valores calculados del momento de inercia (MI) de la matriz de co-ocurrencia de los THSP con la prueba del Tetrazolium (TZ) para la determinación de la viabilidad de las semillas de *Lupinus albus* estudiadas.

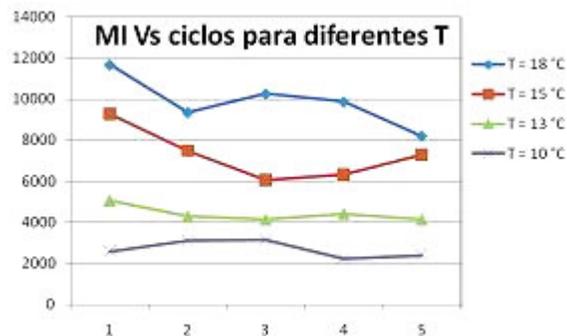


Figura 6. Dependencia del valor del momento de inercia (MI) de la matriz de co-ocurrencia de los THSP con la temperatura T para una semilla de *Lupinus albus* representativa del lote analizado.

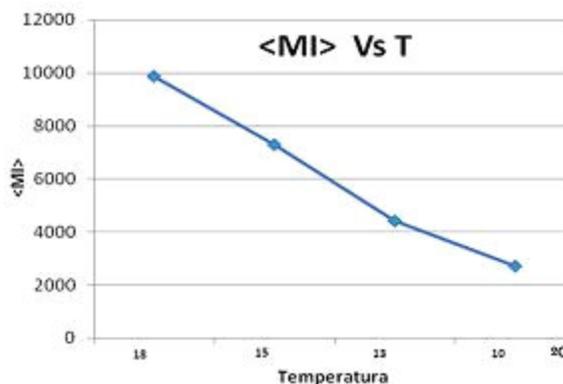


Figura 7. Momento de inercia promedio <MI> de la matriz de co-ocurrencia de los THSP en función de la temperatura para un conjunto de semillas de *Lupinus albus* del lote analizado.

Una vez validada la técnica se procedió a obtener los THSP de las semillas para diferentes temperaturas controladas en el rango entre 5 °C y 25 °C, siempre por en-

cima de la temperatura mínima y por debajo de la temperatura máxima permisibles para no afectar la viabilidad de la semilla. Primeramente se procedió a humedecer las semillas, del mismo modo que se hizo en la etapa anterior pero en este caso se mantuvieron enteras, sin cortar.

Se registraron entre 5 y 10 THSP de cada muestra a cada temperatura y se calcularon los momentos de inercia de la matriz de co-ocurrencia correspondiente, para luego hallar el valor medio y establecer su dependencia con la temperatura.

En la mayoría de las semillas se apreció poca variación en los 5 últimos ciclos de las 10 repeticiones, por lo que, salvo casos muy aislados, se decidió detener la toma de los patrones al concluir en 5^{to} ciclo; también en todas las semillas estudiadas se obtuvo una disminución de los MI promedios al disminuir la temperatura.

En la Figura 6 se presentan las variaciones del momento de inercia MI con la temperatura en los primeros 5 ciclos para una muestra representativa del lote de 100 semillas de *Lupinus albus* estudiadas. También, se decidió considerar válidas las mediciones a temperaturas igual o mayor que 10 °C debido a dos factores: la condensación de agua en la semilla y la dificultad de mantener estable la temperatura durante todo el período de tiempo que se hacían los registros.

La dependencia con la temperatura del valor medio del momento de inercia <MI> de la matriz de co-ocurrencia de los THSP para un subconjunto de semillas del lote analizado se representa en la Figura 7 para algunos valores de temperatura dentro del rango de variación en el que se llevaron a cabo las mediciones; se puede apreciar la disminución de <MI> con la temperatura y a su vez, la significativa disminución de la actividad de las muestras.

4 Conclusiones

Se desarrolló un software amigable para la obtención de los THSP en base a un código MatLab que permite modificar parámetros: resolución, velocidad de muestreo, tiempo de adquisición, etc. según la actividad de la muestra.

Se obtuvo una buena correlación entre el índice de viabilidad de las semillas utilizando la tinción con Tetrazolium y los respectivos valores del momento de inercia de la matriz de co-ocurrencia de los THSP, permitiendo validar esta técnica para caracterizar la actividad de las semillas de *Lupinus albus* estudiadas.

Se implementó un sistema para el establecimiento y control de la temperatura de las muestras en el rango comprendido entre 5 y 25 °C, aunque se comprobó experimentalmente que los valores registrados por debajo de 10 °C no son confiables por no permitir garantizar la humedad constante de la muestra y por no apreciarse repetibilidad en los valores de MI en los diferentes ciclos de registros de los THSP.

La actividad de las semillas disminuye con la disminución de la temperatura pero aún es necesario evaluar el

error introducido por el efecto de la humedad en la condensación de agua al disminuir la temperatura entre 5 °C y 10 °C así como mejorar la disipación del soporte donde se coloca la semilla y se anida la celda Peltier para lograr la estabilidad de la temperatura en ese bajo rango.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo de la Dirección de Investigación y Postgrado de la Universidad de La Frontera mediante el Proyecto **DIUFRO DI 07-0095**.

Referencias

1. A.S. BASRA, "Seed Quality: basic mechanisms and agricultural implications". Food Products Press, New York. (1995).
2. A. Peretti, "Manual para análisis de semillas". Ed. Hemisferio Sur S. A. Primera edición, Argentina. (1994).
3. J. G. Hampton, L. Kahre and A. J. G. Van Gestel, "Quality seed from production to evaluation". Seed Science & Technology, 24, 393-407. (1996).
4. M. S. Howarth and P. C. Stanwood, "Tetrazolium staining viability seed test using colour image processing". Transactions of the ASAE, 36, 1937-1940. (1993).
5. R. A. Braga Jr., I. M. Dal Fabbro, F. M. Borem, G. Rabelo, R. Arizaga, H. J. Rabal and M. Trivi, "Assessment of Seed Viability by Laser Speckle Techniques". Biosystems Engineering, 86 (3), 287-294. (2003).
6. R. A. Braga Jr., B. Oliveira Silva, G. Rabelo, R. Marques Costa, N. Cap, A. Machado Enes, R. Arizaga, H. J. Rabal, M. Trivi and G. Horgan, "Reliability of Biospeckle Image Analysis". Optics and Lasers in Engineering, 45 (3), 390-395. (2007).
7. Y. Aizu and T. Asakura, "Bio-speckles. In Trends in Optics". Consortini A. Ed., 27-49. Academic Press, London. (1996).
8. I. Passoni, A. Dai Pra, H. Rabal, M. Trivi and R. Arizaga, "Dynamic speckle processing using wavelets based entropy". Optics Communications, Vol. 246, Issues 1-3, 82-88. (2005).
9. Z. Xu, C. Joenathan, B. M. Khorana, "Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens". Optical Engineering, 34, 1487-1502. (1995).
10. J. Amalvy, C. Lasquibar, R. Arizaga, H. Rabal and M. Trivi, "Application of dynamic speckle interferometry to the drying of coatings". Progress in Organic Coatings, 42, 89-99. (2001).
11. R. Jones & C. Wykes, "Holographic and speckle interferometry", 2^{da} Edición, Cambridge Studies in Modern Optics. (1989).
12. A. Oulamara; G. Tribillon and J. Duvernoy; "Biological activity measurement on botanical specimen surface using temporal decorrelation effect on laser speckle". J. Mod. Opt. 36; 165-179. (1989).
13. R. Arizaga, M. Trivi and H. J. Rabal, "Speckle time evolution characterization by co-occurrence matrix analysis". Optics and Laser Technology, 31, 163-169. (1999).
14. R. Arizaga, N. Cap, H. J. Rabal and M. Trivi, "Display of local activity using dynamical speckle patterns". Optical Engineering, 41, 287-294. (2002).
15. M. Mera y R. Galdames, "Boroa-INIA. Primera variedad de Lupino (*Lupinus albus*) amargo exportable obtenida en Chile". Agricultura Técnica, Vol. 67, 320-324. (2007).