

---

# PROCESADO DE PATRONES DE *SPECKLE* MEDIANTE DOS MÉTODOS PARA MEDIR LA DESECACIÓN DE SEMILLAS DE UCHUVA (*Physalis peruviana* L.)

INGRID INCIARTE, LUIS MARTÍ-LÓPEZ, EVELIO E. RAMÍREZ-MIQUET, ERICK HERNÁNDEZ, ÁNGEL VILORIA y FERNANDO OTÁLORA-LUNA

---

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la respuesta a la hidratación y desecación de semillas de *Physalis peruviana* L. (uchuva) utilizando la técnica de speckle dinámico, empleando un láser de baja potencia. Se tomó una secuencia de fotografías de las semillas con una cámara digital adaptada a un microscopio estereoscópico, incorporado por primera vez al monitoreo de tejidos vivos con esta técnica. El objetivo del trabajo es aplicar y comparar dos métodos de procesamiento de imágenes de patrones de speckle: a) diferencias generalizadas, ligeramente modificado en este trabajo y b) diferencia temporal. Este último es aplicado por primera vez a semillas. Se trabajó con tres grupos de semillas: semillas vivas hidratadas, semillas vivas secas y semillas

no viables secas. Se demuestra la utilidad de ambos métodos, confirmando los resultados obtenidos en trabajos previos, donde el patrón de actividad de speckle dinámico de semillas hidratadas es mayor que el patrón de actividad de semillas secas y que a través del procesado digital de una secuencia de imágenes es posible medir esta diferencia. Con los dos métodos se detectó mayor actividad en los patrones de speckle dinámico en las semillas vivas hidratadas que en las semillas vivas secas y no viables secas; adicionalmente se midió la evolución temporal del proceso de desecación de las semillas hidratadas. Se propone el uso de esta técnica para el estudio y desarrollo de tecnologías de conservación y almacenamiento de semillas.

La uchuva (*Physalis peruviana* L., Figura 1) es una solanácea endémica del trópico andino (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) cuyo potencial agrícola se ha incrementado en los últimos años debido a su valor culinario y medicinal (Chaves *et al.*, 2005). El fruto es amarillo y parecido a un tomate, del tamaño de una canica o metra (1-2cm) y contiene

pequeñas semillas en su interior que miden 1,5-2,0mm de diámetro y 0,4-0,8mm de grosor.

Las semillas, siendo materiales biológicos, poseen una característica única en comparación con los materiales no biológicos, pues presentan componentes internos que cambian de posición en el tiempo como consecuencia de diversos procesos fisiológicos. Este movi-

miento puede ser mayor o menor dependiendo de la etapa de maduración, el crecimiento o la pérdida de viabilidad, así como la cantidad de agua, temperatura e iluminación. La dinámica interna del tejido de la semilla conduce a una gran complejidad en lo que respecta a la interacción de la luz con sus diversos componentes, interacción que hace posible evidenciar ciertos fenómenos propios de las

---

**PALABRAS CLAVE / Fotobiología / Moteado / Procesamiento de Imágenes / Speckle Biológico / Viabilidad de Semillas /**

Recibido: 14/10/2011. Modificado: 11/08/2012. Aceptado: 22/08/2012.

**Ingrid Mercedes Inciarte Vergara.** Licenciada en Física, La Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela. Magister en Física Fundamental, Universidad de Los Andes (ULA), Venezuela. Profesional Asociado a la Investigación, IVIC, Venezuela. e-mail: ingridi@ivic.gob.ve. Dirección: Laboratorio de Ecología Sensorial, Centro Multidisciplinario de Ciencias, IVIC. Loma de Los Guamos, Parroquia Jají, Edo. Mérida, Venezuela.

**Luis Martí-López.** Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN), La Habana, Cuba.

**Evelio Esteban Ramírez-Miquet.** Ingeniero Nuclear, Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas, Cuba. Aspirante a Investigador, Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN), Cuba. e-mail: ermiquet@ceaden.edu.cu

**Erick Kleny Hernández.** Bachiller en Ciencias, Liceo Rómulo Gallegos, Venezuela. Auxiliar de laboratorio, IVIC, Venezuela. e-mail: erickleny@gmail.com

**Ángel Viloria.** Licenciado en Biología, LUZ, Venezuela. Doctor en Zoología, The University of London, King's College, RU. Investigador, IVIC, Venezuela. e-mail: aviloria@ivic.gob.ve

**Fernando Otálora-Luna.** Licenciado en Biología, ULA, Venezuela. Doctor en Ciencias, Université de Neuchâtel, Suiza. Investigador, IVIC, Venezuela. e-mail: fotalora@ivic.gob.ve

---



Figura 1. Frutos y semillas de *Physalis peruviana* L. (uchuva).



Figura 2. Imagen de los tres grupos de semillas irradiadas con láser de 633nm.

semillas bajo diferentes condiciones de hidratación. Cuando las semillas son irradiadas con luz coherente como la de los láseres, ésta es dispersada, mostrando una apariencia granular o de moteado. La apariencia se debe a la distribución aleatoria de fases que se produce en la superficie de las semillas iluminadas a causa de la falta de homogeneidad de dicha superficie (Figura 2). La variación en el tiempo de este moteado se conoce comúnmente como *speckle* dinámico o *biospeckle* (Braga *et al.*, 2003; Rabal y Bra-

ga, 2009). Este último término se aplica cuando la dinámica del moteado está asociada a una actividad biológica (Braga *et al.*, 2003). En la última década se han utilizado las propiedades de los patrones de *speckle* para describir procesos de actividad biológica en semillas (Braga *et al.*, 2003, 2005, 2007; Enes *et al.*, 2005; Passoni *et al.*, 2005; Rabal y Braga, 2009; García *et al.*, 2010).

La apariencia del patrón de moteado es caótica, similar al de un líquido en hervor, por lo que se requiere aplicar métodos estadísticos para describir el fenómeno. Son diversos los métodos que se han desarrollado para procesar secuencias de imágenes de objetos que presentan un comportamiento dinámico. Entre los métodos utilizados para este tipo de análisis están el método de la diferencia temporal (DT; Chang *et al.*, 2005; Martí-López *et al.*, 2010) y el método de las diferencias generalizadas (DG; Arizaga *et al.*, 2002). Sin embargo, el primero de ellos no ha sido aplicado anteriormente al análisis de semillas. El método DT fue empleado recientemente (Martí-López *et al.*, 2010) para procesar imágenes de patrones de *speckle* dinámico obtenidas de la evaporación de una gota de agua sobre papel de filtro; los resultados muestran que dicho método es una poderosa herramienta para caracterizar procesos superficiales de difusión y evaporación. Para el procesamiento de las imágenes con el método DT se fraccionan las mismas a fin de utilizar las zonas de mayor actividad, evitando de esta manera las regiones de poco o nulo interés. Otros métodos, como el de las DG,

utilizan parte de la imagen para realizar el procesamiento de las mismas. En otros métodos se considera la imagen completa (Chang *et al.*, 2005).

Estudios anteriores han analizado la actividad de *speckle* en semillas a través de diferentes métodos de análisis tales como DG, Fujii y momento de inercia (Braga *et al.*, 2005; García *et al.*, 2010). En el presente trabajo se estudia la respuesta a la hidratación y desecación de semillas de uchuva a través de la técnica de *speckle* dinámico utilizando el método de las DG y, por primera vez en semillas, el método de la DT. El método de las DG se modificó ligeramente, tomando fracciones de la imagen en lugar de la imagen completa. El objetivo del trabajo es evaluar y comparar dos métodos de procesamiento digital de imágenes propuestos por Martí-López *et al.* (2010) y por Arizaga *et al.* (2002), respectivamente. Se discute cómo la técnica de moteado promete facilitar, por su rapidez, sencillez experimental, bajos costos de los equipos y eficiencia, el estudio y desarrollo de técnicas de conservación y almacenamiento de semillas (Pritchard *et al.*, 2004; Daws *et al.*, 2006).

Las semillas de uchuva estudiadas en el presente trabajo son ~120 veces más pequeñas que las comúnmente utilizadas en otros estudios similares (Braga, 2000; Braga *et al.*, 2003, 2005, 2007) en caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) y maíz (*Zea mays* L.). En la Tabla I se indican las dimensiones promedio de las semillas de caraota, maíz, melón y uchuva. La dificultad representada por las pequeñas dimensiones fue compensada incorporando, por primera vez, un microscopio estereoscópico a los métodos de observación y registro del *speckle* biológico, con la finalidad de manipular mejor las semillas. De este modo se amplía la versatilidad de esta técnica, mejorando la visibilidad de la textura de la superficie de las semillas.

## Materiales y Métodos

### Preparación de las semillas

Las uchuvas (*P. peruviana*) fueron cosechadas en la sede del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas en Mérida, ubicada en Loma de Los Guamos, Parroquia Jají, Municipio Campo Elías, Estado Mérida, Venezuela, en las coordenadas 8°33'36,14"N, 71°18'56,87"O, a 1853msnm. Los frutos fueron expuestos a la radiación solar durante tres días. Luego las semillas fueron extraídas del fruto maduro,

TABLA I  
DIMENSIONES DE SEMILLAS COMÚNMENTE USADAS EN LA TÉCNICA DE *SPECKLE* DINÁMICO

Semilla	Uchuva ( <i>Physalis peruviana</i> L.)	Caraota <sup>1</sup> ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Melón <sup>2</sup> ( <i>Cucumis melo</i> L.)	Maíz <sup>3</sup> ( <i>Zea mays</i> L.)
Largo (mm)	1,76	9,44	9,22	9,82
Ancho (mm)	1,50	6,16	3,98	8,08
Grosor (mm)	0,58	4,78	1,48	4,40
Masa (mg)	1,1	199,0	26,1	276,8

<sup>1</sup> Arizaga *et al.* (2002), Braga *et al.* (2003, 2005, 2007). <sup>2</sup> Arizaga *et al.* (2002). <sup>3</sup> Arizaga *et al.* (2002), Braga *et al.* (2005).

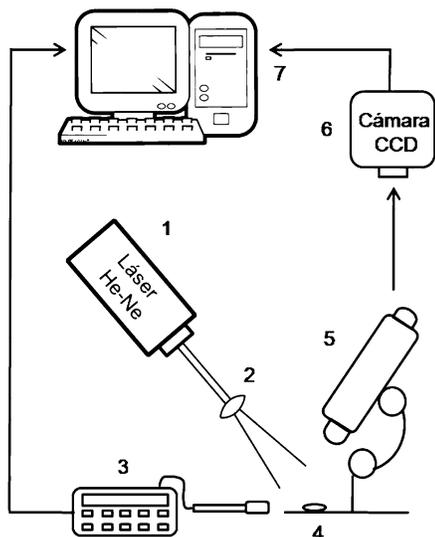


Figura 3. 1: láser de He-Ne (0,5mW, 633nm, marca Uniphase, modelo 1508 Novette); 2: lente expansora de haz; 3: medidor de humedad y temperatura (marca Extech, modelo EA80); 4: semillas; 5: microscopio estereoscópico (marca Leica, modelo M205C); 6: cámara CCD (dispositivo de carga acoplada, marca Leica, modelo EC3); 7: PC con procesador de imagen.

lavadas con agua, desinfectadas y expuestas al sol durante 8h. Para desinfectarlas se lavaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1min. Inmediatamente se pasaron por una solución de etanol al 70% por 1min y finalmente se lavaron con abundante agua destilada con el fin de evitar la aparición de hongos que pudieran alterar los resultados. Se almacenaron a una temperatura de  $23 \pm 4^\circ\text{C}$  y humedad relativa de  $70 \pm 10\%$  en completa oscuridad en una cápsula de Petri cubierta con papel de aluminio durante dos meses previos al experimento. Se escogieron tres grupos de varias semillas cada uno para ser sometidos a diferentes tratamientos. Un grupo de semillas fue hidratado durante 15h (semillas vivas hidratadas), otro no fue hidratado (semillas vivas secas) y el tercer grupo fue sometido a condiciones extremas de calor y frío para hacerlas inviables, es decir, para inducir su muerte celular (semillas no viables secas). Estas últimas fueron colocadas en un horno provisto de un sistema de calentamiento con resistencia térmica y ventilación (modelo 31199XR, Hamilton Beach, EEUU) por 1h a  $\sim 70^\circ\text{C}$  y luego en un congelador (modelo TA04Y07EX, General Electric, México) por 24h a  $\sim 18^\circ\text{C}$ . Un grupo adicional de semillas fue colocado en una cámara de germinación para determinar el tiempo en el que comienzan a germinar sin haber sido sometidas a manipulación experimental. Finalmente se escogie-

ron para el experimento, aleatoriamente, cuatro semillas vivas hidratadas, cuatro semillas vivas secas y una semilla no viable seca que fue usada como control (Figura 2). La muerte celular de la semilla fue corroborada colocando los tres grupos de semillas anteriores en una cámara de germinación.

#### Montaje experimental

Los tres grupos de semillas conformados fueron irradiados simultáneamente con luz coherente (láser de He-Ne de 0,5mW, 633nm; 1508 Novette, Uniphase, EEUU). La disposición de los tres grupos se observa en la Figura 2 y el montaje experimental en la Figura 3. Las imágenes moteadas ( $2048 \times 1536$  píxeles) se registraron cada 5min durante 240min con una cámara CCD, por sus siglas en inglés (EC3, Leica, Alemania), conectada a un microscopio estereoscópico de alta resolución (M205C, Leica, Alemania). Ello generó 50 imágenes, una de las cuales se muestra en la Figura 2. Las imágenes fueron procesadas digitalmente haciendo uso del programa MATLAB, versión 7.6.0.324 (R2008a; The Math Works, EEUU).

El experimento se llevó a cabo dentro de una cava de poliestireno expandido (anime) a fin de amortiguar los cambios de temperatura y humedad externos. Estos parámetros fueron medidos con un higrómetro (modelo EA80, Extech, EEUU). La evolución temporal de la humedad y temperatura durante el experimento se presenta en la Figura 4.

Para garantizar la estabilidad de la iluminación de las semillas se midió, antes de realizar el experimento, la potencia de salida del láser con un medidor de potencia observándose un valor promedio de 0,5mW y una mínima variación ( $< 2,5\%$ ) durante el tiempo de ejecución del experimento. Adicionalmente, la estabilidad de la iluminación en el tiempo se calculó a partir de las propias imágenes determinando la integral de la irradiancia en el área que es la potencia de salida del láser. En la

Figura 5 se aprecia la fluctuación de la estabilidad de la potencia de salida del láser.

#### Métodos de análisis y sus fundamentos teóricos

Las imágenes fueron procesadas digitalmente con dos métodos de análisis: a) método de las diferencias generalizadas (Arizaga *et al.*, 2002) modificado ligeramente en este trabajo y b) método de la diferencia temporal (Martínez-López *et al.*, 2010).

*Método de las diferencias generalizadas (DG).* Este método consiste en cuantificar la actividad de moteado basándose en la acumulación de todas las posibles diferencias de intensidades para cada píxel de una imagen completa, entre cuadros (imágenes) consecutivos y no consecutivos. In-

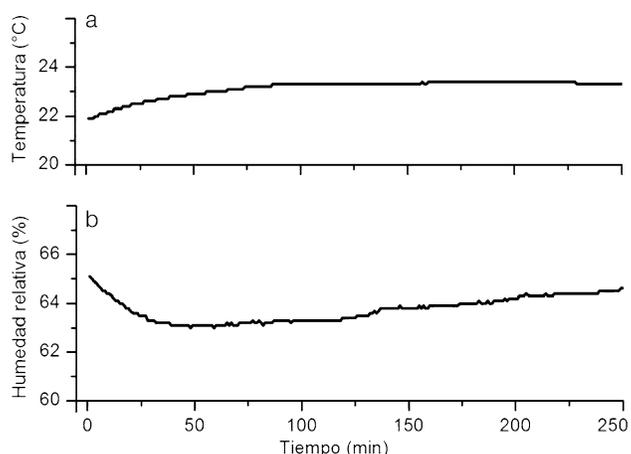


Figura 4. a: Evolución temporal de la temperatura. Temperatura media de  $23,2^\circ\text{C}$ . Variación de temperatura relativa  $< 1,4\%$ . b: Condiciones de humedad relativa. Humedad relativa media de  $64\%$ . Variación de humedad relativa  $< 1\%$ .

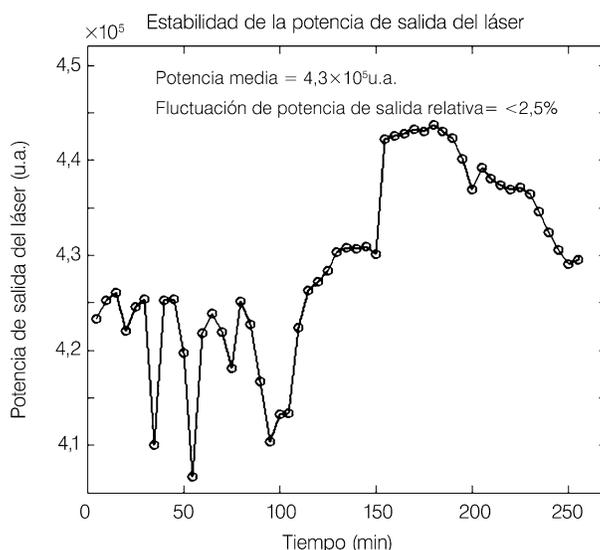


Figura 5. Comportamiento de la estabilidad de la potencia del láser en el tiempo.

cluye operaciones puntuales, es decir, una operación en la cual el valor de la irradiancia de cada uno de los píxeles de la imagen es reemplazado con un nuevo valor que proviene del cálculo que involucra operaciones con los valores de cada uno de los mismos píxeles de varias (o al menos dos) imágenes de una secuencia.

Debido a que en una misma imagen pueden presentarse diferentes niveles de actividad de moteado (algunas regiones pueden presentar cambios rápidos, otras cambios lentos y algunas regiones no presentan cambios), el método de las DG también incluye cálculos de diferencias entre imágenes no consecutivas. Para esto, Arizaga *et al.* (2002) asigna a cada píxel de la imagen procesada el valor  $D_{DG}(i,j)$  dado por

$$D_{DG}(i,j) = \sum_q \sum_k |E(i,j,q) - E(i,j,k)| \quad (1)$$

donde  $i$  y  $j$ : índices del píxel;  $q$  y  $k$ : índices de la secuencia de la imagen;  $E(i,j,q)$ : exposición radiante del píxel  $(i,j)$  de la imagen  $q$ ;  $D_{DG}$ : valor 'diferencia' asignado al píxel, dado por la diferencia del píxel  $(i,j)$  entre las imágenes  $q$  y  $k$  de la secuencia y la doble sumatoria está dada sobre todos los posibles valores de  $q$  y  $k$ .

Como cada valor de  $E(i,j,q)$  es sustraído de todos los otros valores en la misma ubicación  $(i,j)$ , la diferencia  $D_{DG}$  no depende del orden de aparición de los valores de  $E(i,j,q)$ , por lo cual pueden hacerse análisis cada cierto tiempo. El análisis en este trabajo se hizo cada 50min, recordando que el resultado final no dependerá de la evolución del moteado porque se está generalizando el cambio en la estructura del patrón de moteado. Es obvio que el método de las DG es mínimo ( $=0$ ) cuando todos los valores de  $E(i,j,q)$  son iguales, indicando que no existe actividad o es muy baja, es decir, que la diferencia entre dos imágenes consecutivas o no consecutivas no arroja ningún cambio de comportamiento o evolución del objeto estudiado. Por el contrario, un valor  $\neq 0$ , indica un cambio o evolución en la imagen.

En este trabajo se hace una ligera modificación del método DG (asignándole las iniciales DGM), al utilizar para los cálculos solo una parte de la imagen y no la imagen completa. La modificación se basa en una segmentación de la imagen, aislando cada una de las regiones de interés en la imagen donde están representadas las semillas irradiadas, evitando así regiones de poco o nulo interés, como la base donde están dispuestas las semillas. Por ejemplo, cada imagen se fraccionó en nueve segmentos que corresponden a las nueve semillas de la imagen (Figura 2). A cada píxel de la

imagen procesada se le asigna el valor de la 'diferencia'  $D_{DGM}(i,j)$ , para cada uno de los nueve segmentos  $l$ , dados como

$$D_{DGM}(i,j,l) = \sum_q \sum_k |E(i,j,q) - E(i,j,k)| \quad (2)$$

donde  $i$ ,  $j$ ,  $q$ ,  $k$  y  $E$  tienen la misma connotación señalada anteriormente,  $D_{DGM}$  indica el valor 'diferencia' entre los dos píxeles de las imágenes  $q$  y  $k$  en esta modificación de las diferencias generalizadas (DGM), y la doble sumatoria es sobre todos los posibles valores de  $q$  y  $k$  de cada segmento  $l$ .

La actividad de moteado consiste en la acumulación de cada uno de los valores 'diferencia'  $D_{DGM}$ . Así, la actividad de moteado  $AM_{DGM}$  para el método DGM se define para cada segmento  $l$  como

$$AM_{DGM}(l) = \sum_{i,j(l) \text{ zona de interés}} D_{DGM}(i,j,l) \quad (3)$$

El descriptor que representará la actividad de moteado implementado en este trabajo es el  $AME_{DGM}$  (actividad de moteado específico para el método DGM), se define para cada segmento  $l$  como

$$AME_{DGM}(l) = \frac{1}{A} \sum_{i,j(l) \text{ zona de interés}} D_{DGM}(i,j,l) \quad (4)$$

donde  $A$ : área de la zona de interés. Utilizar solo el área de interés permite discriminar la contribución a la actividad que pueda hacer otra superficie diferente de la de las semillas.

*Método de la diferencia temporal (DT).* El método de la diferencia temporal (Tekalp, 1995; Chang *et al.*, 2005; Martí-López *et al.*, 2010) se basa en sustraer dos imágenes consecutivas. En este trabajo las imágenes fueron tomadas con un intervalo de 5min, con intención de detectar si el evento estudiado ha cambiado o no, lo que estaría intrínsecamente relacionado con la actividad de moteado. Este método también se basa en operaciones puntuales, igual que en el de las DG de Arizaga *et al.* (2002). Así, para una secuencia de  $K$  imágenes del evento (con  $K > 2$ ), se obtiene una nueva secuencia de  $K-1$  'imágenes sustraídas', como se denominarán en lo sucesivo.

Los dos métodos se diferencian básicamente en dos aspectos: en los descriptores empleados en ambos para extraer información y en la forma en cómo describen la evolución temporal. En el método de las diferencias generalizadas, el descriptor empleado es una matriz cuyos elementos son la acumulación de los valores 'diferencia' durante la observación, por lo que la matriz resultante no considera la evolución de la actividad durante el tiempo

de observación sino más bien considera el patrón de actividad como un todo y sin orden. Por el contrario, el método de la diferencia temporal emplea como descriptor una secuencia de matrices que permite describir la actividad en el tiempo. Para esto, se asigna a cada píxel de la imagen procesada el valor  $D_{DT}(i,j)$  dado por

$$D_{DT}(i,j,k) = \sum_k |E(i,j,k+q) - E(i,j,k)| \quad (5)$$

donde  $k$ : índice de la imagen,  $1 \leq q \leq$  número de imágenes -1. Usualmente, el número de imágenes es  $\gg 2$  y en este trabajo se tomó  $q = 1$ . La sumatoria es sobre todos los posibles valores de  $k$  de la secuencia completa.

La actividad de moteado para el método de la diferencia temporal ( $AM_{DT}$ ), para cada uno de los  $l$  fragmentos de cada imagen (nueve segmentos por imagen), es definida como

$$AM_{DT}(l) = \sum_{i,j(l) \text{ zona de interés}} D_{DT}(i,j,l) \quad (6)$$

El descriptor estadístico que representa la actividad de moteado específico,  $AME_{DT}$ , se define como

$$AME_{DT}(l) = \frac{1}{A} \sum_{i,j(l) \text{ zona de interés}} D_{DT}(i,j,l) \quad (7)$$

donde  $A$  es el área de la zona de interés.

El procesamiento de la secuencia de imágenes consiste en sustraer imágenes consecutivas y no consecutivas con el método DGM e imágenes consecutivas con el método DT.

### Muestreo de imágenes

Con el método DGM se tomaron las 50 imágenes del experimento y se organizaron por pilas de 10 imágenes. Luego se aplicó el método a cada pila generando un total de cinco imágenes con información de la evolución de la actividad del patrón de moteado, procedimiento que puede visualizarse en el esquema de la Figura 6. Por otro lado, con el método DT se calculó el módulo de la diferencia de dos imágenes consecutivas que conducen a 49 imágenes sustraídas con información de la evolución de la actividad (Figura 7).

## Resultados y Discusión

En condiciones naturales, la germinación de las semillas de uchuva comienza a partir de los 18 días. La pérdida de viabilidad de la semilla de control fue comprobada al poner los tres grupos de semillas del experimento, en una cámara de germinación. Las cuatro semillas hidratadas y las cuatro sin hidratar germinaron entre 32 y 39 días, germi-

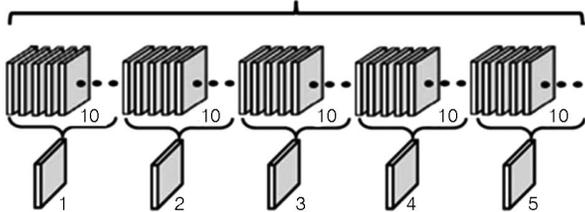


Figura 6. Esquema del algoritmo de las diferencias generalizadas modificado en este trabajo.

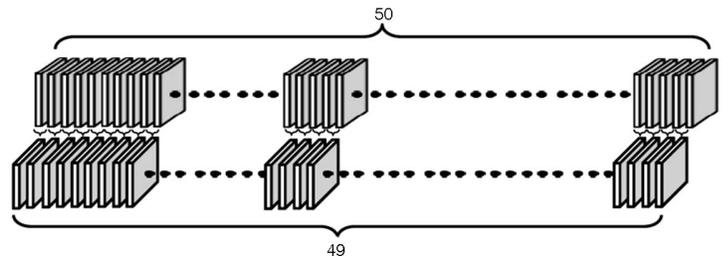


Figura 7. Esquema del algoritmo de la diferencia temporal.

nación que probablemente se hizo tardía dadas las condiciones de estrés a las que se sometieron durante el almacenamiento y experimentación. La semilla de control se mantuvo en la cámara de germinación durante 86 días (dos meses y veinticuatro días) al final de los cuales no germinó, comprobándose la muerte celular luego del tratamiento extremo de calor y frío.

El experimento se llevó a cabo durante 240min, registrándose una imagen cada 5min, lo que generó 50 imágenes. Durante este tiempo la actividad de las semillas hidratadas alcanzó la misma actividad que las semillas secas, por lo tanto el número de imágenes adquiridas describe claramente la evolución en el tiempo de la actividad de las semillas.

Para cada una de las imágenes sustraidas (ver Materiales y Métodos) se aplicaron los métodos DGM y DT, que se corresponden con las Ecs. 4 y 7, respectivamente, para determinar los descriptores estadísticos que representan la actividad de moteado específico para cada área de interés. Estos descriptores estadísticos específicos se representan en función del tiempo en las Figuras 8 y 9, para cada uno de los dos métodos aplicados.

En el caso de DGM, los elementos de la matriz resultante son calculados como la suma de los valores 'diferencia' de la secuencia de imágenes grabadas. Por tal motivo, el resultado no depende del orden de aparición de los términos sino que la matriz describe la actividad de moteado de las semillas como un todo durante el experimento y se pierde la posibilidad de observar los cambios inmediatos o evolución de la actividad durante el mismo. Al no depender del orden de la secuencia de

imágenes pueden hacerse los análisis cada 50min, ya que el resultado final no dependerá de la evolución porque se está generalizando el cambio en la estructura del patrón de moteado. Esta situación puede verse en la Figura 8, donde los descriptores estadísticos  $AME_{DGM}$  son representados cada 50min. Este comportamiento puede comprobarse en la Figura 10 que muestra una imagen en falso color que contiene la acumulación de los valores de actividad en cada semilla. Si se

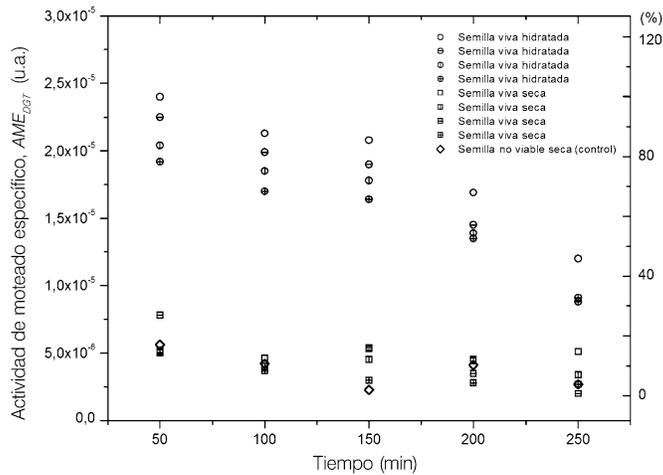


Figura 8. Evolución temporal de la actividad de moteado para el método de las diferencias generalizadas modificado en este trabajo.

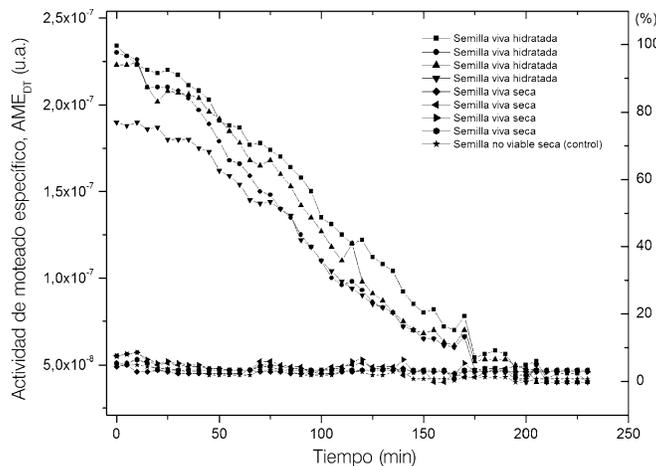


Figura 9. Evolución temporal de la actividad de moteado para el método de la diferencia temporal.

compara esta imagen con la de falso color que muestra la Figura 11, correspondiente a los valores de actividad entre dos cuadros consecutivos separados por un intervalo de tiempo de 5min para el método DT, puede notarse el efecto que tiene la generalización de la diferencia que hace parecer a las semillas de la Figura 10 mucho más activas, aunque se pierde la evolución de la actividad del patrón de moteado. Por el contrario, la imagen representada en la Figura 11 permite representar la evolución de la actividad y evidencia que la contribución a la dinámica del patrón de moteado es mucho menor pues se representa la diferencia entre dos cuadros consecutivos, con lo cual se tiene un registro más certero de la evolución dinámica del sistema biológico.

El método DT emplea como descriptor estadístico una secuencia de matrices que permite describir la actividad del moteado en cada instante del tiempo de muestreo (5min). En la Figura 9 puede apreciarse la evolución temporal de la actividad del patrón de moteado, donde la actividad de moteado de las semillas vivas hidratadas es inicialmente mucho mayor que la actividad de las semillas vivas secas y la semilla no viable seca (control), como es de esperarse debido a que estos dos últimos grupos no fueron hidratados previamente, por lo tanto la testa (capa más externa de la semilla) no experimenta cambios por desecación o éstos son mínimos. Resultados similares para la actividad de moteado se obtuvieron con el método utilizado por Arizaga *et al.* (2002), donde se observó mayor actividad en semillas hidratadas de caraota (*P. vulgaris*). Igualmente Braga *et al.* (2003) concluyeron que el agua presente en semillas vivas y muertas hidratadas de caraotas (*P. vulgaris*) es responsable de parte de la actividad de moteado. En el caso de las semi-

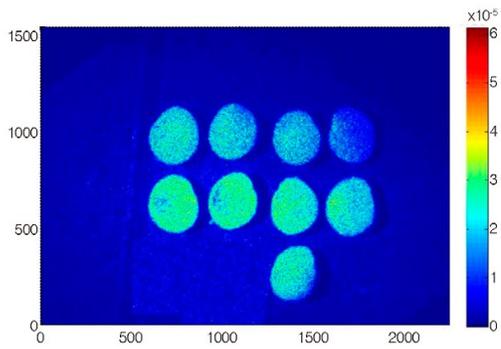


Figura 10. Imagen en falso color de las primeras 10 imágenes procesadas con el método de las diferencias generalizadas modificado (DGM).

llas vivas hidratadas de este trabajo, el descriptor  $AME_{DT}$  decae bruscamente en función del tiempo, un resultado que evidencia la posibilidad de describir la evolución de la desecación de las semillas y medir el tiempo que tarda esa desecación. En la Figura 9 se observa cómo las cuatro semillas vivas hidratadas alcanzan un contenido de humedad similar al de las semillas vivas secas luego de ~205min. Este resultado demuestra que en las condiciones experimentales descritas este intervalo de tiempo es suficiente para que una semilla de uchuva viva e hidratada se deseeque hasta alcanzar el mismo contenido de humedad de una semilla seca. El comportamiento de la evaporación del agua de las semillas vivas hidratadas puede asociarse al comportamiento de la evaporación del agua que se describe en Martí-López *et al.* (2010), donde se estudia experimentalmente la contribución que tiene una gota de agua a la actividad del patrón de moteado. Si se compara el decaimiento de la actividad del agua en el tiempo con el comportamiento de las semillas vivas hidratadas puede notarse una analogía en la forma en que decae dicha actividad, pero el decaimiento en la actividad de las semillas de uchuva hidratadas se manifiesta casi 25 veces más lentamente con respecto a la gota de agua sobre el papel. Esto demuestra que la actividad del agua contribuye considerablemente a la dinámica del moteado y que el tejido de la semilla es más eficiente reteniendo agua, es decir, inhibiendo la evaporación, que el papel de filtro utilizado por Martí-López *et al.* (2010).

Por otro lado, el comportamiento de baja actividad del moteado es similar para las semillas vivas secas y la semilla no viable seca (Figura 9). Tomando en cuenta que la semilla control, al igual que las semillas vivas secas, no fue sometida a un tratamiento de hidratación, este resultado sugeriría que el agua es responsable exclusivo de la actividad del patrón de moteado, por lo cual la técnica de *speckle* dinámico sería incapaz de distin-

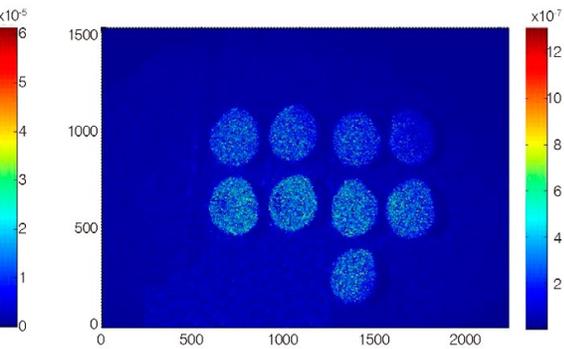


Figura 11. Imagen en falso color de las primeras dos imágenes procesadas con el método de la diferencia temporal (DT).

guir entre semillas vivas secas y la semilla de control en las condiciones experimentales descritas en este trabajo. Cabe la posibilidad de que el bajo contenido de agua inhiba la actividad metabólica de las semillas vivas secas y por ende la posibilidad de distinguir su vitalidad a través del moteado dinámico. Sin embargo, la capacidad que tiene la técnica del *speckle* dinámico para distinguir entre semillas vivas hidratadas y semillas muertas hidratadas mediante actividad metabólica fue comprobada por Braga *et al.* (2003, 2007).

La interpretación física del método DT es directa y su implementación simple, por lo que con él se puede desarrollar aplicaciones agrícolas y ecológicas. La técnica de *speckle* dinámico que se presenta en este trabajo es una herramienta de utilidad para medir el grado de hidratación y desecación de semillas. Este tipo de mediciones es crucial para el desarrollo de técnicas de almacenamiento *ex situ* de semillas, las cuales complementarían y fortalecerían programas de producción de uchuva. Además, el *speckle* dinámico también podría ser útil en el estudio de otro tipo de semillas de valor ecológico. Por ejemplo, existe especial interés en conocer el grado de hidratación de ciertas semillas que son particularmente sensibles a la desecación (semillas recalcitrantes) en ciertos programas de reforestación tropical (Pritchard *et al.*, 2004; Daws *et al.*, 2006). En un futuro, con la técnica desarrollada en este trabajo se podrían investigar otras semillas de utilidad agrícola y ecológica.

## Conclusiones

El montaje experimental permitió trabajar con semillas de uchuva (*P. peruviana*) que son ~50 veces más pequeñas que las semillas de melón (*Cucumis melo* L.) usadas por Arizaga *et al.* (2002). Hasta la fecha no había sido reportado *speckle* dinámico para semillas más pequeñas que estas últimas.

El *speckle* dinámico registrado en las semillas estudiadas depende en gran medida de la evaporación del agua que contienen. Tanto con el método de las diferencias generalizadas modificado (DGM) como con el método de la diferencia temporal (DT) se detectó mayor actividad en los patrones de *speckle* dinámico en las semillas de uchuva vivas hidratadas que en las semillas vivas secas y la semilla no viable seca (control). La técnica no permitió diferenciar estos dos últimos tipos de semillas, probablemente por su bajo nivel de hidratación.

Estos resultados demuestran la efectividad de la presente técnica para medir el nivel de hidratación de las semillas de uchuva, siendo además posible medir la evolución temporal del proceso de desecación y el tiempo de desecación de las semillas hidratadas.

De la comparación de los métodos DGM y DT se evidencia que el último provee información más precisa de la evolución del proceso de desecación de las semillas. El método DGM, si bien es más eficiente filtrando ruido, debe ser modificado para que este filtrado no resulte en la pérdida de información relevante, aunque esto demandaría una mayor capacidad de procesamiento computacional.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores dedican este trabajo a la memoria de Luis Martí-López, quien falleció durante la realización del mismo, y agradecen a Humberto Cabrera por facilitar el láser utilizado en estos experimentos y a Misael Rosales por su asesoramiento en los códigos en MATLAB. Este trabajo se llevó a cabo en el marco del proyecto BIOSPECKLE PROL/1-3/1 del Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN) y la Agencia de Energía Nuclear y Tecnologías de Avanzada, Cuba. Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Ecología Sensorial, Centro Multidisciplinario de Ciencias, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Venezuela. Parte del proyecto fue financiado a través de fondos de aportes LOCTI.

## REFERENCIAS

- Arizaga R, Cap NL, Rabal H, Trivi M (2002) Display of local activity using dynamical speckle patterns. *Opt. Eng.* 41: 287-294.
- Braga RA (2000) "Bio-Speckle": uma Contribuição para o Desenvolvimento de uma Tecnologia Aplicada à Análise de Sementes. Tesis. Universidade Estadual de Campinas. Brasil. 117 pp.

- Braga RA, Dal Fabbro IM, Borem FM, Rabelo G, Arizaga R, Rabal HJ, Trivi M (2003) Assessment of seed viability by laser speckle techniques. *Biosyst. Eng.* 86: 287-294.
- Braga RA, Rabelo GF, Granato LR, Santos EF, Machado JC, Arizaga R, Rabal HJ, Trivi M (2005) Detection of fungi in beans by the laser biospeckle technique. *Biosyst. Eng.* 91: 465-469.
- Braga RA, Oliveira B, Rabelo G, Marques R, Enes AM, Cap N, Rabal H, Arizaga R, Trivi M, Horgan G (2007) Reliability of biospeckle image analysis. *Opt. Lasers Eng.* 45: 390-395.
- Chang CC, Chia TL, Yang CK (2005) Modified temporal difference method for change detection. *Opt. Eng.* 44: 027001.
- Chaves ADC, Schuch MW, Erig AC (2005) Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. *Ciênc. Agrotec.* 29: 1281-1287.
- Daws MI, Garwood NC, Pritchard HW (2006) Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species: a probabilistic model based on two seed traits and 104 species. *Ann. Bot.* 97: 667-674.
- Enes AM, Braga RA, Rabelo GF, Borém FM, Carvalho MLM, Trivi M, Rabal H, Arizaga R, Dal Fabbro IM (2005) Biospeckle laser emtecidos vivos e tecidos mortos de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) durante perda de água. *XXXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola*. Canoas, Brasil.
- García M, Guzmán R, Vargas A (2010) Técnica de biospeckle para estudiar la dependencia de la viabilidad de semillas de lupino con la temperatura. *Rev. Cub. Fis.* 27: 13-17.
- Martí-López L, Cabrera H, Martínez-Celorio RA, González-Peña R (2010) Temporal difference method for processing dynamic speckle patterns. *Opt. Commun.* 283: 4972-4977.
- Passoni I, Dai A, Rabal H, Trivi M, Arizaga R (2005) Dynamic speckle processing using wavelets based entropy. *Opt. Commun.* 246: 219-228.
- Pritchard HW, Daws MI, Fletcher BJ, Gaméné CS, Msanga HP, Omondi W (2004) Ecological correlates of seed desiccation tolerance in tropical African dryland trees. *Am. J. Bot.* 91: 863-870.
- Rabal HJ, Braga RA (2009) *Dynamic Laser Speckle and Applications*. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU. 282 pp.
- Tekalp AM (1995) *Digital Video Processing*. Prentice-Hall. Upper Saddle River, NJ, EEUU. 526 pp.

## PROCESSING OF SPECKLE PATTERNS BY TWO METHODS FOR THE MEASUREMENT OF SEED DESICCATION IN CAPE GOOSEBERRY (*Physalis peruviana* L)

Ingrid Inciarte, Luis Martí-López, Evelio E. Ramírez-Miquet, Erick Hernández, Ángel Viloría and Fernando Otálora-Luna

### SUMMARY

The response of *Physalis peruviana* L (cape gooseberry) seeds to hydration and desiccation was studied by means of the dynamic speckle technique using a low-power laser. A digital camera adapted to a stereoscopic microscope was used to take a series of images of the seeds, being the first time the microscope is used with this technique to study living tissue. The aim was to compare two methods of graphical analysis in processing dynamic speckle images: a) the generalized difference method, slightly modified in the present work, and b) the temporal difference method, being the first time the latter method is applied to seeds. Three groups of seeds were used: live hydrated

seeds, live dry seeds, and dry non-viable seeds. The study demonstrates the usefulness of the two methods, confirming previous results showing that the dynamic speckle activity pattern of the hydrated seeds is higher than that of the dry seeds, and that this difference can be measured by digital processing of a series of images. With both methods a pattern of greater activity was detected in the first group of seeds than in the second and third and, additionally, the temporal evolution of the drying process of the hydrated seeds was measured. It is suggested that this technique can be used to develop seed conservation and storage technologies.

## PROCESSADO DE PADRÕES DE SPECKLE MEDIANTE MÉTODOS NA MEDIÇÃO DA DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE UCHUVA (*Physalis peruviana* L.)

Ingrid Inciarte, Luis Martí-López, Evelio E. Ramírez-Miquet, Erick Hernández, Ángel Viloría e Fernando Otálora-Luna

### RESUMO

No presente trabalho se estuda a resposta à hidratação e dessecação de sementes de *Physalis peruviana* L. (canapu) utilizando a técnica de speckle dinâmico, empregando um laser de baixa potência. Tomou-se uma sequência de fotografias das sementes com uma câmara digital adaptada a um microscópio estereoscópico, incorporado por primeira vez ao monitoramento de tecidos vivos com esta técnica. O objetivo do trabalho é aplicar e comparar dois métodos de processamento de imagens de padrões de speckle: a) diferenças generalizadas, ligeiramente modificada neste trabalho e b) diferença temporal. Este último é aplicado por primeira vez a sementes. Trabalhou-se com três grupos de sementes: sementes vivas hidratadas, sementes vivas secas e sementes secas não viáveis. Demonstra-se a uti-

lidade de ambos métodos, confirmando os resultados obtidos em trabalhos prévios, onde o padrão de atividade de speckle dinâmico de sementes hidratadas é maior que o padrão de atividade de sementes secas e que através do processado digital de uma sequência de imagens é possível medir esta diferença. Com os dois métodos se detectou maior atividade nos padrões de speckle dinâmico nas sementes vivas hidratadas que nas sementes vivas secas e secas não viáveis; adicionalmente se mediu a evolução temporal do processo de dessecação das sementes hidratadas. Propõe-se o uso desta técnica para o estudo e desenvolvimento de tecnologias de conservação e armazenamento de sementes.