

Bio-Speckle aplicado a la caracterización del grado de maduración de frutos

G. G. Romero¹, C.C. Martinez², E. E. Alanís², L. Alvarez^{2*}, V. G. Broglia³ y G.A. Salazar²

Facultad de Ingeniería¹ – Facultad de Ciencias Exactas² – Facultad de Ciencias Naturales³
Consejo de Investigación - Universidad Nacional de Salta
Buenos Aires 177-400-Salta-Argentina
e-mail: marigra@unsa.edu.ar

La medida de la actividad del bio-speckle de muestras biológicas ha demostrado ser una herramienta no destructiva muy útil para el estudio de ciertos procesos que ocurren en las mismas. En particular, se ha explorado su utilidad en la determinación del grado de maduración de distintas líneas de tomate, para evaluar el tiempo de permanencia en estantería. El estudio se ha llevado a cabo registrando tanto la historia temporal de los diagramas de speckle (HTDS) como las variaciones en la intensidad de la luz dispersada, obtenidos al iluminar con luz láser la superficie del fruto. La actividad del bio-speckle se determina a partir de las funciones de autocorrelación de las fluctuaciones de intensidad. Se ha encontrado que es posible correlacionar estas medidas con procesos tales como aumento de respiración, producción de etileno, pérdida de clorofila, etc., procesos que ocurren naturalmente durante la maduración del fruto y cuya evolución brinda información sobre la transición entre las fases de crecimiento y de envejecimiento.

The measure of bio-speckle activity in biological samples (like fruits) is a very useful non-destructive tool for the study of certain processes that occurs in the samples. In particular, to evaluate the tomato fruit shelf life, we explore the bio-speckle utility in the determination of the ripening degree of different lines of tomatoes. The study has been carried out recording the temporal history of speckle diagram (THSD) obtained illuminating the surface of the fruit with a laser beam. The bio-speckle activity is determined by means of the autocorrelation functions of the intensity fluctuations. It has been found that it is possible to correlate the activity measurements with processes such as breathing increase, ethylene production, chlorophyll loss, etc. These processes happen naturally during the fruit ripening and its evolution bring information about the transition between the growing phase and the aging phase of the fruit.

I. INTRODUCCIÓN

Si bien el estudio de los fenómenos intrínsecos que ocurren durante la maduración, está fuera del alcance de este trabajo de investigación, en líneas generales puede decirse que la maduración de un fruto⁽¹⁾, puede ser definida como la secuencia de cambios en color, sabor y textura, que hacen que el fruto de una especie cultivada sea aceptable para el consumo humano. Los fenómenos asociados con la maduración de la mayoría de los frutos incluyen cambios en color, lo que implica una pérdida de clorofila (fruto verde), con el consiguiente desenmascaramiento de algunos pigmentos y la síntesis de otros nuevos. También se observan alteraciones en el sabor, que incluyen cambios en la acidez, astringencia y dulzor, dependientes a su vez de cambios en los ácidos orgánicos, fenoles, azúcares y compuestos volátiles y, por último, cambios en la textura del fruto. Otros cambios visibles incluyen la abscisión del fruto y en algunos frutos un aumento en la deposición de ceras en la piel. Por debajo de estos cambios visibles y como responsables de ellos, se encuentran cambios en la composición química y del metabolismo.

Se ha encontrado que algunos de los cambios que ocurren en muestras biológicas^(2,3,4) se pueden correlacionar con la actividad de los diagramas de speckle de la luz dispersada por las mismas. Uno de los métodos más usados hasta el momento para mostrar la evolución temporal de un patrón de speckle es el propuesto por Oulamara⁽⁵⁾. El método consiste en iluminar la muestra con un láser y re-

gistrar las imágenes con una cámara CCD. Para cada estado del fenómeno bajo estudio se registran 512 imágenes sucesivas del diagrama de speckle dinámico y se selecciona una columna de cada una de ellas, por ejemplo la columna central. Con estas 512 columnas se construye una imagen que resulta de 512x512 píxeles, digitalizada en 256 niveles de gris. Ésta es la denominada Historia Temporal de los Diagramas de Speckle (HTDS), cada fila de la cual representa la evolución temporal de la intensidad luminosa en un punto del campo de speckle. La actividad de la muestra aparece como fluctuaciones de intensidad en la dirección horizontal. Así cuando el fenómeno tiene baja actividad, la HTDS muestra formas elongadas y cuando es muy activo, la misma se parece a un diagrama de speckle ordinario. Una vez obtenidas las HTDS, se calcula la función de autocorrelación promedio de las 512 autocorrelaciones. Para calcular la actividad de los diagramas de speckle se utiliza en este trabajo el ancho del rectángulo equivalente (WER_n)⁽²⁾ de los primeros n puntos de la función de autocorrelación promedio.

Esta técnica, por ser no invasiva y de fácil implementación, resulta adecuada para su aplicación al estudio propuesto. En particular interesa la determinación del tiempo de permanencia en estantería de tomates, característica relacionada con el valor de mercado del producto. Este estudio, de carácter interdisciplinario, intenta servir como herramienta para un proyecto de investigación de mejoramiento vegetal, relacionado con la evaluación de caracteres de líneas de introgresión. En este caso las líneas son descendientes de un cruzamiento inter específico en el

* Becaria SECYT – PICT 2000 N° 13-09991

género *Lycopersicon*. Para ello se estudió el proceso de maduración de diferentes especies de tomates, registrando las HTDS de algunos ejemplares. A continuación se describe el sistema óptico utilizado, el sistema de procesamiento de imágenes desarrollado y algunos resultados preliminares obtenidos.

II. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA ÓPTICO Y DEL SISTEMA DE PROCESAMIENTO.

El sistema óptico utilizado se muestra en la Figura 1. El fruto, tomate en este caso, es iluminado por un láser He-Ne (10 mW) sin expandir y la luz dispersada, después de atravesar un difusor, es capturada por una cámara CCD (768 x 572 píxeles). El atenuador en el sistema cumple la función de regular la intensidad de la luz que incide en la muestra, a fin de obtener imágenes de historias temporales con igual nivel de gris promedio (NGP). Esto es importante ya que, como se describe más adelante, el cambio de coloración del fruto, que es una de las características principales de la maduración, modifica la intensidad de la luz dispersada por el mismo. En el inserto de la figura también se muestra una imagen de un patrón de speckle típico (a) y su correspondiente HTDS (b).

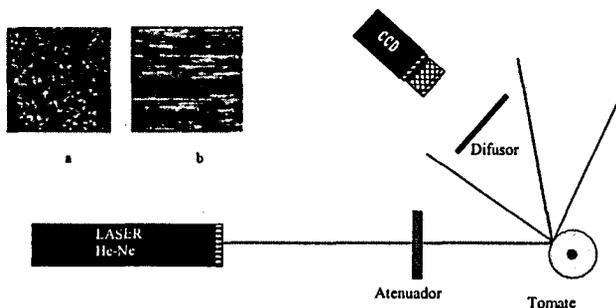


Figura 1: Dispositivo óptico.

Para el estudio de las muestras biológicas analizadas en este trabajo, se desarrolló un programa que permite la generación de imágenes HTDS a fin de caracterizar dichas muestras a partir de parámetros característicos. El mencionado programa fue diseñado en lenguaje Visual Basic, y se usó un procesador de imágenes Matrox Pulsar y librerías MIL (Matrox Imaging Library). Este programa contiene comandos que permiten determinar el nivel de gris promedio de cada patrón de speckle, previo a la generación de la imagen HTDS. Esto resulta conveniente a la hora de comparar distintas muestras a través del cálculo de la función de autocorrelación, permitiendo normalizar este parámetro. El programa también permite efectuar el cálculo de las funciones de autocorrelación correspondiente a cada fila de la imagen como así también la autocorrelación promedio de las 512 filas de cada HTDS. En la Figura 2 se muestra una fotografía del entorno gráfico del programa desarrollado. En esta figura se puede observar también una HTDS característica de una muestra.

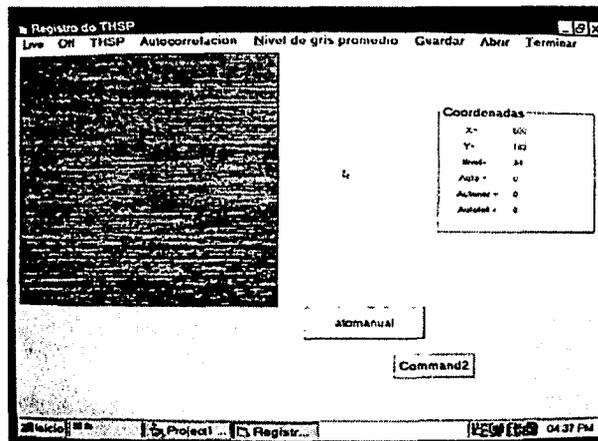


Figura 2: Fotografía de la interfaz gráfica del programa HTDS

III. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Experiencia preliminar

Para poner a punto el sistema y evaluar su capacidad, se ha llevado a cabo una primera experiencia con tomates de una de las variedades comerciales (*Bumbuna*). Esta muestra fue cosechada verde de la planta, en el segundo periodo de su desarrollo⁽⁶⁾, cuando el fruto alcanza prácticamente el tamaño definitivo. Este día es el que llamamos día cero para el análisis de su evolución temporal. Se han registrado diariamente las HTDS de esta muestra durante quince días, periodo durante el cual se producen los cambios metabólicos propios del proceso de maduración. La medida de la actividad a partir de la HTDS, se muestra en la Figura 3. En esta experiencia se registraron los datos de la actividad en diez regiones de la muestra, que por razones prácticas corresponden a la de mayor diámetro del fruto. En la figura se representa el valor promedio de la actividad diaria y las correspondientes barras de error que indican la dispersión en las medidas.

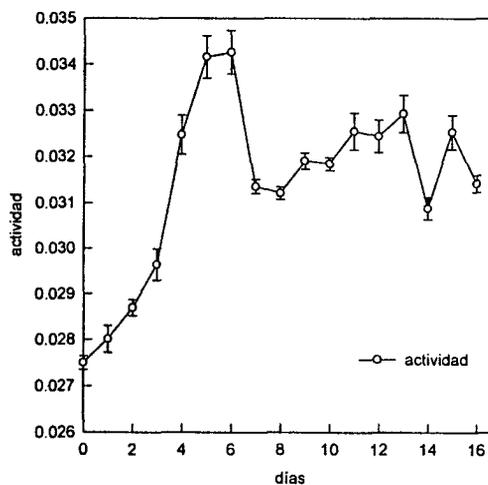


Figura 3: Actividad del Tomate Bumbuna en función del tiempo.

El tomate posee frutos climatéricos, ya que inician su maduración con un aumento en la respiración que coincide con el inicio de la producción de etileno, hormona volátil responsable de los cambios que ocurren durante la maduración. El fruto adulto del tomate está constituido básicamente por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas.

El pericarpo es la parte más exterior del fruto y está formado por el exocarpo o piel, mesocarpo parenquimático con células con cloroplastos (en donde se encuentra la clorofila) y el endocarpo constituido por una capa unicelular que rodea los lóculos. A medida que el fruto madura, se observa que la luz incidente penetra cada vez a mayor profundidad debido a la degradación de la clorofila (que tiene un pico de absorción en la longitud de onda del láser utilizado). De esta manera, la información obtenida a través de la luz dispersada probablemente corresponda a esta región más externa.

En la Figura 3, puede observarse que la actividad aumenta progresivamente desde el día cero hasta el día 5, que en principio coincidiría con el límite entre crecimiento y senescencia. Esta figura se ha comparado con la Figura 4, obtenida de la bibliografía⁽⁷⁾ para la evolución de distintos fenómenos que ocurren durante la maduración del fruto.

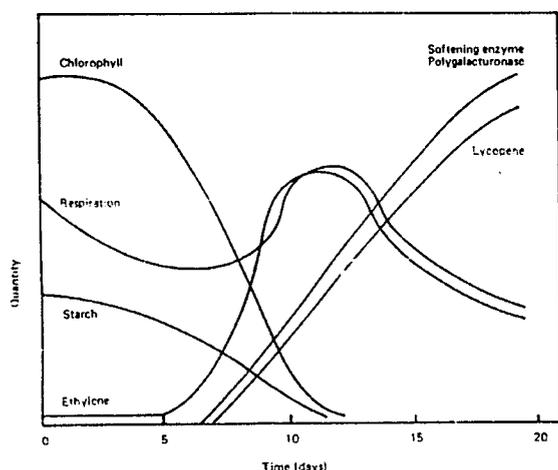


Figure 5.7 Some of the changes that occur during the ripening of tomato fruit.

Figura 4: Algunos cambios que ocurren durante la maduración del tomate.

Si bien el objetivo de este trabajo no contempla medir estos fenómenos, en principio podemos decir que la curva de actividad obtenida por el método óptico puede analizarse globalmente como una medida del proceso de maduración, en particular al observarse una correspondencia entre el aumento de actividad y la disminución de clorofila. Sin embargo, como muestra la Figura 4, ocurren durante la maduración procesos de degradación y síntesis de diferentes metabolitos los que también podrían estar evidenciándose en la curva de actividad de la Figura 3. Al comparar las curvas, no es posible realizar una superposición gráfica de las mismas en función del tiempo ya que en los primeros puntos pueden existir ciertas discrepancias debido a que los frutos han sido cortados en distintos momentos en la historia de su crecimiento. Además, no se dispone de los datos cuantitativos a partir de los cuales han sido elaboradas las curvas de la Figura 4. Los resultados de esta experiencia preliminar, permiten inferir cambios en la actividad del fruto en función del tiempo, durante su maduración. Por lo tanto se ha planteado el uso de esta técnica como herramienta para estudiar el comportamiento de otras líneas, a fin de verificar si las curvas de

actividad permiten inferir ciertas características propias de cada línea analizada.

Experiencias con diferentes líneas

En lo que sigue se describen las experiencias realizadas con cinco líneas diferentes, entre las que se incluyen: dos líneas comerciales, una proveniente de cruzamientos realizados en un programa de mejora genética y otra correspondiente a una línea de introgresión utilizada para análisis de laboratorio. Las líneas en cuestión son las siguientes:

- (línea 1) Variedad Comercial *Bumbuna*, analizada en la experiencia preliminar.
- (línea 2) Variedad Comercial *Uco Plata*, (se analizaron dos ejemplares provenientes de distintas plantas: 2a y 2b)
- (línea 3) Variedad Comercial *VF36*
- (línea 4) F10, resultante del cruzamiento del cultivar comercial *Uco Plata* INTA y PI 134417 de *L. hirsutum f. glabratum* (se analizaron dos ejemplares provenientes de la misma planta).
- (línea 5) Línea de introgresión proveniente de un cruzamiento interespecífico entre la línea E6203 de *L. esculentum* y la línea LA1777 de *L. hirsutum*.

Medidas de actividad de los diagramas de speckle

En la Figura 5 se muestran las curvas de actividad de todas las líneas. Por cuestiones de índole práctica el registro de la actividad de cada muestra se realizó en una sola región de la misma.

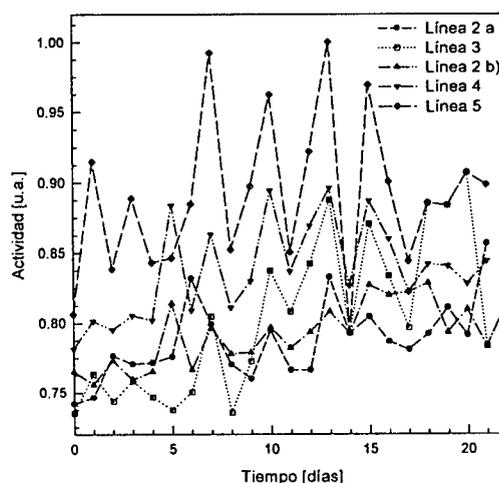


Figura 5: Curvas de actividad de las líneas estudiadas

En esta figura pueden observarse similitudes en el patrón de comportamiento de la actividad de las líneas analizadas. Se aprecian al menos dos momentos de actividad máxima: el primer máximo de actividad podría estar asociado con las últimas etapas del crecimiento del fruto y el segundo período de máxima actividad estaría relacionado con procesos tales como la acumulación de pigmentos y cambios en la paredes celulares que provocan el ablandamiento del fruto, entre otros.

La diferencia en el número de picos entre las muestras analizadas, podría deberse al hecho de que las variedades de tomate estudiadas son genéticamente diferentes y, por

lo tanto, pueden existir diferencias en los componentes genéticos que regulan el inicio y el tiempo de maduración del fruto. En la misma figura también se observa defasaje entre los picos que muestran las distintas líneas, esto podría vincularse por un lado a la diferencia genética entre los ejemplares, y por otro lado a que el tiempo transcurrido desde el cuajado del fruto a la cosecha es distinto para cada muestra. (no todos estaban en el mismo estadio).

A pesar de estas diferencias, la Figura 5 muestra que las líneas comerciales (2 y 3) tienen un comportamiento similar entre ellas y se diferencian de la 4 y la 5. Esta situación podría atribuirse al hecho de que las variedades comerciales tienen frutos que sufren procesos similares durante su maduración. La línea 5 que es utilizada como material para ensayos biológicos y agronómicos muestra valores de actividad mayores y diferentes al resto y la línea 4 que es producto de un proceso de mejora genética y que posee frutos con algunas características semejantes a las comerciales registra un nivel de actividad intermedio entre las líneas comerciales y la línea 5. Para corroborar este análisis se compararon los niveles de actividad de dos muestras de la misma línea provenientes de dos plantas (línea 2), y los niveles de actividad de dos muestras provenientes de la misma planta (línea 4), lo que se muestra en la Figura 6.

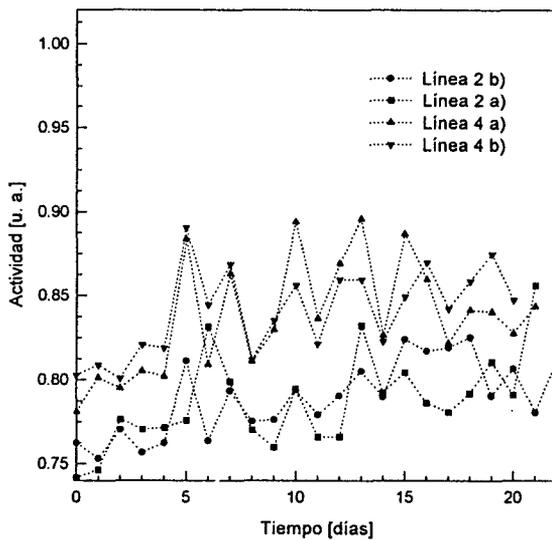


Figura 6: Actividad comparada: dos ejemplares línea 2 y dos ejemplares línea 4

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS MÁS SOBRESALIENTES DE LAS CURVAS DE ACTIVIDAD Y DE I_D .

línea	día de máxima actividad	día de mínimo I_D	Observaciones
1- <i>Bumbuna</i>	6	s/dato	Apto para consumo hasta el día 16.
2- <i>Uco Plata- muestra a)</i>	13	6	Apto para consumo hasta el día 20
2- <i>Uco Plata- muestra b)</i>	15	10	Apto para consumo hasta el día 20.
3- <i>VF36</i>	13	15	Inicio degradación clorofila día 6
4- <i>F10 (Uco Plata x L. hirsutum f. glabratum). Muestra a)</i>	13	7	Aptos para consumo hasta el día 16.
4- <i>F10 (Uco Plata x L. hirsutum f. glabratum). Muestra b)</i>	5	7	Apto para consumo hasta el día 16.
5- <i>Línea de introgresión</i>	13	10	Apto para consumo hasta el día 14.

En esta figura se observa que las curvas de actividad correspondientes a líneas distintas se diferencian entre sí, mientras que las de los ejemplares de una misma línea muestran características similares.

Medidas de variación de la intensidad de la luz dispersada

Uno de los cambios más evidentes durante los primeros días, luego de la cosecha, es el cambio de coloración del fruto, debido a la degradación progresiva de clorofila, responsable del color verde de los tomates. Simultáneamente los cloroplastos (que contienen clorofila) se van transformando en cromoplastos en los que se acumulan los pigmentos responsables de la coloración roja del fruto maduro. En este sentido el láser utilizado resulta ser una buena fuente de luz para medir cantidades de clorofila⁽⁸⁾ ya que uno de los picos de absorción de la clorofila (632 nm) coincide con la longitud de onda del láser.

Si se analiza el comportamiento de la clorofila a través del nivel de gris promedio (NGP) de las imágenes de los diagramas de speckle, se encuentra una correlación entre este valor y la coloración del fruto. Dado que, como se mencionó anteriormente, la clorofila absorbe la luz láser, el nivel de gris promedio de las imágenes aumenta a medida que el fruto degrada este pigmento. Se define un parámetro que varía entre cero y uno, que permite mostrar la evolución de este fenómeno en el tiempo, mediante la expresión:

$$I_D = \frac{I_{m\acute{a}x} - I_i}{I_{m\acute{a}x} - I_{m\acute{i}n}} \quad (1)$$

donde I_{max} e I_{min} son el máximo y el mínimo valor de nivel de gris promedio respectivamente e I_i es el valor de nivel de gris promedio del patrón de speckle correspondiente al día de la medida.

En la Figura 7, se ha graficado I_D para la línea 3. En ella se observa un brusco decaimiento de este parámetro a partir del séptimo día, lo que coincide con el primer pico de máxima actividad para esta línea. Un resumen de los aspectos más relevantes de las curvas de actividad y del parámetro I_D se muestran en la Tabla 1.

Todas las líneas de tomate analizadas muestran un comportamiento similar. En todas ellas se pueden distinguir dos regiones: la región izquierda, hasta el mínimo valor de I_D , puede asociarse a la curva de degradación de clorofila mostrada en la Figura 4. El comportamiento de esta curva en la región de la derecha podría asociarse a la síntesis de los pigmentos amarillos, fundamentalmente xantofilas y β -carotenos que se hacen más aparentes con la progresiva destrucción de la clorofila. Posteriormente, aunque continua la síntesis de dichos compuestos, el tomate adquiere la coloración roja debido a la rápida acumulación de licopeno⁽⁶⁾.

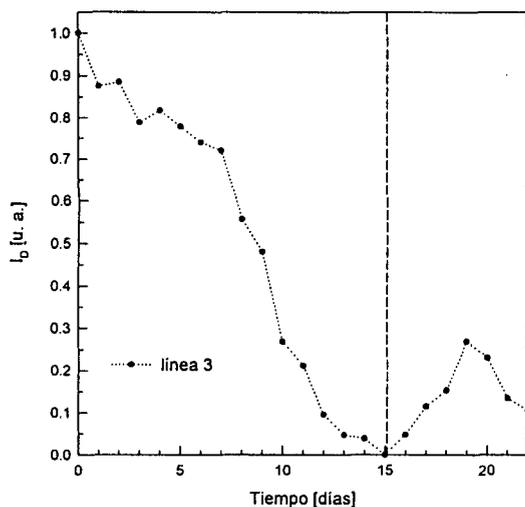


Figura 7: Variaciones de I_D en función del tiempo línea 3.

A fin de comparar el comportamiento de I_D de otras líneas, en la Figura 8 se muestran las curvas correspondientes a los dos ejemplares analizados de la línea 2. Para la comparación se llevó a cabo un corrimiento temporal de una de ellas de manera tal que ambas coincidieran en el valor mínimo de I_D . Se observa que ambas curvas presentan máximos y mínimos relativos aproximadamente coincidentes.

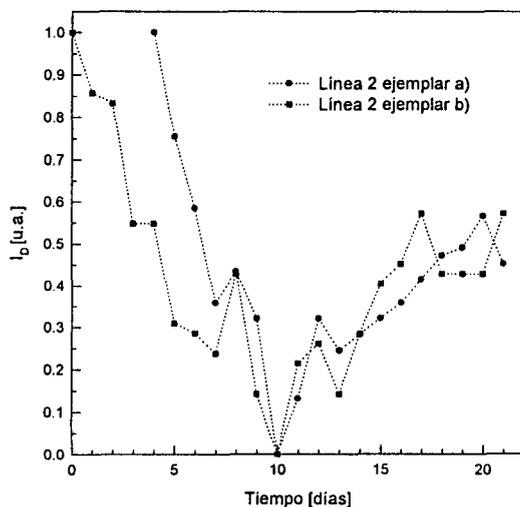


Figura 8: Variaciones de I_D en función del tiempo para la línea 2.

IV. CONCLUSIONES

Se ha verificado experimentalmente que la técnica de bio-speckle resulta apta para analizar los procesos biológicos que ocurren durante la maduración de frutos de tomate. Al analizar individuos de la misma línea, de los que se espera que su comportamiento biológico sea muy similar, el método óptico revela comportamientos de actividad semejantes. La repetibilidad del método se observa en los dos casos analizados. Se continúa trabajando en esta línea de investigación, para estudiar calidad de frutos en líneas en proceso de mejora genética. De los resultados de este trabajo surge que es necesario estandarizar una serie de variables tales como, momento de cosecha, análisis en las características visibles del proceso de maduración (cambio de coloración, textura, ablandamiento, etc.). Esto permitiría establecer correlaciones entre los parámetros ópticos del speckle dinámico y procesos biológicos específicos, tales como degradación de clorofila, producción de etileno, producción de dióxido de carbono, solubilización de azúcares, etc.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo de Investigación, Trabajo N° 1093, Facultad de Ciencias Exactas y Facultad de Ingeniería de la UNSa. y por la ANPCYT PICT 2000 N° 13-09991.

Referencias

- 1- Barceló Coll, J., Nicolás Rodrigo, G., Sabater García, B. y Sánchez Tamés, R. "Fisiología Vegetal", Capítulo 34. Editorial Pirámide, 1998.
- 2- G. Romero, E. Alanís and H. Rabal, "Statistics of the dynamic speckle produced by a rotating diffuser and its application to the assessment of paint drying". Opt. Eng. 39(6), 1652-1658 (2000).
- 3- J. D. Briers, "Speckle fluctuations and biomedical optics: implications and applications", Opt. Eng. 32(2), 277-283 (1993)
- 4- Z. Xu, C. Joenathan and B. Khorana. "Temporal and spatial properties of the time-varying speckles of botanical specimens". Opt. Eng. 34(5), 1487-1501 (1995)
- 5- Oulamara, G. Tribillon and J. Duvernoy. "Biological activity measurements on botanical specimen surfaces using a temporal decorrelation effect of laser speckle". J. Modern Opt. 36, 167-179 (1989).
- 6- Nuez, F. "El cultivo del tomate". Ed. Mundi-Prensa. 1995
- 7- Grierson, D. "Plant molecular biology". 2° edición, SN Covey (1988).
- 8- Anders Bergkvist "Biospeckle-based study on the line profile of light scattered in strawberries". Master Thesis. Lund Reports on Atomic Physics (1997).