

Caracterización de granos de polen por medio de interferometría holográfica digital en transmisión

Gloria Frausto-Rea.¹, Manuel H. De la Torre-I¹, J. Mauricio Flores M², Fernando Mendoza Santoyo²

¹Centro de Investigaciones en Óptica - Unidad Aguascalientes, Prol. Constitución 607, Fracc. Reserva Loma Bonita, Aguascalientes, Ags.,

C.P. 20200, México

²Centro de Investigaciones en Óptica, Loma Del Bosque 115, León Guanajuato C.P. 37150, México



Resumen

Una técnica óptica utilizada regularmente para morfología de objetos microscópicos es la microscopía holográfica digital (DHM) la cual trabaja en transmisión, pero cuando las dimensiones de la muestra están por encima de esa escala, se puede utilizar la interferometría holográfica digital (DHI) para inspeccionarla. Ambas técnicas registran la intensidad y la información de la fase óptica, siendo esta última la que se relaciona con la forma o deformación del objeto.

Una desventaja en DHM es el ruido del moteado (speckle) y el pequeño campo de visión. En este trabajo se presenta un sistema óptico que tiene las capacidades de medición de DHM pero con las ventajas de DHI. Esta configuración utiliza un interferómetro holográfico digital por transmisión (t-DHI)¹ que evita el ruido del laser y la saturación del sensor proyectando la imagen de una muestra biológica semitransparente sobre una pantalla de fase neutra (NPS) como se muestra en la Figura 1.

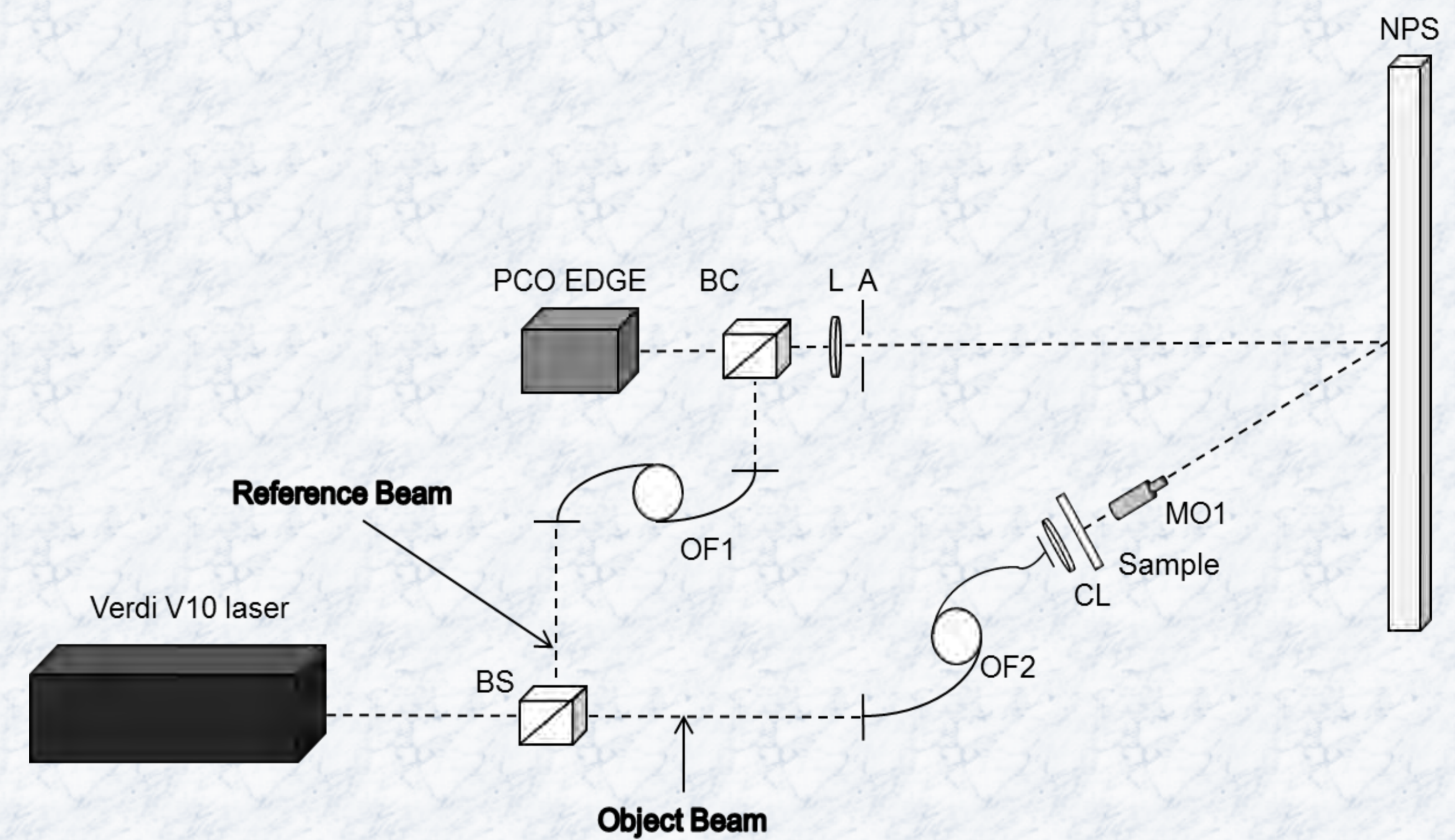


Fig.1. Vista esquemática del sistema t-DHI.

Procedimiento Experimental



Fig.2. Flor Lantana usada para colectar los granos de polen.



Fig.3. Vista esquemática del PFA.

Los objetos bajo estudio son granos de polen de la flor Lantana, la cual generalmente aparece en las anteras de la flor como un fino polvo compuesto de varios granos de polen. La flor Lantana crece en climas tropicales y cálidos principalmente en el continente americano, y en algunas regiones es considerada como una planta invasiva por su rápida tasa de crecimiento y adaptación^{2,3}. En la Fig. 2 se muestra la flor usada para obtener los granos de polen para este trabajo.

Varios granos son colocados y separados sobre un portaobjetos y después de aislarlos se emplea un medio de fijación para evitar el movimiento de los granos de polen. Antes de que la solución solidifique, un segundo portaobjetos es colocado como cubierta, a este arreglo se le conoce como PFA (Fig. 3).

Resultados

Las figuras 4a y 4b muestran la imagen obtenida con un microscopio confocal y la imagen desenvuelta del t-DHI, respectivamente.

Cada grano de polen es independientemente localizado y enumerado tanto para la imagen de fluorescencia confocal como para en el mapa de fase desenvuelto (ver Fig. 5).

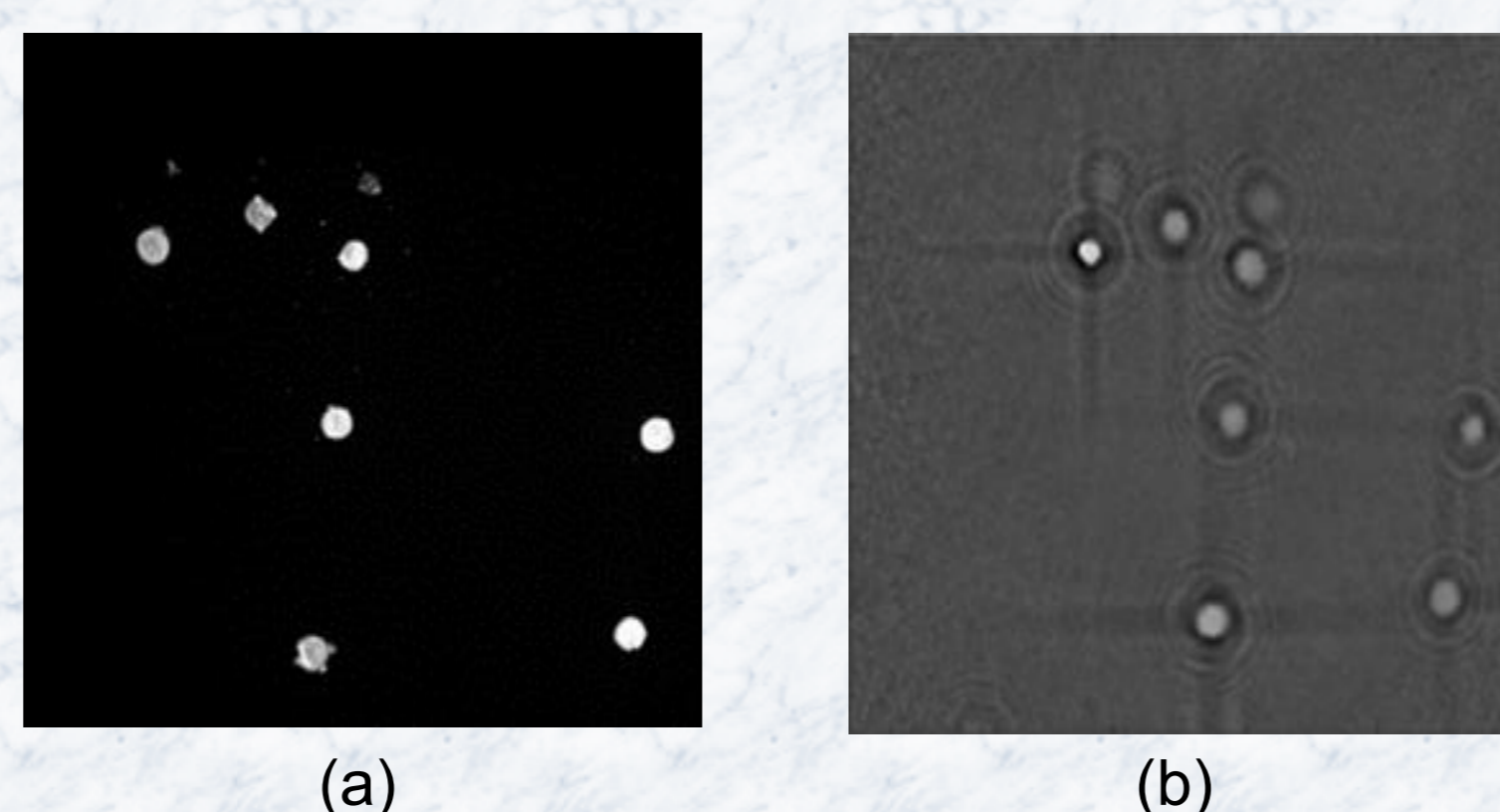


Fig.4. PFA0a (a) imagen confocal y (b) mapa de fase desenvuelto del DHI en transmisión.

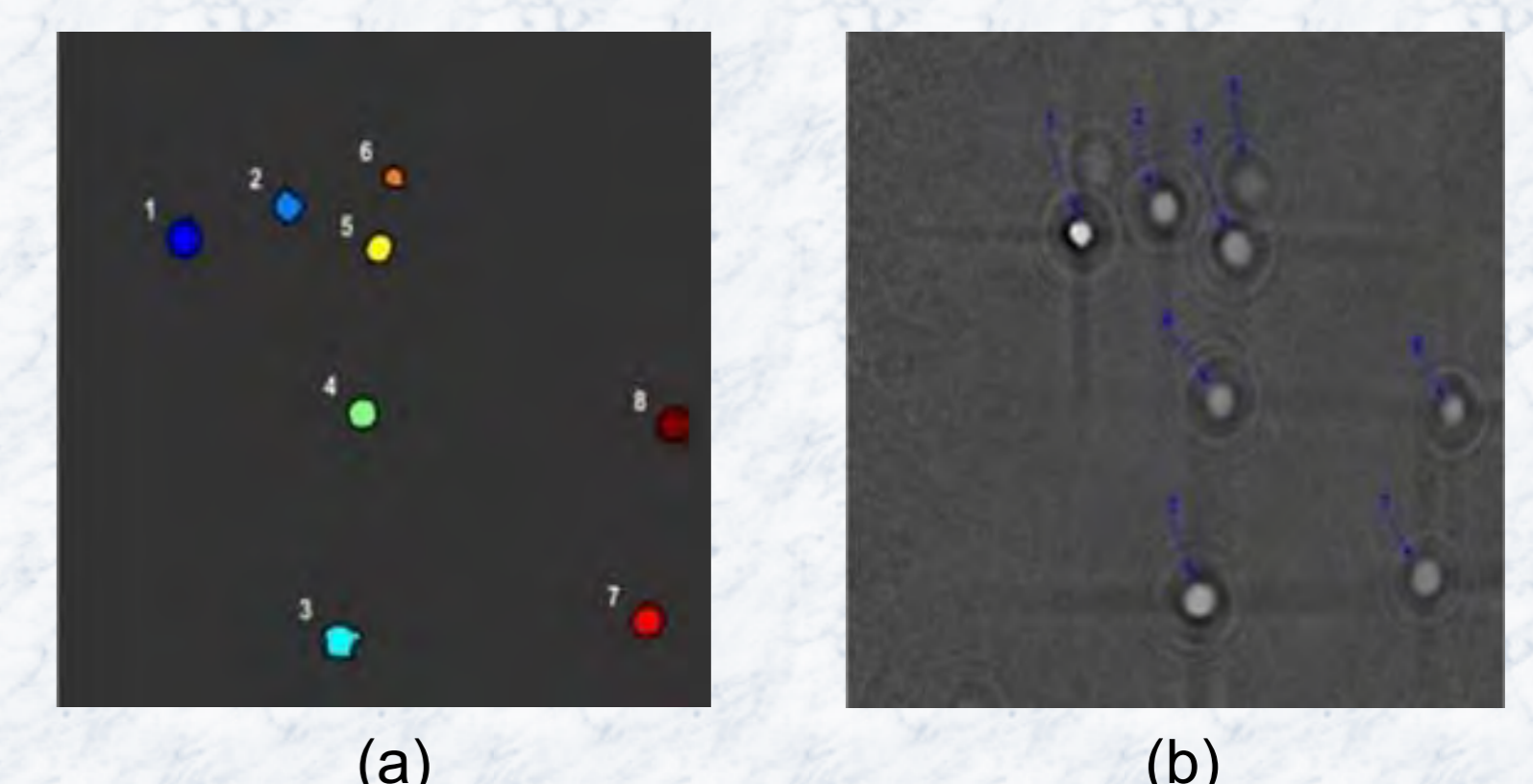


Fig.5. PFA0a etiquetado (a) imagen confocal y (b) fase desenvuelta.

Si se consideran las dimensiones x e y de cada grano de polen (Tabla 1), es notorio que el valor de intensidad máxima corresponde a la partícula más grande mientras que la partícula más pequeña tiene el valor más bajo de intensidad. Sin embargo, los granos de polen no tienen la misma geometría así que las dimensiones x, y son diferentes dependiendo de la forma del grano de polen y estas diferencias no empatan directamente con la intensidad de la fase óptica.

El método propuesto analizar la imagen confocal realiza un análisis geométrico. Cada grano de polen es procesado a fin de calcular el máximo círculo inscrito en su área. Este procedimiento indica el diámetro más grande confinado dentro del perímetro de cada grano de polen. La Tabla 2 muestra los valores de intensidad promedio de tres mediciones y el radio calculado usando el método propuesto. Al mirar esta Tabla es posible observar una mejor relación entre la intensidad de fase con respecto al tamaño del polen.

Tabla 1. Mediciones de la muestra PFA0a

Pollen	Phase intensity (rad)	x (m) size	y (m) size
1	1.710	41.5e-06	48.3e-06
3	0.940	50.4e-06	44.5 e-06
7	0.873	40.7e-06	40.7e-06
8	0.864	40.7e-06	41.1e-06
2	0.760	39.0e-06	44.5e-06
4	0.686	38.2e-06	38.2e-06
5	0.657	36.5e-06	36.9e-06
6	0.251	27.3e-06	26.0e-06

Tabla 2. Intensidad promedio y radio en la muestra PFA0a

Pollen	Phase Intensity (rad)	Radius
1	1.675	49
8	0.896	47
4	0.704	44
7	0.699	44
3	0.981	43
2	0.663	40
5	0.608	39
6	0.278	28

Conclusiones

Un sistema t-DHI ha sido usado con muestras microscópicas para medir su tamaño. Dentro de la configuración óptica pudimos colocar muestras biológicas semi-transparentes provenientes de los granos de polen de la flor Lantana. Esta nueva configuración hace posible asociar un parámetro óptico (fase óptica) con la dimensión de la muestra con la ventaja de un mayor campo de visión comparado con el que tiene un sistema DHM. Además, todas las muestras fueron medidas con un microscopio confocal para obtener una relación entre el mapa de fase desenvuelto y la imagen de fluorescencia esto como un proceso de validación. Como se inspecciona la misma región con el sistema t-DHI y con el microscopio confocal, los resultados muestran una relación entre el tamaño de los granos del polen y la magnitud de fase óptica con la ventaja de tener una medición micrométrica, y un diseño original del sistema capaz de medir muestras mucho mayores.

La imagen de transmisión confocal muestra un artefacto en el polen número 3 como se observa en la Fig. 6. Si esta partícula contaminada es omitida el proceso antes mencionado trabaja correctamente.

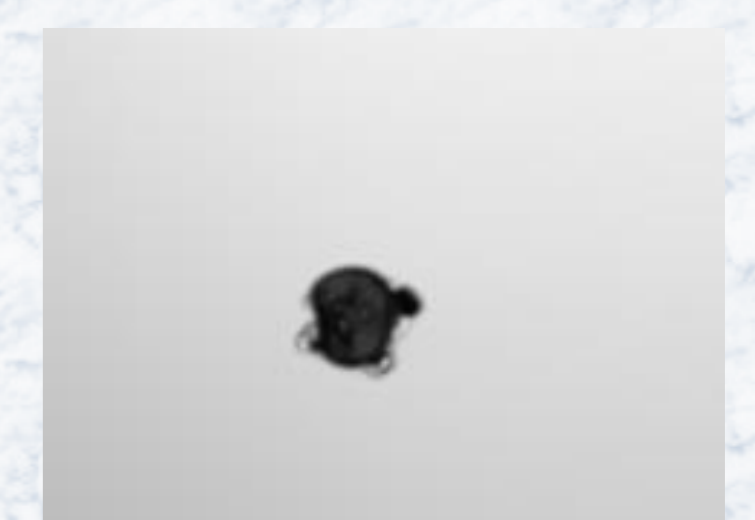


Fig.6. Imagen de transmisión confocal del grano de polen 3.

Referencias

- [1] Manuel H. De la Torre I., Fernando Mendoza S., and M. del S. Hernandez-M., "Transmission out-of-plane interferometer to study thermal distributions in liquids," *Opt. Lett.* **43**, 871-874 (2018).
- [2] Mar Trigo, M. "Contribución al estudio polínico de especies ornamentales: Acanthaceae y Verbenaceae," *Acta Botanica Malacitana*, **18**, 135-146 (1993).
- [3] Ghisalberti, E. L. "Review Lantana cámara L. (Verbenaceae)," *Elsevier Science Fitoterapia*, **71**, 467-486 (2000).