

**“Análisis en tiempo real de fluorescencia de clorofila  
empleando la técnica síntesis digital de señales”**

por **“M.I. Arturo Alfonso Fernández Jaramillo”**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de ingeniería  
Doctorado en Ingeniería

“Análisis en tiempo real de fluorescencia de clorofila empleando la técnica  
síntesis digital de señales”

### TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
“Doctor en Ingeniería”

#### Presenta:

“M. en I. Arturo Alfonso Fernández Jaramillo”

#### Dirigido por:

“Dr. Jesús Roberto Millán Almaraz”

### SINODALES

Dr. Jesús Roberto Millán Almaraz  
Presidente

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Secretario

Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Vocal

Dr. René de Jesús Romero Troncoso  
Suplente

Dr. Luis Miguel Contreras Medina  
Suplente

Dr. Aurelio Domínguez González

Director de la Facultad

  
Firma  
Firma  
Firma  
Firma  
Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco

Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro  
Noviembre de 2014  
México

# RESUMEN

En la actualidad, es crítico generar tecnología que sea aplicable a cultivos, con el objetivo de contrarrestar los problemas de pérdidas de alimentos provocados por factores bióticos o abióticos. Se es bien sabido que las condiciones de estrés afectan la actividad fotosintética que está ampliamente relacionada con el rendimiento de los cultivos. Como resultado a esto, la fluorescencia de clorofila puede ser una herramienta analítica para investigar las condiciones fisiológicas de las plantas y sus estados de estrés, con el objetivo de mejorarlos. Este trabajo presenta un sensor inteligente implementado en lógica programable FPGA que cuenta con la técnica de síntesis digital de señales. Permittiéndonos, a través de un procesador de forma de onda altamente personalizable implementar diferentes formas de onda para la excitación de la muestra fotosintética, dando como resultado la capacidad de obtener nuevos componentes de frecuencia en la respuesta de fluorescencia, enriqueciendo la información del resultado de la medición y así obtener una mayor información fisiológica de la muestra.

Palabras Clave: Fluorescencia, clorofila, sensor inteligente, FPGA, fluorómetro.

# SUMMARY

Nowadays, it is critical to generate technology to be applied to crops in order to counteract the lack of food that can be produced by several biotic and abiotic factors. It is well known that stress conditions affect photosynthetic activity that is closely related to crop yields. As a result, chlorophyll fluorescence can be used as an appropriate analytical tool to investigate physiology and stress conditions of photosynthetic organisms and improve them. This paper presents an FPGA-based smart sensor with Direct Digital Synthesis capabilities for Chlorophyll fluorescence measurement. This is achieved through a customizable waveform processor that is capable of implementing arbitrary waveforms to modulate light source, get new frequencies components to enrich information that a photosynthetic sample can generate, providing researchers with new ways to obtain physiological information.

Key words: chlorophyll, fluorescence, smart sensor, FPGA, fluorometer.

# **AGRADECIMIENTOS.**

A mi dos grandes mujeres que han estado a mi lado: mi madre, la persona más grande y buena que he conocido en la vida, a la cual amo y admiro. Y a mi pareja Nancy por estar a mi lado apoyándome en todo este tiempo; a mi padre que admiro, respeto y amo por brindarme su apoyo y buenos consejos; a mi familia que siempre está a mi lado, en especial a mis tíos Toño, Magui, Alejandrina, Mary, Rogelio; a mis profesores que me apoyaron durante este proceso: Roberto, Troncoso, Irineo, Ramón; pero sobre todo a los compañeros que encontré y terminaron siendo buenos amigos: Luismi, Carlos, Yajaira, Chava, Alexa, Pamela, Javier, Neli, Lina, Jan, Angi, Liz, Ana, Luis, entre muchos más.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	i
SUMMARY .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
I INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Antecedentes y Justificación .....	1
I.2 Planteamiento del problema .....	3
I.3 Hipótesis y objetivos .....	3
I.3.1 Hipótesis general .....	3
I.3.2 Objetivo general .....	4
I.3.3 Objetivos específicos.....	4
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
II.1 Bioluminiscencia.....	5
II.2 Fotosíntesis.....	7
II.3 Instrumentación en los sistemas biológicos .....	9
II.4 Mediciones en plantas .....	10
II.4.1 Fitomonitorio .....	12
II.5 Lógica reconfigurable .....	13
II.6 Procesamiento digital de señales.....	14
II.6.1 Transformada Wavelet.....	15
II.6.2 Síntesis digital de señales.....	16

III	METODOLOGÍA.....	18
III.1	Diseño del fluorómetro .....	18
III.2	Excitador de clorofila.....	21
III.2.1	Instrumentación de la fuente lumínica modulada .....	22
III.3	Medidor de fluorescencia.....	24
III.4	Logica programable del fluorómetro .....	28
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
IV.1	Validación estadística del fluorómetro de clorofila.....	34
IV.1.1	Análisis de la varianza de mediciones y formas de onda .....	38
IV.1.2	Prueba de 3-sigma para repetibilidad del fluorómetro .....	46
IV.2	Procesamiento de señales de fluorescencia modulada.....	47
IV.3	Conclusiones y prospectivas.....	52
	BIBLIOGRAFÍA .....	53
	APÉNDICE A.....	57

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla IV.1 Resultados del analisis ANOVA en la comparación entre la señal de referencia y la de fluorescencia de clorofila. ....	40
Tabla IV.2 Resultados del analisis ANOVA en la comparación entre las diferentes tipos de mediciones: adaptado a la obscuridad, saturada y vacio; con las diferentes formas de onda.....	43
Tabla IV.3 Resultados del analisis ANOVA en la comparación entre las diferentes tipos de formas de onda: senoidal, triangular, dientes de sierra y cuadrada en adaptado al a obscuridad, saturado y sólo con transitorio. ....	45
Tabla IV.4 Análisis estadístico de las mediciones con la regla de una-sigma.....	46



# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1 Absorción y emisión de luz por la clorofila (modificado de Taiz and Zeiger 2006) ...	6
Figura II.2 Respuesta de fluorómetro de fluorescencia de clorofila desarrollado por Kissinger y Wilson en 2011. ....	12
Figura III.1 Diagrama de bloques del fluorímetro de clorofila.....	20
Figura IV.1 Combinaciones de medición para la validación estadística. ....	35
Figura IV.2 Mediciones en adaptación a la obscuridad en campo. ....	36
Figura IV.3 Mediciones en adaptación a la obscuridad de formas de onda seno, triangular, dientes de sierra y cuadrada, con un barrido de frecuencia. ....	36
Figura IV.4 Medición normalizada del estado transitorio en adaptación a la obscuridad en formas de onda: seno, cuadrada, triangular y dientes de sierra.....	37
Figura IV.5 Hoja de una planta simulando un modelo de caja negra y excitada con una señal de forma de onda cuadrada en condiciones de adaptación a la obscuridad.....	38
Figura IV.6 Gráfica de ANOVAS entre la señal de referencia y la fluorescencia de clorofila para las mediciones adaptadas a la obscuridad con forma de onda: senoidal, dientes de sierra, triangular y cuadrada.....	40
Figura IV.7 Gráfica de ANOVAS entre la señal de referencia y la fluorescencia de clorofila para las mediciones saturadas con forma de onda: senoidal, dientes de sierra, triangular y cuadrada.	41
Figura IV.8 Diagrama de comparativas entre las diferentes tipos de mediciones.....	42
Figura IV.9 Gráfica de ANOVAS entre los diferentes tipos de mediciones: adaptada a la obscuridad, saturadas y vacío con las 4 diferentes formas de onda. ....	43
Figura IV.10 Diagrama de comparativas entre las diferentes formas de onda: senoidal, triangular, dientes de sierra y cuadrada. ....	44
Figura IV.11 Diagrama de comparativas entre las diferentes formas de onda: senoidal, triangular, dientes de sierra y cuadrada. ....	45
Figura IV.12 Mediciones adaptadas a la obscuridad y saturadas de cuatro diferentes formas de onda aplicando la regla de una-sigma. ....	47

Figura IV.13 Medición adaptada a la obscuridad con una forma de onda cuadrada con deformaciones en el transitorio de inicio, final, y señales de altas frecuencias en los flancos ascendentes. ....	49
Figura IV.14 Mediciones en adaptación a la obscuridad con forma de onda cuadra en estado de confort y después de la aplicación de hericida a planta de chile habanero.....	51
Figura IV.15 Mediciones en estado de saturación con forma de onda cuadra en estado de confort y después de la aplicación de hericida a planta de chile habanero. ....	51

# CAPÍTULO 1:

## I INTRODUCCIÓN

### I.1 Antecedentes y Justificación

Las plantas se encuentran dentro de los seres más evolucionados del planeta, ellas a diferencia de los humanos, son capaces de producir sus propios nutrientes a través del proceso llamado fotosíntesis. Durante este proceso la energía de la luz del sol es almacenada para posteriormente, en conjunto con el agua y el dióxido de carbono, formar carbohidratos y expeler oxígeno a la atmósfera (Taiz y Zeiger, 2006). Las plantas no son capaces de asimilar toda la energía que es absorbida, ya que solo del 5 al 10% del total de energía se acumula en materia seca (Long *et al.*, 1994). Desde la perspectiva anterior, las plantas son consideradas como organismos de baja eficiencia.

El exceso de energía que es absorbida a través de las hojas es disipado por medio de diferentes métodos, entre los cuales se incluyen; los de disipación térmica, emisión de fluorescencia y los fotoquímicos (Losciale *et al.*, 2011). Sin embargo, lo que puede ser visto como un inconveniente de eficiencia, es bien aprovechado para investigar y sacar información acerca de comportamientos fisiológicos en las plantas, como pueden ser los enfriamientos (quenching) fotoquímicos o no fotoquímicos.

Una manera de estudiar a las plantas es a través de la fluorescencia de la clorofila, la cual consiste en emisión de fotones de un tejido fotosintético en el área del rojo y el infrarrojo lejano del espectro electromagnético. Este fenómeno es provocado como respuesta a una excitación a través de una fuente lumínica (Zarco-Tejada *et al.*, 2002). Debido a que la fluorescencia de la clorofila depende directamente de la actividad fotosintética, se tiene como resultado un claro panorama de la fotosíntesis e incluso se puede inferir su eficiencia (Espinosa-Calderon *et al.*, 2011; Fedack *et al.*, 2005).

A través del correcto análisis y aplicación de esta técnica, se puede investigar acerca de las condiciones de estrés en las cuales puede estar la planta, con el propósito de modificar en un lapso de tiempo corto las condiciones que rodean a la planta y con ello aumentar su estado de

confort, dando como resultado un incremento en la eficiencia fotosintética y en una mayor producción (Bussotti *et al.*, 2011; Colls y Hall, 2004; Faraloni *et al.*, 2011; Mereu *et al.*, 2011).

Anteriormente se ha abordado a las plantas como objeto de estudio de la fluorescencia de la clorofila, sin embargo esta técnica de análisis es utilizada en diferentes organismos con los ajustes específicos en los sistema de medición. Entre algunos ejemplos podemos encontrar a las algas, cianobacterias, entre otros organismos capaces de producir este fenómeno.

Nada de lo mencionado anteriormente puede llevarse a cabo sin la correcta utilización de instrumentación o equipos de medición. La metodología propuesta se puede dividir en dos partes principales; la primera se refiere a la excitación de clorofila a través de una fuente lumínica, la cual puede ser activa o pasiva. El método activo es aquél en el que para llevar a cabo la excitación de la clorofila, se utilizan dispositivos como lámparas (Hideg y Schreiber, 2007; Lichtenthaler *et al.*, 2005b; Van Gaalen *et al.*, 2007), láseres (Kolber *et al.*, 2005; Schächtl *et al.*, 2005; Thoren y Schmidhalter, 2009), LEDs (Avercheva *et al.*, 2009; Bulgarea y Boukadoum, 2001; Faraloni *et al.*, 2011; Fedack *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2009; Kissinger y Wilson, 2011; Wang *et al.*, 2007). Por otro lado los métodos pasivos son aquellos en los cuales la excitación se logra con la utilización de la luz solar (Liu *et al.*, 2005; Meroni *et al.*, 2009). La segunda parte que corresponde a la medición de la respuesta de la clorofila, se logra con la utilización de dispositivos ópticos como: fotodiodos (Fedack *et al.*, 2005), fotomultiplicadores, fibras ópticas (Agati *et al.*, 2011), imágenes de satélite (Frankenberg *et al.*, 2011) y cámaras (Lefcourt *et al.*, 2005; Lichtenthaler *et al.*, 2005b).

Una de las aportaciones que se pretende dar al método de la fluorescencia de clorofila, es la aplicación de la SDS (síntesis digital de señales), donde a través de la manipulación de formas de onda en la fuente de excitación, se obtiene una mayor información del organismo que se desea analizar. Para esto es necesario generar e implementar una forma de onda en un dispositivo digital como un FPGA, para después modular la alimentación de energía de la fuente lumínica.

## **I.2 Planteamiento del problema**

Hoy en día, la tecnología para medir fotosíntesis es cara y compleja, en algunos métodos tienden a medir diferentes variables como la transpiración, temperatura, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> entre otros. Siendo que al medir todas las variables mencionadas se tiende a ser invasivo con la planta de cierto modo. Tomando en cuenta el número de variables que se miden se genera poca portabilidad en los equipos, debido a que entre más variables a medir, se ve reflejado en mayores dispositivos en el sistema e incluso en algunos casos mayores costos en los equipos.

Por otra parte es la poca autonomía que se tienen en los métodos de medición de variables. Dando como resultado una incapacidad para hacer mediciones por largos periodos de tiempo u obtener gran cantidad de datos, debido a que otra limitante es la capacidad y la eficiencia para guardar esta información y procesarlos.

Con el impulso de técnicas de fitomonitorio desarrolladas en el país se evitaría una dependencia tecnología con el extranjero, haciendo las producciones agrícolas más eficientes con la reducción de costos y de tiempos de respuesta ante algún imprevisto con la tecnología, esto es debido a que se ahorraría tiempo en mantenimiento correctivo o preventivo, así como en el proceso de instalación de la tecnología extranjera y el ahorro de costos de transporte y de tecnología.

Aunado a lo anterior, los sistemas de medición tienden a dar poca información o información que se tiene que analizar por un experto en el área. Llevando las técnicas de fitomonitorio solamente para el mercado con alto nivel de tecnificación en sus procesos de cultivo, dejando de lado a otros productores locales.

## **I.3 Hipótesis y objetivos**

### **I.3.1 Hipótesis general**

La correcta selección de intensidad, longitud de onda y modulación de la forma de onda de la fuente de excitación, aunada a métodos avanzados de procesamiento digital de señales, permite diseñar un sensor inteligente, capaz de obtener información del estado fisiológico de la muestra fotosintética a través de la fluorescencia de clorofila.

### **I.3.2 Objetivo general**

Desarrollar un sistema no invasivo implementado en FPGA, que permita monitorear en tiempo real la fluorescencia de la clorofila utilizando la técnica de síntesis digital de señales.

### **I.3.3 Objetivos específicos**

1. Diseñar una fuente de excitación variable en frecuencia, intensidad, y forma de onda para la excitación de la clorofila.

2. Desarrollar un sensor inteligente de fluorescencia de clorofila.

3. Desarrollar una metodología para la medición de fluorescencia de clorofila, utilizando síntesis digital de señales en la fuente de excitación.

4. Evaluar la componente tecnológica desarrollada en una aplicación real.

# CAPÍTULO 2:

## II REVISIÓN DE LITERATURA

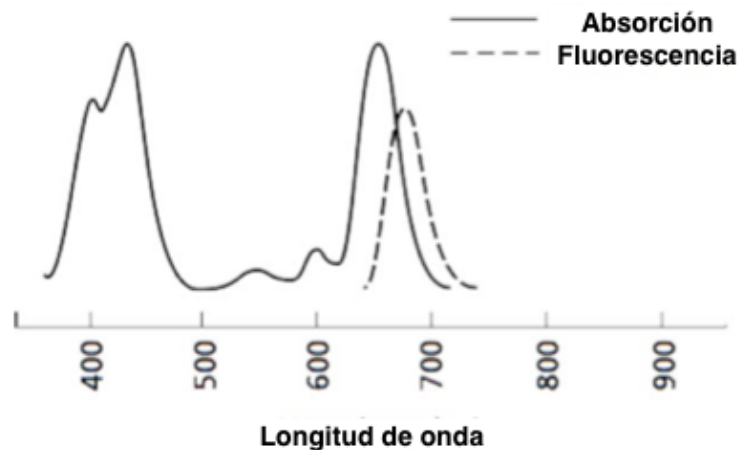
### II.1 Bioluminiscencia

La luminiscencia en los sistemas biológicos ha inspirado la curiosidad y el interés desde los antiguos tiempos de Aristóteles y Pliny. Esta cualidad ha sido el blanco de investigaciones de muchos naturalistas, físicos y fisiólogos. Donde en los inicios de la investigación de la fluorescencia, se realizaban hipótesis bastante intuitivas como la que desarrolló Benjamin Franklin, el cual encontró que la luz es producida mediante la electricidad. Basado en este principio él hizo la hipótesis que la fluorescencia en el mar era provocada por un fenómeno eléctrico, sin embargo no dudó en cambiar de opinión cuando se dio cuenta que esta luminiscencia se podía filtrar del agua por medio de un paño. (Shimomura, 2012)

Sin embargo, los secretos químicos de la bioluminiscencia empezaron a ser realmente descubiertos apenas en los inicios del siglo XX, y fue en 1916 cuando Harvey por primera vez utilizó el término para referirse a la luminiscencia provocada por los seres vivos.

La propiedad de luminiscencia de un organismo involucra una serie de procesos químicos interrelacionados. Existen gran variedad de reacciones para la emisión de luz, sin embargo en su mayoría está involucrada la oxidación de un sustrato, siendo usualmente la luciferina, esta proporciona la energía para la generación de un estado de excitación.

Las plantas también cuentan con la capacidad de fluorescer, sin embargo este proceso es diferente en comparación con los mencionados anteriormente. Para una mejor comprensión del fenómeno debemos entender que para el ojo humano la mayoría de las plantas son percibidas en color verde. Esto debido a que la clorofila absorbe principalmente la parte azul y roja del espectro electromagnético, como se observa en la Figura II.1, dando como resultado la reflexión del espectro de color verde, que es el que el ojo percibe.



**Figura II.1** Absorción y emisión de luz por la clorofila (modificado de Taiz and Zeiger 2006) .

La absorción del espectro azul provoca en la clorofila entrar en un estado de excitación alto, incluso más que durante la absorción del color rojo, esto se debe a que la luz azul contiene mayor energía en los fotones. En el estado de alta excitación, la clorofila tiende a ser extremadamente inestable y rápidamente la energía almacenada es desechada por medio de calor, y así entrar a un estado de excitación bajo. En este estado la clorofila tiene 4 maneras de eliminar la energía disponible, las cuales son:

- Una opción es un proceso fotoquímico en la cual la energía del estado excitado causa reacciones químicas llamadas fotosíntesis. Este tipo de reacción es de las más rápidas conocidas, debido a que su extrema rapidez es necesaria para competir con las siguientes tres reacciones.

- La clorofila puede solo participar en una transferencia de energía directamente a otra molécula.

- otra opción es que regresar a su estado de reposo convirtiendo directamente la energía en calor, esto es emitir energía infrarroja, pero esta sin la emisión de fotones.

- La clorofila excitada puede hacer una re-emisión de un fotón y así pasar a su estado normal de reposo, este proceso es el que nos interesa, debido a que es conocido como fluorescencia., en el cual la emisión del fotón es de menor energía, debido a que parte de esta se



pierde en la emisión de calor de la planta antes de irradiar fotones, es por eso que la fluorescencia emitida por la planta se encuentra en el espectro del rojo (Taiz y Zeiger, 2006).

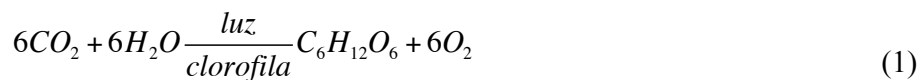
La luminiscencia en los organismos fotosintéticos ha causado admiración y se ha utilizado para investigar y tener una mayor comprensión de los que poseen esta capacidad. Sin embargo no es una característica utilizada para un fin en común, debido a que algunos la utilizan para la búsqueda de pareja, otros para conseguir alimento al utilizarlo como cebo, e incluso algunas para protegerse y confundir a depredadores. Sin embargo usualmente esta característica es usualmente utilizada por los investigadores como herramienta analítica.

En la actualidad, existen sistemas de medición de fluorescencia en plantas y otros organismos fotosintéticos, dichos dispositivos se encargan de inferir algunas condiciones fisiológicas de las plantas. Usualmente la mayoría de estos dispositivos comerciales (Hansatech, li-cor, Optiscience, Photon System Instruments, Walz, etc.) están basados en una técnica llamada PAM, por sus siglas en inglés (Pulse Amplitud Modulation), la cual consiste en usar como fuente de excitación lumínica un flash de saturación con forma de onda cuadrada, este método tiene como característica que puede aplicarse a muestras adaptadas o no adaptadas a la oscuridad (dark- y light-adapted). Con este tipo de dispositivos se puede tener como resultado una eficiencia en los fotosistemas y así poder medir indirectamente la fotosíntesis.

## II.2 Fotosíntesis

La fotosíntesis es uno de los procesos biológicos más importantes sobre la tierra, debido a que la vida depende directamente de la energía emitida por el sol, siendo la fotosíntesis el único proceso que puede almacenar esta energía (Taiz y Zeiger, 2006).

La principal característica de este proceso es el hecho de convertir la energía lumínica en energía química. En la fotosíntesis, el dióxido de carbono proveniente de la atmósfera y el agua contenida en el suelo son unidas en el cloroplasto, donde con la presencia de la luz reaccionan para formar glucosa, como resultado se tiene una liberación de oxígeno por parte de la planta como se observa en la Ecuación 1 (Agris, 2005).



El proceso de la fotosíntesis se divide principal mente en dos partes, la fase luminosa y la fase oscura. La primera fase o fase lumínica es cuando los cloroplastos se encargan de la absorción de la energía lumínica, mientras que en la segunda fase o fase oscura, la energía almacenada de la primera fase, se utiliza para la fijación de CO<sub>2</sub> y ser transformado en carbohidratos y en O<sub>2</sub>. La primera fase es igual para todas las plantas, sin embargo la fase oscura es diferente para algunas plantas y de acuerdo a como se realice se dividen en tres: C3, C4 y CAM.

La fase oscura también es llamada ciclo de Calvin, esta no se limita únicamente a la oscuridad, de hecho las reacciones oscuras son estimuladas por la luz, pero no utilizan directamente la energía de la luz para funcionar, en su lugar utilizan el NADPH y el ATP generado por las reacciones luminosas (Mathews *et al.*, 2002).

Los tres principales procesos del ciclo de Calvin son: carboxilación, reducción y regeneración. Durante el proceso de la carboxilación, se define el tipo de planta que es. Por ejemplo tenemos que en este proceso las plantas del tipo C3, sintetizan el CO<sub>2</sub> en compuestos de 3 carbonos. Algunos ejemplos de este tipo de plantas son: pepinos, jitomates y la mayoría de los cultivos en zonas templadas que tienden a saturarse al estar expuestos a grandes cantidades de luz, mientras que las C4 lo hacen en compuestos de 4 carbonos, en los cuales podemos encontrar; al sorgo, la caña de azúcar, el maíz y pastisales. Estos tipos de plantas no presentan síntomas de saturación de luz por lo cual pueden tener mejor uso de las grandes exposiciones a la luz. Por último, las plantas tipo CAM también hacen compuestos de 4 moléculas de carbonos, sin embargo tienen la diferencia que en la recepción y fijación del CO<sub>2</sub> se llevan a cabo durante la noche, mientras que la descarboxilación y la refijación del CO<sub>2</sub> liberado internamente ocurren durante el día. Debido a estas características las plantas tipo CAM pueden sobrevivir en ambientes con restricciones hídricas constantes, como lo son las cactáceas (Taiz y Zeiger, 2006).

Siendo la fotosíntesis el proceso más importante para las plantas, los investigadores se han enfocado para tratar de comprenderlo e inferirlo a través de sistemas y métodos complejos de medición; y así tener una mejor comprensión de las condiciones en las que se encuentra el organismo de interés.

### II.3 Instrumentación en los sistemas biológicos

Debido al alto crecimiento de la población se han creado técnicas cada vez más complejas para la mejora de la agricultura, uno de los avances más significativo es el de los invernaderos. Los cuales son sistemas cerrados contruidos por vidrio u otro material traslucido, donde su principio es que la luz solar entre a través del material con el que están contruidos y caliente el interior, dando como resultado que los objetos dentro emiten una radiación infrarroja la cual al ser de menor energía que la emitida por el sol, no puede escapar del invernadero.

Existen diferentes clases de invernaderos, los cuales se tipifican de acuerdo a su tecnificación en cuatro categorías.

Tipo 1: Invernaderos con estructuras simples, con ventilación manual lateral y comúnmente contruidos con maya o plástico sencillo.

Tipo 2: Se caracteriza por ser de mayor tamaño y de mejores materiales que los desarrollados en los tipo 1. Normalmente cuentan con sistema de calefacción y ventilación lateral y cenital.

Tipo 3: Invernaderos altamente tecnificados. Básicamente se cuenta con algunas características como lo son: automatización de variables internas como la humedad, temperatura, iluminación, entre otros. Algunos cuentan con sistemas de fecundación a través de abejorros, sistemas de fertirrigación en hidroponía, entre otras características.

Tipo 4: Estos invernaderos contienen un control más sofisticado que los nivel 3, debido a que los parámetros son regulados por la planta, en los cuales por medio de biosensores se monitorean las condiciones en los que se encuentran las mismas y así modificar los valores por medio del comportamiento de la misma.

Existe gran cantidad de instrumentación compleja, un claro ejemplo de esto se ve en la medición de la fluorescencia de la clorofila, donde para tomar mediciones se utilizan complejos dispositivos, como son los espectrómetros (Bulgarea y Boukadoum, 2001; Faraloni *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2005) y dispositivos para trasportar la luz como fibra óptica multicanal (Iliev *et al.*, 2009), incluso en ocasiones se combinan varias técnicas de medición para mejorar los resultados,

como el uso de componentes fotoacústicos y fotómetros para la medición de fotosíntesis (Belanger *et al.*, 1993).

Mediante estos métodos de instrumentación y de control, la agricultura ha tenido una gran explotación, dando como resultado una agricultura más eficiente en términos de producción llevadas a cabo cada vez en menos espacio de plantío.

## **II.4 Mediciones en plantas**

Desde tiempos antiguos en el periodo neolítico, la civilización se encargó de crear técnicas de cultivo, este fue un parteaguas para pasar de un estado de nómadas al sedentarismo y así poder establecerse en un mismo lugar cubriendo sus necesidades de alimentación apoyándose en otras prácticas como la caza y la pesca.

En la agricultura, la fotosíntesis es considerado el proceso más importante en una planta, debido a que le da la característica de ser autótrofa, lo que significa que es capaz de crear su propio alimento. Sin embargo, existen diversos factores los cuales pueden afectar este proceso fotoquímico tan importante, como lo patógenos; los cuales pueden provocar necrosis en la planta, eliminando zonas verdes y así afectar el crecimiento y correcto desarrollo de los frutos (Agrios, 2005).

Existen diferentes factores que pueden afectar la fotosíntesis, y algunas veces no provienen de forma natural como lo son algunos patógenos, sino de técnicas que se han creado para mejorar la producción de la agricultura, como es el caso de los herbicidas que son utilizados para tener un control de maleza no deseadas a un bajo costo. Sin embargo, esto puede ser un factor de contaminación que afecte el suelo y las aguas superficiales, afectando a otros cultivos o plantas que no sean maleza.

Con el objetivo de detectar problemas como el mencionado anteriormente y evitar condiciones adversas en el crecimiento de las plantas, existen diferentes tipos de técnicas para la medición de la fotosíntesis, las cuales fueron reportadas por Millan-Almaraz *et al.* (2009):

Destructivos: también son denominados de materia seca, este método consiste en la estimación de la actividad fotosintética de la planta, basada en la acumulación de materia seca

desde su punto de germinación. El proceso consta en cortar una porción de la planta, deshidratarla y pesar la materia seca (Coombs *et al.*, 1988; Hodson *et al.*, 2005).

**Electroquímicos:** Método utilizado en soluciones acuosas donde se mide el O<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> Por medio de electrodos electroquímicos. Es un método bastante útil debido a su simplicidad y bajo precio (Takahashi *et al.*, 2001; Tank y Musson, 1993). Estos procesos se utilizan mayormente en mediciones de lapsos cortos de tiempo, debido a que en lapsos largos de tiempo se pueden provocar mediciones poco confiables, esto es debido a que los sensores consumen oxígeno de la muestra. Otra característica es que para tener mediciones homogéneas la muestra tiene que ser constantemente agitada.

**Intercambio de gases:** Este método es el más utilizado en la medición de fotosíntesis de hojas individuales (Delieu y Walker, 1983). Para inferir la cantidad de fotosíntesis en este proceso, se debe de sacar una relación de la medición de O<sub>2</sub> o de CO<sub>2</sub> , todo esto aislando la muestra a través de una cámara (Millan-Almaraz *et al.*, 2013; Schulze, 1972).

**Fluorescencia:** Este método se basa en la excitación de la clorofila (Kautsky y Hirsch, 1931), la cual tiene la capacidad de re-emitir fotones en el espectro del rojo para regresar a su estado normal. El proceso se basa que a mayor fluorescencia mayor cantidad de clorofila se encuentra activa (Damm *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2007). Las ventajas de este método es el hecho a que es inmune a variables externas como lo son la temperatura, la presión o la humedad (Taiz y Zeiger, 2006).

Este fenómeno en las plantas por si solo puede servir para detectar ciertas características que pueden ayudar en la mejora de condiciones para su crecimiento, pudiendo detectar en algunos casos tipos de estrés, como los son el estrés hídrico (Faraloni *et al.*, 2011; Komura *et al.*, 2010; Rahbarian *et al.*, 2011), estrés salino (Iliev *et al.*, 2009), incluso compuestos químicos que modifiquen el rendimiento de la fluorescencia , entre otras características que afecten directamente a la planta (Zhang *et al.*, 2009).

Para este proceso de medición de fluorescencia existe una técnica la cual por medio de un fluorímetro tipo PAM en conjunto con un amplificador lock-in. El fluorímetro puede modular la luz que se incide en la planta, y el método lock-in filtrar y evitar el problema del

ruido de la luz ambiental y solo tener la medición de la respuesta lúminica de la planta, esto con el fin crear un métodos menos invasivos (Bulgarea y Boukadoum, 2001).

Dentro de los métodos de fluorescencia en clorofila, Kissinger y Wilson (2011) reportan una nueva metodología para la medición de fluorescencia. El montaje del experimento fue aplicado no a una planta, sino a micro organismos marítimos fotosintéticos. La metodología reporta que si se aplica una modulación senoidal a la fuente de excitación de la clorofila, como se observa en la figura II.2. Como resultado se tiene una respuesta modulada sin embargo con una diferencia en la fase y así poder determinar condiciones fisiológicas del objeto de estudio para su monitoreo.

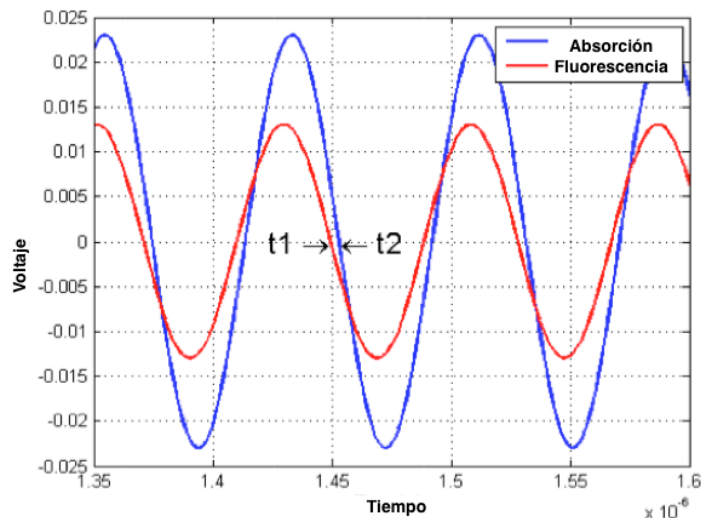


Figura II.2 Respuesta de fluorómetro de fluorescencia de clorofila desarrollado por Kissinger y Wilson en 2011.

#### II.4.1 Fitomonitorio

Este tipo de monitoreo incorpora técnicas de censado, muestreo, protocolos de medición, interpretación de los datos y aplicaciones específicas. Estas técnicas están son empleadas en la llamada “agricultura de precisión”.

Toda la instrumentación está dedicada al monitoreo y comportamiento de variables fisiológicas de la planta (Ehler y Mazanti Hansen, 1995; Ton y Kopyt, 2003). Como se ha

mencionado anteriormente existen diferentes tipos de variables a medir en las plantas, sin embargo hay algunas variables que no son tan fáciles de medir a través de instrumentación electrónica, como lo es la materia seca. Este tipo de mediciones normalmente se hacen manuales debido a la naturaleza de las mismas; como lo son el medir el área foliar, el diámetro de los tallos, el tamaño de los frutos. Sin embargo se conoce que la fotosíntesis produce el 90% de la materia seca en la planta, estimando esta se pueden evitar este tipo de mediciones tardadas y problemáticas.

Para este tipo de procesos de monitoreo, siempre se tiende a buscar variables las cuales sean fáciles de medir por medio de sensores, esto con la objetivo de facilitar el monitoreo de las plantas e incluso automatizar las mediciones de las variables fisiológicas a observar en grandes lapsos de tiempo.

Para la implementación de algunas metodologías de fitomonitorio se necesita de altas prestaciones de procesamiento, así como de monitoriar diferentes procesos o variables en la planta. Esto se puede lograr a través de la plataforma FPGA, la cual puede alcanzar altas velocidades de procesamiento y explotar la característica del paralelismo para facilitar la medición de múltiples procesos.

Un claro ejemplo de una implementación de fitomonitorio se llevó a cabo por Millan-Almaraz *et al.* (2013) donde se puede observar un medidor de fotosíntesis inalámbrico por el método de intercambio de gases. Sin embargo para realizar los cálculos e inferir la fotosíntesis, se emplea la ayuda del paralelismo en el FPGA y así poder monitorear diferentes sensores como lo son los de radiación lumínica, temperatura, CO<sub>2</sub>, humedad, y al mismo tiempo estar transmitiendo de forma inalámbrica los datos.

## **II.5 Lógica reconfigurable**

Este tipo de tecnología es una importante plataforma para el desarrollo de sistemas digitales, desde lo más simples que son compuertas lógicas básicas, hasta sistemas digitales bastantes complejos, como procesamientos digital de señales y algoritmos. Todo esto con la finalidad de tener sistemas completos en un mismo chip (SOC). Los dispositivos de lógica reconfigurable son capaces de proveer un alto nivel de cómputo, gran flexibilidad en

aplicaciones y un alto grado de integración para hacer complejos procesos en un mínimo de recursos lógicos.

Una característica primordial y ampliamente explotable en este tipo de dispositivos reconfigurables como los FPGA, tomado de sus siglas en inglés de Field Programable Gate Array, es el paralelismo, lo cual significa que en un mismo integrado podemos incluir diferentes módulos y cada uno trabajar a la par del otro. Esta es una ventaja importante sobre dispositivos que trabajan de una manera secuencial al momento de ejecutar una serie de instrucciones; como los microprocesadores y microcontroladores. (Troncoso, 2007). Por lo tanto, la lógica reconfigurable es una opción utilizada para el desarrollo de prototipos de dispositivos digitales, los cuales posteriormente son producidos a gran escala en SOCs. Sin embargo, debido a la rápida demanda del mercado, primeramente se debe de desarrollar en lógica reconfigurable para hacer pruebas y poder realizar modificaciones si estos lo requieren. Y así, posteriormente generar los diseños de circuitos de propósito específico, los cuales tienen como ventaja el trabajar a mayores frecuencias, ocupar un menor espacio. Sin embargo, no cuentan con la capacidad de ser reconfigurados después de su elaboración.

Debido a las ventajas antes mencionadas, los sistemas digitales reconfigurables son una opción viable para aplicar complejos algoritmos digitales, con la finalidad del análisis de fenómenos previamente adquiridos y convertidos a datos digitales. Posteriormente a esto, se es posible manejar esa información para generar sistemas de análisis a través de procesamiento digital de señales.

## **II.6 Procesamiento digital de señales**

Considerada una de las tecnologías que han dado forma a la ciencia y a las ingenierías del siglo XXI, el procesamiento digital de señales ha generado cambios revolucionarios en una amplia gama de sectores como: desarrollo de ordenadores, circuitos integrados, comunicaciones, imágenes médicas, radar y sonares, exploración de petróleo, entre otras. Debido a los recientes avances de la tecnología de integración, a diferencia de hace 30 años donde los ordenadores eran lentos, grandes y caros, y no se podía tener un procesamiento a tiempo real. Ésto ha cambiado durante los últimos años, donde se ha tenido acceso a computadores con prestaciones y recursos que dan la posibilidad de hacer un procesamiento digital, incluso a tiempo real para el análisis y resolución de problemas. Cada área mencionada anteriormente desarrolla técnicas profundas de



procesamiento digital de señales, con sus propios algoritmos, matemáticas y técnicas especializadas (Smith, 1997). Los circuitos digitales utilizados para los procesamientos permiten diseños o sistemas programables. Lo cual, mediante software se puede modificar fácilmente las funciones del procesado de señal para posteriormente sean ejecutadas. Lo anterior, comparado con los circuitos analógicos, no permiten esa flexibilidad aportada por la electrónica digital.

Para entender el procesamiento digital de señales, se debe entender el principio básico de convertir una señal de tipo analógica a una señal digital, definiendo una señal como una cantidad física que varía con el tiempo, el espacio o cualquier otra variable o variables independientes. Una señal analógica cuenta con un valor continuo de voltaje durante el tiempo, a diferencia de una señal digital que mantiene valores en lapsos discretos de tiempo. Lo anterior se logra mediante los convertidores analógicos digital o ADC por sus siglas en inglés (Analog-to-Digital Converter). Matemáticamente una señal se describe como una función de una o más variables independiente, por ejemplo la Ecuación 2, la cual varía linealmente con la variable independiente tiempo ( $t$ ). Mientras que la Ecuación 3 define una señal con dos variables independientes  $x$  e  $y$  que pueden representar coordenadas espaciales en un plano (Proakis y Manolakis, 2006).

$$S_1(t) = 4t \quad (2)$$

$$S(x, y) = 3x + 2xy + 10y^2 \quad (3)$$

Las señales utilizadas en los procesamientos digitales en la mayoría de los casos prácticos provienen de sensores que adquieren señales de fenómenos del mundo real como: vibraciones sísmicas, imágenes, ondas de sonido, entre otras. El procesado de estas señales tiene diferentes objetivos, como lo pueden ser: el reconocimiento de patrones; la compresión, almacenamiento y transferencia de datos; así como transformadas de tiempo-frecuencia como puede ser transformada discreta de fourier y transformada discreta wavelet, entre otras.

### II.6.1 Transformada Wavelet

La transformada Wavelet es una herramienta matemática para transformar señales a tiempo-frecuencia, esta herramienta básicamente usa una convolución entre la señal que se analiza  $x(t)$  y una función llamada ondoleta o wavelet en inglés, representada por  $\Psi(t)$  como se describe en la Ecuación 4. Donde  $W_{C\Psi}$  es el vector de coeficiente wavelet.

$$Wc_{\Psi} = \int_{-\infty}^{\infty} x(t)\overline{\Psi(t)}dt \quad (4)$$

Existe una versión discreta de la transformada wavelet (WDT por sus siglas en inglés de Wavelet Discrete Transform), la cual es reportada y descrita por la Ecuación 5, donde  $n$  es el índice de tiempo discreto, por lo tanto  $x(n)$  es la señal de entrada en tiempo discreto, mientras que  $h(n)$  es la función wavelet en tiempo discreto,  $N$  es el total de muestras de la señal de entrada,  $j$  es un escalado en tiempo,  $k$  es el índice del desplazamiento de la función wavelet a través de la señal de entrada  $x(n)$ . La transformada discreta wavelet está basada en el algoritmo de Mallat, el cual consiste básicamente una serie de filtros FIR, por sus siglas en inglés de “respuesta finita al impulso”, conectados en cascada para lograr una separación de la señal en diferentes niveles, lo que corresponde a una separación en componentes de altas y bajas frecuencias, por la aplicación en paralelo de filtros pasa-bajas y filtros pasa-altas. Llamados aproximación ( $A$ ) y detalle ( $D$ ) respectivamente. Lo anteriormente mencionado se aplica determinado número de veces, con el objetivo de generar diferentes niveles de descomposición de la señal en altas y bajas frecuencias. (Millan-Almaraz *et al.*, 2011).

$$Wc_{j,k} = \sum_N x(n)\overline{h_{j,k}(n)} \quad (5)$$

## II.6.2 Síntesis digital de señales

Surgida en 1977, la síntesis digital de señales o DDS por sus siglas en inglés de Digital Direct Synthesis, consiste en un sintetizador digital utilizado para generar señales arbitrarias sintéticas. En la actualidad se pueden conseguir circuitos integrados con implementaciones que generan señales arriba de los mega Hertz. Éstas implementaciones son generadora de formas de onda periódicas discretas en tiempo, como señales senoidales, dientes de sierra, triangulares y cuadradas, por mencionar algunos ejemplos. La implementación de esta técnica usualmente es dividida en dos partes: Generador de fase (acumulador) y otra parte de conversión de fase a forma de onda. La implementación de la síntesis digital de señales se basa en la aritmética de enteros. El tamaño del acumulador o el ancho de la palabra digital es  $N$  asumiendo que el periodo de la señal es de  $2\pi$ , y su máxima fase es representada por el número entero de  $2^N$ . Durante cada lapso del tiempo de muestreo o  $T_o$  se incrementa  $\Delta_{ACC}$ , siendo la relación del incremento de fase del acumulador para tener la frecuencia de salida deseada ( $F_o$ ). Por lo tanto para llegar a la

máxima fase de  $2^N$  tomaría  $T_o$  o  $1/F_o$ , siendo  $F_o$  en términos de frecuencia lo expresado en la Ecuación 6.

$$F_o(\Delta_{ACC}) = \frac{F_s}{2^N} \Delta_{ACC} \quad (6)$$

Donde el incremento de fase  $\Delta_{ACC}$  ronda cerca de el entero dado por la Ecuación 7.

$$\Delta_{ACC} = [F_o \frac{2^N}{F_s} + 0.5] \quad (7)$$

Para fines prácticos, la implementación de una síntesis digital de señales, consta de una serie de tabla de valores digitales, la cual en la bibliografía es mencionada como LUT, siendo las siglas en ingles de Look Up Table. En ella se encuentran una serie de datos digitales que coinciden con valores que se podrían otorgar a un convertidor digital-analógico para su conversión a señal analógica. Esto es que si se necesitara implementar una señal dientes de sierra y se contara con un convertidor de 9 bits de resolución, se tendrían 512 valores diferentes para trabajar. Por lo tanto una LUT constaría de 512 valores digitales en incremento del 0 al 511, pasando después de nuevo al estado inicial o valor 0. La implemetación puede llevarse a cabo en una memoria RAM con valores pre establecidos, incluso con la ayuda de herramientas potentes como Matlab, la cual es capaz de generar a través de programación, archivos con implementaciones de memorias en el lenguaje de descripción de hardware VHDL. Dando como resultado una herramienta de generación de señales a través de funciones o datos previamente guardados en una computadora.

# CAPÍTULO 3:

## III METODOLOGÍA

Dentro de la metodología se podrá observar el proceso para el diseño del fluorómetro, así como la selección e instrumentación de los dispositivos electrónicos. Esta sección se dividirá en dos partes principales, donde encontraremos la etapa de la fuente de excitación para posteriormente pasar a la modulación de la misma a través la técnica de Síntesis Digital de Señales implementada en lógica reconfigurable FPGA. Posteriormente, se indagará en la selección del dispositivo fotosensible con su respectiva instrumentación y acondicionamiento de señal, para la obtención de la respuesta de la fluorescencia de clorofila, así como la puesta en en la fase experimental y la validación del prototipo de medición.

### III.1 Diseño del fluorómetro

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes aplicaciones de la fluorescencia de clorofila, algunas enfocada a mediciones de plantas de manera individual (Bulgarea y Boukadoum, 2001; Hu *et al.*, 2013; Lichtenthaler *et al.*, 2005a), otras a grandes extensiones de cultivo (Middleton *et al.*, 2006), mientras que otras miden la fluorescencia de microorganismos como cyanobacterias . Por lo anterior, dependiendo de cual sea la aplicación del fluorómetro tiene cambios significativos en su diseño y en sus componentes. Nuestra aplicación es para desarrollar mediciones en campo, para una hoja de planta a la vez. Por lo tanto se desarrolló un fluorómetro con la fuente de excitación activa, a través de tecnología LED, mientras que para sensar la fluorescencia se utilizó fotodiodos como se explicará posteriormente.

En la Figura III.1 se puede observar el diagrama general a bloques del fluorómetro de fluorescencia de clorofila, en el cual su control está implementado en la plataforma FPGA, para este caso se utilizó en específico una tarjeta de educación y desarrollo Altera DE1, la cual cuenta con un chip Cyclone II EP2C20F484C7N. En el FPGA, como se observa en la figura inicialmente. Se cuenta con un bloque principal de interacción con el usuario que realiza las mediciones, mientras que por otro lado tiene la conexión con la PC a través de una comunicación RS232 para enviar las señales con la medición y ser analizados. El aporte principal de este proyecto es el módulo de Síntesis Digital de Señales, el cual consiste en una memoria tipo RAM

(Random Access Memry), por sus siglas en inglés, la cual tiene grabada una señal sintética previamente cargada a través de una función ejecutada en Matlab. Mientras que aunado a lo anterior, se aprecia otra RAM para el almacenamiento de la respuesta de fluorescencia de la clorofila a través del sistema de adquisición de datos que está leyendo la señal sensada por los fotodiodos.

En color verde se encuentra representado un módulo DAC , por sus siglas en inglés (Convertidor Analógico-Digital) , el cual se le proporciona la señal digital sintética y la convierte en analógica para pasar a través de un Amplificador de voltaje y otro de corriente. Y así finalmente, alimentar la fuente de luz con la señal modulada y excitar la clorofila de la muestra fotosintética y provocar su respuesta de fluorescencia de clorofila . Para adquirir la respuesta antes mencionada, se cuenta con la etapa de los fotodiodos, estos dos dispositivos fotosensibles son transductores encargados de convertir la señal de fluorescencia y la señal de excitación otorgada por los LEDs en señales eléctricas. Posteriormente, pasar por otra etapa de acondicionamiento de señal y ser adquiridas por un módulo DAS, llamado así por sus siglas en inglés de Sistema de Adquisición de Datos, el cual se encarga de convertir las señales eléctricas analógicas proporcionada por los fotodiodos a señales digital, para su posterior almacenado en otro módulo RAM en el FPGA. Es importante mencionar que la parte amarilla de la imagen representa lo que es el acondicionamiento de señal, tanto como las amplificaciones de la señal sintética para alcanzar los valores de voltaje y corriente que necesita la fuente de excitación, como el filtrado y atenuación para no sensar ruido que pueda mandar el fotodiodo.

Como se observa también en la misma figura, se cuenta con una cámara de aislamiento, donde se encuentran montados los fotodiodos anteriormente mencionados, uno para la medición de la fluorescencia de clorofila y otro para sensar la señal emitida por la fuente lumínica. La cámara de aislamiento está diseñada para evitar la luz ambiental que generaría ruido, asimismo para realizar mediciones en adaptación a la obscuridad, con la que podemos analizar algunos detalles fisiológicos que no podrían ser tomados en cuenta si esta estuviera sometida a la luz ambiental. Se cuentan con dos filtros ópticos, uno en la parte de la fuente lumínica y otro en los fotodiodos, esos son utilizados principalmente para evitar que se presente un traslape entre la señal de fluorescencia de respuesta de la planta y la señal lumínica de los LEDs en el módulo del excitador de clorofila.

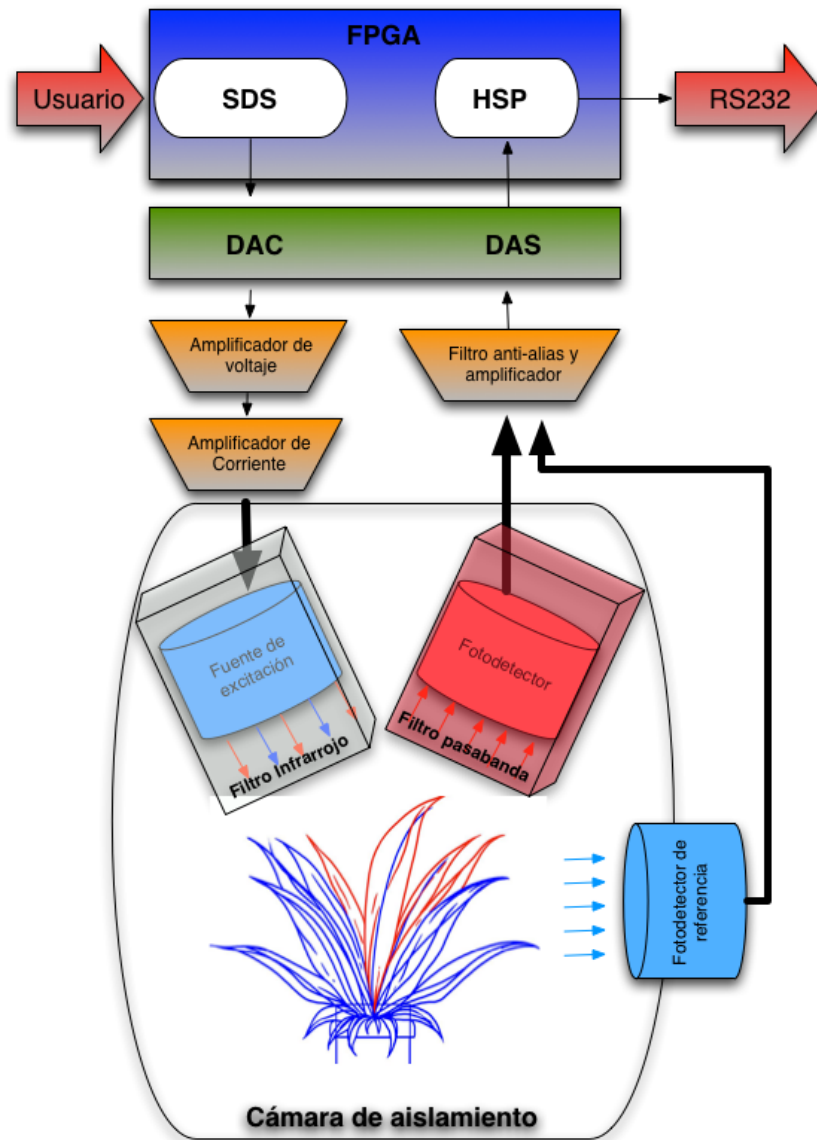


Figura III.1 Diagrama a bloques del fluorímetro de clorofila.

### III.2 Excitador de clorofila

El proceso de selección del dispositivo emisor de luz y el diseño de su control fue crítico para el desarrollo de este trabajo, debido a que el principal aporte científico y tecnológico se da a través de esta fase. Para el desarrollo y elección del dispositivo lumínico se tomó en cuenta principalmente la absorción de luz de la clorofila mostrada anteriormente en la Figura II.1, en la cual nos menciona que de acuerdo al espectro electromagnético se necesita de un dispositivo lumínico aproximadamente dentro del rango del azul y/o rojo.

Para abordar la zona azul de absorción se utilizaron dos LEDs de alta intensidad de color azul (LZ400B200) de la marca LED ENGIN. Las condiciones de operación eléctrica están en 14V a 700mA mientras que su emisión de luz se encuentra centrado alrededor de los 460 nm como se observa en la Figura III.2. Esta región está dentro del área fotosintéticamente activa (PAR), con la cual se puede lograr la excitación de la clorofila para obtener una respuesta de fluorescencia.

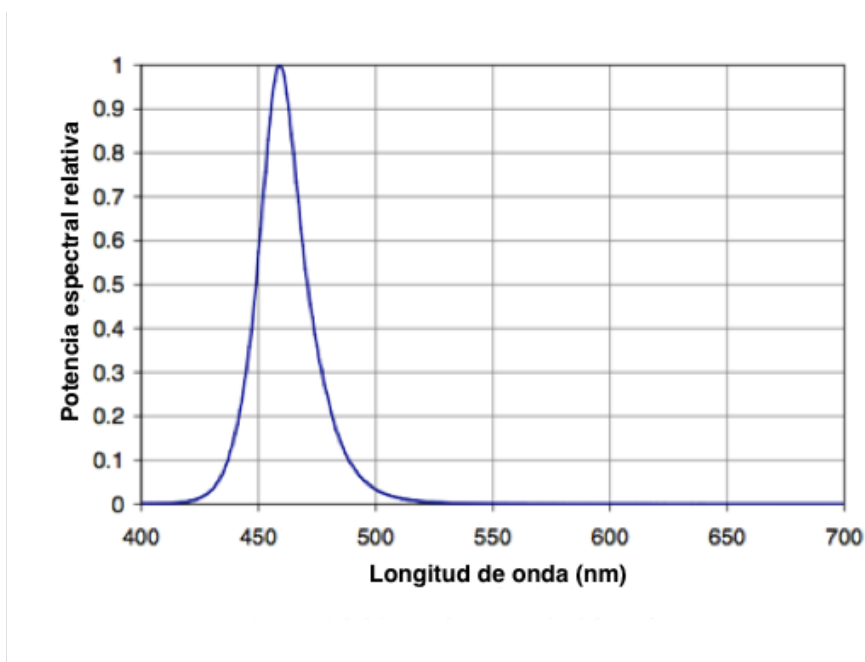


Figura III.2 Distribución de potencia espectral relativa del LED.

A pesar de la información proporcionada por la hoja de datos, se es bien sabido que no siempre cuentan con una respuesta ideal, en ocasiones propiciadas por el mismo ambiente de operación que no es el óptimo o por cuestiones físicas del mismo dispositivo lumínico, como los

picos de luz generados en múltiplos de las frecuencias de operación llamados armónicos. Para evitar este tipo de emisiones no deseadas, se implementó junto con la fuente emisora de luz un filtro óptico pasa-banda de 335 a 610 nm, rechazando cualquiera emisión que afecte la fluorescencia de la clorofila dentro del rojo e infrarrojo.

Los dispositivos LEDs al ser de alta intensidad tienden a tener pérdidas a través de calor, como se ha mencionado anteriormente, realizar una medición sin generar estrés es una de las ventajas que tiene la fluorescencia de clorofila, para seguir conservando estas condiciones de medición se montó una lámina de cristal entre los LEDs y el filtro óptico pasa-banda. Con el objetivo de evitar inducir calor a la muestra que esté dentro de la cámara de aislamiento y cuidar las condiciones de confort de la misma.

### **III.2.1 Instrumentación de la fuente lumínica modulada**

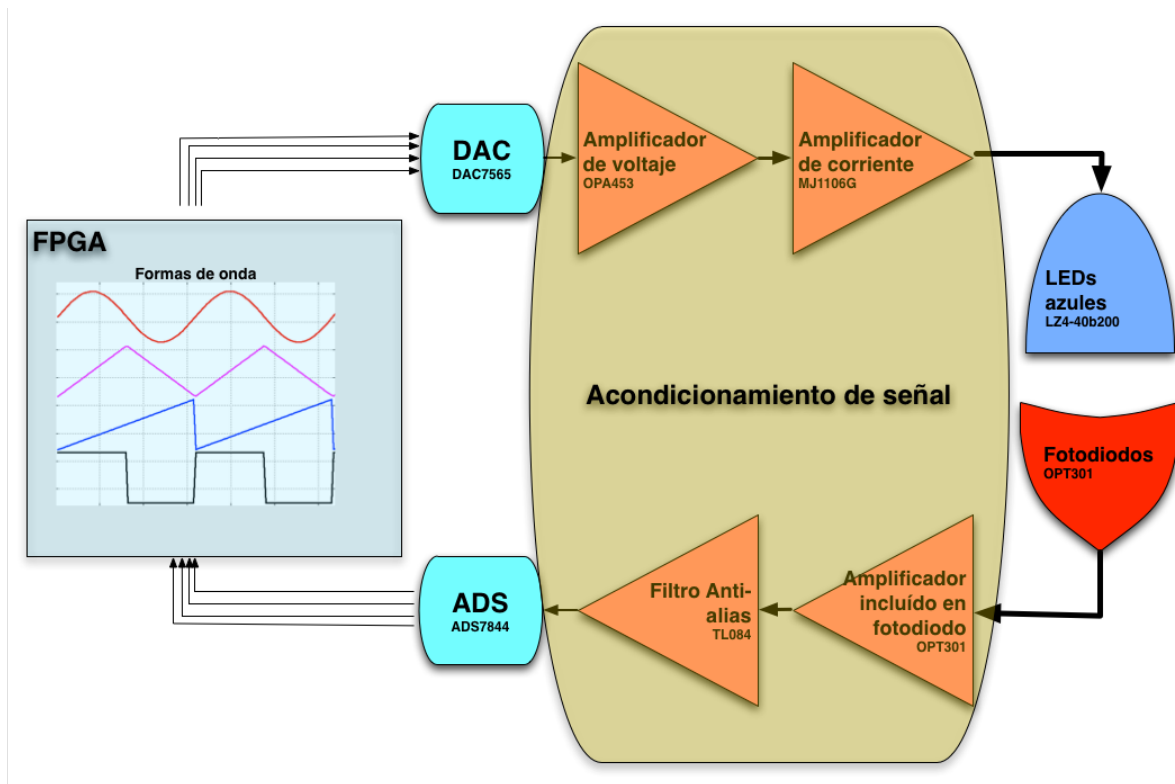
Para la modulación de la fuente de excitación, el dispositivo inmediato a la tarjeta FPGA es el convertidor Analógico-Digital (DAC7565). El cual es un convertidor de 12 bits y cuenta con cuatro canales, encargado de convertir la señal implementada en el FPGA a través de la Síntesis Digital de Señales. Entregando una señal que está acotada de 0 a 2.5 Volts con una baja corriente para la aplicación deseada, alrededor de 20 mA como máximo.

Teniendo en cuenta las especificaciones de la señal analógica antes mencionadas, se pasa al acondicionamiento de señal para trabajar en los valores nominales de la fuente lumínica. Para el caso específico de los dos LEDs azules los cuales trabajan con 700 mA a 14 Volts en individual. Al ser dos los que están implementados, será necesario generar 1400 mA a 14 Volts. Es necesario recordar que se necesita una fuente regulada con estas características la cual básicamente está constituida por un amplificador de voltaje y un amplificador de corriente modulados mediante el DAC del fluorómetro.

La primera etapa se encarga de amplificar el voltaje, para esta finalidad se utilizó un OPA453, como se muestra en la Figura III.3 el cual cuenta con un encapsulado del tipo 7DDPAK y consta de un amplificador operacional de alto voltaje, teniendo la capacidad de ser alimentado en un rango de  $\pm 10V$  a  $\pm 40$  Volts con una corriente de 50 mA. Para alcanzar el valor nominal de voltaje se necesitó construir un amplificador en configuración no inversor con factor

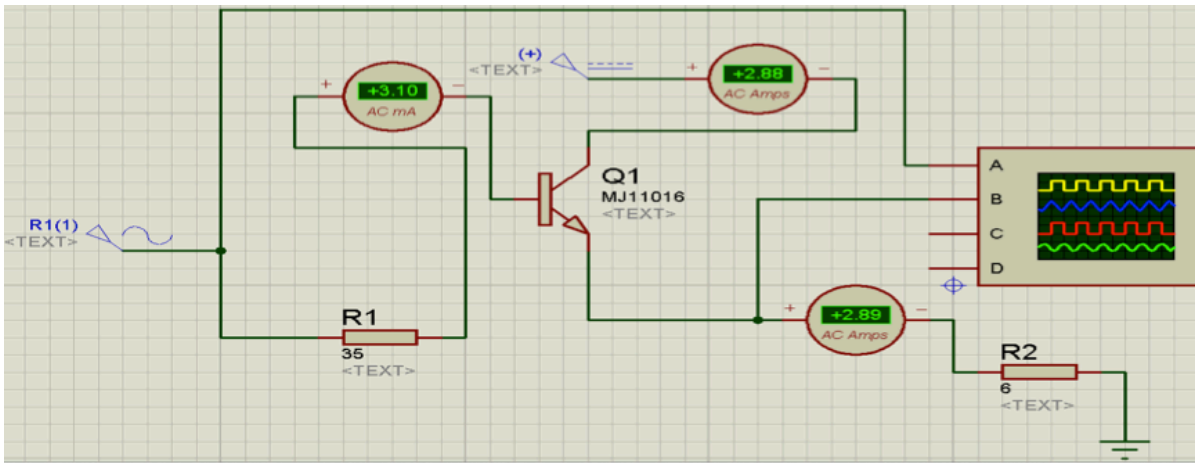


de amplificación de 5.6 para alcanzar los 14 V con los que trabajan los LEDs, Sin embargo, en el diseño se incluyó en serie una resistencia variable para poder calibrarlo en intensidad lumínica.



**Figura III.3 Diagrama a bloques generación, acondicionamiento, y adquisición de señal.**

Posterior de la amplificación de voltaje se necesita de una etapa de amplificación de corriente con un mínimo de modificación en la tensión. Con el objetivo de cumplir con lo anteriormente mencionado, se diseñó un amplificador en modo colector común, cumpliendo con las características de modificar lo menos posible el voltaje. Se utilizó un amplificador Darlington MJ11032. Debido a la alta demanda de corriente, para este diseño no se necesitó de resistencia externa en el emisor, simplemente con la impedancia proporcionada por los LEDs fue suficiente para tener una correcta amplificación de corriente como se muestra en la Figura III.4.



#### III.4 Diseño del amplificador de corriente utilizando MJ1032.

Finalmente se cuenta con una fuente lumínica capaz de generar una señal modulada, gracias a la implementación de una serie de datos digitales proporcionados al FPGA a través de un programa en Matlab. Este programa tiene la capacidad de generar mediante una función matemática, un archivo en lenguaje VHDL describiendo el hardware necesario para la implementación de la señal en un módulo RAM, dando la flexibilidad de poder modificar la modulación en forma e incluso en intensidad de una manera fácil, ligado a la serie de datos binarios que se proporcionan al dispositivo DAC

### III.3 Medidor de fluorescencia

Posterior al diseño del excitador de clorofila, es necesario sensar la respuesta de fluorescencia y también el de la misma fuente de excitación. De nuevo basándonos en la figura Figura II.1, para adquirir la fluorescencia se buscó sensar alrededor de los de los cerca de los 685 nm o hasta los 730 nm de acuerdo a lo revisado en la bibliografía (Pandey *et al.*, 2012; Zarco-Tejada *et al.*, 2002). Por lo tanto como dispositivo medular del medidor de fluorescencia se seleccionó al fotodiodo OPT301 de Texas Instruments, el cual es un dispositivo fotosensible que incorpora un amplificador de transimpedancia dentro del encapsulado del tipo TO-99 de 8 pines, presentando una notable sensibilidad dentro del rojo y sobre todo el infra-rojo, apegiándose a las necesidades de esta aplicación como se observa en la Figura III.5

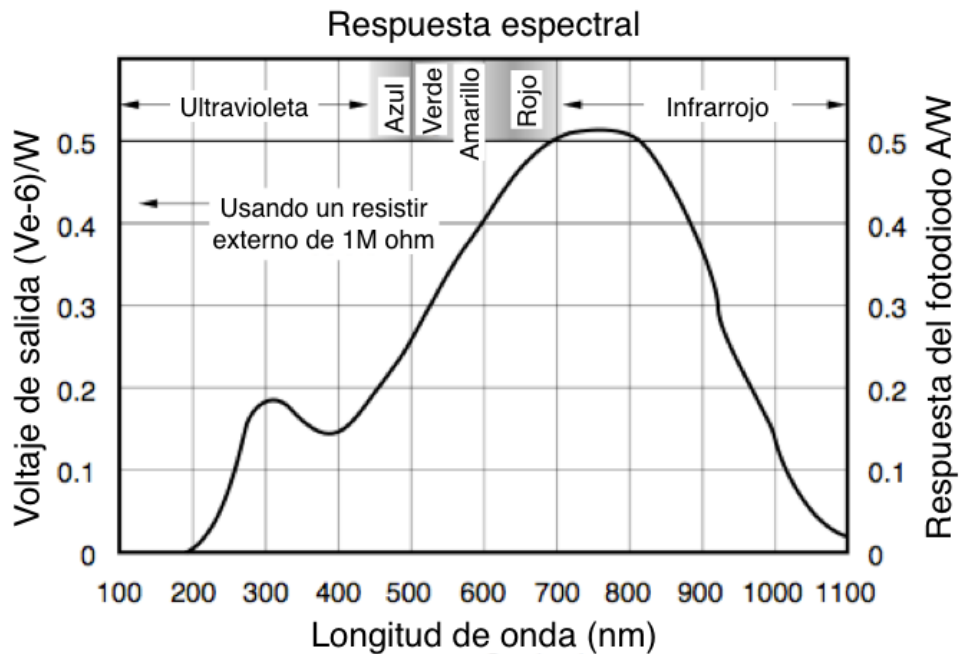


Figura III.5 Respuesta espectral de fotodiodo opa453 de Texas Instruments.

Tomando en cuenta que el fotodetector tiene un amplio rango de respuesta, abarcando casi la totalidad del rango visible humano. Se puede entender que los LEDs utilizados para la excitación de la clorofila generarían una interferencia con al momento de adquirir la fluorescencia, que como anteriormente se mencionó, es notablemente más débil. Por lo anterior fue necesario la utilización de filtros ópticos y poder separar adecuadamente la señal de excitación de la señal de fluorescencia de la planta. Todo el montaje de los dispositivos ópticos, tanto como filtros LEDs y fotodiodos, fueron realizados dentro de una cámara de aislamiento de una hoja como se muestra en la Figura III.1 y más detalladamente en la Figura III.6. Se observa como todo lo que se ha montado en la cámara de aislamiento, en la parte de arriba se tiene el disipador de calor de los LEDs, debido que al ser de alta intensidad tienden a calentarse y necesitan de un sistema de disipación de calor para evitar que se dañen. Posteriormente a los LEDs tenemos dos filtros, el primero es una placa de cristal común encargado simplemente de aislar del calor de los LEDs, evitando así cualquier daño por calor al filtro óptico que está enseguida, y sobre todo para proteger la muestra que está bajo medición que pueda estar expuesta a estrés térmico. Seguido del filtro térmico se cuenta con un filtro pasa-banda. El principal

objetvo de este filtro es dejar pasar sin problema alguno la la emisión azul del LED, sin embargo se es bien sabido que pueden llegar a tener armónicos que nos podrían afectar las mediciones, así como emisión dentro del infrarrojo que se puede traslapar con la medición de fluorescencia de clorofila.

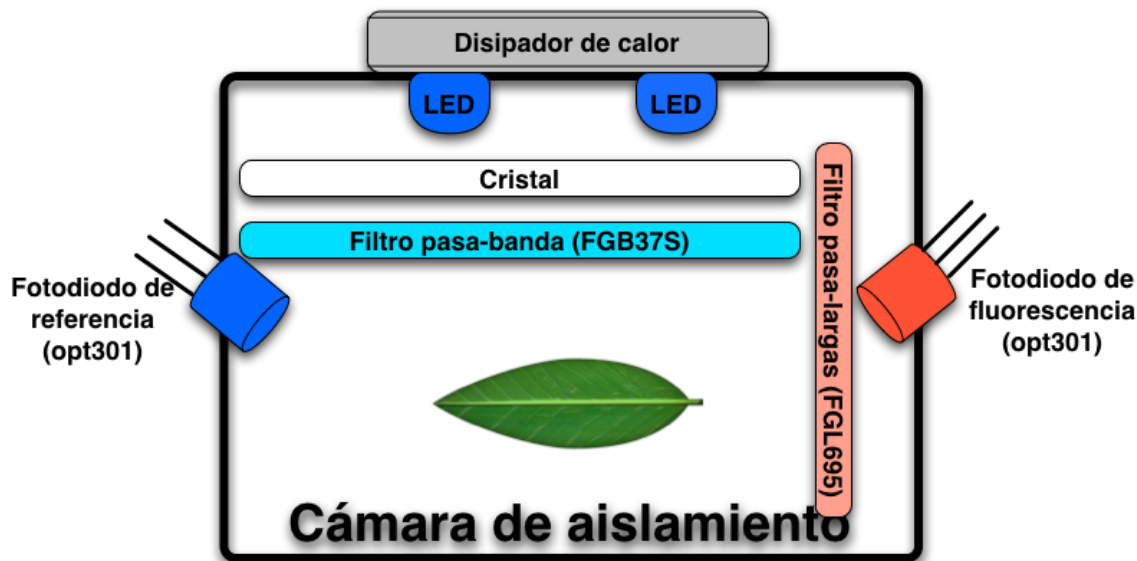


Figura III.6 Diseño del amplificador de corriente utilizando MJ11032.

Después de depurar la señal de excitación de los LEDs, se necesitó poner un filtro de protección para el fotodiodo de fluorescencia, llamado pasa-largas de 695 nm, el cual solamente permite pasar un poco del espectro del rojo y todo el infrarrojo, suprimiendo a la perfección la radiación azul emitida por la fuente de excitación. Se realizó una prueba sin muestra fotosintética, sólo con una superficie altamente reflectiva apuntando hacia el fotodiodo con el filtro óptico, y así probar que la radiación que el fotodiodo adquiriría fuera mínima. Por el otro lado de la cámara de aislamiento se cuenta con otro fotodiodo exactamente igual al encargado de sensar la fluorescencia de clorofila, sin embargo este tiene el objetivo de adquirir la señal de lumínica de los LEDs modulados, por lo cual no cuenta con un filtro óptico. A pesar de tener dos fotodiodos iguales, estos están configurados con diferentes ganancias en los amplificadores internos de transimpedancia. Debido a que sensan diferentes intensidades de luz, el fotodiodo de fluorescencia de clorofila está configurado de una manera más sensible, mientras que el de referencia tiene una amplificación menor, debido a la gran cantidad de luz que emite el LED azul. El fotodiodo de referencia no cuenta con un filtro óptico, únicamente con la baja

amplificación no es afectado por la emisión de fluorescencia de clorofila por la característica de que ésta es muy débil en comparación con la emisión de los LEDs.

Posteriormente a la puesta en marcha de la fase óptica del sistema, se pasó a la etapa de validación, en la cual se utilizó un espectrómetro Acton Series SP 200i (Princeton Instruments), con el cual se obtuvo la respuesta real de los dispositivos ópticos. Primeramente se tomaron mediciones de los LEDs. En los cuales se mostraron que contenían armónicos en el espectro de la fluorescencia de la clorofila, posteriormente se puso a prueba el filtro óptico como se muestra en la parte azul de la Figura III.7. Se puede observar que en esta fase de excitación se cuenta con una línea punteada la cual es la respuesta del filtro óptico pasa-banda, el cual permite solamente el paso de la emisión azul del LED, suprimiendo los armónicos en el infrarrojo previamente mencionados. En la fase de adquisición, de color rojo tenemos la respuesta de la fluorescencia de clorofila, mientras que la línea de color verde punteada tenemos la respuesta del filtro pasalargas, encargado de suprimir la mayor parte de la fuente de luz azul y sólo permitir la adquisición de la fluorescencia. Posteriormente a que se cuenta con el correcto sensado de las señales y la correcta modulación de la fuente de excitación, a través de la parte analógica, se puede pasar al control de la parte digital del sistema implementado en lógica programable.

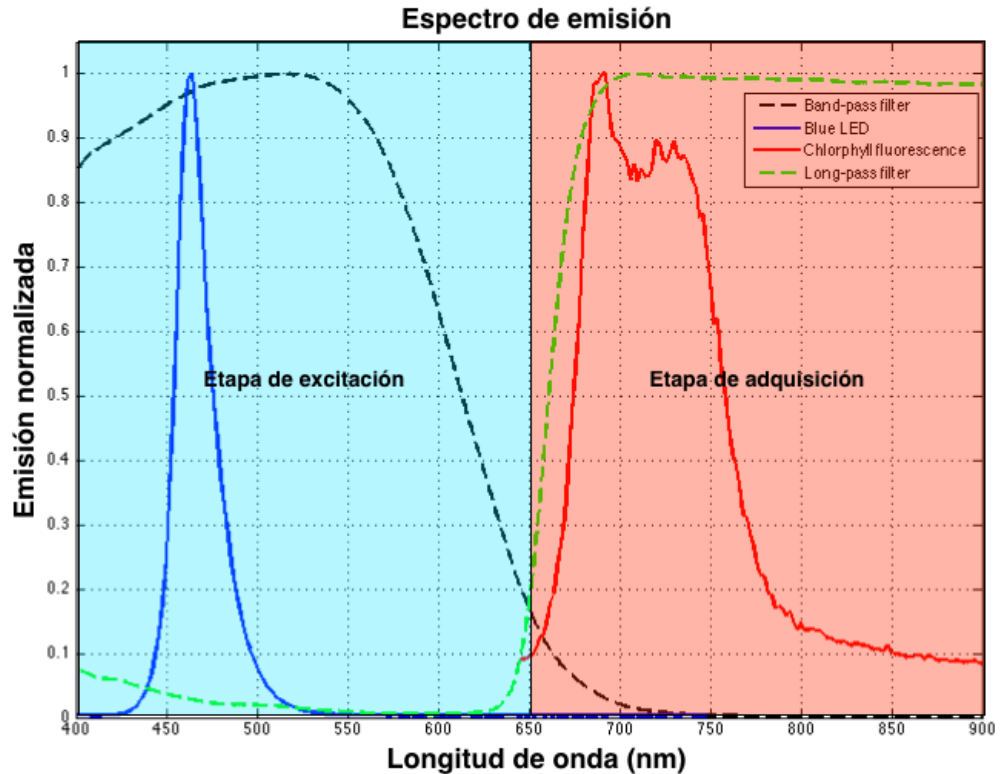


Figura III.7 Emisiones de la fuente de excitación y la fluorescencia de clorofila.

### III.4 Logica programable del fluorómetro

La parte digital del fluorómetro se implementó en la tecnología FPGA, específicamente en una tarjeta de educación y desarrollo ALTERA DE1 que cuenta con un chip FPGA Cyclone II EP2C20F484C7N chip. La implementación en FPGA se dio con la finalidad de aprovechar la ventaja que otorga el paralelismo y así poder controlar varios procesos a la vez; por ejemplo: Convertidores Analógicos-Digital y Digital-Analógicos, memorias, Síntesis Digital de Señales, transmisión de señales y control en general del fluorómetro. Para esta sección se revisará la parte digital del fluorómetro dividada en: interfaz con el usuario, implementación de la síntesis digital de señales, almacenamiento de la señal de fluorescencia y transmisión.

Primeramente se abordará el contacto directo con el usuario o su interfaz. Él podrá manejar dos tipos de medición. La primera medición es la denominada adaptada a la obscuridad o dark-adapted, mencionada en literatura en inglés y está controlada por la entrada ST\_CHIRP,

mostrado en la Figura III.8. La medición antes mencionada consiste en mantener durante 5 minutos en periodo de obscuridad a la muestra fotosintética que se encuentra dentro de la cámara de aislamiento. Posteriormente, al dejar la planta en reposo el usuario puede seleccionar esta opción e inmediatamente exponer la muestra fotosintética a la señal sintética previamente implementada en el sistema, adquirir su respuesta y finalmente ser almacenada. Otra opción con la que cuenta el operador es hacer una prueba con la muestra saturada, siendo ésta controlada por la señal ST\_SS\_CHIRP. Esta medición consta en mantener la planta bajo una luz intensa y continua, lo cual significa mantener la fuente sólo en estado de encendido, sin modular. Posteriormente a que termina la fase de saturación, inmediatamente comienza una medición con la fuente modulada por medio de la señal sintética para el posterior almacenamiento de la respuesta de la fluorescencia de la clorofila. Finalmente se cuenta con la opción de envío de los datos almacenados por el fluorómetro, controlado por la señal ST\_TRMS. Este conjunto de datos se envían a través de controlador implementado en el FPGA para el puerto serial. Siendo capaz de recibir los datos en una computadora por ejemplo, y hacer un despliegue de los mismos así como de su procesado.

En el diagrama a bloques de la implementación en FPGA, posteriormente a los controles para seleccionar el tipo de medición, contamos con un módulo llamado FSM (máquina de estados finitos, por sus siglas en inglés) encargado de la forma de onda. A la salida de esta máquina de estados se cuenta con tres señales, La primer señal llamada E\_CHIRP viene de Enable\_CHIRP debido a que se implementaron diferentes formas de onda con un barrido en su frecuencia, simulando una señal CHIRP. Esta señal es la encargada de habilitar el módulo del barrido de frecuencia el cual está conectado directamente al módulo RAM donde se almacenó previamente la señal sintética generada en Matlab a través de una función, como puede ser: seno, triangular, cuadrada, dientes de sierra, etc. La salida de la memoria donde se encuentra implementada la señal, va a la entrada de un multiplexor el cual su selección está controlado por la señal ENB\_SS que también es una salida de la máquina de estados finitos previamente mencionada, está se encarga de cambiar la selección entre la señal sintética o un valor fijo binario, otorgado por OFFSET\_FF, que se utiliza para representar una intensidad del LED de excitación para las mediciones en saturación al activar esta opción mediante la señal ST\_SS\_CHIRP previamente mencionada. La última señal de salida de la máquina de estados de la forma de onda, tenemos a CHIRP\_LOAD, esta señal es la encargada de iniciar un contador de

almacenamiento, el cual está sincronizado con el envío de la señal sintética y así almacenar la señal sintética de excitación y la señal de respuesta de fluorescencia de clorofila. Este almacenamiento de datos se adquiere a través del ADS, el cual se encuentra adquiriendo ambas señales por medio del controlador del mismo. El motivo de almacenar de nuevo la señal de excitación o señal que envía el LED es debido a que se busca tener una correlación precisa entre las dos señales, y se es bien sabido que se pueden dar deformaciones de la misma a través del LED, así como de otro tipo de interferencias, es por eso que las dos señales se adquieren a través de dos fotodiodos exactamente iguales para minimizar el error lo mayor posible, tanto en fase como en forma.

Finalmente, se cuenta con la parte de la transmisión de datos, para realizar esta operación se tiene en la parte de abajo de la Figura III.8 una máquina de estados finita que se encarga de controlar el almacenamiento y la transmisión de datos. La máquina de control de transmisión cuenta con una señal de entrada que la activa el operador como se menciona al inicio de esta descripción. Mientras que a la salida tiene dos señales de control, la primera es ENB\_TRSM, que se encarga de habilitar el contador de transmisión, el cual tiene como objetivo hacer un barrido en la dirección de las localidades de la memoria de transmisión para sacar las señales almacenadas. Por otro lado se tiene la señal de TRMS, encargada de controlar al demultiplexor que se encarga de seleccionar entre el contador de almacenamiento y el contador de transmisión. Por otro lado, la misma señal de TRMS está conectada a un multiplexor bidireccional para seleccionar la dirección del flujo de datos; es decir, si los datos van al controlador de ADS para ser adquiridos o para el caso de la transmisión, para seleccionar el controlador de UART.



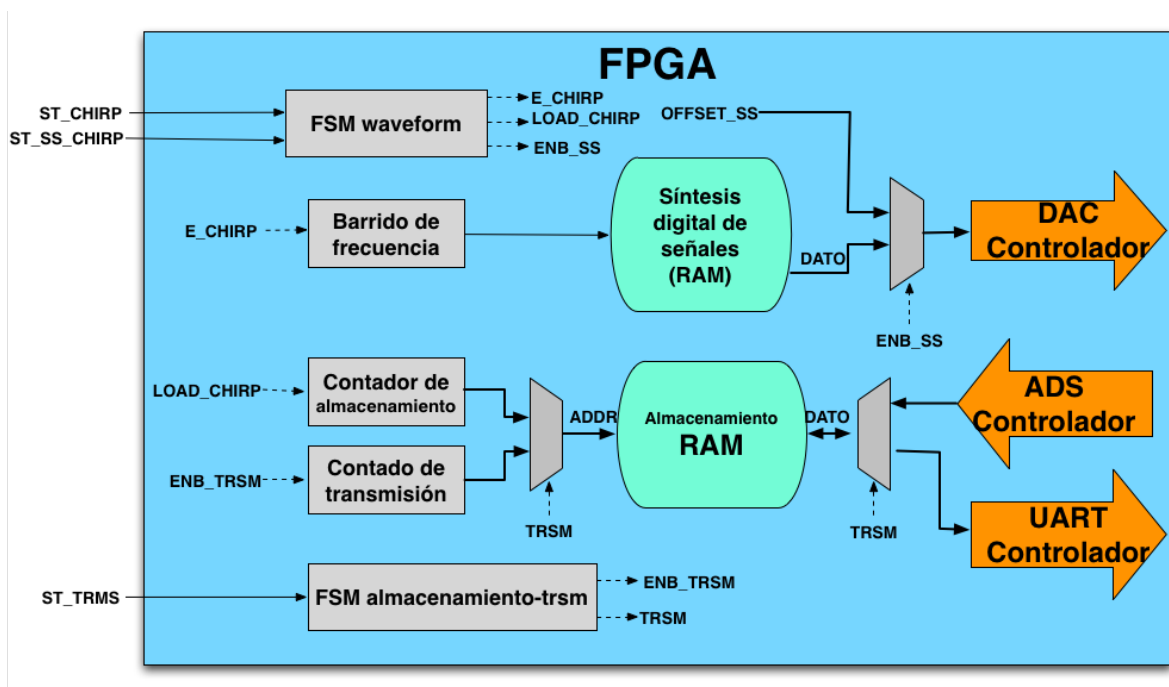


Figura III.8 Diagrama a bloques de la implementación del fluorómetro en FPGA.

Posteriormente a la integración de la parte óptica, digital y analógica del fluorómetro, queda el montaje del experimento. La mayor parte de la electrónica se ingresó en un estuche rígido para otorgarle robustez debido a la naturaleza de sus mediciones, sobre todo para las pruebas en campo o invernadero. Por otra parte, la mayoría del arreglo óptico como se mencionó anteriormente va sobre la cámara de aislamiento que se diseñó, mostrada en la Figura III.9. Como se puede observar, en la parte de arriba se aprecia el sistema de enfriamiento de los dos LEDs azules utilizados para la excitación de la muestra. Posterior a los dos LEDs de alta intensidad se cuenta con la placa de cristal que se utiliza para proteger del calor a la muestra y al filtro pasa-banda que se encuentra posterior a ella. También se puede observar ambos fotodiodos. El encargado de adquirir la clorofila está montado en la parte superior en un acrílico el cual cuenta con una montura para poner un el filtro pasa-altas mencionado anteriormente para solamente adquirir las emisiones rojas e infrarrojas emitidas por la fluorescencia de clorofila. Por otro lado en el costado se cuenta con una abertura en la que se montó el fotodiodo de referencia, encargado de adquirir la luz de la fuente de excitación. Éste se encuentra colocado en la parte del costado para evitar que la luz ingrese directamente y evitar que se dañe por la alta intensidad de emisión que generan ambos LEDs. La cámara de aislamiento se maquinó en aluminio con el objetivo de hacerla durable y robusta, como se muestra más detalladamente en la Figura III.10,

se le adaptaron unas almohadillas en las orillas donde entran en contacto con la muestra para evitar causar un daño considerable a la hoja al momento de la experimentación en campo.

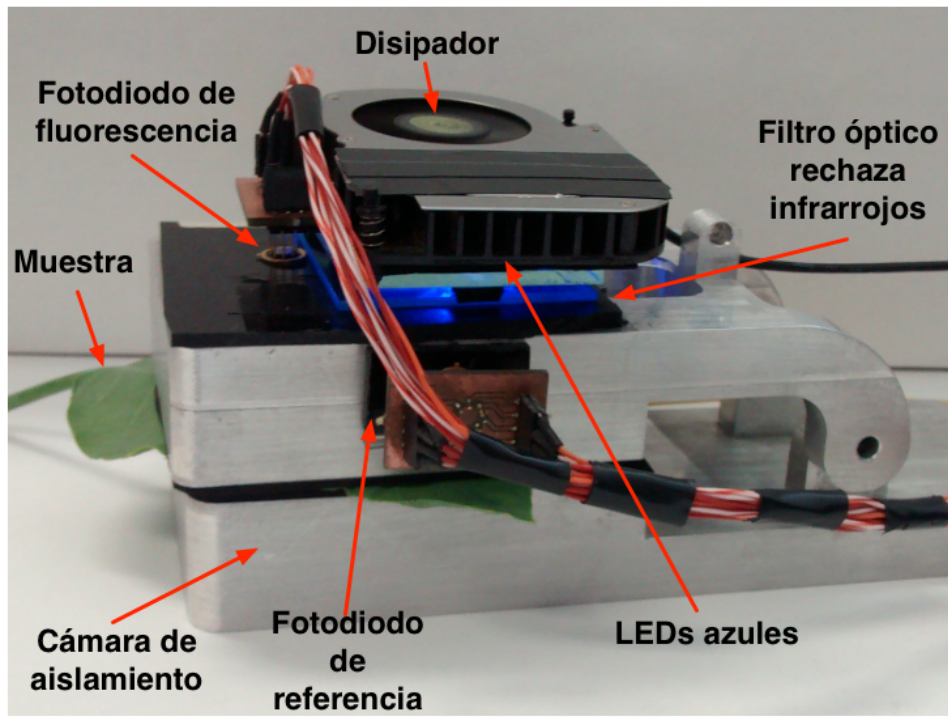
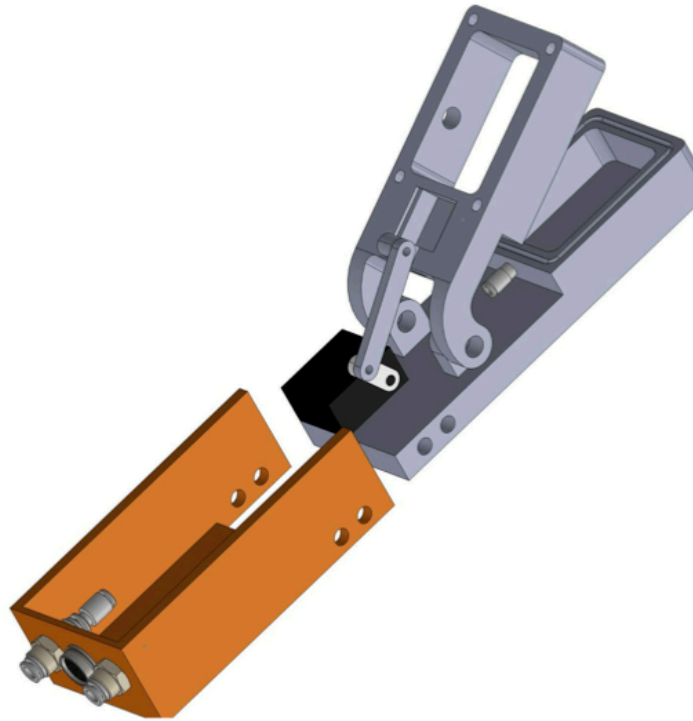


Figura III.9 Puesta de arreglos ópticos en la cámara de aislamiento.



**Figura III.10** Diseño de la cámara de aislamiento del fluorómetro.

# CAPÍTULO 4:

## IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se analizarán cuidadosamente los resultados obtenidos a través del fluorómetro. La primera etapa constará en realizar pruebas para su validación, debido a que es un sistema de medición diseñado desde cero, en su parte electrónica como en su metodología de medición, se tiene que probar y validar para saber que se tienen una medición confiable y que nos otorga diferentes beneficios e información acerca de la muestra fotosintética que otros fluorómetros no otorga.

### IV.1 Validación estadística del fluorómetro de clorofila

La fase de validación se divide principalmente en tres etapas experimentales: Medición adaptada a la obscuridad, Saturada y el transitorio inicial de la medición adaptada a la obscuridad o transitorio rápido (Guo y Tan, 2013), e incluso se tomaron algunas mediciones sin muestra fotosintética o vacío como referencia. Todas las fases de medición se trabajaron con 4 diferentes formas de onda con un barrido de frecuencia de 23 a 500 Hz. Seno, triangular, dientes de sierra y señal cuadrada fueron implementadas para ser utilizadas en la modulación de la fuente de excitación, como se muestra en la Figura IV.1. Para la señal cuadrada es importante aclarar la diferencia entre un control de la fuente de excitación ON-OFF y una modulación de este tipo, debido a que puede haber ciertas confuciones al ser las dos mediciones bastantes similares en su forma de señal. Sin embargo, la principal característica que tiene una modulación de este tipo es que incluso en su estado “bajo”, lo análogo al estado de OFF en el control ON-OFF, este también mantiene una excitación de la clorofila, simplemente es una intensidad menor a la del estado “alto”, por lo cual en los dos estados de “alto y bajo” la clorofila se encuentra en excitada o fluoresciendo. Mientras que por otra parte, en el estado “OFF” es un apagado total de la fuente de excitación lumínica.

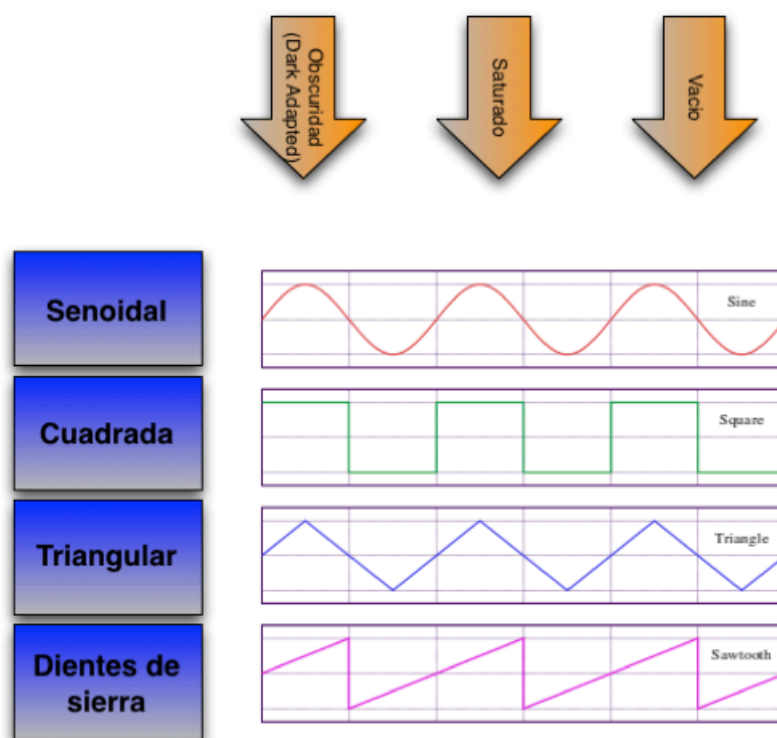


Figura IV.1 Combinaciones de medición para la validación estadística.

Las muestras fotosintéticas utilizadas para la experimentación fueron *Ficus Insipida Willd* las cuales tenían 1.6 años y estaban en la fase de crecimiento vegetativo. En el caso de las mediciones adaptadas a la oscuridad, una hoja de la muestra aislada de la luz a través de la cámara de aislamiento durante 10 minutos, como se muestra en la Figura IV.2, e inmediatamente se realiza una medición que dura 1.53 segundos. Solamente en la medición de adaptación a la oscuridad se tiene un estado de transitorio al inicio de la medición, aproximadamente en los primeros 0.5 segundos de la medición, como se muestra en la Figura IV.3 y IV.4 donde se cuenta con una medición normalizada en la señal de referencia como en la señal de fluorescencia de clorofila. Se puede observar como desde que inicia la medición la fluorescencia tiene menor magnitud que la señal de referencia, y conforme pasa el tiempo ésta pasa a un estado estable en la que se mantiene una magnitud constante. Por otro lado se cuenta, la medición saturada consiste en mantener a la planta en un estado de saturación mediante la fuente de excitación encendida sin modulación durante 5 minutos. Ésto con la finalidad de evitar el estado de

transitorio mencionado anteriormente y obtener otro tipo de información acerca del estado fisiológica de la planta. Sin embargo, es necesario remarcar que la medición con la muestra en estado de saturación es diferente a la medición de la fluorescencia retardada o delayed fluorescence como comúnmente se puede encontrar en la bibliografía de habla inglesa (Guo y Tan, 2013)



Figura IV.2 Mediciones en adaptación a la obscuridad en campo.

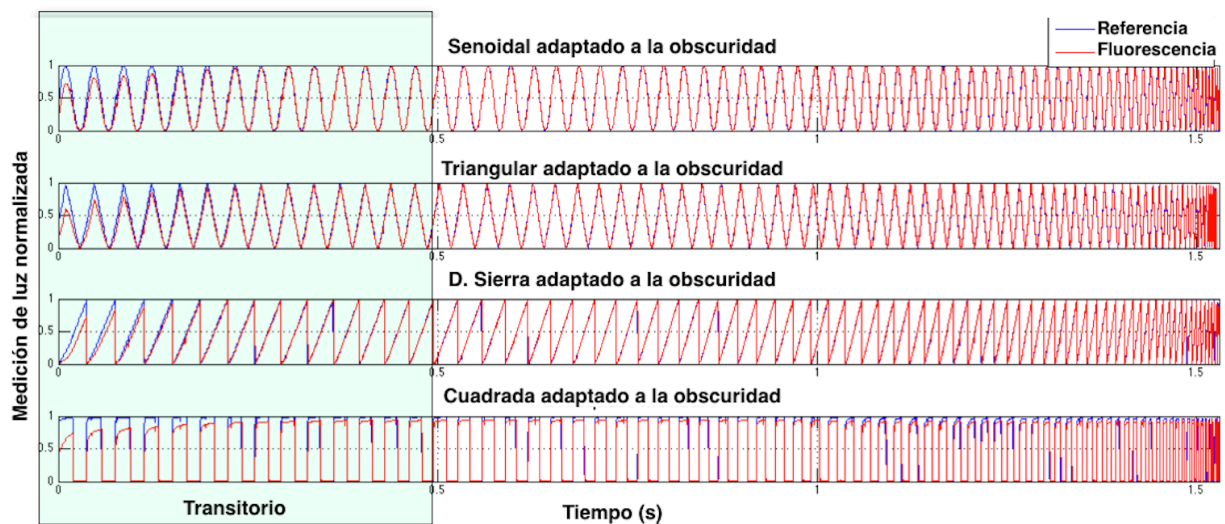
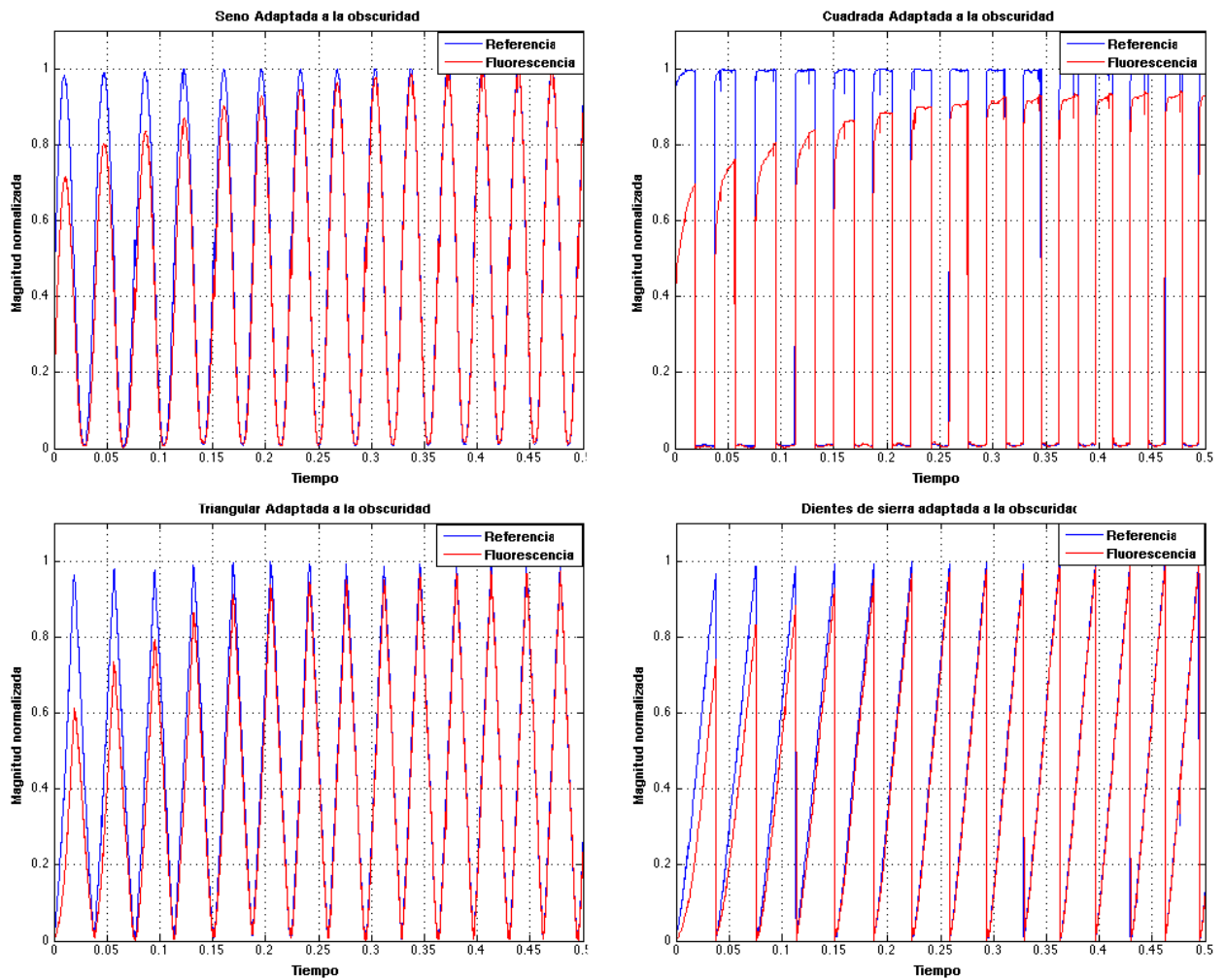


Figura IV.3 Mediciones en adaptación a la obscuridad de formas de onda seno, triangular, dientes de sierra y cuadrada, con un barrido de frecuencia.



**Figura IV.4 Medición normalizada del estado transitorio en adaptación a la oscuridad en formas de onda: seno, cuadrada, trangular y dientes de sierra.**

La primera etapa de la validación consiste en hacer una comparación entre las señales de referencia y de fluorescencia de clorofila. Para ésto fue necesario llevar a cabo docientas cuarenta mediciones, treinta de cada forma de onda, resultando en ciento veinte para cada medición de saturación y de adaptación a la oscuridad. Como resultado en las pruebas se busca tener una diferencia significativa entre la señal de excitación y la señal de respuesta de la muestra fotosintética, la cual se puede representarse como un model de caja negra, ilustrado en la Figura IV.8, donde se observa una señal lumínica azul de forma de onda cuadrada que es aplicada a  $h(t)$ , resultando a la respuesta de salida una señal de fluorescencia roja distorciónada y de forma de

onda cuadrada representada como  $y(t)$ , la cual tiene un comportamiento diferente a altas o bajas frecuencias.

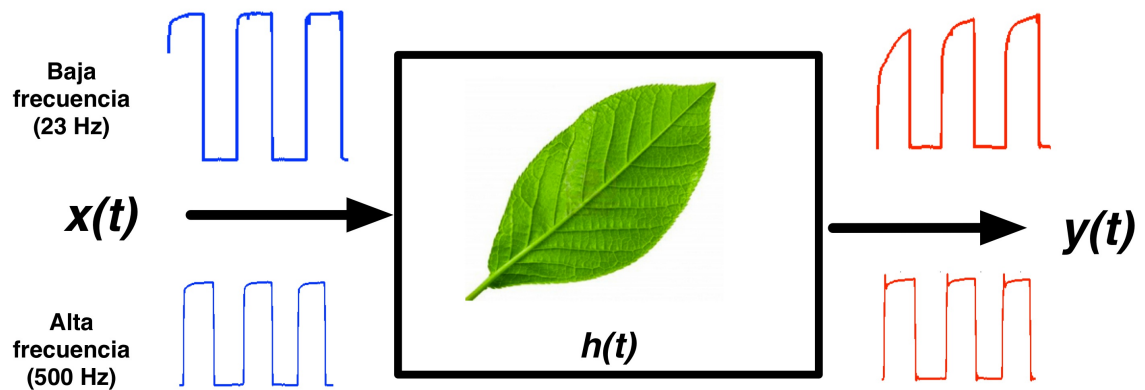


Figura IV.5 Hoja de una planta simulando un modelo de caja negra y excitada con una señal de forma de onda cuadrada en condiciones de adaptación a la obscuridad.

Con el objetivo de cuantificar la cantidad de deformación entre la forma de onda de la fuente modulada de excitación y la respuesta de la fluorescencia de la clorofila fue necesario utilizar el análisis de ANOVA (Wetzels *et al.*, 2011), el cual es utilizado para determinar o encontrar diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos de datos. Debido a que las mediciones consisten en 18565 valores digitales que corresponden al total de datos adquiridos por los fotodiodos y los convertidores Analógico-Digital de las señales de referencia y fluorescencia de clorofila, fue necesario calcular las medias estadísticas y sus desviaciones estandar de cada serie de datos o medición. Por lo tanto, el valor de “ $p$ ” (encontrado como  $p$ -value en idioma inglés) fue utilizado para las pruebas de diferencias estadísticamente significativa; donde la hipótesis nula ocurre cuando  $p > 0.05$ . Lo cual arrojaría como resultado que entre el grupo de datos analizados no cuentan con una diferencia estadísticamente significativa (Fay y Proshan, 2010; Sellke *et al.*, 2001). Por otra parte, cuando  $p \leq 0.05$  es considerado como una hipótesis alternativa, lo cual significa que existe una diferencia estadística significativa entre el grupo de datos, que para nuestros fines prácticos sería la media de una serie de repetición de mediciones.

#### IV.1.1 Análisis de la varianza de mediciones y formas de onda

La primera sesión de comparaciones se realizó entre la señal de referencia y la señal de fluorescencia de clorofila, éste sería el primer paso para comprobar que el fluorómetro nos



entrega una deformación estadísticamente significativa entre la señal de entrada o excitación y la señal de salida o de fluorescencia de clorofila. En la Figura IV.6 se muestran las gráficas arrojadas por el análisis ANOVAs en la cuales se observan las 4 formas de onda básicas que se han utilizado para la validación del fluorómetro. Del lado derecho de cada gráfica se puede observar la respuesta de la fluorescencia de la clorofila mientras que de lado izquierdo se muestra la referencia. En las 4 gráficas se tiene la referencia en un nivel más alto que el de la fluorescencia, una de las razones es por los bajos valores que se adquieren en el estado transitorio de los primeros 0.5 segundos. Por otra parte, en la Tabla IV.1 se puede observar que todos los valores  $p$  son pequeños, lo cual significa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las señales de referencia y la señal de fluorescencia de clorofila. Posteriormente a la realización de la comparación en mediciones adaptadas a la obscuridad, se realizó el mismo procedimiento pero ahora para las saturadas, como se observa en la Figura IV.7. Al igual que las mediciones adaptadas a la obscuridad, se puede apreciar que la fluorescencia se mantiene en valores más abajo que la referencia y de nuevo los valores de  $p$  son pequeños, los cuales se muestran también en la Tabla IV.1.

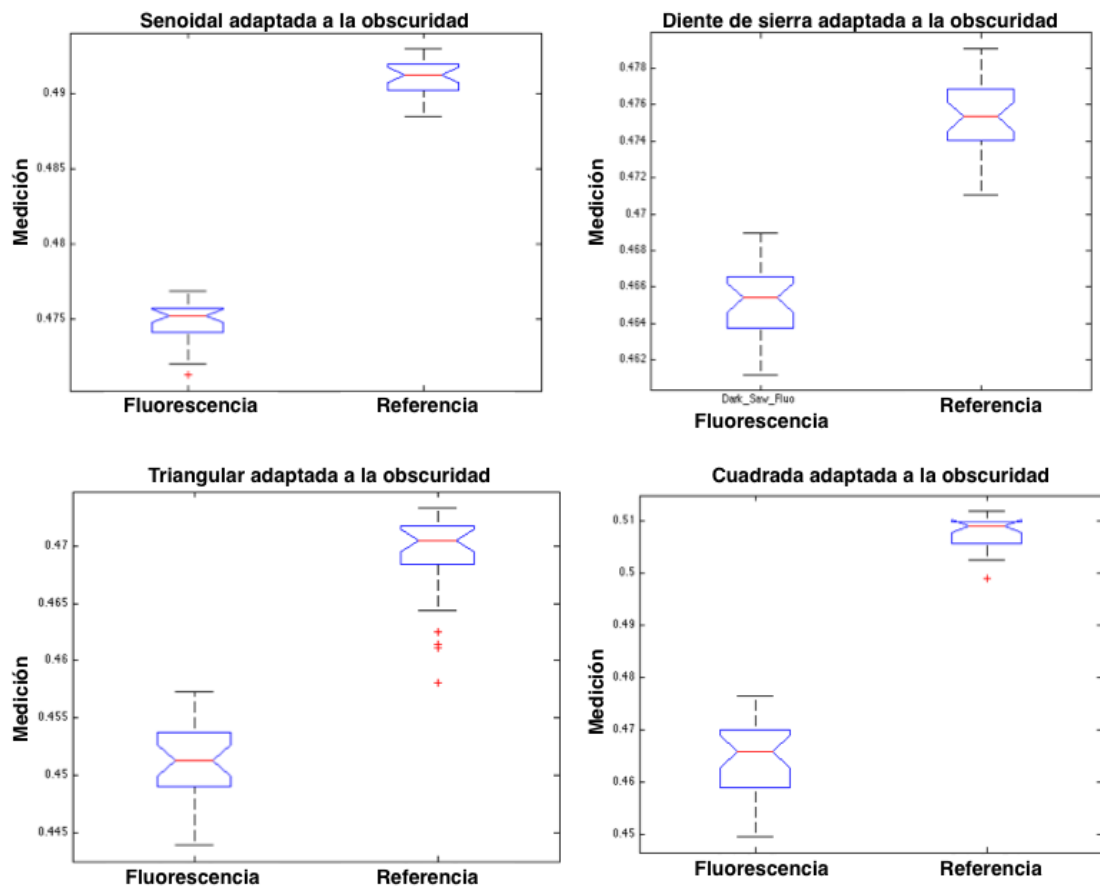


Figura IV.6 Gráfica de ANOVAS entre la señal de referencia y la fluorescencia de clorofila para las mediciones adaptadas a la oscuridad con forma de onda: senoidal, dientes de sierra, triangular y cuadrada.

Tabla IV.1 Resultados del analisis ANOVA en la comparación entre la señal de referencia y la de fluorescencia de clorofila.

F. clorofila VS referencia	Suma de cuadrados	Estadístico F	Valor <i>p</i>
Senoidal obs.	0.00395	2631.01	5.0603e-50
Triangular obs.	0.00499	348.89	3.27351e-26
D. Sierra obs.	0.00146	333.81	9.81793e-26
Cuadrada obs.	0.02816	846.47	2.73042e-36
Senoidal sat.	0.01523	841.61	3.19276e-36
Triangular sat.	0.01164	317.36	3.41827e-25
D. Sierra sat.	0.01394	1083.59	3.16887e-39
Cuadrada sat.	0.02087	233.12	5.57613e-22

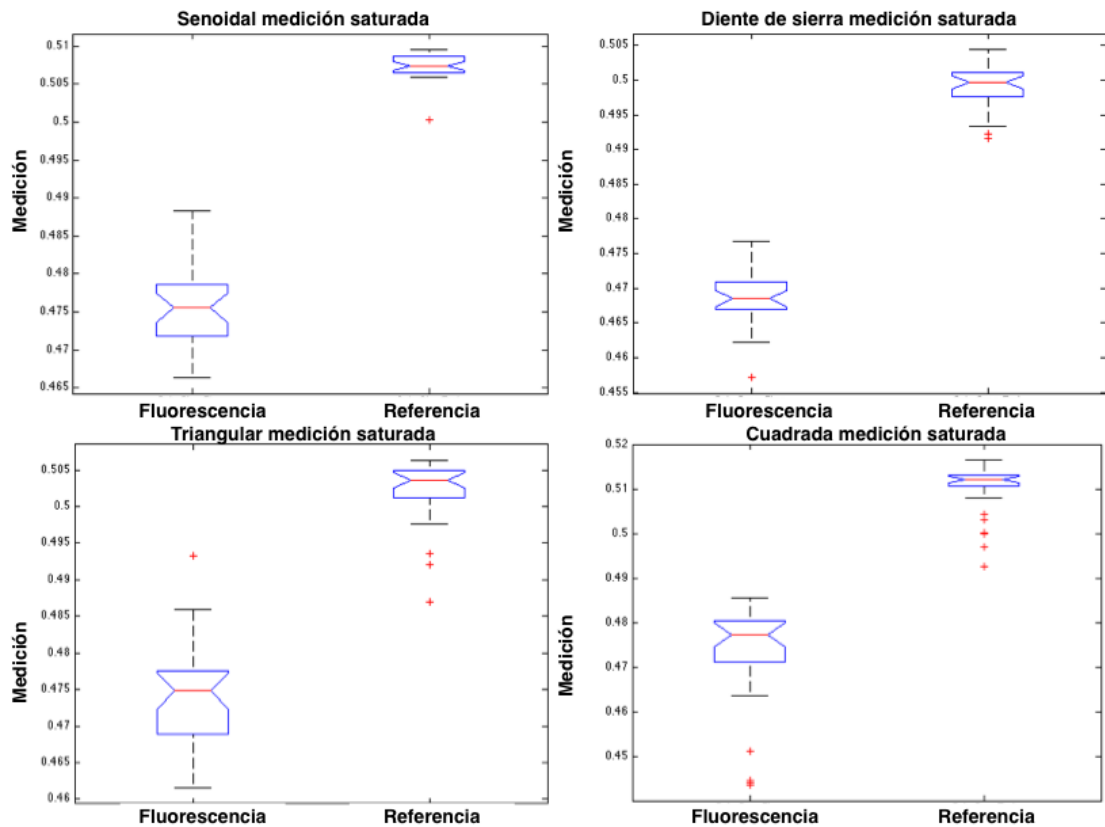


Figura IV.7 Gráfica de ANOVAS entre la señal de referencia y la fluorescencia de clorofila para las mediciones saturadas con forma de onda: senoidal, dientes de sierra, triangular y cuadrada.

Posteriormente a la comparación entre la señal de entrada a la de salida, se pasa a analizar si existen diferencias significativas entre los tipos de mediciones. Anteriormente hablamos de tres tipos de mediciones: saturada, adaptada a la obscuridad y como referencia tenemos una llamada “vacío”, la cual consta de hacer una medición sin muestra fotosintética y simplemente es usada como una referencia. Por lo tanto, la comparativa que se realizó se puede observar en la Figura IV.8. Posteriormente se implementó el análisis de varianza entre los diferentes tipos de medición como se muestra en la Figura IV.9, donde se puede observar que la medición más dispersa y que maneja una menor magnitud es la de vacío, debido a que sólo se está muestreando una pequeña cantidad de señal referencia aunada a ruido. Mientras que en la medición de obscuridad y saturación se encuentran más cercanas en una misma área. Sin embargo, con una diferencia significativa de nuevo como se muestra en la Tabla IV.2 donde los valores  $p$  se encuentran en magnitudes muy bajas. Se puede observar que las mediciones

saturadas tienden a ser un poco más dispersas, mientras que en general las mediciones con señal cuadrada también tienden a manejar una mayor dispersión, esto debido a las altas frecuencias que se manejan en los cambios abruptos de los estados de la señal. Con esto se puede entender que se puede obtener diferente información entre una medición saturada y una adaptada a la oscuridad como lo dice la bibliografía.

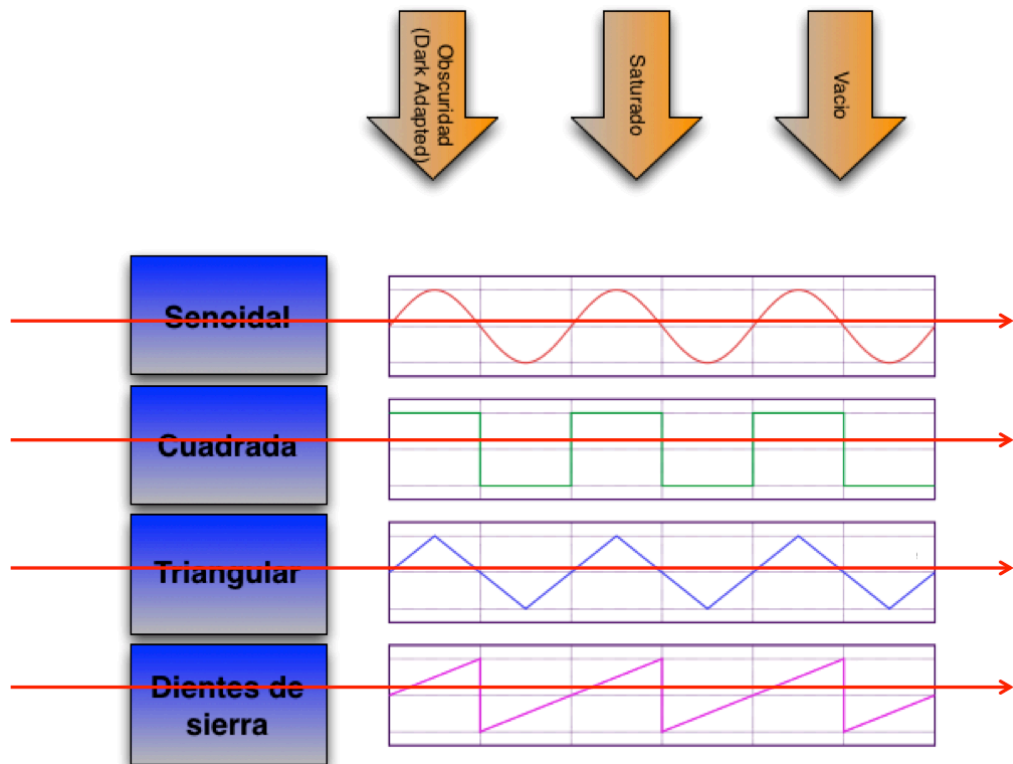


Figura IV.8 Diagrama de comparativas entre los diferentes tipos de mediciones.

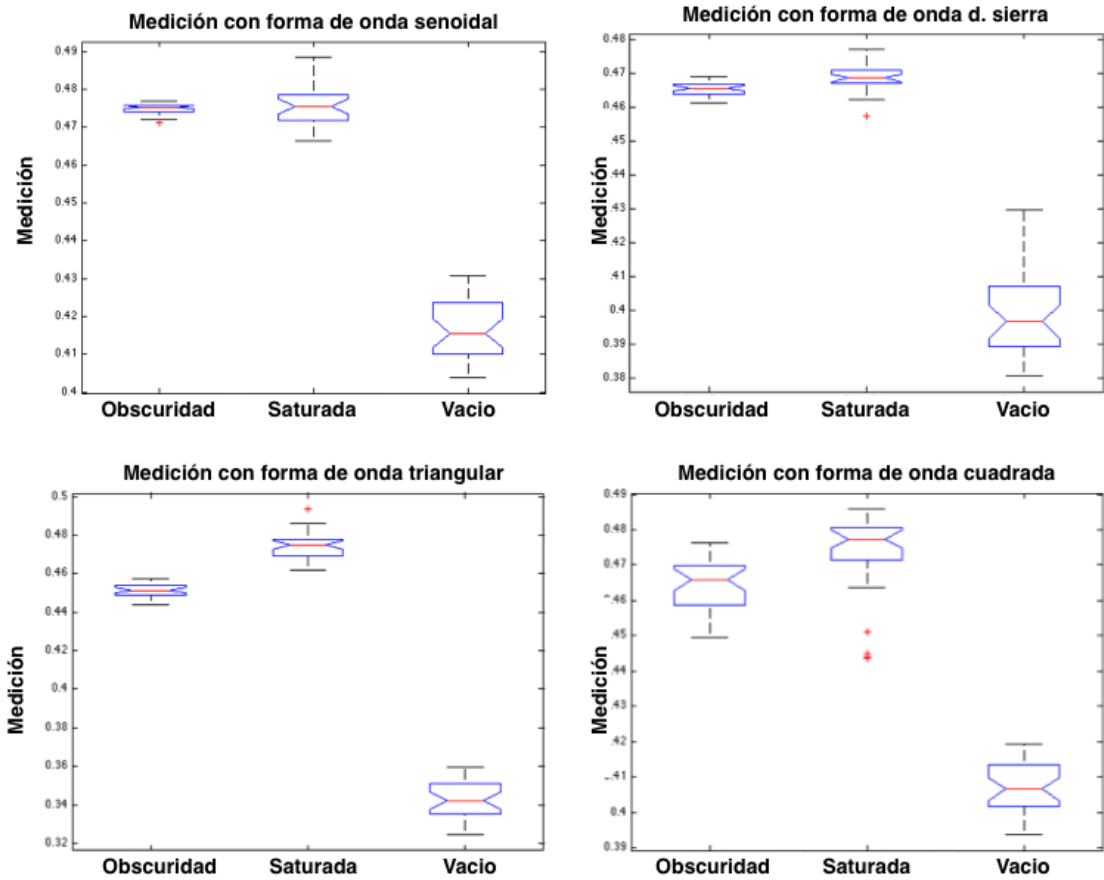


Figura IV.9 Gráfica de ANOVAS entre los diferentes tipos de mediciones: adaptada a la obscuridad, saturadas y vacío con las 4 diferentes formas de onda.

Tabla IV.2 Resultados del análisis ANOVA en la comparación entre las diferentes tipos de mediciones: adaptado a la obscuridad, saturada y vacío; con las diferentes formas de onda.

Obscuridad. VS saturacion VS vacío	Suma de cuadrados	Estadístico F	Valor <i>p</i>
Senoidal	0.06772	986	1.60991e-60
Triangular	0.29565	2619.87	1.85352e-78
D. Sierra	0.08968	654.43	3.70137e-53
Cuadrada.	0.07735	452.09	1.08781e-46

Después de analizar las diferentes tipos de mediciones, se pasó a la comparación de las diferentes formas de onda. Esto con la finalidad de identificar si nos están entregando

información diferente cada una de ellas, y si es necesaria la implementación de las mismas. Por esa razón los análisis de varianza correrían de la manera que se especifican en la Figura IV.10. donde se compararán las cuatro formas de onda cuadrada en obscuridad, después en saturado y por último solamente el transitorio de la medición adaptada a la obscuridad. En la Figura IV.11 se puede apreciar como las mediciones adaptada a la obscuridad con la señal cuadrada y de dientes de sierra cuentan con mediciones bastante parecidas, esto puede ser debido a que las dos cuentan con componentes de altas frecuencias a diferencia de la señal senoidal y dientes de sierra, las cuales se encuentran muy separadas unas de otras a pesar de ser las que se pueden considerar más parecidas. En las mediciones saturadas, las señales están bastante traslapadas, el valor estadístico  $p$  es el más alto de todos los análisis, como se puede apreciar en la Tabla IV.3, sin embargo se cuenta con una diferencia significativa. Mientras que en la gráfica inferior se encuentra la comparación entre los transitorios de la medición de adaptado a la obscuridad, se puede encontrar el valor  $p$  más pequeño, diciéndonos que son las mediciones más diferentes entre ellas como se puede ver en la misma gráfica. Teniendo que las únicas que se traslapan en una pequeña parte son los transitorios triangular y el dientes de sierra.

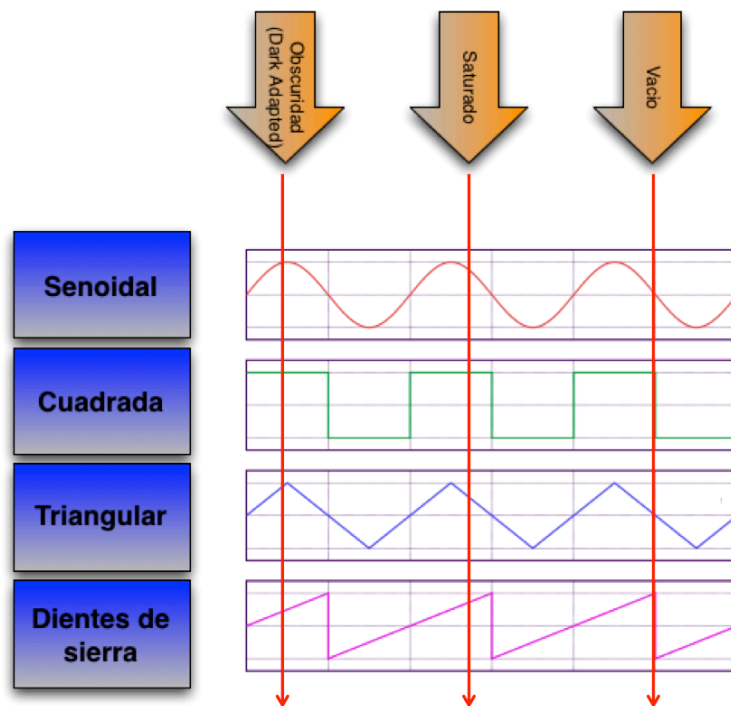


Figura IV.10 Diagrama de comparativas entre las diferentes formas de onda: senoidal, triangular, dientes de sierra y cuadrada.

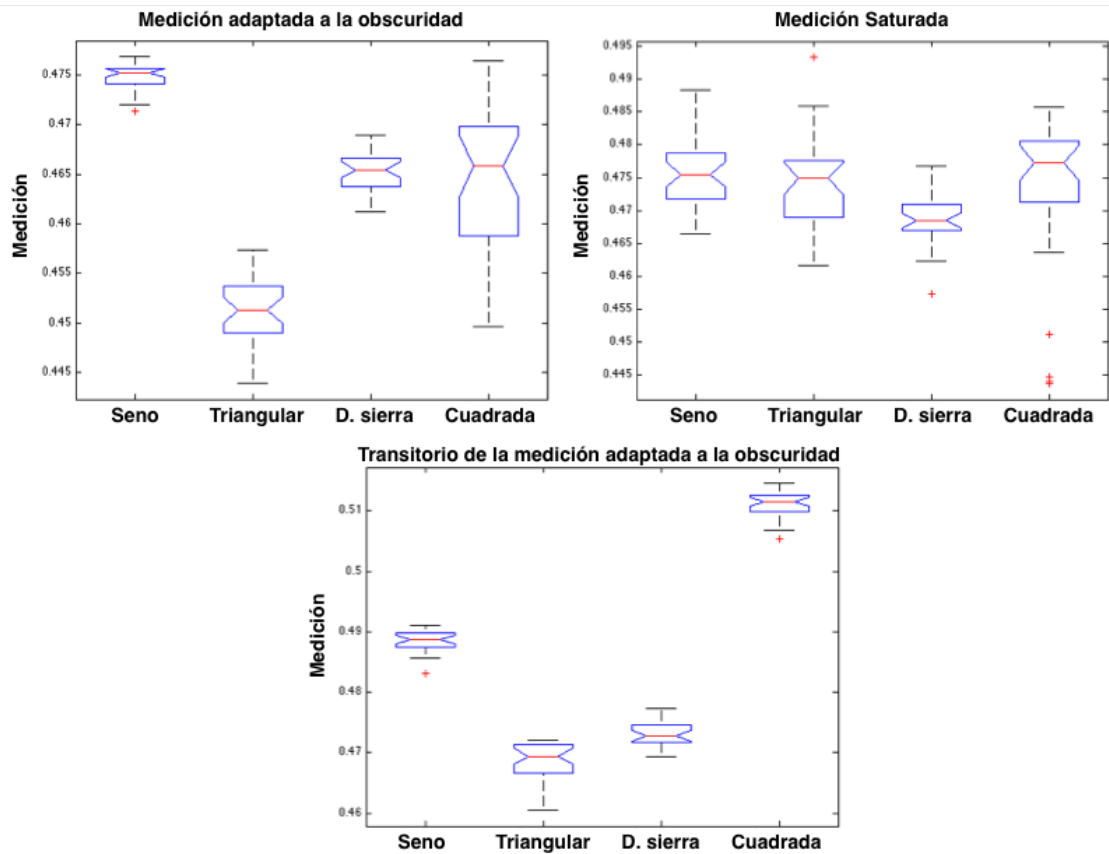


Figura IV.11 Diagrama de comparativas entre las diferentes formas de onda: senoidal, triangular, dientes de sierra y cuadrada.

Tabla IV.3 Resultados del analisis ANOVA en la comparación entre las diferentes tipos de formas de onda: senoidal, triangular, dientes de sierra y cuadrada en adaptado al a obscuridad, saturado y sólo con transitorio.

Senoidal VS triangular VS d. sierra VS cuadrada	Suma de cuadrados	Estadístico F	Valor <i>p</i>
A. Obscuridad	0.00869	153.77	2.92084e-40
Saturada	0.00008	4.3	0.0065
Transitorio	0.03413	1753.46	2.00684e-96

### IV.1.2 Prueba de 3-sigma para repetibilidad del fluorómetro

Posteriormente a los análisis de varianza y probar que las mediciones sean funcionales es necesario hacer pruebas de repetibilidad a las que son sometidas cualquier instrumento de medición. Es importante especificar que el fluorómetro no se puede someter a pruebas de exactitud debido a que no se cuenta con un sistema de medición calibrado y probado que arroje mediciones similares para realizar métodos de comparación. Lo anterior es mencionado debido a que se presenta una propuesta nueva de medición. Para relizar el análisis fueron utilizadas 240 mediciones para cuantificar la repetibilidad. Primeramente, la regla de una-sigma fue utilizada, esto permite que cerca del 68.1% de las mediciones estén dentro del rango de la regla. El resultado de la repetibilidad son mostrados en la Tabla IV.4 y en la Figura IV.12. Donde se puede apreciar que la tasa más baja es de insidencia de una-sigma es de 70% en la señal senoida y triangular con medición saturada. Sin embargo a pesar de ser las mediciones más dispersas, estos se encuentran dentro de los límites aceptables de la regla. Donde también se puede observar que hay una insidencia de 100% para la regla de tres-sigmas (Vežočník *et al.*, 2009)

$$PRECISION = \frac{\sigma}{MEASURING\ RANGE} * (100) \quad (8)$$

Tabla IV.4 Análisis estadístico de las mediciones con la regla de una-sigma.

Fluorescencia de clorofila	Media	Desviación Estándar.	% Dentro de una-sigma	Presición
Seno obs.	0.4751	0.0012	76.6667	4.9051e-05
Triangular obs.	0.4512	0.0035	73.3333	1.6493e-04
D. Sierra obs.	0.4647	0.0033	86.6667	1.1761e-04
Cuadrada obs.	0.4646	0.0075	73.3333	2.6462e-04
Seno sat.	0.4758	0.0057	70	7.1811e-04
Triangular sat	0.4748	0.0072	70	8.1209e-04
D. Sierra sat	0.4690	0.0038	76.6667	3.7893e-04
Cuadrada sat	0.4732	0.0121	83.3333	0.0011



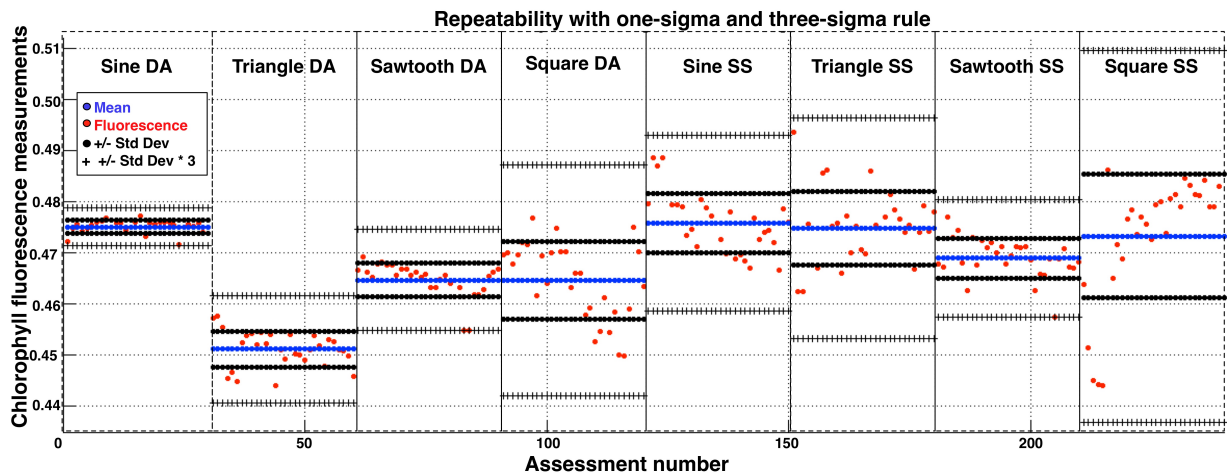


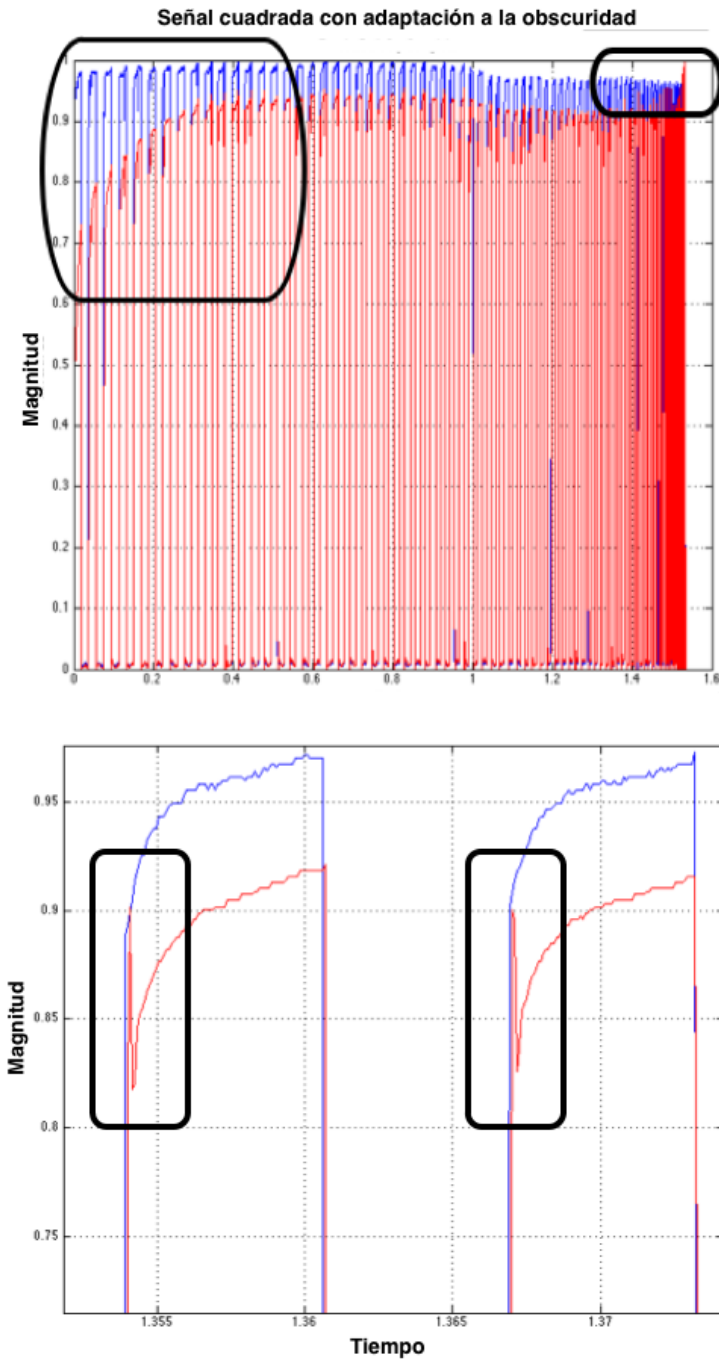
Figura IV.12 Mediciones adaptadas a la obscuridad y saturadas de cuatro diferentes formas de onda aplicando la regla de una-sigma.

Por último, la medición de precisión fue llevada a cabo usando la Ecuación 8 donde  $\sigma$  es la desviación estándar. El rango de medición fue tomado de la diferencia entre el máximo y el mínimo valor arrojado por las mediciones de cada forma de onda con las diferentes condiciones de la muestra como lo son la adaptación a la obscuridad o la saturación de la misma. Los resultados también son listados en la Tabla IV.4 en la columna de precisión, donde se puede observar que la medición más precisa fue la arrojada por la forma de onda senoidal bajo la adaptación a la obscuridad. Mientras que la menos precisa fue la señal cuadrada bajo un estado de saturación. Es importante remarcar que se generó un sistema de medición el cual tiene repetibilidad en sus mediciones y precisión, lo cual nos da una medición confiable para poder analizar las señales de fluorescencia y poder correlacionarlas con el estado fisiológico de la muestra fotosintética a través de nuevas metodologías.

## IV.2 Procesamiento de señales de fluorescencia modulada.

El principal objetivo de desarrollar un sistema de medición de fluorescencia de clorofila aunado a la técnica de síntesis digital de señales, tiene la finalidad de generar una medición más fina y con una mayor información acerca de la muestra fotosintética, lo cual se ve reflejado en la modificación de frecuencia de la señal, así como contar con diferentes formas de onda con altas o bajas frecuencias implícitas en su forma. Al generar la medición una cantidad importante de datos con suficiente información, nos proporciona la facilidad de implementar diferentes tipos de

procesamientos para encontrar cambios sustanciales y correlacionarlas con algunos problema, estrés o condiciones específicas en los estados fisiológicos de la planta. Las técnicas de procesamiento de señales pueden ser desde métodos estadísticos básicos como medias, medianas, filtros; así como procesamientos estadísticos más complejos como entropía. También existen técnicas para hacer cambios de tiempo-frecuencia como puede ser la transformada de fourier, transformada chirp o transformadas wavelets u ondoletas. Todas con la finalidad de encontrar información que esté contenida en la deformación que genere la muestra fotosintética a la señal original como se puede observar en la Figura IV.13, la cual nos muestra el transitorio de inicio, el cual ha sido profundizado anteriormente, así como un incremento al final de la medición en la fluorescencia de la clorofila, mientras que en la gráfica inferior se tiene una ampliación de la señal cuadrada en las que se puede apreciar unas señales de altas frecuencias en los flancos positivos de la señal.

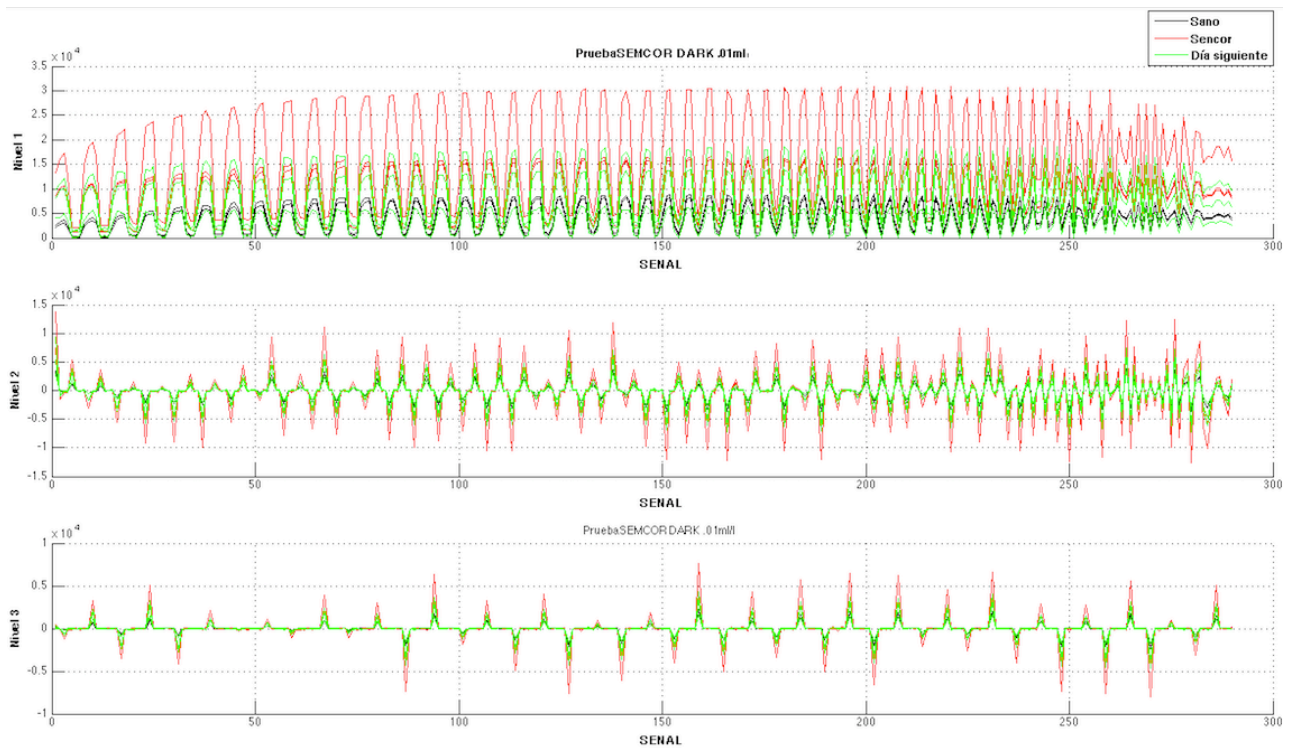


**Figura IV.13** Medición adaptada a la obscuridad con una forma de onda cuadrada con deformaciones en el transitorio de inicio, final, y señales de altas frecuencias en los flancos ascendentes.

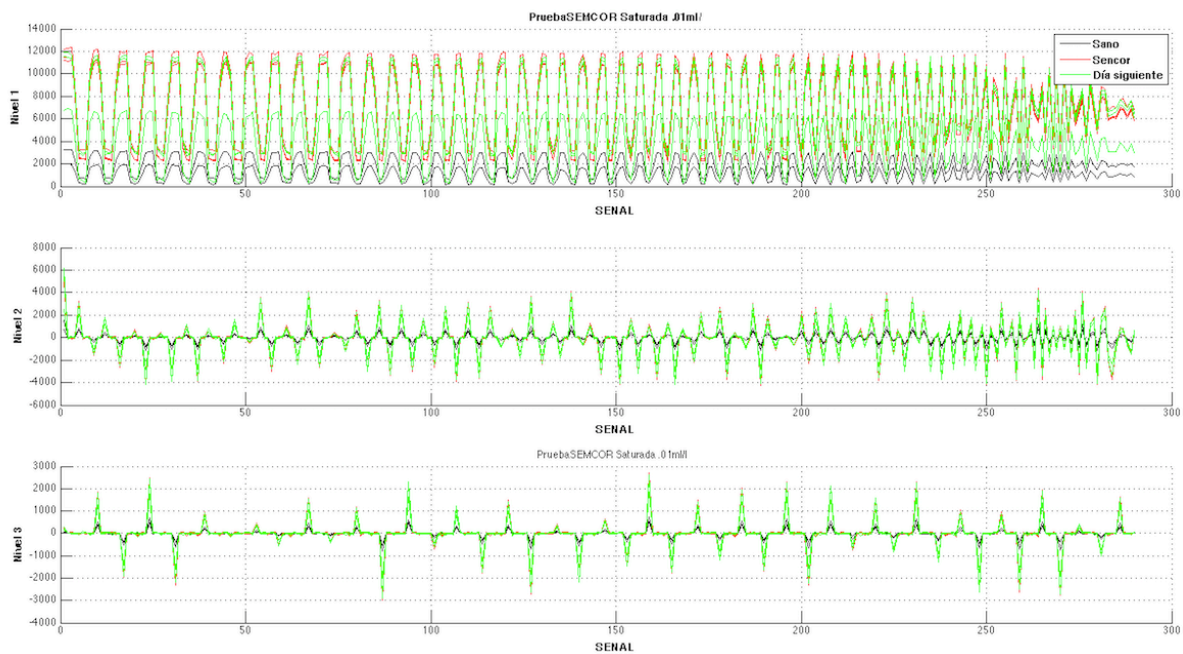
Basados en lo antes mencionado, se buscó identificar un estrés en específico, por lo se utilizó la planta de chile habanero (*Capsicum chinense*) con 5 meses de crecimiento, el cual fue

expuesto al herbicida Sencor® 480 SC que contiene el componente activo llamado Metribuzina. Inicialmente se tomaron dos mediciones en estado sano, todas las mediciones fueron hechas con la forma de onda cuadrada, debido a que era la que arroja una mayor información de la planta, buscando obtener las altas frecuencias anteriormente mencionadas y contenidas en la Figura IV.13. Posterior a las mediciones en estado sano, se expuso a la planta con herbicida en una concentración de 0.01 ml diluidos en un litro de agua. Después de 4 mediciones con herbicida se dejó la planta reposar, mientras que al siguiente día se llevaron a cabo dos nuevas mediciones para ver la evolución de la fluorescencia de clorofila. Las mediciones se llevaron a cabo en saturación y adaptación a la oscuridad.

Después de tomar estas mediciones, se pasó al análisis a través de wavelet u ondoletas, con las cuales se busca separar por diferentes componentes de frecuencias e identificar cuales son las frecuencias con mayor afectación por el herbicida. En la Figura IV.14 se puede observar las mediciones anteriormente mencionadas en adaptación a la oscuridad. El graficado con línea negra son las dos mediciones en estado de sano, en el nivel uno es en el que más se alcanza a observar este tipo de estado, mientras que en el nivel 2 y el 3 se traslapa con la medición de color verde que son las mediciones al día siguiente de la aplicación de herbicida, lo que nos da como resultado que la planta tiende a recuperarse después de la aplicación del estrés. Por otro lado tenemos en graficado en rojo las 4 mediciones hechas inmediatamente a la aplicación, por lo cual se nota un aumento significativo a la magnitud de la fluorescencia de clorofila. Por otro lado en la Figura IV.15 se puede observar las mismas mediciones pero en estado de saturación, en la cual no se notan mediciones abruptas en el instante siguiente a la aplicación como en la medición adaptada a la oscuridad (señal graficada en rojo). Con la muestra en un estado de saturación, las mediciones en estado de confort se aprecian bien definidas, mientras que las mediciones posteriores a la aplicación del herbicida se observan con una magnitud mayor y sin cambio indiferentemente al día de la medición. Esto ahorraría tiempo al momento de hacer un diagnóstico debido a que se puede evitar el tiempo de adaptación a la oscuridad.



**Figura IV.14 Mediciones en adaptación a la oscuridad con forma de onda cuadrada en estado de confort y después de la aplicación de hericida a planta de chile habanero.**



**Figura IV.15 Mediciones en estado de saturación con forma de onda cuadrada en estado de confort y después de la aplicación de hericida a planta de chile habanero.**

### **IV.3 Conclusiones y prospectivas.**

En este trabajo de doctorado se presenta un sistema de medición confiable, siendo el principal aporte una nueva manera de analizar la fluorescencia de clorofila. Esto se logra a través de la utilización de la síntesis digital de señales, logrando una fuente de excitación modulada y ampliamente personalizable gracias a la implementación del control del fluorómetro en una plataforma FPGA. Resultando una nueva herramienta para el análisis del estado fisiológico de muestras fotosintéticas, utilizando diferentes formas de onda en la fuente de excitación. Lo anteriormente mencionado abre las posibilidades de aplicar técnicas de procesamiento digital de señales y adquirir información contenida en la deformación de la señal de fluorescencia de clorofila con respecto a la señal de excitación de la muestra o de referencia.

Es importante tomar en cuenta que para fines prácticos de este trabajo fue aplicado en plantas, sin embargo hay un amplia gama de aplicaciones de fluorescencia donde esta metodología puede ser aplicada, debido a su fácil personalización. Con base en lo pasado, se propone una mejora a los fluorómetros comerciales, los cuales en su mayoría manejan controles simples de “ON-OFF”. Esta mejora se logra a través del principio de modulación en forma de onda de la fuente de excitación, y así revisar diferentes frecuencias, amplificaciones o atenuaciones mediante un análisis más detallado de las señales para encontrar correlaciones con problemas fisiológicos de las muestras fotosintéticas, y abrir la puerta a no sólo identificar si hay problemas con la muestra, sino identificar puntualmente el problema para su diagnóstico.

Al tener la identificación puntual del tipo de estrés, se puede tener un aporte significativo al sector primario. Utilizando la muestra fotosintética como lazo de retroalimentación y control, y así ajustar las variables internas de un invernadero, como lo son la temperatura, la humedad o el riego de acuerdo a las necesidades de la planta, aumentando las condiciones de confort del cultivo así como el ahorro de recursos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agati, G., Z. G. Cerovic, P. Pinelli, y M. Tattini. 2011. Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques. *Environmental and Experimental Botany* 73: 3-9.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant pathology*. Amsterdam: Academic: 635.
- Avercheva, O. *et al.* 2009. Growth and photosynthesis of Chinese cabbage plants grown under light-emitting diode-based light source. *Russian Journal of Plant Physiology* 56: 14-21.
- Belanger, R., A. Paquette, C. N. N'soukpoé-Kossi, y R. M. Leblanc. 1993. New portable photoacoustic and fluorescence photometer for field measurement of photosynthesis. *Review of scientific instruments* 64: 1175-1181.
- Bulgarea, G., y M. Boukadoum. 2001. A high-performance instrumentation system to measure the fluorescence kinetics of plants for in vivo photosynthesis research. *Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on* 50: 679-689.
- Bussotti, F. *et al.* 2011. Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll a fluorescence. A critical reassessment of existing data. *Environmental and experimental botany* 73: 19-30.
- Colls, J., y D. Hall. 2004. Application of a chlorophyll fluorescence sensor to detect chelate-induced metal stress in *Zea mays*. *Photosynthetica* 42: 139-145.
- Coombs, J., D. Hall, S. Long, y J. Scurlock. 1988. *Técnicas en fotosíntesis y bioproductividad*. Programa Ambiental de las Naciones Unidas.
- Damm, A. *et al.* 2010. Remote sensing of sun-induced fluorescence to improve modeling of diurnal courses of gross primary production (GPP). *Global Change Biology* 16: 171-186.
- Delieu, T. J., y D. A. Walker. 1983. Simultaneous measurement of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence from leaf pieces. *Plant physiology* 73: 534-541.
- Ehler, N., y J. Mazanti Hansen. 1995. The Plants-on-line-box: Monitoring Whole Plant Net Photosynthesis as a Tool to Evaluate Plant Productivity and Stress in *Begonia Elatior Var'Ilona'*. In: *II International Symposium On Sensors in Horticulture* 421. p 145-154.
- Espinosa-Calderon, A. *et al.* 2011. Description of photosynthesis measurement methods in green plants involving optical techniques, advantages and limitations. *Afr. J. Agric. Res* 12: 2638-2647.
- Faraloni, C. *et al.* 2011. Chlorophyll fluorescence technique as a rapid tool for *in vitro* screening of olive cultivars (*Olea europaea* L.) tolerant to drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 73: 49-56.
- Fay, M. P., y M. A. Proschan. 2010. Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Statistics surveys* 4: 1.
- Fedack, V., O. Kytaev, P. Klochan, V. Romanov, y I. Voytovych. 2005. Portable Chronofluorometer for Express-Diagnostics of Photosynthesis. In: *Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications, 2005. IDAACS 2005*. IEEE. p 287-288.
- Frankenberg, C. *et al.* 2011. New global observations of the terrestrial carbon cycle from GOSAT: Patterns of plant fluorescence with gross primary productivity. *Geophysical Research Letters* 38.
- Guo, Y., y J. Tan. 2013. Applications of Delayed Fluorescence from Photosystem II. *Sensors* 13: 17332-17345.

- Hideg, É., y U. Schreiber. 2007. Parallel assessment of ROS formation and photosynthesis in leaves by fluorescence imaging. *Photosynthesis research* 92: 103-108.
- Hodson, M., P. White, A. Mead, y M. Broadley. 2005. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annals of Botany* 96: 1027-1046.
- Hu, Y. *et al.* 2013. An In-Situ Highly Sensitive and Reliable Chlorophyll Sensor Based on Pseudo-Random Sequence Modulation. *Instrumentation and Measurement, IEEE Transactions on* 62: 2314-2322.
- Iliev, I., D. Krezhova, T. Yanev, E. Kirova, y V. Alexieva. 2009. Response of chlorophyll fluorescence to salinity stress on the early growth stage of the soybean plants (*Glycine max* L.). In: *Recent Advances in Space Technologies, 2009. RAST'09. 4th International Conference on*. p 403-407.
- Ji, J. W., M. H. Xu, y Z. M. Li. 2010. Research and application on chlorophyll fluorescence on-line monitoring technology. *Advanced Materials Research* 139: 2550-2555.
- Johnson, X. *et al.* 2009. A new setup for in vivo fluorescence imaging of photosynthetic activity. *Photosynthesis research* 102: 85-93.
- Kautsky, H., y A. Hirsch. 1931. Neue versuche zur kohlen säureassimilation. *Naturwissenschaften* 19: 964-964.
- Kissinger, J., y D. Wilson. 2011. Portable fluorescence lifetime detection for chlorophyll analysis in marine environments. *Sensors Journal, IEEE* 11: 288-295.
- Kolber, Z. *et al.* 2005. Measuring photosynthetic parameters at a distance: laser induced fluorescence transient (LIFT) method for remote measurements of photosynthesis in terrestrial vegetation. *Photosynthesis Research* 84: 121-129.
- Komura, M., A. Yamagishi, Y. Shibata, I. Iwasaki, y S. Itoh. 2010. Mechanism of strong quenching of photosystem II chlorophyll fluorescence under drought stress in a lichen, *Physciella melanchla*, studied by subpicosecond fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1797: 331-338.
- Lefcourt, A. M., M. S. Kim, y Y.-R. Chen. 2005. A transportable fluorescence imaging system for detecting fecal contaminants. *Computers and electronics in agriculture* 48: 63-74.
- Lichtenthaler, H., C. Buschmann, y M. Knapp. 2005a. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RfD of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* 43: 379-393.
- Lichtenthaler, H., G. Langsdorf, S. Lenk, y C. Buschmann. 2005b. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica* 43: 355-369.
- Liu, L., Y. Zhang, J. Wang, y C. Zhao. 2005. Detecting solar-induced chlorophyll fluorescence from field radiance spectra based on the Fraunhofer line principle. *Geoscience and Remote Sensing, IEEE Transactions on* 43: 827-832.
- Long, S., S. Humphries, y P. G. Falkowski. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual review of plant biology* 45: 633-662.
- Losciale, P., L. Hendrickson, L. C. Grappadelli, y W. S. Chow. 2011. Quenching partitioning through light-modulated chlorophyll fluorescence: A quantitative analysis to assess the fate of the absorbed light in the field. *Environmental and Experimental Botany* 73: 73-79.
- Mathews, C., K. van Holde, y K. Ahern. 2002. *Biochemistry* Vol. 1. San Francisco: Addison Wesley Longman.



- Mereu, S. *et al.* 2011. Gas exchange and JIP-test parameters of two Mediterranean maquis species are affected by sea spray and ozone interaction. *Environmental and experimental botany* 73: 80-88.
- Meroni, M. *et al.* 2009. Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: Review of methods and applications. *Remote Sensing of Environment* 113: 2037-2051.
- Middleton, E. M., J. E. McMurtrey, P. K. Entcheva Campbell, y L. M. Butcher. 2006. Fluorescence sensing techniques for vegetation assessment. *Applied optics* 45: 1023-1033.
- Millan-Almaraz, J., R. Romero-Troncoso, R. Osornio-Rios, y A. Garcia-Perez. 2011. Wavelet-based methodology for broken bar detection in induction motors with variable-speed drive. *Electric Power Components and Systems* 39: 271-287.
- Millan-Almaraz, J. R., R. G. Guevara-Gonzalez, R. Romero-Troncoso, R. A. Osornio-Rios, y I. Torres-Pacheco. 2009. Advantages and disadvantages on photosynthesis measurement techniques: A review. *African Journal of Biotechnology* 8.
- Millan-Almaraz, J. R. *et al.* 2013. FPGA-based wireless smart sensor for real-time photosynthesis monitoring. *Computers and Electronics in Agriculture* 95: 58-69.
- Pandey, J. K., P. Srivastava, R. S. Yadav, y R. Gopal. 2012. Chlorophyll Fluorescence Spectra as an Indicator of X-Ray< b>. *Journal of Spectroscopy* 27: 207-214.
- Proakis, J., y D. Manolakis. 2006. *Digital signal processing* 4th Edition. Prentice Hall.
- Rahbarian, R., R. Khavari-Nejad, A. Ganjeali, A. Bagheri, y F. Najafi. 2011. Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer Arietinum* L.) genotypes. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 53: 47-56.
- Schächtl, J. *et al.* 2005. Laser-induced chlorophyll fluorescence measurements for detecting the nitrogen status of wheat (*Triticum aestivum* L.) canopies. *Precision Agriculture* 6: 143-156.
- Schulze, E.-D. 1972. A new type of climatized gas exchange chamber for net photosynthesis and transpiration measurements in the field. *Oecologia* 10: 243-251.
- Sellke, T., M. Bayarri, y J. O. Berger. 2001. Calibration of  $p$  values for testing precise null hypotheses. *The American Statistician* 55: 62-71.
- Shimomura, O. 2012. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. World Scientific.
- Smith, S. W. 1997. *The scientist and engineer's guide to digital signal processing*.
- Taiz, L., y E. Zeiger. 2006. *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I.
- Takahashi, M., T. Ishiji, y N. Kawashima. 2001. Handmade oxygen and carbon dioxide sensors for monitoring the photosynthesis process as instruction material for science education. *Sensors and Actuators B: Chemical* 77: 237-243.
- Tank, J. L., y J. C. Musson. 1993. An inexpensive chamber apparatus for multiple measurements of dissolved oxygen uptake or release. *Journal of the North American Benthological Society*: 406-409.
- Thoren, D., y U. Schmidhalter. 2009. Nitrogen status and biomass determination of oilseed rape by laser-induced chlorophyll fluorescence. *European journal of agronomy* 30: 238-242.
- Ton, Y., y M. Kopyt. 2003. Phytomonitoring information and decision-support system for crop growing. *Proceedings of the 2nd IS on Intelligent Information Technology in Agriculture*. Zhao Chunjiang (ed.). Beijing, China.
- Troncoso, R. d. J. R. 2007. *Electrónica Digital y Lógica Programable* 1ra edición ed. Universidad de Guanajuato.

- Van Gaalen, K. E., L. B. Flanagan, y D. R. Peddle. 2007. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and spectral reflectance in Sphagnum moss at varying water contents. *Oecologia* 153: 19-28.
- Vežočník, R. *et al.* 2009. Use of terrestrial laser scanning technology for long term high precision deformation monitoring. *Sensors* 9: 9873-9895.
- Wang, J., D. Xing, L. Zhang, y L. Jia. 2007. A new principle photosynthesis capacity biosensor based on quantitative measurement of delayed fluorescence *in vivo*. *Biosensors and bioelectronics* 22: 2861-2868.
- Wetzels, R. *et al.* 2011. Statistical evidence in experimental psychology an empirical comparison using 855 t tests. *Perspectives on Psychological Science* 6: 291-298.
- Zarco-Tejada, P. J., J. Miller, G. Mohammed, T. Noland, y P. Sampson. 2002. Vegetation Stress Detection through Chlorophyll+ Estimation and Fluorescence Effects on Hyperspectral Imagery. *Journal of environmental quality* 31: 1433-1441.
- Zhang, Y.-j., L.-y. Liu, M.-y. Hou, L.-t. Liu, y C.-d. Li. 2009. Progress in remote sensing of vegetation chlorophyll fluorescence. *Journal of Remote Sensing* 13: 971-978.

**APÉNDICE A**  
**ARTÍCULOS Y PRODUCTOS DURANTE EL**  
**DOCTORADO.**

Review

## Instrumentation in Developing Chlorophyll Fluorescence Biosensing: A Review

**Arturo A. Fernandez-Jaramillo**<sup>1</sup>, **Carlos Duarte-Galvan**<sup>1</sup>, **Luis M. Contreras-Medina**<sup>1,2</sup>, **Irineo Torres-Pacheco**<sup>1</sup>, **Rene de J. Romero-Troncoso**<sup>2</sup>, **Ramon G. Guevara-Gonzalez**<sup>1</sup> and **Jesus R. Millan-Almaraz**<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Biosystems Engineering CA, Postgraduate Study Division, Engineering Faculty, Autonomous University of Queretaro, Cerro de las Campanas St., Querétaro, 76010, Qro., Mexico; E-Mails: aafernandez@hspdigital.org (A.A.F.-J.); cduarte20@alumnos.uaq.mx (C.D.-G.); mcontreras@hspdigital.org (L.M.C.-M.); irineo.torres@uaq.mx (I.T.-P.); ramon.guevara@uaq.mx (R.G.G.-G.)

<sup>2</sup> HSPdigital-CA Mecatronics, Engineering Faculty, Autonomous University of Queretaro, Campus San Juan del Rio, 249 Rio Moctezuma St., San Juan del Rio, 76807, Qro., Mexico; E-Mail: troncoso@hspdigital.org

<sup>3</sup> Faculty of Physics and Mathematics, Autonomous University of Sinaloa, Universitarios Blvd., De las Americas Ave., Cd. Universitaria, Culiacan, 80000, Sinaloa, Mexico

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jrmillan@uas.edu.mx; Tel.: +52-667-716-1154 (ext. 117).

Received: 25 June 2012; in revised form: 9 August 2012 / Accepted: 13 August 2012 /

Published: 29 August 2012

---

**Abstract:** Chlorophyll fluorescence can be defined as the red and far-red light emitted by photosynthetic tissue when it is excited by a light source. This is an important phenomenon which permits investigators to obtain important information about the state of health of a photosynthetic sample. This article reviews the current state of the art knowledge regarding the design of new chlorophyll fluorescence sensing systems, providing appropriate information about processes, instrumentation and electronic devices. These types of systems and applications can be created to determine both comfort conditions and current problems within a given subject. The procedure to measure chlorophyll fluorescence is commonly split into two main parts; the first involves chlorophyll excitation, for which there are passive or active methods. The second part of the procedure is to closely measure the chlorophyll fluorescence response with specialized instrumentation systems. Such systems utilize several methods, each with different characteristics regarding to cost,

resolution, ease of processing or portability. These methods for the most part include cameras, photodiodes and satellite images.

**Keywords:** fluorescence; chlorophyll; photosynthesis; instrumentation; LED; laser; Kautsky

---

## 1. Introduction

Plants are among the most evolved beings on the planet; for example, unlike humans they are capable of producing their own nourishment through the process of photosynthesis. During this process sunlight energy is stored, and subsequently, in conjunction with water and carbon dioxide, forms carbohydrates and expels oxygen into the atmosphere [1]. However, plants cannot assimilate all the stored energy and approximately 5–10% of the total absorbed energy is accumulated as dry matter [2]. Consequently, plants are considered to be low-efficiency organisms. The excess energy is absorbed by the leaves must be dissipated through different paths involving thermal dissipative process, fluorescence emissions and photochemistry [3]. These losses can be utilized to research certain physiological behaviors in plants, such as photochemical and non-photochemical quenching.

Chlorophyll fluorescence is the red and far-red light emitted by photosynthetic tissue when it is excited by a light source [4]. Chlorophyll measurement is a non-invasive method for imaging photosynthetic fluxes because fluorescence depends directly on photosynthetic activity and it can be inferred through this [5–7].

This article reviews many applications in the measurement of fluorescence, most notably the detection of plant stress factors, with the objective of improving comfort conditions for the plant and providing higher production rates [8–11]. There are many factors that can produce plant diseases like stress caused by the environmental factors, among others [12]; however, these are not the only applications. Recently there has been climate impact research utilizing chlorophyll fluorescence analysis, along with satellite images [13] and manual measurement systems [14].

In order to develop instrumentation systems for measuring chlorophyll fluorescence, it is necessary to merge electrical engineering and plant biology. In this review, one vertex between the respective fields of electrical engineering and plant biosystems, is examined, especially the instrumentation when applied to the measurement of chlorophyll fluorescence. This phenomenon is common in some algae, bacteria and especially plants.

There are even some applications of chlorophyll fluorescence that focus on the quality, chemistry or physical characteristics of fruits; for instance, there are destructive methods which are commonly used in the process of detecting anthocyanin or flavonoids in specific fruits [1]. With chlorophyll fluorescence methods, this can be avoided. Regarding quality, there is research focused on plant nutrition characteristics to determine the types of elements that are beneficial for the plant and in what amounts [15,16]. Another important physical characteristic is the measurement of biomass, because it can be reflected directly in agricultural production [16], even in climate research through this characteristic [13].

None of the aforementioned techniques can be carried out without the appropriate instrumentation or equipment. The procedure proposed is made up of two main parts: the first being the chlorophyll

excitation, for which there are active and passive methods. The active methods use lamps [17–19], LEDs [6,9,20–25], or lasers [16,26,27] to excite the chlorophyll before beginning the measurements. The passive methods takes advantage of solar radiation to achieve the same goal [28,29]. The second part of the procedure is the measurement of the chlorophyll fluorescence. This can include several methods, each with different characteristics such as cost, resolution, ease of processing or portability. These characteristics primarily take into account the cameras [19,30], photodiodes [6,21], optical fiber [31] and satellite images [13] used during the process.

This article is both an update and overarching review regarding the instrumentation and sensing methods for measuring chlorophyll fluorescence; the objective is to provide a panoramic view of this field of research to aid in future developments and research projects. The long term objective of this review is to provide useful information and key data: primarily, the wavelength, intensity, and operating conditions that a given source of active or passive chlorophyll excitation requires. Next, the proper handling of the sample for correct measurement is reviewed. After that, the connections, methods, and electronic devices to maximize fluorescence response acquisition are described. Finally, data processing of the fluorescence response which includes filters, algorithms and equations, is examined.

## 2. Evolving Knowledge of Chlorophyll Fluorescence

Hans W. Kautsky and his collaborator, A. Hirsh, discovered a time dependent fluorescence when they observed an increase in fluorescence intensity when dark-adapted photosynthetically active samples were illuminated [32]. This phenomenon is also known as fluorescence transient, OJIP curve, fluorescence induction, fluorescence decay or the Kautsky effect.

All plants, from higher specimens to unicellular green algae, possess a chloroplast with thylakoid membranes containing photosystems I (PSI) and II (PSII), which are connected to each other by the cytochrome  $b_6/f$  complex. PSI is capable of producing fluorescence, but in very small quantities which are negligible. PSII is the only viable contributor to variable fluorescence [20,33].

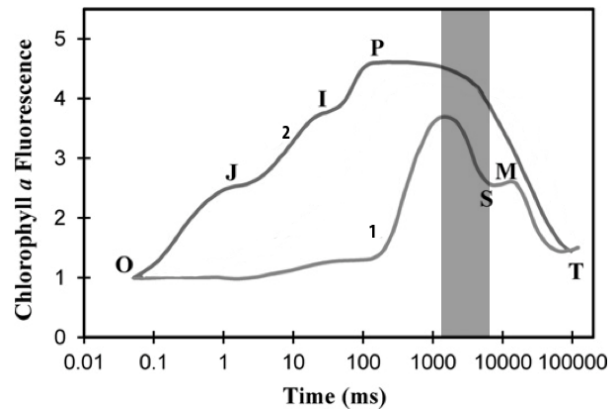
PSII consists of pigments and proteins in the thylakoid membrane of chloroplasts, which is the major target of many environmental stresses [34]. Based on this, chlorophyll fluorescence is widely used to determine the quality of growth conditions particularly in precision agriculture, where the parameters can be manipulated to improve the comfort conditions of plants.

Recent research suggests that the methods to dissipate excessive sunlight energy can be considered as a slowly reversible, protective mechanism, because inactive PSII complexes can act as protective shields [35]. Therefore, these mechanisms decrease the photochemical efficiency of PSII by interrupting the equilibrium between the radical pair and excitons in the light-harvesting antenna [36]. Consequently, photosynthetic energy harvesting is reduced and photon re-emitting by fluorescence is increased. Based in these facts, many techniques have been developed in the measurement of fluorescence for the improvement of comfort conditions in the plant and have increased production rates through the early detection of stress conditions [8–11].

In order to make accurate measurements of chlorophyll fluorescence, it is necessary to obtain the chlorophyll a fluorescence induction transient. This process is divided into two parts: the fast phase, which occurs within a second is labeled OJIP as shown in Figure 1, where O is the origin, P is the peak, and the two intermediate states are J-I [33]. This phase can be divided into two sub-phases;

(1) the photochemical phase that consists of O-J, and is directly dependant on the intensity of the excitation light; and (2) the nonphotochemical phase that consists of the J-I-P transient and is dominated by mechanisms for the excitation-dependent thermal dissipation of energy from PSII [37,38].

**Figure 1.** Chlorophyll *a* fluorescence induction transient, wavelength of excitation 650 nm and (1) 32 and (2) 3,200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the leaf surface respectively (modified from [33]).



In this part, the main characteristics of the OJIP curve are described. Due to the fact that  $F_O$  and  $F_M$  are the most common parameters, these can be translated to O and P, respectively. In normal non-stressed plant leaves, the ratio of  $F_M/F_O$  is a constant high value [39]. There is another parameter called the variable fluorescence,  $F_V$ , which is the difference between  $F_M$  and  $F_O$  as shown in Equation (1). The ratio shown in Equation (2) is related to the maximum quantum yields of primary PSII photochemistry [37,40,41]. The relative variable fluorescence,  $V(t)$  at time  $t$  is a parameter frequently used in graphical representations of fluorescence inductions data, as stated in Equation (3). This is a double normalization of the fluorescence induction curve that permits a comparison of fluorescence transient measured under different conditions and/or within different samples:

$$F_V = F_M - F_O \quad (1)$$

$$\phi_{Po} = \frac{F_V}{F_M} = 1 - \frac{F_O}{F_M} \quad (2)$$

$$V(t) = \frac{(F(t) - F_O)}{(F_M - F_O)} \quad (3)$$

The above processes are applied to photosynthetic samples that have been kept in darkness, but, for samples that are kept in light, there are variants of this analysis. These measurements are commonly made during the decrease stage of fluorescence induction, utilizing a pulse of intense light between P and S time intervals as is highlighted in Figure 1. This leads to a transient increase of the fluorescence to a maximum value that, for the samples kept in light, this is called  $F'_M$ . This is usually lower than the  $F_M$  measured in dark-adapted samples. This decrease of maximum fluorescence during the slow phase of fluorescence induction is attributed to the non-photochemical process [42]. Similarly, the  $F_O$  value

of the sample kept in light is labeled as  $F'_O$ , being slightly different [43]. Nevertheless, the change is small enough to be negligible and it can be assumed that  $F_O = F'_O$ .

To calculate the non-photochemical quenching of samples kept in light, the expression in Equation (4), is used [44]. As has been observed, it is not necessary to differentiate the  $F_O$  and  $F'_O$  values. However, it is noted that  $F'_M$  is affected by photochemical quenching too. There are definitive results with samples that had been kept in darkness, and these can serve as reference for the normalization of data obtained from samples that have been kept in light. In such cases the formula for non-photochemical quenching is Equation (5). Taking into consideration that  $F'_O = F_O$ , the non-photochemical quenching formula for light-kept samples becomes Equation (6), whereas the photochemical quenching formula for light-kept samples is expressed as Equation (7). It must be taken into account that  $q_N$  and  $q_P$  are not two complementary terms, meaning that  $q_N$  and  $q_P$  are not equal to one [33]:

$$\frac{(F_M - F'_M)}{F'_M} \quad (4)$$

$$q_N = 1 - \frac{(F'_M - F'_O)}{(F_M - F_O)} \quad (5)$$

$$q_N = \frac{(F_M - F'_M)}{(F_M - F_O)} \quad (6)$$

$$q_P = 1 - \frac{(F'_M - F(t))}{(F'_M - F'_O)} \quad (7)$$

To begin with, the first instrumentation systems for chlorophyll fluorescence measurement evolved slowly. This happened because there was not much variety in the electronic devices available to develop these instruments, limiting possible research projects for lack of suitable technology. For example, in earlier tests, quartz fluorescence tubes with lens, prisms and photoelectric cells had to be used to acquire the fluorescence response. Today, far more advanced instrumentation and new technologies are available in order to provide a light source for this procedure.

### 3. Instrumentation in Chlorophyll Fluorescence

Most applications of chlorophyll fluorescence are focused on herbaceous plants, as these represent the main part of agricultural production. There are many kinds of measurements for monitoring plant variables, but these methods always attempt to be less invasive; that is, to make the measurements without causing damage and with a minimum amount of stress to the plant. This is why the chlorophyll fluorescence method is so successful. The instrumentation methods used to carry this out are thought to be the least invasive possible, even when the measurements are made in the laboratory.

The complete methodology to measure chlorophyll fluorescence is shown in Figure 2. First, it is necessary to prepare the sample to be measured. For example, if the measurement is carried out in dark-adapted conditions, the sample must be put inside a light isolation chamber to avoid ambient light interference. Sometimes, microorganisms need pre-treatments to improve the measurement and avoid stress conditions. The next step is the development of system instrumentation, using lamps, LEDs,



lasers, among others as excitation light source on active methods. However, there are passive methods which utilize only sunlight. This can be an advantage when the designer wants to save on light source devices, but it commonly requires more processing capabilities. The next stage consists of designing and selecting the proper optical detection devices, to obtain the fluorescence response from the previously excited sample for subsequent data storage and analysis. Later, it is necessary to process the response by applying signal processing techniques and displaying data in order to analyze the conditions of the sample.

**Figure 2.** Stages of chlorophyll fluorescence measurement process.

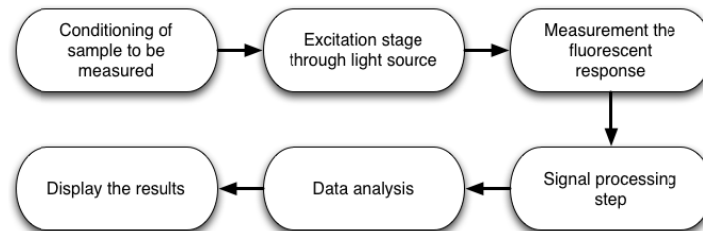
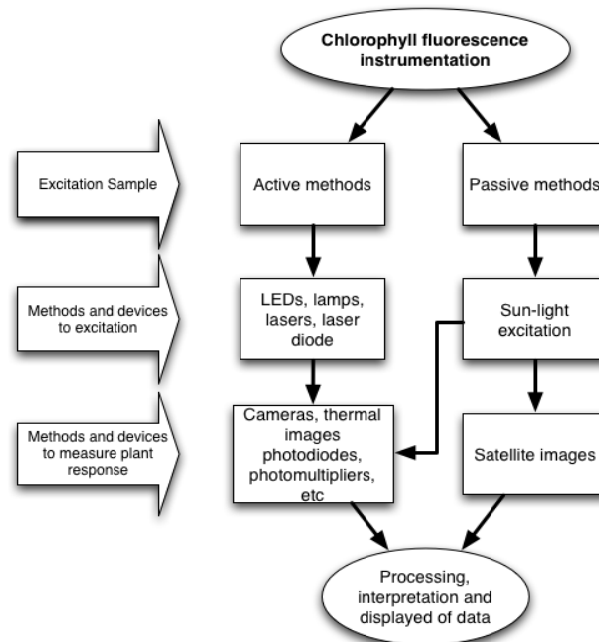


Figure 3 shows two possible ways to perform the measurement process. Active methods are those in which excitation light is provided by electronic devices such as LEDs, lamps, lasers, laser diodes, *etc.* On the other hand, passive methods, utilize only the sunlight energy as an excitation source. Furthermore, there are different ways to obtain the fluorescence response, depending on the excitation method and sample conditions. This can be achieved by using photodetector devices such as, cameras, photodiodes, photomultipliers, among others. It is necessary to process the collected data in order to obtain the chlorophyll fluorescence response to perform a proper interpretation and display results.

**Figure 3.** Chlorophyll fluorescence measurement routes by excitation source.



### 3.1. Light Sources for Excitation of Chlorophyll

As mentioned before, chloroplasts are very sensitive to stress. Consequently, the instrumentation applied to the plant for chlorophyll excitation should affect as little of the plant as possible. The first objective of study is the excitation light source. Correct selection is critical. First, taking into consideration the stress it is inflicting on the study subject, and second, the kinds of energy being emitted by the light source. It is well known that light sources are not very efficient devices, and often waste too much energy on others types of radiations, such as heat. The chlorophyll needs high light intensity to be activated and submit a response, and herein lays the problem. If the light source is intense, this could cause a harmful increase in temperature, especially when the subject is isolated via a dark chamber [6,18,22].

An appropriate light source must be selected. The first consideration for any light source is a lamp; yet, common lamps emit light primarily through filaments, which are low-efficiency devices due to the wasted energy in the form of heat and infrared emissions. Nevertheless, some kinds of lamps are widely used for plant growth. For example, high-pressure sodium lamps likes GroLux [17] do not use filament, but instead function through the excitation of the gas inside them. However, this type of lamp, like the filament lamp, emits heat that can cause stress to the plant; consequently, causing a disruption in the sample measurement.

New and more efficient alternatives for lighting are constantly being generated; one of the most current is the *Light Emitter Diode* (LED). The LED commonly takes up less space, generates less heat, and has a higher efficiency. This technology is being used regularly as a chlorophyll fluorescence source [6,9,20–25].

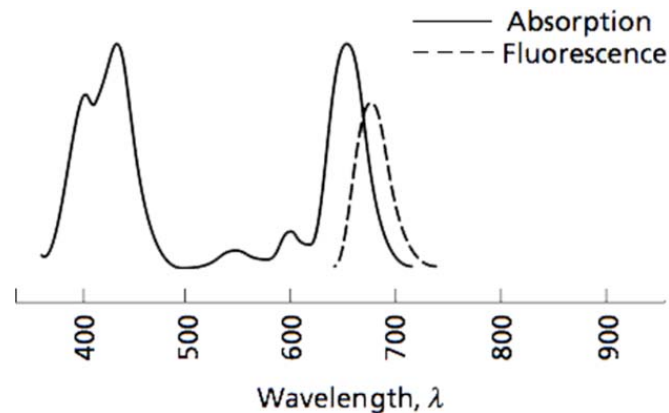
Some applications do not need to excite the entire subject, only a small part of it. In these cases lasers or laser diodes are an excellent choice, taking advantage of their special characteristic of emitting coherent light. This means that all of the electromagnetic waves emitted by the laser are pointed in a single direction. In contrast to what occurs with a common lamp where the emissions are dispatched in all directions, also referred to as omnidirectional. The coherent light emitted by these devices is quite a handy feature because a considerable amount of energy can be directed to a small area. This can cut down on the amount of necessary devices, and in some cases even lower costs. Also, these are a good choice for implementing portable chlorophyll fluorescence sensing systems. Such positive attributes are what makes the laser a frequently used device in these applications [16].

Another important factor to consider for the application of chlorophyll excitation is the wavelength. It is critical to choose the correct excitation wavelength to get the expected response. It is common knowledge that chlorophyll absorbs blue and red wavelengths, but reflects green, which is why the human eyes perceive plants in this hue [1]. The chlorophyll absorption zone on the electromagnetic spectrum and its fluorescence wavelength response are shown in Figure 4. Despite this standard, each chlorophyll excitation application uses a specific wavelength. This is because depending on what intensity or spectrum is the excitation source, the subject will have a different response.

Regarding the correct choice of wavelength, different selections are considered depending on the applications or electronic devices that were used in carrying out the experiment. This is based on the fact that the fluorescence of the plant is a re-emitting process of the absorbed photons with increased wavelength [1]. For example, for a plant that absorbs light in the blue (440 nm) and red (660 nm)

wavelengths the chlorophyll fluorescence will manifest as a red and infrared wavelength approximately 700 nm. This happens because energy is lost through heat, as seen in Figure 4.

**Figure 4.** Light absorption and emission by chlorophyll (modified from [1]).



Depending on the target applications, researchers select different wavelengths for excitation, as well as the appropriate light source, to carry out the fluorescence measurement. Table 1, shows a revision of the wavelengths utilized to excite samples, via various chlorophyll fluorescence sensing systems. Most are in the range from the ultra-violet to infrared.

**Table 1.** Wavelength use rate in chlorophyll sample excitation.

Wavelength (nm)	365	375	400	450	460	470	477	520	528	454	580	600	628	630	640	650	655	660	665	700	740
Use rate	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	2	1	1	1

### 3.2. Detection Devices for Chlorophyll Fluorescence

After the proper selection of chlorophyll excitation light-emitting devices and wavelengths, the second step is to have a way of identifying the response of the excited plant. This is achieved through different methods or sensing devices, depending on the system's design. For example, sometimes when an isolation chamber is used, optical fibers may be needed to convey the plant response to be processed outside of the chamber [14,22,24]. Photodiodes are widely used in these applications, often because they have both a good response time and are low-cost optical sensing devices along with other options for detecting the fluorescence (e.g., photomultipliers, thermal cameras, interferometry, *etc.*). As was aforementioned, photomultipliers are also used [45,46]. These are optical detectors like photodiodes, but with a base of vacuum tubes, and are particularly sensitive to low radiation.

However, the fluorescent response is not always acquired and processed as a one-dimensional signal. On many occasions image processing is also applied, and this is where the use of cameras comes in [19,26]. Generally, researchers tend to be more familiar with cameras as the sensing devices, because it is easy to understand how cameras can capture the response of the excited plant, not only on the visible spectrum but also through thermal imaging. It is possible that the use of thermal imaging is not taking fluorescence into account, only the temperature of the plant. But one must remember that

visible light makes up just a small part of the electromagnetic spectrum, and that thermal emissions are located just below the visible, in the infrared spectrum. Taking this into account, thermal cameras are just as common and necessary as those that process visible light, the only difference being that they exhibit greater sensitivity to longer wavelengths.

The application of cameras in this field sometimes has different objectives than those of two-dimensional imaging. For instance, there are camera-based applications that can be used in the quality-control area, such as the research carried out by Lefcourt *et al.* in 2005 [30]. In this study, special filters and edge detections were found to be able to detect when a fruit, in this case a red-delicious apple, was contaminated by fecal waste. In other cases, camera application can be used to detect pathogens even when there are no symptoms visible to the human eye.

Image processing for chlorophyll fluorescence is not only used for small-subject analysis; it is also widely applied for large-scale analysis, as in cases where it is necessary to analyze the fluorescence of high plants, or even large sets of plants, via satellite imaging.

#### 4. Measurement Methods for High Plants

It tends to be more difficult to make measurements for high plants, or in other words trees, because they are less manageable than herbaceous plants for either laboratory or field measurements. Therefore, it is sometimes impossible to use the aforementioned techniques for this type of procedure.

This section of the review will focus on the techniques that differ from those used for herbaceous plants. However, it is important to note that some of the chlorophyll fluorescence sensing systems are used in a similar fashion, especially with commercial products such as PEA Hansatech Instruments Ltd., which is used in applications with high as well as herbaceous plants [10].

Some of the methods used in chlorophyll excitation are called passive since they do not use an excitation device, the only excitation source employed being natural sunlight. This can lead to problems, since most of the active measurements are performed under controlled conditions; for example, the sample isolation chamber used in many laboratory measurements. However, when using the sun as a source of chlorophyll excitation the main problem lies in the photon emission response from the plant. This is below that which is emitted by the sun, less 1% [28].

To perform these types of measurements with environmental noise present, different methods have been developed to combat solar interference and obtain an accurate response from the plant. One way to solve this problem is through Fraunhofer lines. This technique is based on the capacity of gases in the atmosphere to absorb certain wavelengths. This means that band-reject filters can be used in such a manner that when determined by the incursion of gas, they can suppress an absorbed wavelength [13,28,47].

This technique can exploit oxygen capability by suppressing the 688 nm and 760 nm wavelengths, which is the bandwidth where chlorophyll fluorescence occurs [11]. Through the suppression of these wavelengths the fluorescence emitted by the plant can be viewed in order to make measurements.

Another way to make measurements on high plants is through the use of satellite [48] or airborne images [49], sometimes even both [50]. In contrast to ground applications, the estimation of chlorophyll fluorescence from air or space-borne sensors complicates the results. Consequently, the chlorophyll fluorescence, which is emitted by plants, needs to be separated from the reflected light by the sample

and the atmosphere path radiance conditions, which creates accuracy problems on the sensor [29]. These techniques, due to their nature, are applied to large numbers of subjects at the same time, even on a global level. Because a single subject emitting chlorophyll fluorescence is negligible using this method, such techniques can be used for large-scale environmental and ecological analysis. They can also be used for the analysis of photosynthesis in primary sector production, because it is well known that these variables are highly related. The methods of chlorophyll excitation for these applications are always passive, due to the nature of their collective analysis.

## 5. Measurement Methods for Micro Organisms

There are other applications of this process contrasting greatly with the mega-analysis methods covered in the previous section; these processes focus on analyzing microorganisms such as phytoplankton, algae, and bacteria. Method-wise, however, these procedures are not significantly different since photosynthetic reactions occur at a cellular level. Some of the commercial tools used to make the fluorescence measurements are actually used in both whole plants and unicellular organisms [50–53].

Despite the similarities in the chlorophyll excitation process and fluorescence response acquisition in both single cells and whole plants, a serious factor to consider is that the manipulation of samples changes noted for microorganisms, as compared to leaf-level measurements. Single-cell samples need special consideration and complex treatment. For example, there is a custom spectrometer modified to carry out measurement of the delayed fluorescence spectra of *Chlorella vulgaris* [52]. In conjunction with the commercial PAM-2000, it is possible to measure the efficiency of photochemical energy conversion in PSII reaction centers in microorganism samples [43].

Another sample type with similar features is algae. One specific case, in an experiment carried out by Drinovec in 2011 [54], the delayed fluorescence excitation spectra were measured with a custom-built delayed fluorescence spectrometer. The excitation was performed by halogen lamp and linear filter, while light was detected with a Perkin Elmer C1393 channel photomultiplier in photon-counting mode, assisted by two electromagnetic shutters used to protect the photomultiplier from the excitation light. This is because, as was aforementioned, the photomultiplier is a highly sensitive device and is subsequently used in lower light conditions.

Cyanobacteria are another type of microorganism capable of being analyzed via these methods. Cyanobacteria are thought, evolutionarily speaking, to be among the oldest organisms; they can perform oxygenic photosynthesis and respiration simultaneously, and many species are able to fix nitrogen. Within cyanobacteria similar conditions can be found and reactions such as those found in plants; for example, stress caused by heavy metal effects. These kinds of stress conditions can be detected by the previously detailed commercial methods, but these need to have been previously modified for this application. The container, especially, is different in this context. A cuvette equipped with sensors, such as piezoelectric transducers attached to its wall, usually serves as a detection system [53].

Wavelengths for chlorophyll excitation and subsequent fluorescence responses are not much different in analysis, between plants and microorganisms. However, it is necessary to perform tests to determine the most appropriate wavelength to use with any appliance, because the fluorescence excitation spectrum of fluorescence depends on the various cell pigments [52]. It is even possible to

take advantage of this situation, since samples in different taxonomic groups can be discriminated using delayed fluorescence spectroscopy by applying a sweep of wavelength, for example in a range between 400 nm and 700 nm [53].

## 6. Chlorophyll Fluorescence Signal Processing and Drivers

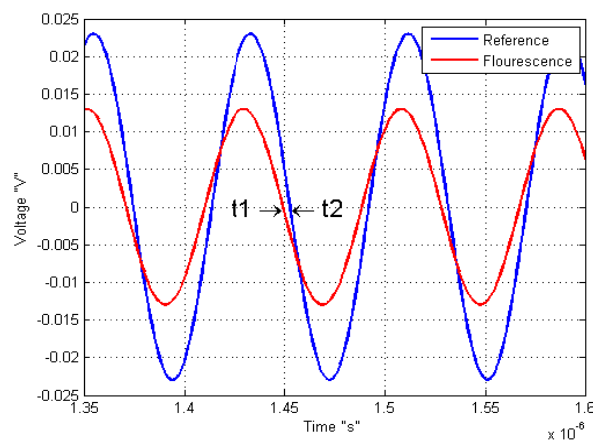
In this review the methods and electronic devices to elicit the chlorophyll fluorescence as well as the measurement of the response have been analyzed. Nevertheless, none of these are functional without data or signal processing, with the overall goal of estimating the condition or characteristics of the sample being measured.

Some equipment just displays the fluorescence behavior graphs and the operator is responsible for interpreting those graphs. Yet, other equipment is able to process information to show clear results such as photochemical and non-photochemical quenching. Depending on the pretreatment of the sample, the formula is selected like light-adapted or dark-adapted quenching [33].

Commercial equipment, generally known as PAM, functions with a Pulse Amplitude Modulated and operates without isolation chambers, which means that it is susceptible to environmental noise. In these cases, it is necessary to separate the fluorescent plant response in sunlight from fluorescence caused by chlorophyll excitation device. This is achieved by the pulse modulation of light source device, which induces a pulsed chlorophyll fluorescence signal form, the sample within conditions where ambient light is excluded with the assistance of optical filters permitting only three types of light signals: ambient light, non-pulsed fluorescence signal induced by the ambient light, and pulsed fluorescence signal induced by the modulation light source. It is noteworthy that this process is an active method, because the source light is different from the sun.

Another example of modified light source is used by Kissinger and Wilson on 2011, where they connected an oscillator to vary the LED source, with the objective to know the response of the sample by a sine-modulated excitation. This means that the phase difference between the reference or signal excitation and the output signal of the sample response indicates the fluorescence lifetime response as shown on Figure 5.

**Figure 5.** Sine waveform of light source chlorophyll excitation with a fluorescent response (Modified of [21]).



There are a variety of commercial or custom instruments to measure fluorescence, all of these aim to be less expensive and more accurate than other complex and inefficient methods. The fluorescence measurement has many advantages compared with other photosynthesis measurement methods. Chlorophyll fluorescence has the advantages of low energy consumption, fast measurement process, portability, lower cost, to name but a few when it is compared with carbon dioxide exchange method.

## 7. Main Applications of Chlorophyll Fluorescence

Chlorophyll fluorescence is a defense mechanism or excess energy dissipation performed by the subject [33] that is highly linked to the photosynthetic process. Consequently, it is one of the main applications used to estimate the photosynthesis level. Considering photosynthesis maintains autotrophic life, it is imperative to seek new alternatives for its measurement estimations. Chlorophyll fluorescence is one of them.

The main reason behind of these chlorophyll fluorescence sensing systems is to determine the comfort status of the plant, which gives one an idea of how productive the plant will become. However, these comfort conditions are not only reflected in the photosynthesis estimate, but also in the measurement of chlorophyll fluorescence. This means that it is not necessary to perform photosynthesis estimation procedures, because stress can also be detected through the sole use of chlorophyll fluorescence measurement. The quenching curves alone reflect several types of stress, including hydric or drought [55,56], frost damage [57], ozone [8], nutritional (such as boron) [15] and nitrogen [16,27,47].

There are other interesting features that can be detected by fluorescence as well; one being the amount of anthocyanins and flavonoids present in a subject. These can be detected by the surface skin fluorescence, as has been done with grapes [58]. Such uses are not as common as stress detection but are a good alternative to avoid destructive methods in these types of processes.

A method of identifying traces of feces in food was previously discussed. This takes advantage of the bacteria or plant remains found in feces, which are made to fluoresce. Through filters and image processing, the contaminating material can be detected. This can be applied to evaluate fruit washing methods, and therefore result in cleaner food without risk of disease [30]. As can readily be seen, the chlorophyll fluorescence method is a heavily exploited and is a useful tool in the areas of industry, agriculture, food, and research, including the area of global climate change.

## 8. Conclusions

The main advantage of chlorophyll fluorescence measurement is that it has the possibility of being a non-invasive technique. This differs from other stress-detection methods in which the measurement itself causes undue stress to the plant, which in turn can alter the resulting measurements. Based on these facts, many techniques for chlorophyll fluorescence measurement have been developed with the aim of improving comfort conditions for the plant and of obtaining increased production rates. However, these are not the only applications, because significant research on climate and environmental impact can also be carried out via chlorophyll fluorescence, which can be measured with the use of satellite images or manual methods. Due to various ecological problems, this is now more important than ever before.

Taking into account that electronic devices are constantly evolving and becoming more efficient, equipment to measure chlorophyll fluorescence will constantly improve; therefore, making smaller, more precise and more accurate measurements possible. However, there are many pathways to create new biosensors research. Therefore, this article review should be helpful in achieving a wide overview of state of the art investigations. For example, new methods and waveforms in the excitation light source could be utilized with the goal of finding new expressions in chlorophyll fluorescence response, and enhancing the methods of detecting bad conditions or problems in samples.

In modern fluorescence biosensing systems, it is necessary to perform the measurement in real time, with an optimal resolution and with portable biosensing systems. Furthermore, the aim is to improve the detection of stress conditions on plants of interest, as well as creating automated and easier measurement methods, in order to perform a large number of measurements at the same time without requiring highly qualified personnel. To carry out real-time measurement, it is necessary to design embedded sensor systems and reduce dependency on stationary and manual laboratory equipment.

However, none of these applications can be carried out without the appropriate instrumentation or equipment. As such, this review has been written with the goal of both widening general knowledge of these kinds of applications, and of providing the necessary information to develop novel and custom biosensors for chlorophyll fluorescence measurement.

### Acknowledgement

This project was partially supported by the CONACYT scholarship 226888 and the “Programa de Desarrollo e Innovación en Tecnologías Precursoras (PROINNOVA)”, by the program 20501059. The authors wish to thank Rebecca Baker and Silvia C. Stroet for English language editing. And finally, we wish to thank Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) for the academic support for this Ph. D. research.

### References

1. Taiz, L.; Zeiger, E. *Plant Physiology*, 5th ed.; Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA, 2002; pp. 111–192.
2. Long, S.P.; Humphries, S.; Falkowski, P.G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant. Mol. Biol.* **1994**, *45*, 633–662.
3. Losciale, P.; Hendrickson, L.; Grappadelli, L.C.; Chow, W.S. Quenching partitioning through light-modulated chlorophyll fluorescence: A quantitative analysis to assess the fate of the absorbed light in the field. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 73–79.
4. Zarco-Tejada, P.J.; Miller, J.R.; Mohammed, G.H.; Noland, T.L.; Sampson, P.H. Vegetation stress detection through chlorophyll a + b estimation and fluorescence effects on hyperspectral imagery. *J. Environ. Qual.* **2002**, *31*, 1433–1441.
5. Genty, B.; Briantais, J.M.; Baker, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *990*, 87–92.



6. Fedack, V.; Kytaev, O.; Klochan, P.; Romanov, V.; Voytovych, I. Portable Chronofluorometer for Express-Diagnostics of Photosynthesis. In *Proceedings of Intelligent Data Acquisition and Advanced Computing Systems: Technology and Applications*, Sofia, Bulgaria, 5–7 September 2005.
7. Espinosa-Calderon, A.; Torres-Pacheco, I.; Padilla-Medina, J.A.; Osornio-Rios, R.A.; Romero-Troncoso, R.J.; Villaseñor-Mora, V.; Rico-Garcia, E.; Guevara-Gonzalez, R.G. Description of photosynthesis measurement methods in green plants involving optical techniques, advantages and limitations. *Afr. J. Agric. Res.* **2011**, *12*, 2638–2647.
8. Bussotti, F.; Desotgiu, R.; Cascio, C.; Pollastrini, M.; Gravano, E.; Gerosa, G.; Marzuoli, R.; Nali, C.; Lorenzini, G.; Salvatori, E.; *et al.* Ozone stress in woody plants assessed with chlorophyll a fluorescence. A critical reassessment of existing data. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 19–30.
9. Faraloni, C.; Cutino, I.; Petruccelli, R.; Leva, A.R.; Lazzeri, S.; Torzillo, G. Chlorophyll fluorescence technique as a rapid tool for *in vitro* screening of olive cultivars (*Olea europaea* L.) tolerant to drought stress. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 49–56.
10. Mereu, S.; Gerosa, G.; Marzuoli, R.; Fusaro, L.; Salvatori, E.; Finco, A.; Spano, D.; Manes, F. Gas exchange and JIP-test parameters of two Mediterranean maquis species are affected by sea spray and ozone interaction. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 80–88.
11. Colls, J.J.; Hall, D.P. Application of a chlorophyll fluorescence sensor to detect chelate-induced metal stress in *Zea mays*. *Photosynthetica* **2004**, *42*, 139–145.
12. Contreras-Medina, L.M.; Torres-Pacheco, I.; Guevara-González, R.G.; Romero-Troncoso, R.J.; Terol-Villalobos, I.R.; Osornio-Rios, R.A. Mathematical modeling tendencies in plant pathology. *Afr. J. Agric. Res.* **2009**, *25*, 7399–7408.
13. Frankenberg, C.; Fisher, J.B.; Worden, J.; Badgley, G.; Saatchi, S.S.; Lee, J.E.; Toon, J.C.; Butz, A.; Jung, M.; Kuze, A.; *et al.* New global observations of the terrestrial carbon cycle from GOSAT: Patterns of plant fluorescence with gross primary productivity. *Geophys. Res. Lett.* **2011**, *38*, 1–6.
14. Piccotto, M.; Bidussi, M.; Tretiach, M. Effects of the urban environmental conditions on the chlorophyll a fluorescence emission in transplants of three ecologically distinct lichens. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 102–107.
15. Guidi, L.; Degl’Innocenti, E.; Carmassi, G.; Massa, D.; Pardossi, A. Effects of boron on leaf chlorophyll fluorescence of greenhouse tomato grown with saline water. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 57–63.
16. Thoren, D.; Schmidhalter, U. Nitrogen status and biomass determination of oilseed rape by laser-induced chlorophyll fluorescence. *Eur. J. Agron.* **2009**, *30*, 238–242.
17. Van Gaalen, K.E.; Flanagan, L.B.; Peddle, D.R. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and spectral reflectance in Sphagnum moss at varying water contents. *Oecologia* **2007**, *153*, 19–28.
18. Hideg, E.; Schreiber, U. Parallel assessment of ROS formation and photosynthesis in leaves by fluorescence imaging. *Photosynth. Res.* **2007**, *92*, 103–108.
19. Lichtenthaler, H.K.; Langsdorf, G.; Lenk, S.; Buschmann, S. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system. *Photosynthetica* **2005**, *43*, 355–369.

20. Johnson, X.; Vandystadt, G.; Bujaldon, S.; Wollman, F.A.; Dubois, R.; Roussel, P.; Alric, J.; Béal, D. A new setup for *in vivo* fluorescence imaging of photosynthetic activity. *Photosynth. Res.* **2009**, *102*, 85–93.
21. Kissinger, J.; Wilson, D. Portable fluorescence lifetime detection for chlorophyll analysis in marine environments. *IEEE Sens. J.* **2011**, *11*, 288–295.
22. Wang, J.; Xing, D.; Zhang, L.; Jia, L. A new principle photosynthesis capacity biosensor based on quantitative measurement of delayed fluorescence *in vivo*. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2861–2868.
23. Avercheva, O.V.; Berkovich, Y.A.; Erokhin, A.N.; Zhigalova, T.V.; Pogosyan, S.I.; Smolyanina, S.O. Growth and photosynthesis of chinese cabbage plants grown under light-emitting diode-based light source. *Russ. J. Plant. Phys.* **2009**, *56*, 14–21.
24. Bulgarea, G.; Boukadoum, M. A high-performance instrumentation system to measure the fluorescence kinetics of plants for *in vivo* photosynthesis research. *IEEE. T. Instrum. Meas.* **2001**, *50*, 679–689.
25. Ji, J.W.; Xu, M.H.; Li, Z.M. Research and application on chlorophyll fluorescence on-line monitoring technology. *Adv. Mat. Res.* **2010**, *139–141*, 2550–2555.
26. Kolber, Z.; Klimov, D.; Ananyev, G.; Rascher, U.; Berry, J.; Osmond, B. Measuring photosynthetic parameters at a distance: Laser induced fluorescence transient (LIFT) method for remote measurements of photosynthesis in terrestrial vegetation. *Photosynth. Res.* **2005**, *84*, 121–129.
27. Schächtl, J.; Huber, G.; Maidl, F.X.; Sticksel, E. Schulz, J.; Haschberger, P. Laser-induced chlorophyll fluorescence measurements for detecting the nitrogen status of wheat (*Triticum aestivum* L.) canopies. *Prescis. Agric.* **2005**, *6*, 143–156.
28. Liu, L.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhao, C. Detecting solar-induced chlorophyll fluorescence from field radiance spectra based on the fraunhofer line principle. *IEEE Trans. Geosci. Remote* **2005**, *43*, 827–832.
29. Meroni, M.; Rossini, M.; Guanter, L.; Alonso, L.; Rascher, U.; Colombo, R.; Moreno, J. Remote sensing of solar-induced chlorophyll fluorescence: Review of methods and applications. *Remote. Sens. Environ.* **2009**, *113*, 2037–2051.
30. Lefcourt, A.M.; Kim, M.S.; Chen, Y. A transportable fluorescence imaging system for detecting fecal contaminants. *Comput. Electron. Agric.* **2005**, *48*, 63–74.
31. Agati, G.; Cerovic, Z.G.; Pinelli, P.; Tattini, M. Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques. *Environ. Exp. Bot.* **2011**, *73*, 3–9.
32. Kautsky, H.; Hirsch, A. Neue versuche zur kohlenensäureassimilation. *Naturwissenschaften* **1931**, *19*, 964–964.
33. Stirbet, A.; Govindjee. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J. Photochem. Photobiol. B* **2011**, *104*, 236–257.
34. Lin, Z.; Liu, N.; Lin, G.; Pan, X.; Peng, C. Stress-induced alteration of chlorophyll fluorescence polarization and spectrum in leaves of *Alocasia macrorrhiza* L. Schott. *J. Fluoresc.* **2007**, *17*, 663–669.

35. Sun, Z.; Lee, H.; Matsubara, S.; Hope, A.B.; Pogson, B.J.; Hong, Y.; Chow, W.S. Photoprotection of residual functional photosystem II units that survive illumination in the absence of repair, and their critical role in subsequent recovery. *Physiol. Plant* **2006**, *128*, 415–424.
36. Hendrickson, L.; Förster, B.; Pogson, B.J.; Chow, W.S. A simple chlorophyll fluorescence parameter that correlates with the rate coefficient of photoinactivation of photosystem II. *Photosynth. Res.* **2005**, *84*, 43–49.
37. Campbell, D.; Hurry, V.; Clarke, A.K.; Gustafsson, P.; Öquist, G. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *68*, 667–683.
38. Buonasera, K.; Lambreva, M.; Rea, G.; Touloupakis, E.; Giardi, M.T. Technological applications of chlorophyll a fluorescence for the assessment of environmental pollutants. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *40*, 1139–1151.
39. Björkman, O.; Demmig, B. Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **1987**, *170*, 489–504.
40. Govindjee. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. *Aust. J. Plant Physiol.* **1995**, *22*, 131–160.
41. Govindjee. Chlorophyll A Fluorescence: A Bit of Basics and History. In *Chlorophyll a Fluorescence A Signature of Photosynthesis*; Springer: Berlin, Germany, 2004; Volume 19, pp. 1–42.
42. Krause, G.H.; Jahns, P. Non-Photochemical Energy Dissipation Determined by Chlorophyll Fluorescence Quenching: Characterization and Function. In *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis (Advances in Photosynthesis and Respiration)*; Papageorgiou, G.C., Govindjee, Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2004; pp. 463–495.
43. Bilger, W.; Schreiber, U. Energy-dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynth. Res.* **1986**, *10*, 303–308.
44. Bilger, W.; Björkman, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* **1990**, *25*, 173–185.
45. Bürling, K.; Hunsche, M.; Noga, G. Use of blue-green and chlorophyll fluorescence measurements for differentiation between nitrogen deficiency and pathogen infection in winter wheat. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168*, 1641–1648.
46. Hunsche, M.; Bürling, K.; Noga, G. Spectral and time-resolved fluorescence signature of four weed species as affected by selected herbicides. *Pestic. Biochem. Phys.* **2011**, *101*, 39–47.
47. Zhang, Y.; Liu, L.; Hou, M.; Liu, L.; Li, C. Progress in remote sensing of vegetation chlorophyll fluorescence. *J. Remote Sens.* **2009**, *13*, 971–978.
48. Xing, X.; Zhao, D.; Liu, Y.; Yang, J.; Xiu, P.; Wang, L. An overview of remote sensing of chlorophyll fluorescence. *Ocean Sci. J.* **2007**, *42*, 49–59.
49. Zarco-Tejada, P.J.; González-Dugo, V.; Berni, J.A.J. Fluorescence, temperature and narrow-band indices acquired from a UAV platform for water stress detection using a micro-hyperspectral imager and a thermal camera. *Remote Sens. Environ.* **2012**, *117*, 322–337.

50. Koponen, S.; Attila, J.; Pulliainen, J.; Kalliob, K.; Pyh lahti, T.; Lindfors, A.; Rasmus, K.; Hallikainen, M. A case study of airborne and satellite remote sensing of a spring bloom event in the Gulf of Finland. *Cont. Shelf Res.* **2007**, *27*, 228–244.
51. Kurzbaum, E.; Eckert, W.; Yacobi, Y.Z. Delayed fluorescence as a direct indicator of diurnal variation in quantum and radiant energy utilization efficiencies of phytoplankton. *Photosynthetica* **2007**, *45*, 562–567.
52. Kurzbaum, E.; Beer, S.; Eckert, W. Alterations in delayed and direct phytoplankton fluorescence in response to the diurnal light cycle. *Hydrobiologia* **2010**, *639*, 197–203.
53. Dudkowiak, A.; Olejarz, B.; Łukasiewicz, J.; Banaszek, J.; Sikora, J.; Wiktorowicz, K. Heavy metals effect on cyanobacteria *synechocystis aquatilis* study using absorption, fluorescence, flow cytometry, and photothermal measurements. *Int. J. Thermophys.* **2011**, *32*, 762–773.
54. Berden-Zrimec, M.; Drinovec, L.; Zrimec, A. Delayed Fluorescence. In *Developments in Applied, Chlorophyll Fluorescence in Aquatic Science: Methods and Applications*; Suggett, D.J., Pr sil, O., Borowitzka, M.A., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2010; Volume 4, pp. 293–309.
55. Komura, M.; Yamagishi, A.; Shibata, Y.; Iwasaki, I.; Itoh, S. Mechanism of strong quenching of photosystem II chlorophyll fluorescence under drought stress in a lichen, *Physciella melanclha*, studied by subpicosecond fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1797*, 331–338.
56. Rahbarian, R.; Khavari-Nejad, R.; Ganjeali, A.; Bagheri, A.; Najafi, F. Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer Arietinum* L.) genotypes. *Acta Biol. Crac. Bot.* **2011**, *53*, 47–56.
57. Rapacz, M.; Sasal, M.; Gut, M. Chlorophyll fluorescence-based studies of frost damage and the tolerance for cold-induced photoinhibition in freezing tolerance analysis of triticale (*×Triticosecale* Wittmack). *J. Agron. Crop Sci.* **2011**, *197*, 378–389.
58. Cerovic, Z.G.; Moise, N.; Agati, G.; Latouche, G.; Ghozlen, N.B.; Meyer, S. New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence. *J. Food. Compos. Anal.* **2008**, *21*, 650–654.

Article

## FPGA-Based Smart Sensor for Drought Stress Detection in Tomato Plants Using Novel Physiological Variables and Discrete Wavelet Transform

Carlos Duarte-Galvan <sup>1</sup>, Rene de J. Romero-Troncoso <sup>2</sup>, Irineo Torres-Pacheco <sup>1</sup>,  
Ramon G. Guevara-Gonzalez <sup>1</sup>, Arturo A. Fernandez-Jaramillo <sup>1</sup>, Luis M. Contreras-Medina <sup>1,2</sup>,  
Roberto V. Carrillo-Serrano <sup>3</sup> and Jesus R. Millan-Almaraz <sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> CA Ingeniería de Biosistemas, División de Investigación y Posgrado, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas s/n, Querétaro 76010, Qro., Mexico; E-Mails: cduarte20@alumnos.uaq.mx (C.D.-G.); irineo.torres@uaq.mx (I.T.-P.); ramon.guevara@uaq.mx (R.G.G.-G.); aafernandez@hspdigital.org (A.A.F.-J.); mcontreras@hspdigital.org (L.M.C.-M.)

<sup>2</sup> HSPdigital-CA Telemática, DICIS, Universidad de Guanajuato, Carr. Salamanca-Valle km 3.5+1.8, Palo Blanco, Salamanca 36885, Gto, Mexico; E-Mail: troncoso@hspdigital.org

<sup>3</sup> División de Investigación y Posgrado, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas s/n, Querétaro 76010, Qro., Mexico; E-Mail: roberto.carrillo@uaq.mx

<sup>4</sup> Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. De las Américas y Blvd. Universitario, Cd. Universitaria, Culiacán 80000, Sinaloa, Mexico

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jrmillan@uas.edu.mx; Tel.: +52-667-716-1154 (ext. 117).

External Editor: Gonzalo Pajares Martinsanz

Received: 18 June 2014; in revised form: 9 September 2014 / Accepted: 10 September 2014 /

Published: 9 October 2014

---

**Abstract:** Soil drought represents one of the most dangerous stresses for plants. It impacts the yield and quality of crops, and if it remains undetected for a long time, the entire crop could be lost. However, for some plants a certain amount of drought stress improves specific characteristics. In such cases, a device capable of detecting and quantifying the impact of drought stress in plants is desirable. This article focuses on testing if the monitoring of physiological process through a gas exchange methodology provides enough information to detect drought stress conditions in plants. The experiment consists of using a set of smart sensors based on Field Programmable Gate Arrays (FPGAs) to monitor a

group of plants under controlled drought conditions. The main objective was to use different digital signal processing techniques such as the Discrete Wavelet Transform (DWT) to explore the response of plant physiological processes to drought. Also, an index-based methodology was utilized to compensate the spatial variation inside the greenhouse. As a result, differences between treatments were determined to be independent of climate variations inside the greenhouse. Finally, after using the DWT as digital filter, results demonstrated that the proposed system is capable to reject high frequency noise and to detect drought conditions.

**Keywords:** drought detection; smart sensor; transpiration dynamic; photosynthesis measurement; plant water stress monitoring

---

## 1. Introduction

Plant stress is any factor that promotes unfavorable growing conditions on plants. Soil drought is an environmental stress that affects crop productivity more than any other factor. Current monitoring devices for precision agriculture usually take into account climatic variables. However, it is desirable to have tools that provide information about plant health in order to explore responses under unfavorable conditions.

The main responses of plants under drought are photosynthetic dysfunction and overproduction of Reactive Oxygen Species (ROS) that are highly reactive and deteriorate the normal plant metabolism through oxidative damage of plant macromolecules [1]. These effects are cumulative; depend on the crop growth stage and the severity and frequency of the drought event. Fortunately, plants have several resistance mechanisms to survive under drought conditions; these range going from morphological to biochemical adaptations at subcellular, cellular, and organ level [2]. The disadvantage of such survival strategies is that they rely on limited plant development and low yield. However, the study of those mechanisms allows the development of strategies to increase drought tolerance without losing productivity, for example: crop varieties associated with high yield can be targeted in breeding programs to induce drought tolerance. Biotechnology research has made it possible to identify and change drought-responsive genes inducing some desired qualitative and quantitative traits. Finally, the exogenous application of plant growth regulators (PGR) have proven to enhance drought tolerance in plants [3]. Concluding, the impact of drought on agricultural practices and the requirements to maintain a constant improvement of drought resistant varieties makes the development of technological tools to detect and monitor drought in plants imperative.

Different methodologies have been proposed for early detection of drought stress in plants. The predominant tendency is to use thermography and hyperspectral vision [4]. Other methods use impedance, thermal or gas exchange principles. The thermography utilizes infrared thermometer sensors or thermal cameras to measure the canopy temperature ( $T_c$ ) and to define crop water stress indexes [5,6]. However,  $T_c$  measurement presents low resolution and it is susceptible to meteorological conditions and foliage geometric structure such as leaf angles [7]. On the other hand, hyperspectral analysis consists of monitoring changes in the chlorophyll fluorescence or in photochemical

reflectance. The problem with chlorophyll fluorescence analysis is that it requires a dark chamber to isolate a plant sample [8,9]. In this manner, the chlorophyll fluorescence response may occur as variations in magnitude or phase [4,10]. Monitoring reflectance has been applied to study entire crops; several wavelengths have been explored to find better responses and relations with current state of the crops. 705–750 nm was determined to be a suitable wavelength range to be used to explore plant response to water stress [11]. The aforementioned results have been supported by many researchers who have proposed different indexes to detect and even measure the effects of drought [12,13]. Though, the performance of hyperspectral imaging is critically affected by ambient illumination changes [11], it requires successive monitoring of plants [14], the image acquisition is complicated where drones or satellites are required [15,16].

Limitations to identify small variations in water stress could be solved using plant-based sensors. In this manner a simple sensor mounted on the leaf could measure variations in the temperature gradient according to the water content of the plant [17]. Electrical impedance spectroscopy is robust to environmental noise and has higher sensitivity than hyperspectral imaging; it has been proven to detect water stress, even environmental changes and nutrient deficit. However, additional studies are necessary to understand the environmental effects on plant impedance [18,19].

Gas exchange systems constitute the basis of most photosynthesis measurement tools. This consists of using Infrared Gas Analyzer (IRGA)-based carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) sensors to measure the difference between ambient CO<sub>2</sub> concentration and the concentration in a transparent chamber where a plant leaf is isolated [20]. These tools also estimate important phenomena such as transpiration and stomatal conductance [21,22]. Despite the fact that CO<sub>2</sub> exchange method is more sensitive than fluorescence techniques to environmental changes; a higher amount of information related to plant physiology can be obtained [23].

The objective of this article is the development of a novel smart sensor that performs a new signal processing methodology to minimize the noise in a photosynthesis measurement system which is based on CO<sub>2</sub> exchange method. Furthermore, the proposed system is utilized to detect and monitor the effects of soil drought in tomato plants. The signal processing methodology combines average decimation and Kalman filters to improve signal quality, and an additional filtering stage based on Discrete Wavelet Transform (DWT) to explore plants signal response. Therefore, short and long-term novel indexes were proposed to provide a set of information regarding the response of plants to drought.

The smart sensor was implemented in a FPGA due to its parallel computation capabilities and flexible configurability. It made possible to implement the aforementioned algorithms to calculate *in-situ* and in *real-time* the physiological processes of plants for decision making, data storing and off-line processing purposes. In order to validate the drought detection capabilities of the developed smart sensor, an experimental setup was carried out using tomato plants in a greenhouse. Because of this, three smart sensors controlled by a coordinator were installed to monitor specific groups of plants subjected to induced drought conditions. Finally, interesting relations between drought and plant physiological responses were obtained.

## 2. Background

### 2.1. Plant Transpiration, Photosynthesis Dynamics and Drought

Photosynthesis and transpiration are two of main physiological processes in plants. Photosynthesis is a process performed by plants and other organisms to convert light into chemical energy that can later be released to fuel the organism activities. More specifically, light energy drives the synthesis of carbohydrates from carbon dioxide and water with the generation of oxygen ( $O_2$ ). On the other hand, transpiration is an important component of temperature regulation because plants can dissipate the heat input from sunlight through phase exchange of water that escape into the atmosphere. This process controls the water movement through the plant and the evaporation from aerial parts, especially from the leaves [24]. Leaf surfaces contain pores called stomata; the aperture of these pores is conducted by guard cells. Through the stomata, plants exchange moisture with the atmosphere and permit the diffusion of  $CO_2$ ; transpiration also changes osmotic pressure of cells and enables the flow of mineral nutrients and water from roots to shoots. Since both processes share the same pathways, carbon assimilation carries a loss of water to the atmosphere through the stomata. Consequently, effects of drought over both physiological processes are closely related with parameters that have been previously stated [25].

Plant responses to soil drought can change according to the severity and frequency of the stress and the effects over physiological process does not occur immediately and linearly. Therefore, the severity of the stress and plant responses to drought can be summarized in three phases. Phase 1: Mild water stress. A reduction in transpiration is caused by a decline of stomatal conductance ( $g_s$ ) is presented [26]. However, the rate of net  $CO_2$  assimilation remains constant because stomatal closure inhibits transpiration more than it decreases intercellular  $CO_2$  concentrations. Even during early stages of drought stress, the plant increases its water-use efficiency. Phase 2: Moderate water stress. Here, a further decrease of  $g_s$  is accompanied by large decrease of mesophyll conductance ( $g_m$ ), and a small but significant decrease in photosynthetic activity appears [27]. Finally, in phase 3: Severe water stress. Stomatal conductance drops below its threshold value, the photosynthetic capacity is impaired, and a permanent damage of photosystems suggests that the leaves are enduring oxidative stress, senescence and remobilization of leaf nutrients [28]. At this point, the effects of drought are irreversible and are reflected in the net  $CO_2$  assimilation of the plant [29].

Plants response is often affected by different stress conditions. Because of this, monitoring of multiple plant related variables promises to be a more accurate tool to assess the real plant state. Furthermore, changes on stomatal conductance and transpiration are more specifically related to soil water content than leaf water content. Consequently, stomata related changes are far more significant than changes in net photosynthesis; that could be considered for early detection. However, drought stress eventually provokes irreversible damage in photosystems and plant efficiency which allows utilizing this variable as a long-term indicator, principally after water recovery.

### 2.2. Estimation of Plant Physiological Processes

As aforementioned, the basis of the gas exchange method for photosynthesis ( $P_n$ ) estimation involves a comparison between  $CO_2$  concentration in the atmosphere ( $C_i$ ) and  $CO_2$  concentration in the



leaf chamber ( $C_o$ ) where the plant sample is isolated. Additionally, it is necessary to estimate the mass flow rate per leaf area ( $W$ ) as stated in its equation in Table 1 [30]. Here,  $P$  is the atmospheric pressure in Bar,  $V$  is the volumetric air flow in liters per minute (lpm),  $T_aK$  is air temperature in Kelvin (K) and  $A$  is leaf area in  $\text{cm}^2$ . The 2005.39 constant is an adjusted coefficient to change mass units to mol, surface to  $\text{m}^2$  and time from minutes to seconds. In a similar manner, estimation of transpiration ( $E$ ) is performed, but in this case by measuring the  $\text{H}_2\text{O}$  vapor exchange. Other important processes such as stomatal conductance, vapor pressure deficit ( $VPD$ ) and leaf to air temperature difference ( $LATD$ ) can be estimated by using equations that have been previously stated by many authors and are summarized in Table 1 [22,25,31].

**Table 1.** Equations for the estimation of physiological processes of plants.

Variable	Equation	Unit of Measurement
Mass flow rate per area	$W = (2005.39) \frac{(V)(P)}{(T_aK)(A)}$	$\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$
Photosynthesis	$P_n = (W)(C_i - C_o)$	$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
Transpiration	$E = (W)(1000)(18.02) \frac{(e_o - e_i)}{(P - e_o)}$	$\text{mg}/\text{m}^2/\text{s}$
Stomatal conductance	$g_s = \frac{W}{\left( \frac{e_{leaf} - e_o}{e_o - e_i} \right) \left( \frac{P - e_o}{P} - r_b(W) \right)} (1000)$	$\text{mmol}/\text{m}^2/\text{s}$
Vapor pressure deficit	$VPD = e_s - e_i$	kPa
Leaf to air temperature difference	$LATD = T_a - T_{leaf}$	$^{\circ}\text{C}$

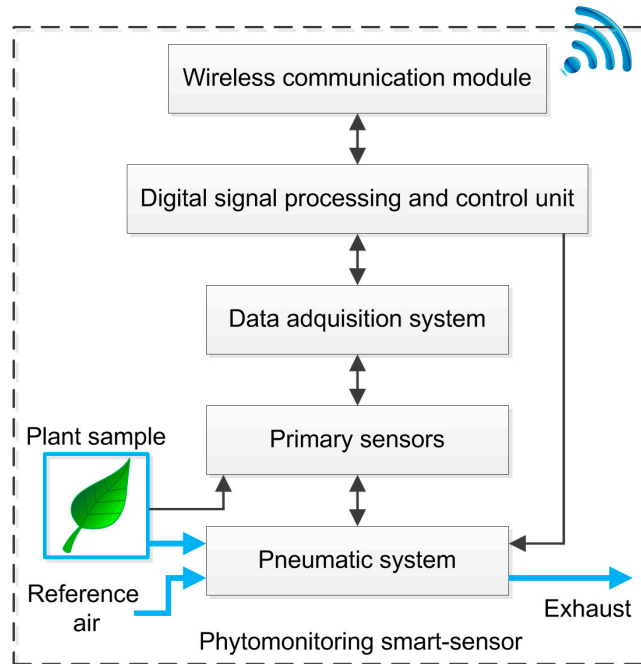
### 3. Smart Sensor

The proposed smart sensor fuses a water vapor and a  $\text{CO}_2$  gas exchange system into the same pneumatic line in order to estimate  $P_n$  and  $E$ . The system also estimates other phenomena such as  $g_s$ ,  $VPD$ , and  $LATD$ . Climatic variables such as solar radiation, temperature and relative humidity can also be monitored with the same hardware. As can be seen in Figure 1, five stages (black blocks) integrate the smart-sensor.

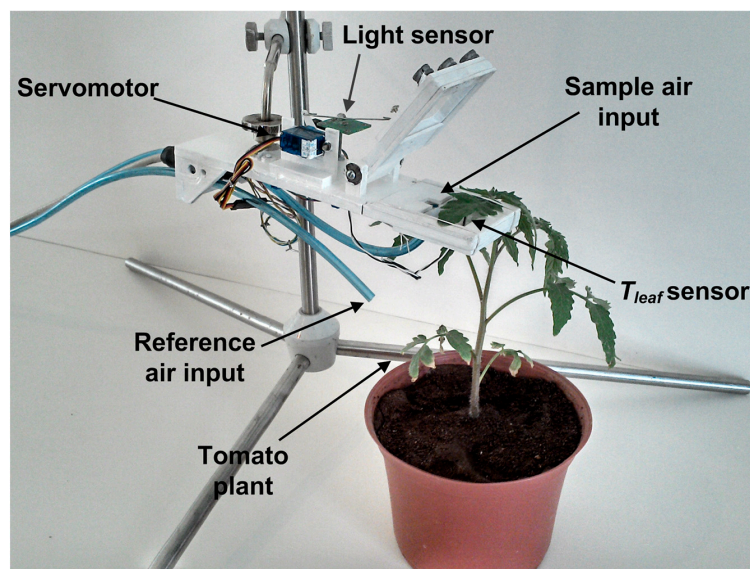
First, the pneumatic system uses a transparent acrylic chamber to isolate the plant sample; a set of electrovalves switching between the environment air reference or leaf chamber, and an air pump applies negative pressure in order to move air through the pneumatic system where the sensors are attached. The set of primary sensors are located in two places as can be seen in Figure 2. A Honeywell Pt1000 Resistance Temperature Detector (RTD) configured to measure in a range from 0 to  $65^{\circ}\text{C}$  with a measurement error of  $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$  is located in the leaf chamber, which has a suitable range to monitor leaf temperature of the plant on contact. Also, an OSRAM SFH5711 ambient solar radiation sensor with a 0 to 100,000 lux range and measurement error of  $\pm 0.04\%$  of its measured value is located near the plant sample, which is isolated in the leaf chamber. In the rest of the pneumatic system are attached a Sensirion SHT75 digital Micro Electro Mechanical System (MEMS)-based sensor that measures temperature and relative humidity ( $RH$ ) of air with a resolution of 14-bits for temperature and 12-bits for  $RH$  and measurement error of  $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$  and  $\pm 1.8\%$ , respectively. An OMRON DF6 MEMS-based flow sensor is used to monitor the volumetric flow of the pneumatic line; this sensor has a

measurement range of 0 to 5 lpm with measurement error of  $\pm 0.4\%$ . To monitor the atmospheric pressure, a Freescale Semiconductor MPX4115A absolute pressure sensor with a range of 15 to 115 kPa and a measurement error of  $\pm 1.5\%$  was utilized. Finally, in order to monitor the CO<sub>2</sub> concentration an Edinburgh Instruments Gascheck 2 IRGA based CO<sub>2</sub> sensor is required. The sensor has a measurement range of 0–3000 ppm with measurement error of  $\pm 30$  ppm.

**Figure 1.** Block diagram of the phytomonitoring smart-sensor.



**Figure 2.** Leaf chamber and sensors arrangement.



The signals of all primary sensors are standardized to a 0 to 5 V output format by using OpAmp-based modules. Then, each sensor reading is entered into the Data Acquisition System (DAS) through an analog front end, 2nd order anti-alias low pass filter with a cut-off frequency of 20 Hz. A 12-bit Analog to Digital Converter Texas Instruments ADS7844 sampled the previously filtered sensor signals. The ADS7844 communicates via SPI with the third stage, the Digital Signal Processing and Control Unit (DSPCU) which is embedded in a low-cost EP2C35F672C6 FPGA that manages the ADS7844 at 200 kg samples per second (ksps), and also communicates via a 2-wire serial interface with the digital SHT75 sensor. This FPGA-processor is also responsible for controlling the mechanism used in the pneumatic line. The aforementioned tasks are performed simultaneously because of the parallel capabilities of the FPGA. Moreover, this unit performs data filtering operations in order to improve the quality of signals. Finally, the DSPCU estimates and transmits the physiological processes together with environmental readings to a coordinator device by using a wireless communication module.

### Digital Signal Processing Techniques

Because the experiment is performed in a noisy environment where the greenhouse microclimate presents sudden changes due to the influence of external weather, two stages of signal processing units are embedded inside the FPGA in order to reduce the amount of noise in primary sensors readings. As is illustrated in Figure 3, previously the estimation of plant processes, the signals  $X(k)$  from the primary sensors pass through a 1024th order average decimation filter, where a single average sample reduced in quantization and undesirable noise is obtained every second. Furthermore, the oversampled versions of sensor readings  $X_{os}(k)$  are introduced into the Kalman filters to obtain new filtered signals  $X_{ost}(k)$  [32].

As can be seen in Figure 3, once all the  $X_{ost}(k)$  are calculated, the plant physiological process estimator computes  $P_n$ ,  $E$ ,  $g_s$ ,  $VPD$ , and  $LATD$  from primary sensors readings. In addition, the proposed smart sensor provides a new version of the aforementioned process, in which spatial variations induced for the solar radiation can be reduced by using the simple index expressed in Equation (1). Herein,  $X_{norm}(k)$  represents the normalized version of the signals  $P_n$ ,  $E$ ,  $g_s$ ,  $VDP$  or  $LATD$ . Meanwhile  $Rad_{norm}(k)$  is the normalized version of radiation, but considers the maximum  $Rad$  value from all nodes. Finally,  $X_{rad\_index}(k)$  is the index that relates the physiological process to the radiation at the time when the sample was acquired:

$$X_{rad\_index}(k) = \frac{X_{norm}(k)}{Rad_{norm}(k)} \quad (1)$$

Moreover, the plant physiological estimator unit calculates the first derivative of  $P_n'$ ,  $E'$ ,  $g_s'$ ,  $VPD'$ , and  $LATD'$  in order to explore phenomena involved in the changes of physiological activity. This task is performed by using a discrete derivative as described in Equation (2), which can easily be implemented in the FPGA. Herein,  $X'(k)$  can represent any of the physiological processes previously estimated:

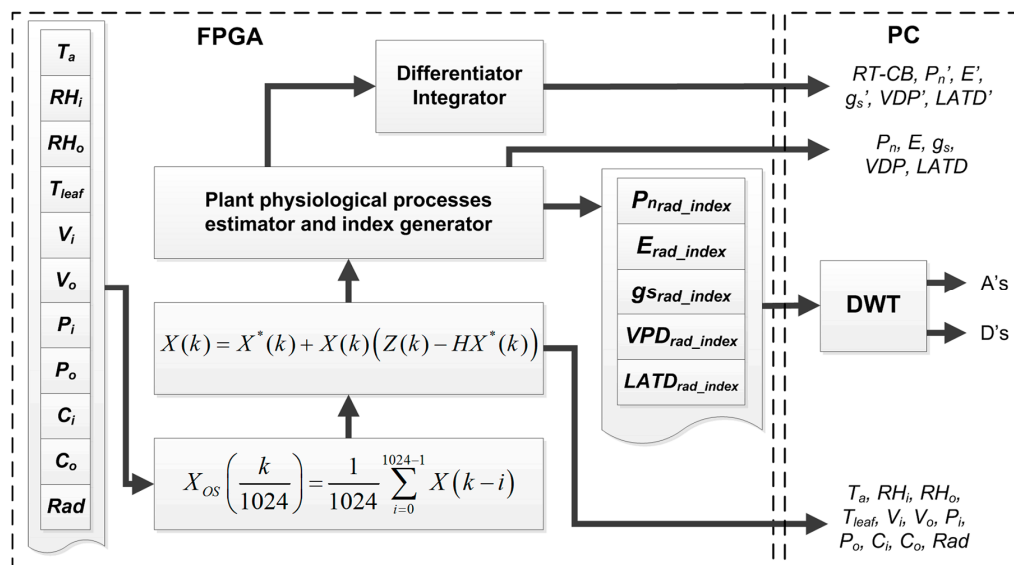
$$X'(k) = \frac{X(k) - X(k-1)}{T_s} \quad (2)$$

This unit also computes the Real Time-Carbon Balance (*RT-CB*), by integrating  $P_n$ , this index, as was previously reported in [22], describes the accumulation of carbon due to the photosynthesis activity. It is calculated by using Equation (3), which is the discrete time version of the integral:

$$RT - CB = T_s \sum_{k=0}^N P_n(k) \quad (3)$$

Furthermore, these signals are transmitted to a PC together with data from primary sensors to be stored and plotted. In addition, the PC performs a DWT to  $X_{rad\_index}(k)$  signals in order to explore the responses at different frequencies.

**Figure 3.** FPGA filtering stage and plant physiological estimator unit.



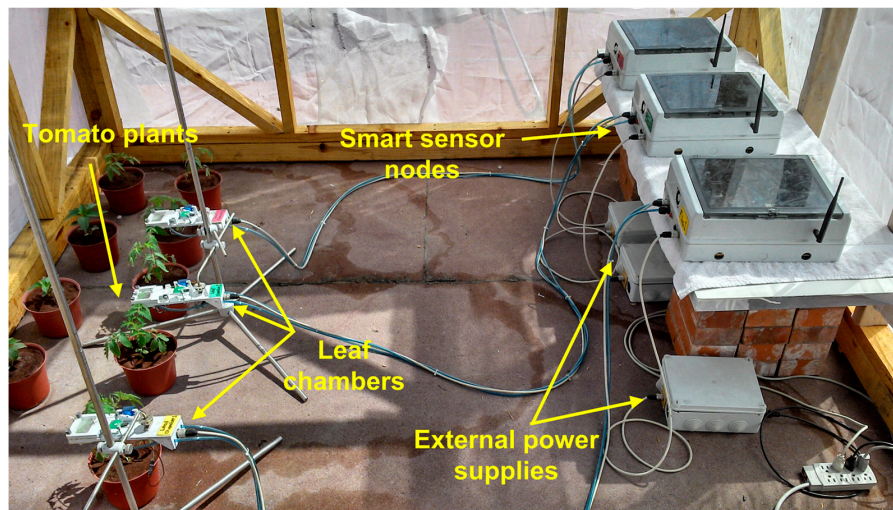
## 4. Experimentation and Results

### 4.1. Experimental Setup

The experiment illustrated in Figure 4 was conducted during 2013 in a research greenhouse located at an altitude of 54 m, in the Universidad Autonoma de Sinaloa, School of Biology, Culiacan Rosales, Sinaloa, Mexico (24°48'0"N, 107°23'0"W). The greenhouse was a single span arch type with 30 m<sup>2</sup> of ground, equipped with a commercial climate controller. The plants used for the experiment were single genotype tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) variety Raffaello; it is an indeterminate tomato appropriate for cultivation within greenhouse conditions and it is resistant to pests and diseases.

The variation factor in the experiment was the content of water in the soil at two levels: (a) The reference that represents plants irrigated at field capacity and (b) The drought treatment where the irrigation is recurrently suspended one day in order to reach water deficit in the soil. Three smart sensor nodes were used to measure the responses of plants to different irrigation levels. In addition, three tensiometers Irrometer model R were installed in the monitored plants in order to monitor the content of water in the soil. These sensors have a 0 to 100 kPa range with an accuracy rating of ±2%.

**Figure 4.** Experimental setup for smart sensors under real operating conditions.



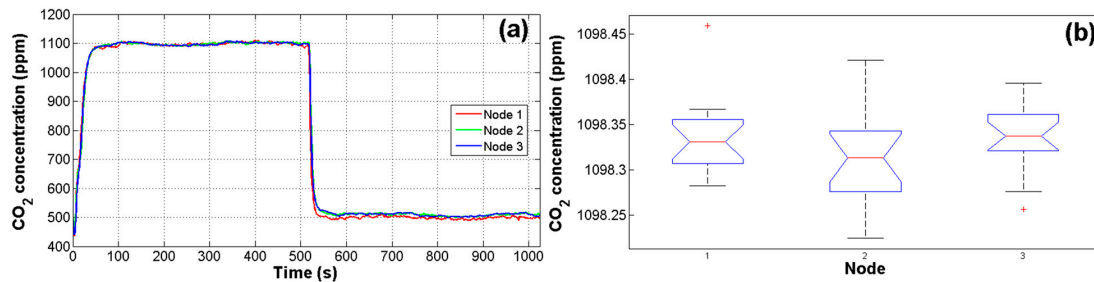
#### 4.2. Sample Preparation

The tomato plants were germinated and transplanted into two liters containers where the plants were grown in greenhouse conditions until they were an appropriate size to attach the sample in the leaf chambers. The substrate used was a volcanic stone called tezontle, screened to homogenize the particles diameter and ensure same soil conditions (apparent density of  $605 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ). In order to avoid other variation factors, all the plants were irrigated with Steiner solution at a concentration according to the plant growth stage. Finally, in order to obtain reliable responses between different plants, it was necessary to standardize a method to select the leaves that would be monitored. The selected leaves were located at the same height, not to low leaves because it is reported that they are the first to lose the photosynthetic activity due to aging, and not the top leaves because they are the last to respond to drought [33].

#### 4.3. In-Situ Node Adjustment and Validation

Due to the high noise in  $\text{CO}_2$  signals and the fact that reliability of estimations depends on measurements of primary sensors, a test was performed in order to assess the responses of the IRGA  $\text{CO}_2$  sensors using an 1100 ppm  $\text{CO}_2$  reference. As can be seen in Figure 5a, the first 512 samples correspond to the  $\text{CO}_2$  reference and the next 512 samples correspond to the inside air of the closed greenhouse without plants. This test was performed for 16 cycles for the three nodes. Finally, with the average of cycles, an ANOVA was carried out to evaluate the response of nodes. The value of alpha  $\alpha$  for this and other tests in this work was set to 0.05 (95% of confidence). The resulting  $p$ -value of the analysis was 0.2205, which is higher than 0.05 that represents the upper boundary considered for statistical differences between treatments [34]. In this manner, the resulting  $p$ -value represents no significant difference between node readings. As it can be observed in Figure 5b there are only two outlier data points in node 1 and 3. The means in the analysis were 1098.4, 1098.3, and 1098.3 ppm with standard deviations of 4.49, 4.31, and 4.67 ppm respectively for nodes 1, 2, and 3.

**Figure 5.** Validation test of IRGA CO<sub>2</sub> sensors. (a) 1 cycle monitoring with an 1100 ppm CO<sub>2</sub> reference; (b) Analysis of variance boxplot results.



#### 4.4. Filtering Results

Figure 6 illustrates improvements over signal quality after the filtering stages. In the Figure 6a (CO<sub>2</sub> concentration) the amount of noise presented on the CO<sub>2</sub> signal can be easily appreciated. Consequently, the estimation of photosynthesis showed in Figure 6b is too noisy. Furthermore, it can be observed that filtering stages have improved the overall signal quality of CO<sub>2</sub> concentration at Figure 6c and net photosynthesis in Figure 6d.

**Figure 6.** Digital filtering results over photosynthesis estimation. (a) Non-filtered CO<sub>2</sub> signal; (b)  $P_n$  estimation based on raw signals; (c) filtered CO<sub>2</sub> signal; and (d)  $P_n$  estimation based on filtered signals.

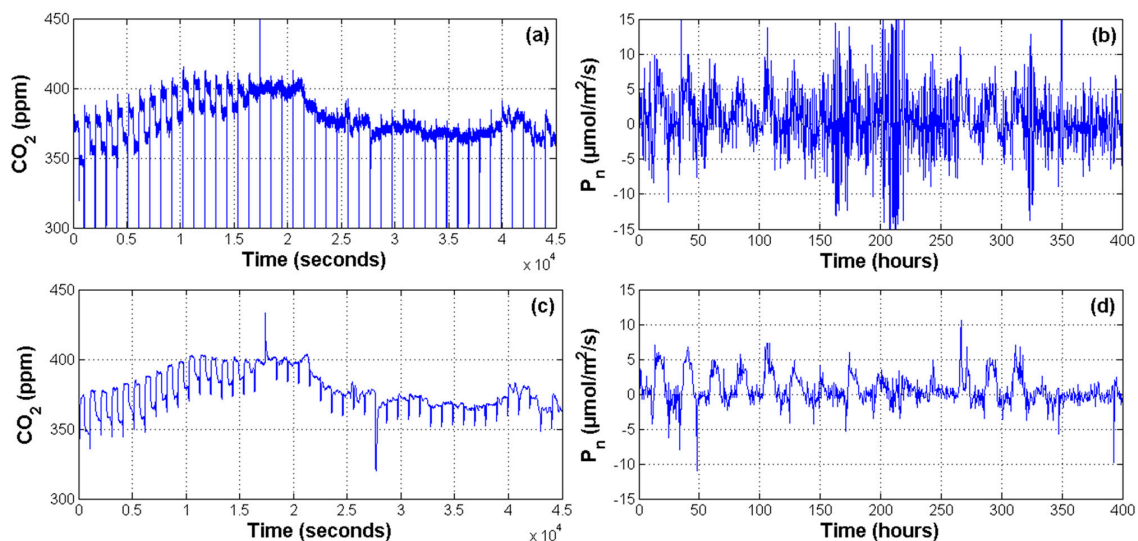


Figure 6 shows only the result of 1 node, but similar results were obtained for the other nodes of the network. In order to quantify how the filtered signals improved the estimation of physiological processes, a Pearson correlation between raw and filtered photosynthesis signals against radiation signal was conducted. Results presented in Table 2 suggest that the behavior of  $P_n$  when it was estimated with non-filtered signals do not correspond with the radiation pattern. In contrast, a better correlation between  $Rad$  and the  $P_n$  estimated with filtered signals was found. In Table 2,

photosynthesis with the subscript *osk* is the estimated one with filtered primary signals. The *R*-value shows the correlation weight while *p*-values below 0.05 confirm the existence of correlation between signals.

**Table 2.** Correlation analysis results for radiation against photosynthesis with and without filtering.

Variables	Photosynthesis–Radiation		Photosynthesis <sub>osk</sub> –Radiation	
	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
Node 1	0.0672	0.0515	0.5146	<0.0001
Node 2	0.2023	<0.0001	0.5307	<0.0001
Node 3	0.1027	0.0028	0.6557	<0.0001

#### 4.5. Environmental Signals

Because the experiment was carried out in a commercial greenhouse, spatial differences in the microclimate produced changes on physiological processes, even for plants undergoing the same water stress treatment. Then, it was necessary to monitor the microclimate related variables in order to understand these changes. Figure 7 illustrates the most important environmental variables monitored inside the greenhouse at three different locations. Figure 7a shows the readings for radiation during the entire experiment. This variable is noteworthy because it modifies the temperature (Figure 7b), *VPD* (Figure 7c) and *RH* (Figure 7d) of the air inside the greenhouse and therefore the transpiration rates of plants. Moreover, the photosynthesis is more sensitive to radiation than to any other factor.

**Figure 7.** WSN environmental readings inside the greenhouse at locations of Nodes 1, 2 and 3. (a) Solar radiation; (b) air temperature; (c) vapor pressure deficit; and (d) relative humidity.

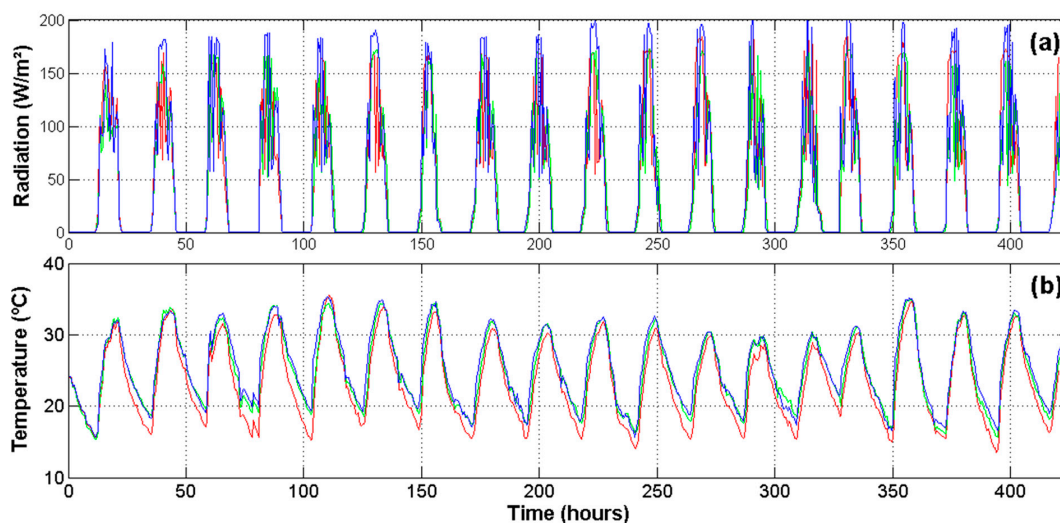
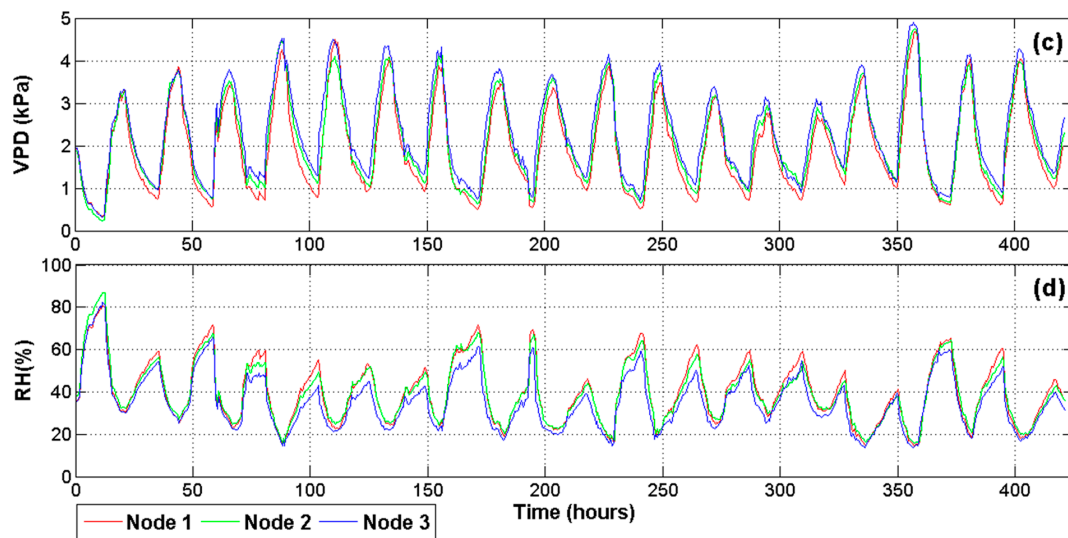
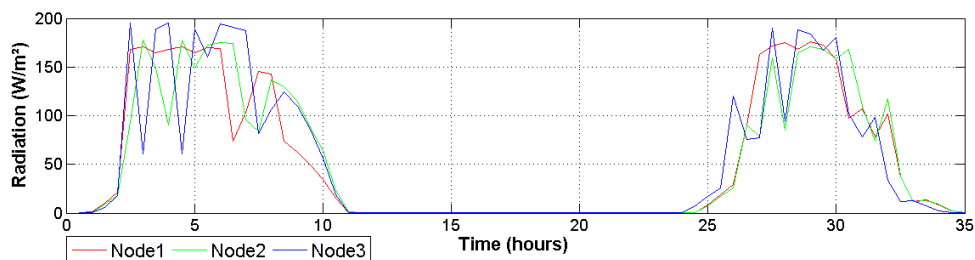


Figure 7. Cont.



Differences between node readings change throughout the day, but keep a relatively regular pattern in which node 3 registers a higher temperature and drier air conditions. As can be seen in Figure 8, this behavior is influenced by the total solar radiation received by this node. This figure illustrates how the greenhouse presents spatial variations provoked mainly by the structure geometry. This is important because it helps investigators to understand abrupt changes in transpiration and photosynthetic signals estimated by the system. Finally, it is important to note that received radiation was around  $175 \text{ W/m}^2$ , which is a suitable quantity to grow Raffaello variety of tomatoes [35].

Figure 8. Image zooms for two days of radiation.



#### 4.6. Physiological Signals

The methodology to induce drought stress was as follows: The first two days of monitoring were a stabilizing period in which plants were watered at field capacity (10 kPa); on day three, the irrigation was suspended so that two plants could reach 30–40 kPa soil drought conditions. Then, plants were rehydrated in order to avoid reaching permanent wilting point (PWP). After one rehydration day, the drought treatment began again. The experiment lasted 19 days. As is illustrated in Figure 9, red and green signals correspond to plants suffering from drought stress (SP1 and SP2 respectively). The reference plant (RP) that was continuously irrigated at 10 kPa is represented with the blue signal. The



light blue shadow indicates irrigation and light orange means water depletion. The brown arrows indicate irrigation interruption for the RP. After two days the irrigation was resumed, this is indicated by the blue arrows.

**Figure 9.** Physiological signals. (a) Photosynthesis; (b) transpiration; (c) stomatal conductance; and (d) leaf to air temperature difference.

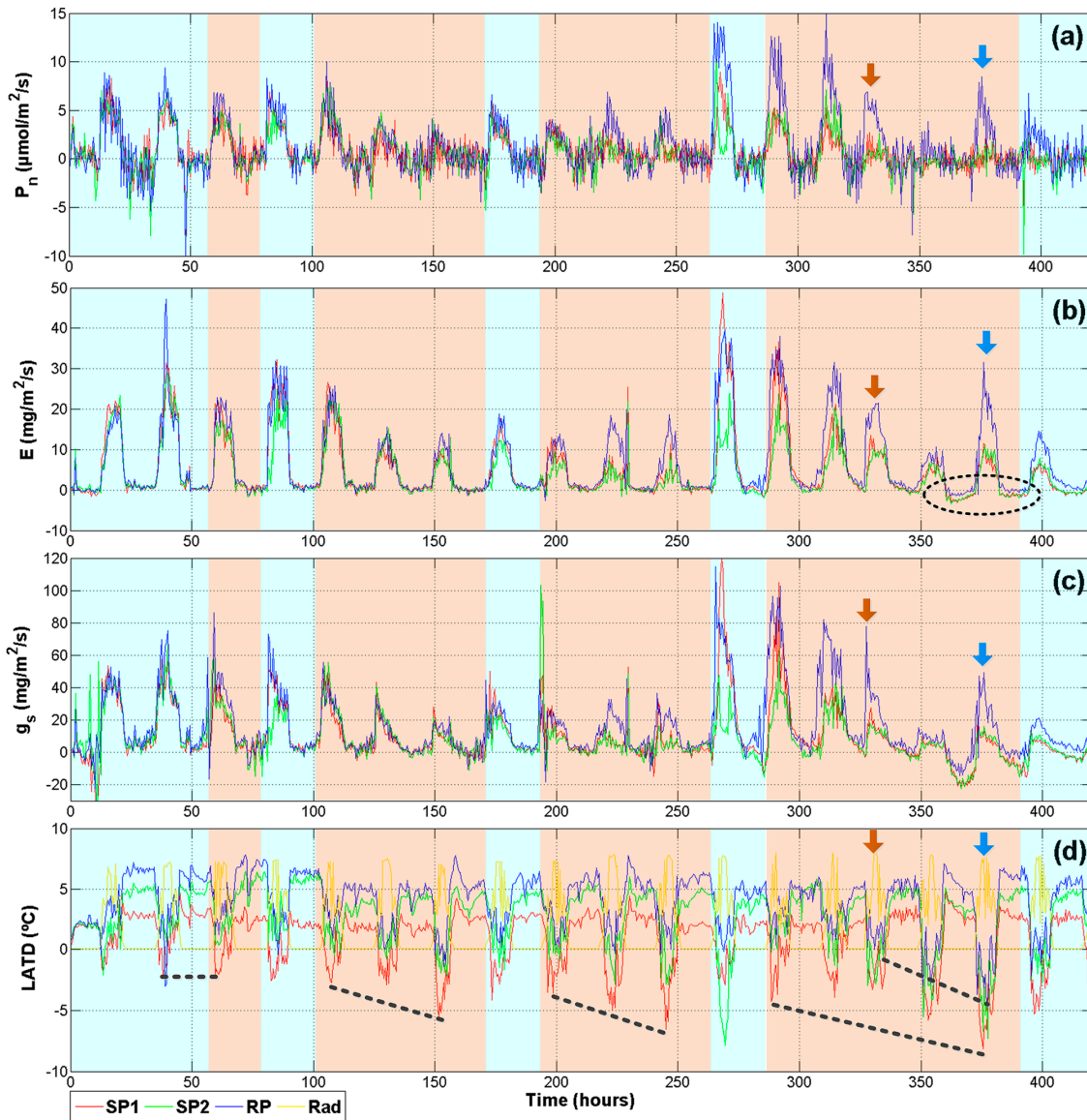


Figure 9 summarizes the physiological signals that provide more information related to plant status ( $P_n$ ,  $E$ ,  $g_s$ , and  $LATD$ ). As was expected, photosynthesis is not sensitive to early stages of drought. In Figure 9a, a difference between the RP and the treatments can be noticed only after three periods of stress near hour 225. Furthermore, after the fourth period of stress around hour 400, net photosynthetic activity for SP1 and SP2 was not recovered after being rehydrated. This behavior can be explained

because drought periods generate an accumulative oxidative stress in the leaves until damaging photosystem II in a permanent way by reactive oxygen species [2,36].

Transpiration results (Figure 9b) show an early response to treatments, especially in the second and third stages of stress. However, the most interesting behavior is at the end, enclosed by the dark ellipse, a low amplitude negative transpiration rate indicates that leaves are taking water vapor from the atmosphere instead of expelling it. This is a defense mechanism observed in plants under severe drought [37]. The stomatal conductance (Figure 9c) presents more marked differences as compared with  $P_n$ . Even in the first day of drought, SP1 and SP2 present a sudden drop in  $g_s$ . This is explained because the stomata closure and the decrease of  $g_s$  are the first defenses plants employ in order to reduce the amount of water loss through the stomata and it is related more to soil drought than leaf water status [2]. The higher decrease in the third stage of drought could be related to a decrease of  $g_m$  because the leaves are preparing for severe stress conditions.

The final graph (Figure 9d) illustrates the difference between air temperature and leaf temperature. Herein, a yellow line illustrates the day where the  $LADT$  must be zero or slightly positive. This is a normal behavior because in well-watered plants the  $T_{leaf}$  is cooler than  $T_a$ . However, if plants are under drought conditions, the  $T_{leaf}$  is higher than  $T_a$ . This tendency is clearly noticed in Figure 9d, where once the water depletion begins an increase in negative readings appears. This tendency is illustrated with the dashed black lines. Nevertheless, despite being under the same conditions, SP2 always presented a better tolerance to the stress than SP1. This can be noted because the red line presents more negative and sudden changes in  $LADT$ . On the other hand, the reference plant showed stable behavior with zero or positive values until the irrigation was suspended at hour 330. After this point, the drought was maintained for two days and a clear drop of blue line appears. After the rehydration day during hour 375, the  $LADT$  of RP slowly returns to zero and positive values.

Finally, it is important to mention that a significant reduction in height and the leaf areas of plants under drought was expressed. At the end of the experiment, plants under drought conditions maintained heights of approximately 80% of non-stressed plants.

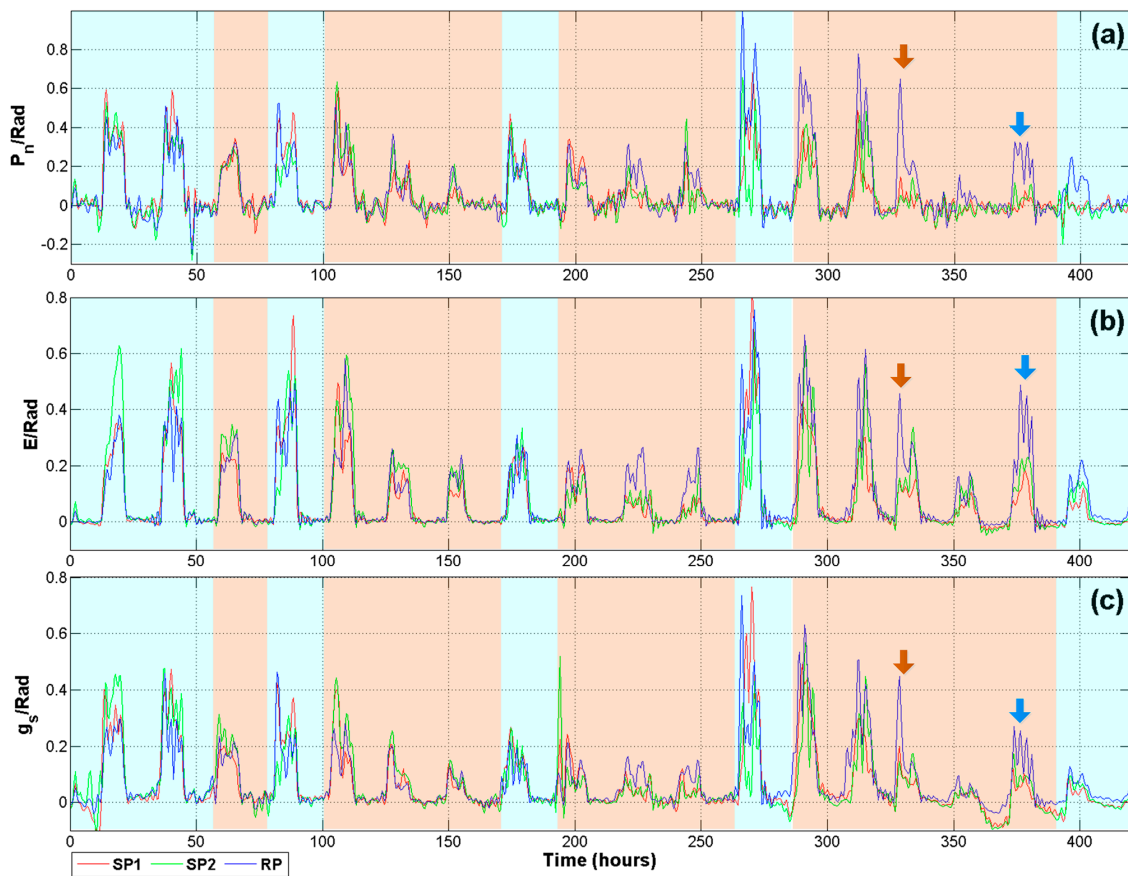
#### 4.7. Indexes and DWT Analysis

Despite the fact that Figure 9 provides important information about effects of drought on plants, the analysis requires data from at least two days in order to be able to notice a behavioral pattern. The problem with performing single day assessment is the amount of remnant noise, mainly for  $P_n$  and  $g_s$  signals. Another problem is the variation in growing conditions throughout the greenhouse, which may cause plants under the same treatment to respond quite differently. The variable that mainly affects the results is the solar radiation. This problem was addressed using the index previously described in Equation (1). Therefore, if plants under the same treatment receive different radiation levels, the difference in variable responds is mitigated permitting a better comparison. This methodology was useful for  $P_n$ ,  $E$ , and  $g_s$  signals which presented a higher component of noise as compared with  $VPD$  or  $LADT$ .

As it can be seen in Figure 3, after the normalization process, these signals were analyzed using the DWT. In a preliminary experiment, several configurations were performed in order to explore the best one to extract information from signals. Finally, the DWT applied to filter the signals illustrated in

Figure 10 uses a mother wavelet Daubechies db40 at a level A2 that rejects signals outside the range from 0 to 0.27 mHz bandwidth. This criterion was selected because lower mother wavelet levels discriminate important information related with abrupt changes due to radiation. Also, db40 mother wavelet required less computational resources compared with other wavelets such as Symmlets. The high frequency analysis of D levels is not reported because no clear patterns were found; this behavior could be a consequence of the system slow sampling frequency. The new version of  $P_n$  signals corresponding to Figure 10a presents a considerable reduction in the high frequency noise compared to Figure 9a, where after several stages of filtering, the  $P_n$  signal maintains a considerable amount of noise, this could be probably an aliasing of a frequency generated for the IRGA Sensor itself. However, after the use of DWT analysis such as an extra filtering stage, this component of noise was reduced allowing a comparison along one single day.

**Figure 10.** Wavelet of processes/Radiation indexes. (a) Photosynthesis; (b) transpiration; and (c) stomatal conductance.



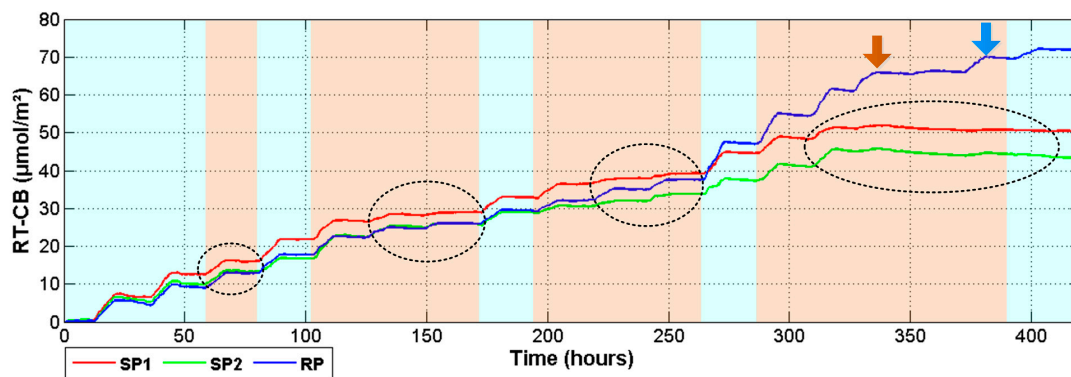
Furthermore, in order to avoid the removal of information related with the plant response and considering that  $P_n$  is highly related with  $Rad$ , a Pearson correlation was conducted to compare  $Rad$  with  $P_n$  before the DWT processing. The correlation results are presented in Table 3 to support the idea that DWT rejects the noise on photosynthesis signal but it keeps the information related with

photosynthesis itself. As it can be appreciated, the correlation between  $P_n$  and  $Rad$  slightly increases when  $P_n$  is filtered with the DWT. Only node 3 did not repeat this trend. However, the decrease in the correlation is not too high. Table 3 presents the results of the hypothesis test of no correlation. The  $p$ -values suggest that null hypothesis is rejected.

**Table 3.** Photosynthesis–radiation correlation results with and without DWT filtering.

Variables	Photosynthesis <sub>osk</sub> –Radiation		Photosynthesis <sub>DWT</sub> –Radiation	
	$R$	$p$	$R$	$p$
Node 1	0.5146	<0.0001	0.5600	<0.0001
Node 2	0.5307	<0.0001	0.5574	<0.0001
Node 3	0.6557	<0.0001	0.6308	<0.0001

**Figure 11.** Real Time-Carbon Balance ( $RT-CB$ ).



Finally, in order to understand the impact of drought for long-term development and health of the plants, the analysis of  $P_n$  integral calculation which is named as Real Time-Carbon Balance index was proposed to explore the response of plants under drought conditions. As it can be seen in Figure 11, during the day  $RT-CB$  increases but stops or slightly decreases during the nights. This behavior is a result of the photosynthetic and respiration activity; but, as it is indicated with dark ellipses, when the plants were subjected to drought, the  $RT-CB$  signals remained constant until the rehydration day. Here it is important to state that the first day of drought did not significantly affected plant response and changes appeared until day two. During the rehydration days corresponding to hours 75, 175, and 275; the plants were recovered and photosynthetic activity was normalized. Nevertheless, SP1 and SP2 did not recover after the fourth period of drought, even when plants were watered at approximately hour 380. Here, the  $RT-CB$  index maintains the negative tendency which means that the photosynthetic activity stops, and the net respiration increases causing a loss of dry matter. Figure 11 also shows the exponential behavior of the photosynthesis activity as the plant grows, because around hour 275 of experimentation, the  $RT-CB$  registered an important increase for the reference plant. However, this tendency changed when the irrigation was suspended. The first day of scarcity, as indicated with the brown arrow did not change the plant response. However, the next day a fall in the Carbon assimilation was reported. This tendency continues until normal irrigation was re-established in the day marked with the blue arrow.

## 5. Conclusions

In this investigation, a smart sensor system was developed to monitor primary variables in plants. Then, this information was then used to estimate physiological processes such as photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance. The proposed experiment demonstrates the capabilities of the system to detect stress in plants submitted to soil drought conditions. It also reveals that even under real operation conditions (greenhouse applications) the system properly estimates the aforementioned physiological processes. However, important considerations must be taken into account if the system pretends to be operated outside due to sunlight and rain conditions. But it is important to state that this is a prototype that can be improved in a future. Another central consideration relies on the leaf chamber design and stress conditions that are produced on isolated leaves. During the experiment, it was necessary to periodically changed between leaves. However, during periods of three days not important damage over the samples was appreciated. This may be due to the Nylamid-acrylic materials utilized in the leaf chamber design, which do not overheat under sunlight such as aluminum based chambers that are used in commercial devices.

In addition, the DWT was used to process the signal combined with an index that adjusts the estimation according to the plants surrounding environment. It resulted useful in order to perform a day by day comparison for drought detection, which is important because conventional analysis requires long time to detect drought conditions. Moreover, the *RT-CB* index provides an alternative method for monitoring plant growth without using destructive laboratory analysis. Therefore, *RT-CB* provides information about irregular growing circumstances such as drought. Finally, the proposed digital signal processing methodology implemented in the gas exchange system represents an alternative that can be used to detect and monitor drought under real growth conditions. Also, this methodology can be utilized for filtering purposes in precision agriculture applications where the signal-to-noise ratio is high (like chlorophyll fluorescence or impedance sensor applications). Furthermore, it can be utilized to explore time-frequency properties of different kinds of signals.

## Acknowledgments

This project was partially supported by CONACYT scholarship 231946, PROINNOVA-20501059, and by PROFAPI 2012-111 and PROFAPI 2013-116. The authors wish to thank Ismael Urrutia for his support and advice related with the biological part of this investigation. Also thanks to M.C. Gilberto Marquez Salazar for providing the greenhouse where the experiments were conducted and Texas Instruments for providing device samples tested in this project. Finally, the authors wish to thank Silvia C. Stroet for her support by doing the English language edition.

## Author Contributions

Guevara-Gonzalez and Carrillo-Serrano designed the study. The experiments and the signal processing and analysis were performed by Duarte-Galvan, Millan-Almaraz, and Romero-Troncoso. All authors discussed the results and implication and everyone provided helpful feedback and commented on the manuscript at all stages.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Taiz, L.; Zeiger, E. *Plants Physiology*; Sinauer Associates, Incorporated: Sunderland, MA, USA, 2010.
2. Aroca, R. *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012.
3. García-Mier, L.; Guevara-González, R.G.; Mondragón-Olguín, V.M.; del Rocío Verduzco-Cuellar, B.; Torres-Pacheco, I. Agriculture and bioactives: Achieving both crop yield and phytochemicals. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 4203–4222.
4. Fernandez-Jaramillo, A.A.; Duarte-Galvan, C.; Contreras-Medina, L.M.; Torres-Pacheco, I.; Romero-Troncoso, R.D.J.; Guevara-Gonzalez, R.G.; Millan-Almaraz, J.R. Instrumentation in developing chlorophyll fluorescence biosensing: A review. *Sensors* **2012**, *12*, 11853–11869.
5. Agam, N.; Cohen, Y.; Berni, J.A.J.; Alchanatis, V.; Kool, D.; Dag, A.; Yermiyahu, U.; Ben-Gal, A. An insight to the performance of crop water stress index for olive trees. *Agric. Water Manag.* **2013**, *118*, 79–86.
6. Udompetaikul, V.; Upadhyaya, S.K.; Slaughter, D.; Lampinen, B.; Shackel, K.; House, G. Plant Water Stress Detection Using Leaf Temperature and Microclimatic Information. In Proceedings of 2011 ASABE Annual International Meeting Sponsored by ASABE Galt House, Louisville, KY, USA, 7–10 August 2011.
7. Jiménez-Bello, M.A.; Ballester, C.; Castel, J.R.; Intrigliolo, D.S. Development and validation of an automatic thermal imaging process for assessing plant water status. *Agric. Water Manag.* **2011**, *98*, 1497–1504.
8. Abboud, T.; Bamsey, M.; Paul, A.-L.; Graham, T.; Braham, S.; Noumeir, R.; Berinstain, A.; Ferl, R. Deployment of a fully-automated green fluorescent protein imaging system in a high arctic autonomous greenhouse. *Sensors* **2013**, *13*, 3530–3548.
9. Millan-Almaraz, J.R.; Guevara-Gonzalez, R.G.; Romero-Troncoso, R.; Osornio-Rios, R.A.; Torres-Pacheco, I. Advantages and disadvantages on photosynthesis measurement techniques: A review. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 7340–7349.
10. Hsiao, S.-C.; Chen, S.; Yang, I.C.; Chen, C.-T.; Tsai, C.-Y.; Chuang, Y.-K.; Wang, F.-J.; Chen, Y.-L.; Lin, T.-S.; Lo, Y.M. Evaluation of plant seedling water stress using dynamic fluorescence index with blue led-based fluorescence imaging. *Comput. Electron. Agric.* **2010**, *72*, 127–133.
11. Kim, Y.; Glenn, D.M.; Park, J.; Ngugi, H.K.; Lehman, B.L. Hyperspectral image analysis for water stress detection of apple trees. *Comput. Electron. Agric.* **2011**, *77*, 155–160.
12. Mirzaie, M.; Darvishzadeh, R.; Shakiba, A.; Matkan, A.A.; Atzberger, C.; Skidmore, A. Comparative analysis of different uni- and multi-variate methods for estimation of vegetation water content using hyper-spectral measurements. *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.* **2014**, *26*, 1–11.

13. Senay, G.; Budde, M.; Verdin, J.; Melesse, A. A coupled remote sensing and simplified surface energy balance approach to estimate actual evapotranspiration from irrigated fields. *Sensors* **2007**, *7*, 979–1000.
14. Ghulam, A.; Li, Z.-L.; Qin, Q.; Yimit, H.; Wang, J. Estimating crop water stress with ETM + NIR and SWIR data. *Agric. Forest Meteorol.* **2008**, *148*, 1679–1695.
15. Barbagallo, S.; Consoli, S.; Russo, A. A one-layer satellite surface energy balance for estimating evapotranspiration rates and crop water stress indexes. *Sensors* **2009**, *9*, 1–21.
16. Suárez, L.; Zarco-Tejada, P.J.; González-Dugo, V.; Berni, J.A.J.; Sagardoy, R.; Morales, F.; Fereres, E. Detecting water stress effects on fruit quality in orchards with time-series PRI airborne imagery. *Remote Sens. Environ.* **2010**, *114*, 286–298.
17. Atherton, J.J.; Rosamond, M.C.; Zeze, D.A. A leaf-mounted thermal sensor for the measurement of water content. *Sens. Actuators A Phys.* **2012**, *187*, 67–72.
18. Wang, Z.-Y.; Leng, Q.; Huang, L.; Zhao, L.-L.; Xu, Z.-L.; Hou, R.-F.; Wang, C. Monitoring system for electrical signals in plants in the greenhouse and its applications. *Biosyst. Eng.* **2009**, *103*, 1–11.
19. Tomkiewicz, D.; Piskier, T. A plant based sensing method for nutrition stress monitoring. *Precis. Agric.* **2012**, *13*, 370–383.
20. Passaro, V.; De Leonardis, F. Investigation of SOI raman lasers for mid-infrared gas sensing. *Sensors* **2009**, *9*, 7814–7836.
21. Escalona, J.M.; Fuentes, S.; Tomás, M.; Martorell, S.; Flexas, J.; Medrano, H. Responses of leaf night transpiration to drought stress in *Vitis vinifera* L. *Agric. Water Manag.* **2013**, *118*, 50–58.
22. Millan-Almaraz, J.R.; Torres-Pacheco, I.; Duarte-Galvan, C.; Guevara-Gonzalez, R.G.; Contreras-Medina, L.M.; Romero-Troncoso, R.d.J.; Rivera-Guillen, J.R. FPGA-based wireless smart sensor for real-time photosynthesis monitoring. *Comput. Electron. Agric.* **2013**, *95*, 58–69.
23. Schmidt, U. Low-cost system for on-line measurement of plant transpiration and photosynthesis in greenhouse production. *Acta Hort.* **1998**, *421*, 249–258.
24. Sánchez, J.A.; Rodríguez, F.; Guzmán, J.L.; Arahá, M.R. Virtual sensors for designing irrigation controllers in greenhouses. *Sensors* **2012**, *12*, 15244–15266.
25. Millan-Almaraz, J.R.; Romero-Troncoso, R.D.J.; Guevara-Gonzalez, R.G.; Contreras-Medina, L.M.; Carrillo-Serrano, R.V.; Osornio-Rios, R.A.; Duarte-Galvan, C.; Rios-Alcaraz, M.A.; Torres-Pacheco, I. FPGA-based fused smart sensor for real-time plant-transpiration dynamic estimation. *Sensors* **2010**, *10*, 8316–8331.
26. Centritto, M.; Brilli, F.; Fodale, R.; Loreto, F. Different sensitivity of isoprene emission, respiration and photosynthesis to high growth temperature coupled with drought stress in black poplar (*populus nigra*) saplings. *Tree Physiol.* **2011**, *31*, 275–286.
27. Flexas, J.; Ribas-Carbó, M.; Hanson, D.T.; Bota, J.; Otto, B.; Cifre, J.; McDowell, N.; Medrano, H.; Kaldenhoff, R. Tobacco aquaporin NtAQPI is involved in mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> *in vivo*. *Plant J.* **2006**, *48*, 427–439.
28. Munné-Bosch, S.; Mueller, M.; Schwarz, K.; Alegre, L. Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. *J. Plant Physiol.* **2001**, *158*, 1431–1437.
29. Munné-Bosch, S.; Alegre, L. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta* **2002**, *214*, 608–615.

30. Hubbard, R.; Ryan, M.; Stiller, V.; Sperry, J. Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. *Plant Cell Environ.* **2001**, *24*, 113–121.
31. CI-340. *Hand-Held Photosynthesis System Instruction Manual*; CID Inc.: Camas, WA, USA, 2008.
32. Rodriguez-Donate, C.; Osornio-Rios, R.A.; Rivera-Guillen, J.R.; Romero-Troncoso, R.D.J. Fused smart sensor network for multi-axis forward kinematics estimation in industrial robots. *Sensors* **2011**, *11*, 4335–4357.
33. Ton, Y.; Kopyt, M. Phytomonitoring information and decision-support system for crop growing. In Proceedings of the 2nd IS on Intelligent Information Technology in Agriculture, Beijing, China, October 2003.
34. Goodman, S.N. Toward evidence-based medical statistics. 1: The p value fallacy. *Ann. Intern. Med.* **1999**, *130*, 995–1004.
35. Vazquez-Cruz, M.A.; Luna-Rubio, R.; Contreras-Medina, L.M.; Torres-Pacheco, I.; Guevara-Gonzalez, R.G. Estimating the response of tomato (*solanum lycopersicum*) leaf area to changes in climate and salicylic acid applications by means of artificial neural networks. *Biosyst. Eng.* **2012**, *112*, 319–327.
36. Sharma, P.; Jha, A.B.; Dubey, R.S.; Pessarakli, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* **2012**, *2012*, doi:10.1155/2012/217037.
37. Beebe, S.E.; Rao, I.M.; Blair, M.W.; Acosta-Gallegos, J.A. Phenotyping common beans for adaptation to drought. *Front. Physiol.* **2013**, *4*, doi:10.3389/fphys.2013.00035.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# Chapter 13

## Instrumentation and Control to Improve the Crop Yield

Maria S. Acosta-Navarrete, José A. Padilla-Medina,  
José E. Botello-Alvarez, J. Prado-Olivarez, M. Perez-Rios M,  
José J. Díaz-Carmona, Luis M. Contreras-Medina,  
Carlos Duarte-Galvan, Jesus R. Millan-Almaraz  
and Arturo A. Fernandez-Jaramillo

### Contents

13.1	Introduction.....	364
13.2	Image Acquisition Process.....	365
13.2.1	Image Processing in Food Industry.....	365
13.2.2	Artificial Vision Systems Applied Grains.....	366
13.3	Materials and Methods.....	369
13.3.1	Sample Preparation.....	369
13.3.2	Image Processing.....	369
13.3.3	Experiments Design and Statistics Analysis.....	371
13.4	Results.....	372
13.5	Conclusions.....	375
13.6	Gas Exchange and Photosynthesis Sensors.....	376
13.7	Sap Flow Sensors.....	378
13.8	Plant Morphological Sensors.....	379

---

M. S. Acosta-Navarrete · M. Perez-Rios M  
Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, Carretera Valle de  
Santiago-Huamimaro Kilómetro 1.2 38400 Valle de Santiago GTO, Mexico

J. A. Padilla-Medina · J. E. Botello-Alvarez · J. Prado-Olivarez · J. J. Díaz-Carmona  
Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico y García Cubas S/N, 38010 Celaya,  
GTO, Mexico

L. M. Contreras-Medina · C. Duarte-Galvan · **A. A. Fernandez-Jaramillo (✉)**  
Ingeniería de Biosistemas CA, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ingeniería,  
Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N 76010 Querétaro, QRO,  
Mexico  
e-mail: aafernandez@hspdigital.org

J. R. Millan-Almaraz  
Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas, Universidad Autónoma de Sinaloa,  
Av. De las Americas y Blvd., Universitarios, Cd. Universitaria 80000 Culiacán,  
SIN, Mexico

R. Guevara-Gonzalez and I. Torres-Pacheco (eds.), *Biosystems Engineering:*  
*Biofactories for Food Production in the Century XXI*, DOI: 10.1007/978-3-319-03880-3\_13,  
© Springer International Publishing Switzerland 2014

---

## **Characteristics of Mycotoxin Analysis Tools for Tomorrow**

---

Luis Miguel Contreras-Medina,  
Alejandro Espinosa-Calderon, Carlos Duarte-Galvan,  
Arturo Alfonso Fernandez-Jaramillo,  
Rafael Francisco Muñoz-Huerta,  
Jesus Roberto Millan-Almaraz,  
Ramon Gerardo Guevara-Gonzalez and  
Irineo Torres-Pacheco

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/51683>

---

### **1. Introduction**

Aflatoxins difuranocoumarin derivatives are produced by fungi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomius* [1] and they are part of the group of mycotoxins. From the twenty metabolites that have been formed endogenously in animals, aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>) are the most common and the most toxic. The names of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub> are based on their fluorescence characteristics. Aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> show strong blue fluorescence under UV light, whereas aflatoxins G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> exhibit greenish yellow fluorescence [2]. All the aflatoxins have been classified as carcinogenic compounds for humans, but AFB<sub>1</sub> has been tagged as the most dangerous, highly toxic, immunosuppressive, mutagenic, and teratogenic compound and its effects have been identified as well. Also, malabsorption syndrome and reduction in bone strength may occur due to AFs consumption. Aflatoxins not only have adverse effects on human health but also cause serious economic losses when tons of foods have to be dropped or destroyed for being contaminated with AFs.

To ensure food's safety, the maximum level of aflatoxins in food has been set by international organizations. For each kind of aflatoxin a minimum quantity of concentration is allowed,