

UTILIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE IMÁGENES EN LA EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA INTERNA Y EL VIGOR DE LAS SEMILLAS DE *Morus alba*

Marlen Navarro¹, Silvio Moure Cícero² y Francisco Guilhien Gomes-Junior²

1 Estación Experimental "Indio Hatuey"/Universidad de Matanzas. Cuba.

2 Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo. Brasil

El análisis de imágenes de semillas y plántulas ha demostrado alto potencial de utilización para diversas finalidades de la industria semillera. Los sistemas que más se destacan son la evaluación automatizada de la prueba de rayos X y el análisis de imágenes de plántulas.

Una cantidad considerable de investigaciones con rayos X en semillas relacionan el estudio de la morfología interna con el potencial fisiológico de las simientes de diversas especies (Cicero, 2010). Gomes-Junior (2010) ofrece una reseña de los resultados más sobresalientes, por especie, con la utilización de rayos X para la evaluación de la morfología interna de semillas. De acuerdo con Marcos Filho (2010) la utilización del software "*Seed Vigor Imaging System*" (SVIS[®]) permite la evaluación segura del vigor de semillas de varias especies, lo que representa un avance significativo en la determinación del desempeño de plántulas, por incluir procedimientos simples, reducir la subjetividad, la interferencia humana en la interpretación de los resultados y el período necesario para la conducción del test en comparación con la evaluación manual del crecimiento de las plántulas.

La integración de los sistemas de análisis de imágenes con los tests de análisis del vigor considerados tradicionales, puede contribuir al desarrollo de metodologías que permitan auxiliar en la estandarización de los tests. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia del test de rayos X para la evaluación de la morfología interna de las semillas, y de un sistema automatizado de análisis de imágenes de plántulas (SVIS[®]) en la determinación del vigor de semillas de diferentes lotes de *Morus alba*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis de Semillas y el Laboratorio de Análisis de Imágenes ambos de la USP/ESALQ en Brasil. Fueron utilizadas semillas de *Morus alba* cv. YU-62, provenientes de 5 lotes con diferentes potenciales fisiológicos (diferentes niveles de vigor).

Evaluación de la morfología interna

- Test de Rayos X: se utilizaron ocho repeticiones de 25 semillas de cada lote para cada test (G, EP, SVIS). La radiación se realizó con un equipo digital Faxitron X-Ray modelo MX-20 DC-12, acoplado a una computadora.
- Análisis de las imágenes de rayos x: se empleó el *software Image-Pro Plus*[®] versión 7.0. Fue necesario ajustar diferentes parámetros del *software*, esenciales para la precisión y confiabilidad de los resultados. Las evaluaciones ofrecieron los valores del espacio vacío (EV) entre el embrión y el endosperma, calculada en relación al área total de la simiente.

Evaluación del vigor

- Germinación: se utilizaron ocho repeticiones de 25 semillas para cada lote. Las cuales fueron colocadas en papel de filtro en cajas plásticas y llevadas al germinador a 20-30°C en ausencia de luz donde permanecieron 28 días después de la siembra.
- Primer conteo de germinación: fue realizado de conjunto con el test de germinación, determinando el porcentaje de plántulas normales a los 14 días de iniciado el test.
- Envejecimiento acelerado tradicional: una capa de semillas uniforme fue distribuida sobre la tela metálica acoplada a cada caja plástica del tipo gerbox conteniendo 40 ml de agua

destilada en el fondo. Las cajas tapadas fueron expuestas a 41°C por 48 horas en incubadora BOD, de acuerdo con Marcos Filho (1999). Luego se determinó el contenido de humedad de las semillas y se montó el test de germinación con ocho repeticiones de 25 semillas para cada lote. La duración del test de germinación fue de 14 días.

- Envejecimiento acelerado con solución saturada de sales: semejante al procedimiento tradicional, pero se sustituyó el agua por 40 ml de NaCl (Jianhua y McDonald, 1996).
- Conductividad eléctrica: fueron pesadas 25 semillas de cuatro repeticiones para cada lote y colocadas para embeber en 25 ml de agua desionizada durante 24 horas a 25±1°C (ISTA, 2009). Posteriormente se hicieron las lecturas en un conductivímetro marca DIGIMED, modelo DM-31. Los valores se dividieron entre el peso de las simientes y los resultados se expresaron en $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.
- Emergencia de plántulas en arena: en bandejas de plástico con arena como sustrato donde fueron distribuidas ocho repeticiones de 25 semillas para cada lote. El conteo de las plántulas emergidas se realizó a los 21 días después de la siembra.
- Índice de velocidad de emergencia: se calculó de acuerdo con Maguire (1962).

Análisis automatizado de plántulas:

Las semillas, previamente numeradas (después de radiografiadas) fueron colocadas en dos filas en el tercio superior de la superficie del papel. Se utilizaron ocho réplicas de 25 semillas para cada lote. Las cajas de germinación, tapadas y envueltas en bolsas plásticas, se colocaron en el germinador tipo BOD a 20-30°C durante 11, 12 y 13 días. Las plántulas normales identificadas en cada repetición fueron transferidas para cartulina de color negro de 30 x 22 cm (correspondiente al área útil del *scanner*) y las imágenes fueron captadas por un *scanner* HP Scanjet 2004 con resolución de 300 dpi con el apoyo del *software* Photosmart.

Para el análisis de las imágenes se determinó como parámetros del índice de vigor: (i) tamaño máximo de las plántulas: 3,5; 3,8 y 4,0 pulgadas para 11, 12 y 13 días, respectivamente; de acuerdo con los tests preliminares; (ii) proporción 70% para el crecimiento y 30% para la uniformidad; en base a los resultados obtenidos para otras especies. Las imágenes en formato JPEG se analizaron con el *software* SVIS[®]. Luego del procesamiento de las imágenes, se obtuvieron de manera automatizada los valores medios del índice de vigor (IV), de uniformidad (IU), de crecimiento (IC) y la longitud individual de las plántulas (CP). Los datos de CP fueron ofrecidos por el *software* en pulgadas y se transformaron en cm. Después de la transformación, los datos de CP se dividieron entre 300, tomando en consideración que la resolución del *scanner* para la obtención de las imágenes fue de 300 dpi.

Para el procesamiento estadístico se utilizó un diseño totalmente aleatorizado. Se realizó análisis de varianzas para cada variable en estudio, excepto para EV. Para la comparación de las medias se empleó el test de Tukey, al 5% de probabilidad. Los valores de EV fueron procesados con análisis de frecuencia. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 21.

RESULTADOS

La figura 1 muestra los diferentes niveles de gris (radioluminiscencia) que caracteriza a las imágenes radiográficas. Se observa que en las semillas de las figuras 1A, 1B e 1C el área interna con radiotransparencia (gris oscuro) es mayor comparada con las simientes de las figuras 1D, 1E y 1F, ya que en éstas el grado de radiopacidad (gris claro) es mayor, lo que indica deterioro de los tejidos y de manera general la reducción del potencial fisiológico.

La tabla 1 ilustra los resultados del análisis de frecuencias para la variable EV en cada lote. El valor de EV del lote 1 varió de 2,69 a 50,77% y el 60% de las semillas se agruparon en las clases 1 y 2 con valor máximo de 18,72% del parámetro evaluado. Para el lote 2, la variación

fue de 2,56 al 49,0% no obstante en las dos primeras clases (2,56 a 18,04%) estuvieron representadas el 70% de las simientes. El valor mínimo y máximo del EV del lote 3 fue de 2,28 y 27,12%, respectivamente; además el 84% de las semillas evaluadas presentaron valores de EV inferiores al 84%. El lote 4 exhibió valores de EV entre 4,15 y 63,0%, aunque la variación fue más amplia que en los lotes 1, 2 y 3 es meritorio aclarar que solamente en la primera clase (4,15 a 13,96%) se agrupó el 68% de las semillas del lote 4. La frecuencia de distribución del lote 5 tuvo un comportamiento diferente en comparación con los demás lotes, de tal modo sólo el 18% de las simientes presentaron valores de hasta 14,26% (valor máximo de la clase 1).

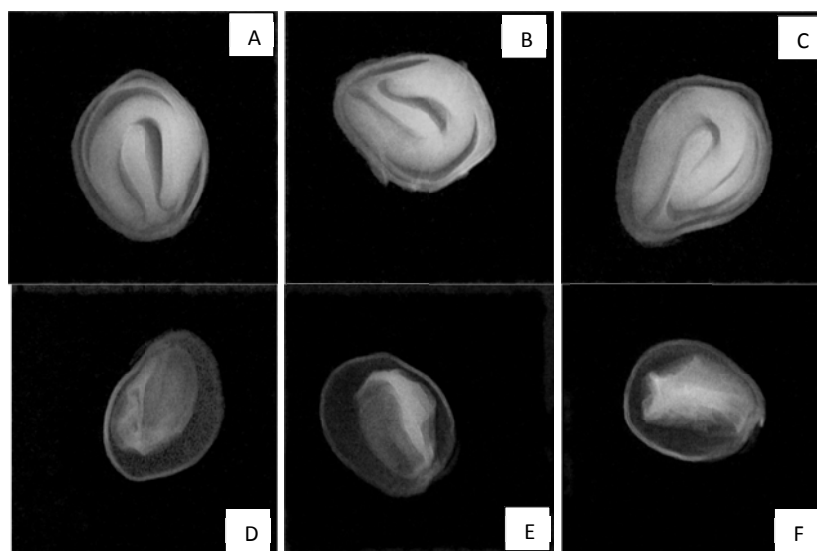


Figura 1. Morfología interna de las semillas de morera a través de imágenes radiográficas.

Tabla 1. Porcentaje del área correspondiente al espacio vacío entre el embrión y el endosperma, en relación con el área total de las semillas.

Lote	DE	Clase	Valor mínimo (%)	Valor máximo (%)	Frecuencia relativa (%)
1	8,86	1	2,69	10,70	19
		2	10,70	18,72	51
		3	18,72	26,73	17
		4	26,73	34,74	8
		5	34,74	42,76	4
		6	42,76	50,77	1
2	8,18	1	2,56	10,30	34
		2	10,30	18,04	36
		3	18,04	25,78	24
		4	25,78	33,52	3
		5	33,52	41,26	2
		6	41,26	49,00	1
3	5,69	1	2,28	6,42	14
		2	6,42	10,56	28
		3	10,56	14,70	21
		4	14,70	18,84	21
		5	18,84	22,98	11
		6	22,98	27,12	5

4	8,06	1	4,15	13,96	68
		2	13,96	23,77	26
		3	23,77	33,58	3
		4	33,58	43,38	1
		5	43,38	53,19	0
		6	53,19	63,00	2
5	9,06	1	4,35	14,26	18
		2	14,26	24,17	36
		3	24,08	34,08	33
		4	34,08	43,99	10
		5	43,99	53,90	1
		6	53,90	63,81	2

La tabla 2 muestra la evaluación del vigor de los lotes de morera. El contenido de humedad varió entre 7,31 y 9,46%. La conductividad eléctrica indicó la inferioridad de los lotes 1, 2 y 5 con relación a 3 y 4. Para la emergencia de plántulas el lote 4 obtuvo el mejor desempeño sin diferir estadísticamente del lote 3. Mientras que el índice de velocidad de emergencia reveló el dominio del lote 4 y además mostró la inferioridad del 5. Los resultados de la germinación indicaron el comportamiento superior del lote 4 en relación a 1, 2 y 5; el primer conteo de la germinación presentó un comportamiento similar. En el test de envejecimiento acelerado tradicional el lote 4 se destacó como el de mayor potencial en relación al resto de los lotes. Del mismo modo, en el envejecimiento acelerado con solución saturada de sal, el lote 4 mostró superioridad.

Es interesante observar que los tests de vigor ofrecieron información acertada respecto al mayor potencial del lote 4 y la inferioridad del lote 5 en relación a los lotes 1, 2 y 3 los cuales mostraron un comportamiento intermedio para el vigor. Sin dejar de mencionar que los lotes 3 y 4 fueron similares en varios de los tests evaluados (CE, EP, PCG e G).

Tabla 2. Valores del contenido de humedad (CH), conductividad eléctrica (CE), emergencia de plántulas (EP), índice de velocidad de emergencia (IVE), primer conteo de germinación (PCG), germinación (G), envejecimiento acelerado (EA) y envejecimiento acelerado con solución salina (EASS) de cinco lotes de YU-62.

Lote	CH (%)	CE ($\mu\text{Scm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	EP (%)	IVE	PCG (%)	G (%)	EA (%)	EASS (%)
1	8,95 bc	3,93 b	39,00 b	4,63 b	77,00 b	79,00 b	70,00 b	60,00 bc
2	9,46 c	3,40 b	54,00 b	6,41 b	52,00 a	52,00 a	72,00 b	47,00 ab
3	7,31 a	2,28 a	80,00 c	8,92 c	85,00 bc	91,00 bc	67,00 b	66,00 c
4	8,59 b	1,73 a	84,00 c	11,23 d	97,00 c	98,00 c	89,00 c	89,00 d
5	8,60 b	3,39 b	12,00 a	1,59 a	44,00 a	44,00 a	30,00 a	43,00 a
EP (\pm)	0,169	0,190	5,972	0,702	3,661	3,882	4,775	5,145

Medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren entre sí por el test de Tukey ($p \leq 0,05$)

El análisis automatizado de plántulas a los 11 días de edad (tabla 3) mostró similitud en el desempeño de los lotes 1, 2, 3 y 4. Los índices observados en la tabla 3 también indicaron un desempeño insatisfactorio del lote 5, lo que indica que el vigor de estos materiales es bajo.

Los resultados para 12 días de edad (tabla 4) revelaron diferencias significativas entre los lotes. Los índices de vigor y de uniformidad identificaron el desempeño inferior del lote 5. Para el índice de crecimiento los lotes 1 y 3 mostraron superioridad, 2 y 4 fueron los de comportamiento intermedio y el lote 5 fue el peor. Para la longitud de las plántulas se verificó que los lotes 1, 3 y 4 fueron superiores, mientras que 2 y 5 fueron inferiores. Por otro lado, para la última variable mencionada solo el lote 5 exhibió un comportamiento inferior.

Para los índices de vigor y de crecimiento en plántulas a los 13 días (tabla 5) todos los lotes mostraron comportamiento alto, excepto el 5 que mostró un desempeño marcadamente inferior. El índice de uniformidad indicó la existencia de diferencias significativas para el lote 5 en comparación con 1, 2, 3 y 4. También para la longitud de las plántulas, el lote 5 mostró el peor desempeño; mientras que el 4 fue superior aunque sin diferir estadísticamente del lote 3.

Tabla 3. Valores del índice de vigor (IV), índice de crecimiento (IC), índice de uniformidad de crecimiento (IU) y longitud de las plántulas (LP) de semillas evaluadas con SVIS® a los 11 días.

Lote	IV	IC	IU	LP (cm)
1	741,50 b	758,50 b	703,25 b	1,50 b
2	770,50 b	839,00 b	612,50 b	1,49 b
3	829,75 b	850,25 b	783,50 b	1,72 b
4	704,00 b	723,25 b	660,25 b	1,68 b
5	197,50 a	165,25 a	273,25 a	0,17 a
EP (±)	80,591	93,536	60,947	0,220

Medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren entre sí por el test de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabla 4. Valores del índice de vigor (IV), índice de crecimiento (IC), índice de uniformidad de crecimiento (IU) y longitud de las plántulas (LP) de semillas evaluadas con SVIS® a los 12 días.

Lote	IV	IC	IU	LP (cm)
1	821,25 b	861,25 c	730,25 b	1,99 b
2	716,25 ab	739,00 ab	664,25 ab	1,63 ab
3	853,50 b	908,00 c	728,25 b	1,95 b
4	802,50 b	827,00 ab	729,25 b	2,31 b
5	433,25 a	443,00 a	410,50 a	0,61 a
EP (±)	76,906	92,944	51,871	0,250

Medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren entre sí por el test de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabla 5. Valores del índice de vigor (IV), índice de crecimiento (IC), índice de uniformidad de crecimiento (IU) y longitud de las plántulas (LP) de semillas evaluadas con SVIS® a los 13 días.

Lote	IV	IC	IU	LP (cm)
1	750,75 b	776,25 b	692,75 bc	1,79 b
2	802,50 b	880,00 b	623,25 b	1,83 b
3	888,50 b	936,00 b	779,25 c	2,15 bc
4	858,50 b	919,75 b	717,00 bc	2,67 c
5	404,25 a	407,75 a	396,50 a	0,60 a
EP (±)	55,840	66,997	42,631	2,330

Medias seguidas por la misma letra en la columna no difieren entre sí por el test de Tukey ($p \leq 0,05$)

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la evaluación de la morfología interna, los test de vigor y el análisis con SVIS® muestran coherencia en cuanto al mayor potencial fisiológico del lote 4. El período de 12 días, para evaluar las plántulas con SVIS®, permitió clasificar los lotes en diferentes niveles del vigor de manera más eficaz que las edades 11 y 13 días, ya que presentó resultados semejantes a los obtenidos en los tests de vigor, principalmente para el índice de velocidad de emergencia y envejecimiento acelerado con sin solución saturada de sales.

REFERENCIAS

- Cicero, S.M. Aplicação de imagens radiográficas no controle de qualidade de sementes. *Informativo ABRATES*, v.20, n.3, p.48-51, 2010.
- Gomes-Junior, F. G. Aplicação da análise de imagens para avaliação da morfologia interna de sementes. *Informativo ABRATES*, v.20, n.3, p.33-39, 2010.
- Jianhua, Z.; McDonald, M. B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. *Seed Science and Technology*, v. 25, n. 1, p. 123-131, 1996.
- Maguire, J. D. Speed of germination-aid in relation evaluation for seedling emergence vigor. *Crop Science*, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- Marcos-Filho, J. Testes de vigor: importância e utilização. In: Krzyzanowski, F.C.; Vieira, R.D.; França-Neto, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999.
- Marcos-Filho, J. Sistema computadorizado de análise de imagens de plântulas (SVIS®) para avaliação do vigor de sementes. *Informativo ABRATES*, v.20, n.3, p.40-44, 2010.