



El análisis de calidad de semillas en un nuevo escenario tecnológico

Martínez, M. A.¹⁻²⁻³; Gomes Junior, F. G.⁴; Arango Perearnau, M.¹ y Gallo, C.¹.


¹ Tecnología de Semillas, INTA EEA Oliveros, Oliveros, Santa Fe, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

³ Departamento de Fisiología Vegetal, Fac. Cs. Agrarias, UNR, Zavalla, Santa Fe, Argentina.

⁴ Departamento de Produção Vegetal, USP/ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil.

martinez.mailen@inta.gob.ar

 **Palabras clave:** evaluación de calidad de semillas, potencial fisiológico.

Introducción

La evaluación de calidad de semillas es fundamental para conocer el potencial fisiológico de un lote y disponer de semillas de calidad en cada campaña agrícola. La calidad determina el éxito en la implantación del cultivo y el potencial productivo a campo. Entre los atributos que hacen a la calidad de un lote están: la Pureza física y botánica, la Viabilidad, la Germinación, el Vigor, la Sanidad, la Humedad, el aspecto, la uniformidad, entre otros. Para evaluar estos atributos, se deben realizar análisis de semillas en laboratorios acreditados a fin de obtener resultados precisos y confiables.

Los avances tecnológicos logrados en las últimas décadas en informática, robótica, electrónica, óptica, procesamiento digital, así como en inteligencia artificial, han abierto un mundo de posibilidades para las innovaciones en el agro, y el Análisis de Calidad de Semillas no es la excepción. En el área de Calidad de Semillas, las tecnologías automatizadas y no destructivas se encuentran en constante cambio e innovación buscando mejorar los métodos tradicionales de análisis, principalmente mediante la obtención de resultados de forma más rápida, económica y precisa. Sin embargo, también existen tecnologías que traen nuevos enfoques y paradigmas, brindando una visión multidimensio-

nal e integrada de la calidad. Pese a ello, a diferencia de otras áreas de la agricultura, el Análisis de Calidad de Semillas continúa siendo tradicional, respondiendo a las metodologías estandarizadas y avaladas por asociaciones internacionales, tales como ISTA y AOSA.

Actualmente, los comités técnicos y científicos de ambas asociaciones están estudiando el potencial de aplicación de las nuevas tecnologías en los análisis de calidad. El gran desafío de las tecnologías que están emergiendo es estar a la altura de los protocolos, estándares, niveles de precisión y reproducibilidad dentro y entre laboratorios, para poder ser incorporadas en la rutina de análisis de semillas.

Dentro de las nuevas tecnologías, se incluyen técnicas como Análisis Automatizado de Imágenes para la evaluación de germinación y vigor, Imágenes Multi e Hiperespectrales, Fluorescencia de Clorofila, Respiración Individual, Espectrofotometría, Rayos X 2D y 3D, Resonancia Magnética Nuclear, Termografía, entre otras. Muchas de las técnicas mencionadas incluyen el análisis y procesamiento digital de imágenes de semillas y de plántulas para estimar, de manera objetiva, parámetros derivados de la imagen como: tamaño, textura, forma, color, dimensiones y defectos. Estos parámetros se correlacionan con los resultados obtenidos mediante métodos tradicionales como son las Pruebas de Germinación, Viabilidad, Vigor y Sanidad.



Análisis y procesamiento digital de imágenes para la evaluación de germinación y vigor

Las imágenes digitales están formadas por un conjunto de puntos definidos por valores numéricos, donde cada punto corresponde a un píxel. En general, una imagen digital se compone de miles de píxeles y a cada píxel se le asigna un tono de color específico. Esta información de color individual, píxel por píxel, es esencial para identificar cambios que son difíciles de percibir por la visión humana, lo que constituye un procedimiento eficiente para proporcionar precisión y velocidad a la evaluación de calidad de lotes de semillas.

El procesamiento digital de imágenes puede ser muy útil para monitorear el proceso de germina-

ción, utilizando algoritmos para identificar cambios en el color, tamaño y forma de las semillas durante la imbibición hasta la protrusión de la raíz e incluso durante la evaluación del crecimiento de las plántulas. Por ejemplo, los cambios cuantitativos en la densidad de los componentes de color Rojo-Verde-Azul (RGB) pueden usarse como marcadores para identificar cambios en el color de los tegumentos seminales asociados con la pérdida de germinación. Por lo tanto, esta evaluación puede usarse como un método no destructivo en la clasificación de semillas con diferentes niveles de viabilidad. La información cuantitativa de los componentes RGB también se puede utilizar para identificar el momento en que se produce la emisión de la raíz primaria, dichos cambios son observables mediante las variaciones en la distribución de dichos componentes RGB (Figura 1).

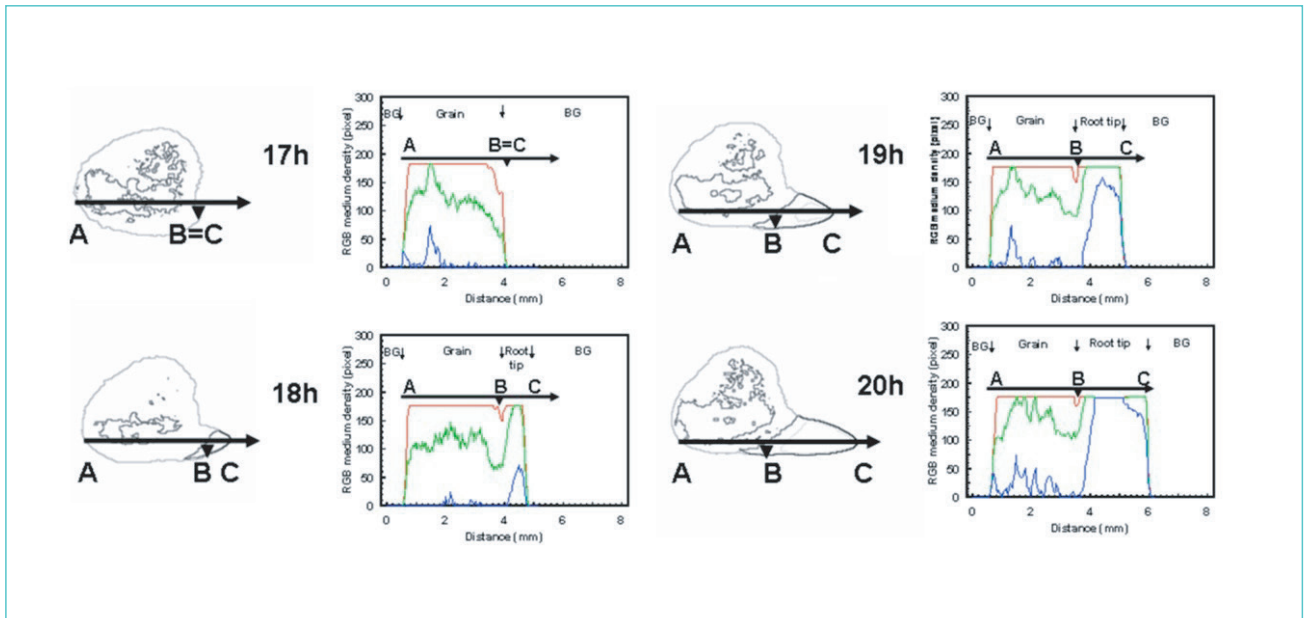


Figura 1. Evaluación de la tasa de crecimiento de la raíz de la semilla de rabanito (*Raphanus sativus* L.) utilizando la distribución de los componentes de color Rojo-Verde-Azul (RGB) a lo largo del eje A-C. El punto B marca la ubicación del contorno de la semilla donde se produce la protrusión de la raíz (Dell'Aquila, 2009) <https://openagriculturejournal.com/VOLUME/3/PAGE/37/>





En la evaluación del vigor, el procesamiento de imágenes ha sido muy útil para extraer información sobre las características morfológicas de las plántulas. Las imágenes de las plántulas, generalmente después de tres o cuatro días de germinación, se capturan con un escáner o una cámara CCD y se almacenan en la computadora para su posterior análisis con un software específico. Los sistemas para el análisis computarizado de imágenes brindan información sobre la longitud de la plántula, generalmente expresada en centímetros, la uniformidad de crecimiento y desarrollo (expresada en valores de 0 a 1000) y el índice de vigor (0 a 1000), directamente proporcional al vigor. Por lo tanto, en la interpretación de los resultados, las muestras con una longitud de plántula promedio más corta y valores de índice de crecimiento, uniformidad y vigor más bajos son de menor vigor, y las muestras con una longitud de plántula promedio más larga y valores más altos de crecimiento, uniformidad e índice de vigor presentan mayor vigor.

La simplicidad para la ejecución e interpretación de los resultados, el bajo costo y el uso de equipos poco sofisticados son las principales ventajas del análisis computarizado de la longitud de las plántulas, y pueden utilizarse para evaluar el vigor de las semillas de prácticamente todas las especies cultivadas, siempre que se cuente con el software específico para las especies de interés. Un ejemplo de este método está representado por el sistema Vigor-S para evaluar las plántulas de soja (Figura 2). El análisis se realiza a partir de imágenes de plántulas con tres días de edad, digitalizadas mediante un escáner, y las partes de las plántulas se identifican y marcan mediante un software específico. Después del procesamiento de la imagen, se obtienen datos sobre la longitud del hipocótilo, la raíz primaria y la plántula completa, la relación hipocótilo/raíz y los datos de vigor, crecimiento y uniformidad del desarrollo de las plántulas.

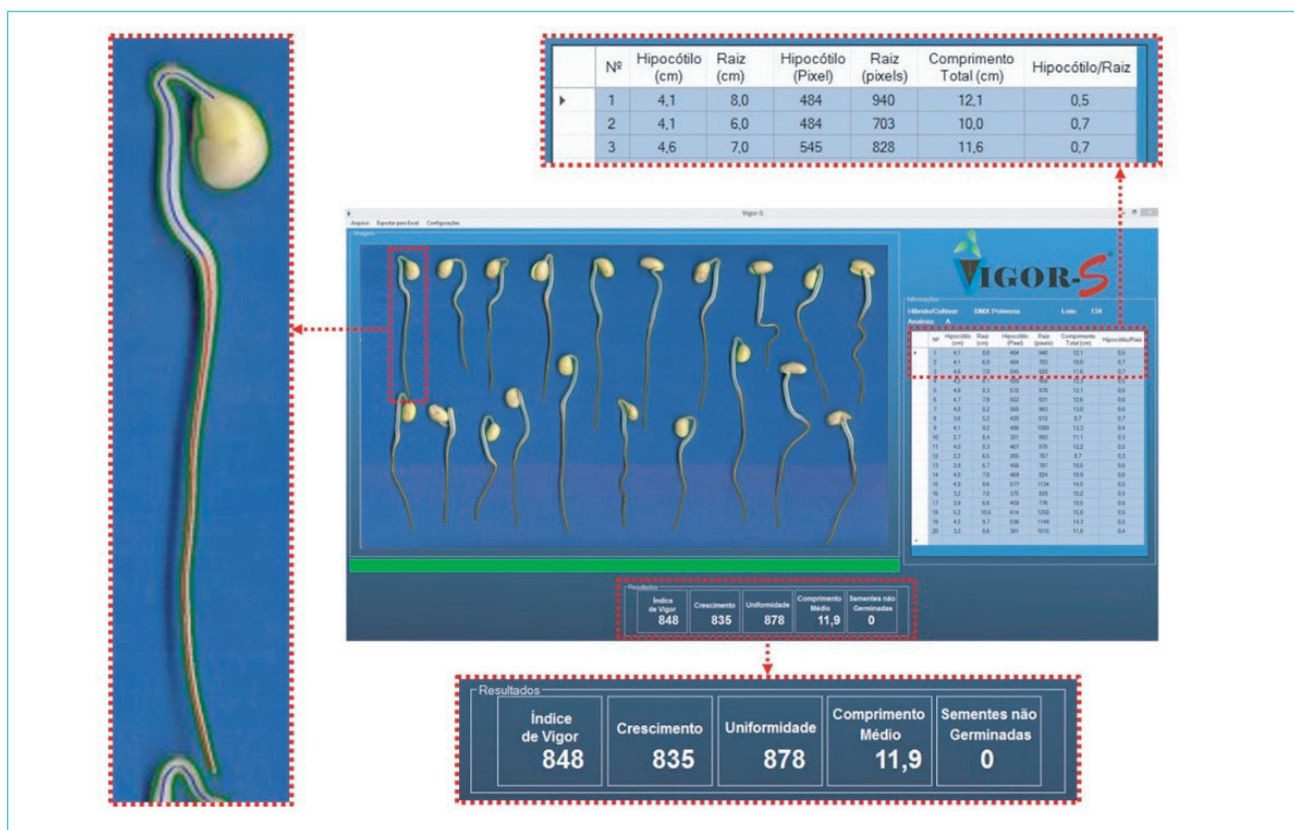


Figura 2. Análisis automatizado de plántulas de soja (tres días de germinación a 25 °C) por el sistema Vigor-S. Descarga gratuita de software en el enlace https://drive.google.com/open?id=0B8rVh_veepVzXM0MIJ1M0I0ZEK





Visión computacional

La Visión Computacional (VC) es un área de la Inteligencia Artificial que permite que las computadoras sean capaces de simular la visión humana, incluyendo el aprendizaje, la realización de inferencias y la acción en base a entradas visuales para lograr objetivos específicos. Esta tecnología emplea cámaras para la adquisición de imágenes y utiliza la informática para el procesamiento digital, análisis y reconocimiento de datos multidimensionales de las imágenes para obtener información del objeto en estudio. En Calidad de Semillas, los sistemas de VC están siendo de utilidad en identificación y clasificación de semillas en función de las características de la imagen tales como: el tamaño, la forma, el color y la textura. El color se refiere a la intensidad de los píxeles, el tamaño refleja el número de píxeles, la forma describe los límites del objeto y la textura denota la variación en la intensidad de los píxeles.

Este sistema es capaz de detectar, simultáneamente, diferentes características de la imagen para seleccionar las más adecuadas en aplicaciones específicas. La VC es una de las tecnologías que más aplicación tiene para pruebas automatizadas de Germinación, Vigor, Pureza física y botánica, como así también para detectar la presencia daños e infecciones y medir características morfológicas como perímetro, largo y ancho. Actualmente, ya se

comercializan sistemas de VC para determinar Pureza comercial e identificar variedades.

En Germinación y Vigor, se han investigado los cambios en parámetros derivados de la imagen tales como dimensiones y forma de las semillas, durante la imbibición que correlacionan con cambios a nivel biológico que ocurren durante la germinación. Permiten generar curvas de germinación a lo largo del tiempo y determinar la tasa de alargamiento de la radícula en base a algoritmos. También se ha estudiado su potencial para identificar semillas de diferentes especies y variedades dentro de una misma especie (Choudhary *et al.*, 2008; Guevara-Hernández and Gomez-Gil, 2011; Xin Yi *et al.*, 2016). Además, estos sistemas también han sido utilizados para la identificación de semillas de malezas. Los análisis de Pureza son un requisito para la comercialización de semillas; dichos análisis se realizan en laboratorios acreditados y requieren de técnicos altamente calificados. En Argentina, investigadores del Laboratorio de Semillas de EEA Oliveros del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y del Instituto de Física de Rosario, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) desarrollaron un Sistema de Identificación Automática de Semillas de Malezas por Machine Visión y lograron identificar 236 especies en base a las propiedades morfológicas, al color y a la textura (Granitto *et al.*, 2005) (Figura 3).

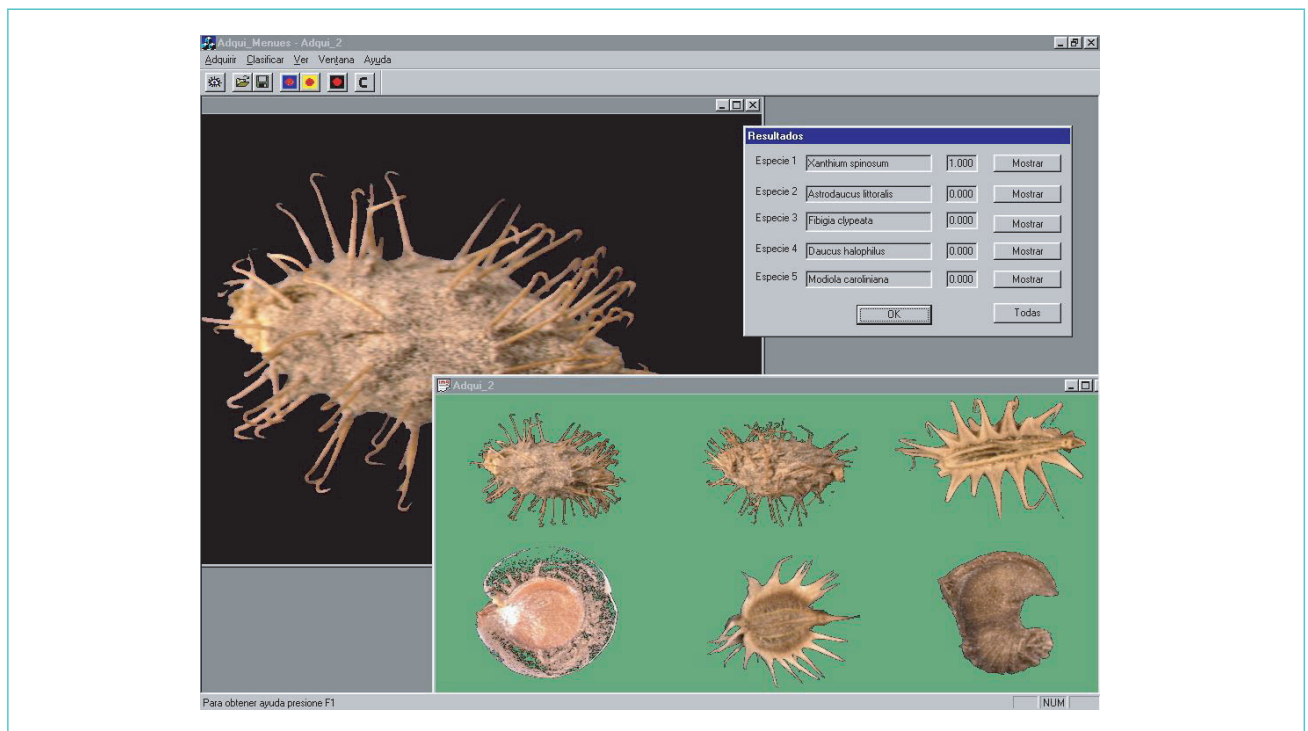


Figura 3. Identificación automática de semillas de *Xanthium spinosum*. El Identificador Automático de Semillas de Malezas utiliza algoritmos para comparar las características morfológicas, el color y la textura del objeto a identificar con la base de datos de imágenes generada previamente (Granitto *et al.*, 2005).





El sistema de visión artificial requiere de un gran volumen de imágenes para validar una aplicación y de sistemas capaces de procesar ese volumen de información. Sin embargo, ha demostrado ser muy eficiente en cuanto a la velocidad y precisión en la adquisición de imágenes, procesamiento y análisis. Es un área que está avanzando de manera extraordinaria gracias a la rapidez en las actualizaciones de hardware y software, la optimización de algoritmos y las herramientas de procesamiento que son esenciales para mejorar el rendimiento de los sistemas de VC.

Imágen multi e hiperspectral

Las imágenes espectrales reproducen la figura de un objeto en función de la longitud de onda que esté reflejando o emitiendo, brindando información espacial y espectral de manera simultánea. Para ello, el objeto de interés se expone secuencialmente a una fuente de luz de diferentes longitudes de onda, mediante una cámara se capta la señal y se genera un set de imágenes donde cada una de ellas representa una cierta longitud de onda. En semillas, el set de imágenes obtenido puede

brindar información sobre sus propiedades químicas y estructurales, contenido de agua y sus características morfológicas. Luego de la adquisición de las imágenes se requiere de técnicas de procesamiento digital y espectral, métodos matemáticos, análisis multivariados para seleccionar las longitudes de onda óptima para la interpretación y obtención de resultados.

Existen imágenes multiespectrales e hiperspectrales. En las imágenes multiespectrales, se toman imágenes en bandas seleccionadas de longitudes de onda, normalmente entre 3 y 20, no siendo necesario que las bandas sean contiguas (Figura 4.b). En cambio, las imágenes hiperspectrales combinan la visión computacional y la espectroscopía para capturar imágenes en un rango espectral completo con un intervalo específico y contiguo entre cada longitud de onda (Figura 4.c). Esta última obtiene el espectro continuo del objeto de análisis, debiéndose seleccionar aquellas longitudes de onda que proporcionan información sobre cierto aspecto de la calidad. Mientras tanto, una imagen multiespectral permite obtener información en longitudes de onda discretas.

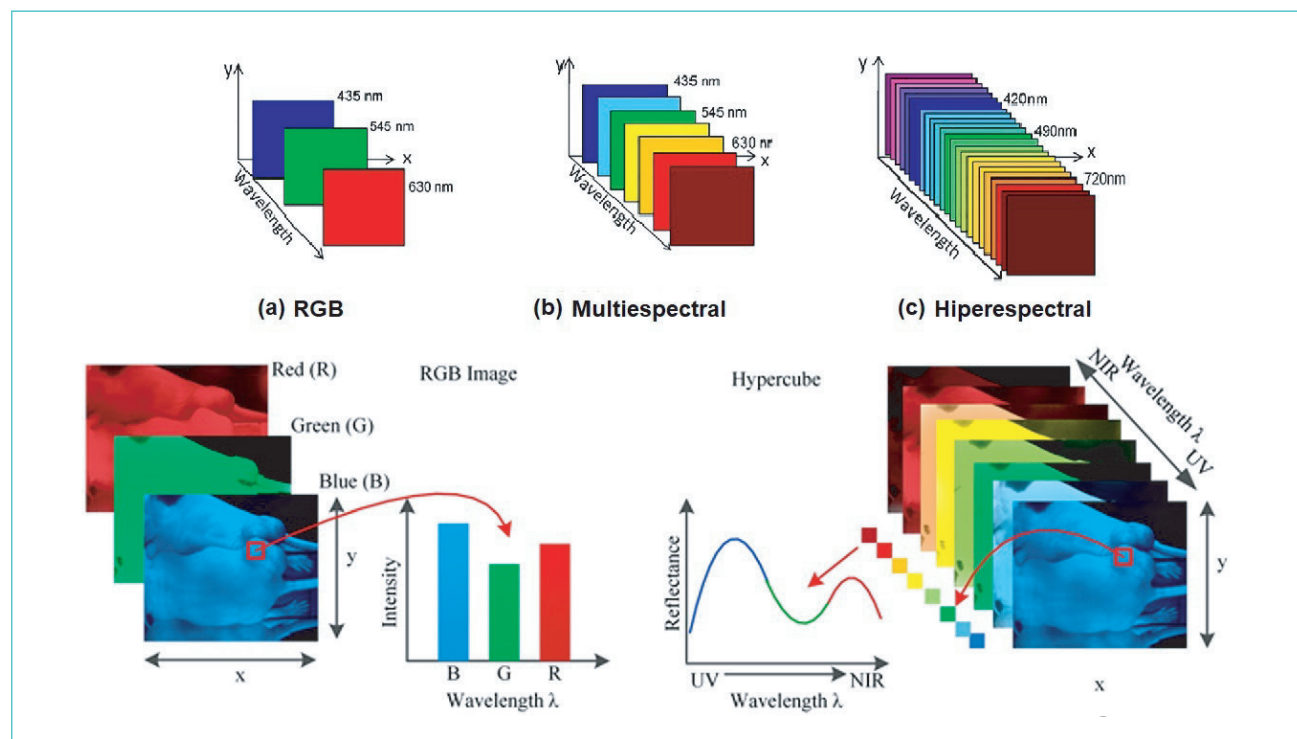


Figura 4. Comparativa entre distintos tipos de imágenes en función del número de bandas espectrales capturadas. (a) RGB (Red-Green-Blue), (b) multiespectral y (c) hiperspectral.



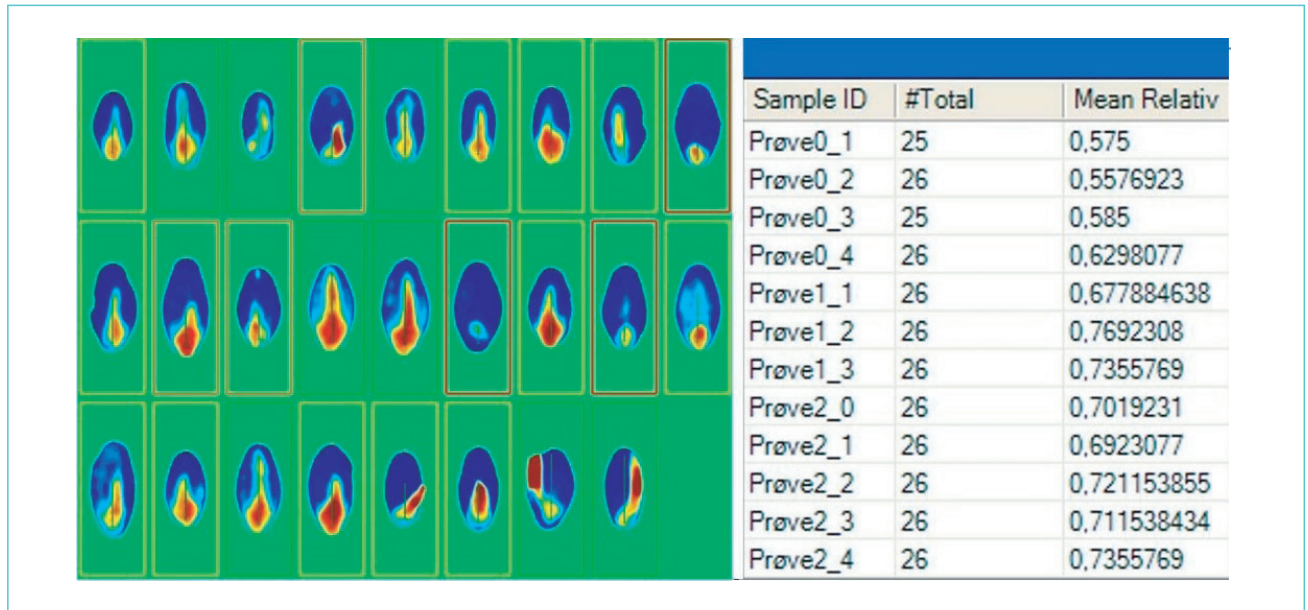


Figura 5. Imagen multispectral utilizada en un análisis de Germinación y Vigor. <https://videometer.com/Applications/Seed-imaging/Germination-and-vigor>

Las imágenes multispectrales demostraron ser útiles en análisis de Pureza, pudiendo distinguir entre especies y variedades en base a las características espectrales y visuales de las semillas. También está en investigación su potencial en Pruebas de Germinación y Vigor, en base a características morfológicas y bioquímicas de la semilla, logrando determinar la tasa de germinación y brindando información sobre la longitud de la radícula, lo cual está relacionado directamente con el vigor (Figura 5).

Por otra parte, las imágenes multispectrales también se han utilizado en análisis de Sanidad. La combinación de imágenes captadas en longitudes de onda dentro del espectro visible (380–780 nm) y NIR (780–2500 nm) han logrado separar semillas infectadas de semillas no infectadas en diferentes especies (Olesen *et al.*, 2011; Jaillais *et al.*, 2015; Vrešak *et al.*, 2016). También, se han realizado algunos estudios para identificar diferentes especies de hongos en semillas de espinaca (Olesen *et al.*, 2011) y cebada (Boelt *et al.*, 2018) (Figura 6).

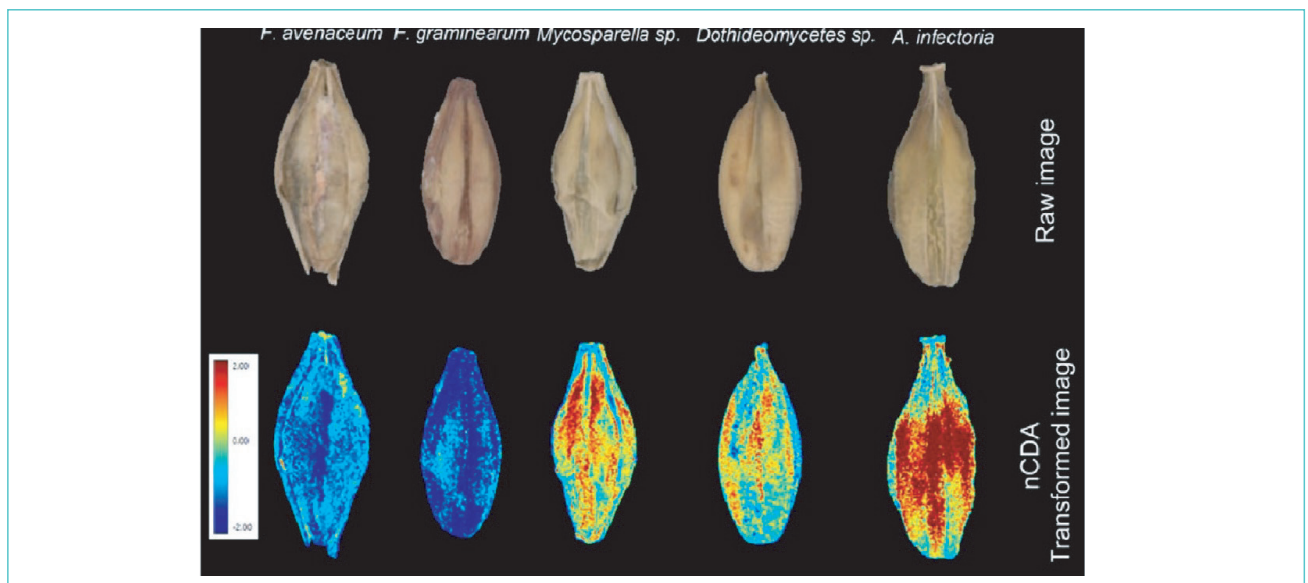


Figura 6. Imagen de semillas de cebada infectadas con *Fusarium avenacetum*, *Fusarium graminearum*, *Mycosparella sp.*, *Dothidomycetes sp.*, *Alternaria infectoria* y su correspondiente imagen transformada CDA (Análisis Discriminante Canónico) (Boel, *et al.*, 2018).



Las imágenes espectrales están demostrando tener un gran potencial y versatilidad como una herramienta tecnológica no destructiva y rápida en análisis de calidad de semillas; sin embargo, los equipamientos aún resultan costos y se requiere de personal cualificado para el análisis de resultados.

Fluorescencia de clorofila

La clorofila es un pigmento fotosintético que, a menudo, está presente en algunas especies de semillas durante su desarrollo. En el proceso de maduración, la clorofila se degrada progresivamente, el tenor de clorofila disminuye y la semilla cambia también su coloración. Sin embargo, condiciones ambientales adversas pueden afectar el proceso natural de degradación provocando la presencia de clorofila residual, la cual influye negativamente sobre los atributos de calidad fisiológica y comercial, como en el caso de las semillas de soja. El nivel de clorofila se puede evaluar mediante métodos destructivos de extracción química, pero resulta una metodología compleja de utilizar en la rutina de análisis dado que se requiere de personal altamente calificado y de equipamientos costosos.

La técnica de Fluorescencia de Clorofila (FC) utiliza tecnología láser, detectores de clorofila y filtros de interferencia en 656 y 730 nm. Cuando se hace incidir el haz de luz sobre la semilla se genera la excitación de las moléculas de clorofila, que luego durante el retorno desde un estado excitado a un estado fundamental reemiten luz conocida como FC. Basándose en la relación existente entre el contenido de clorofila de las semillas y la intensidad de FC, se han desarrollado equipamientos para cuantificar dicha FC de forma rápida y no destructiva. Esta técnica permite medir y clasificar semillas utilizando histogramas de intensidad o imágenes bidimensionales de FC. La distribución de la señal de FC se ha estudiado en numerosas especies como *Brassica oleracea* (Dell'Aquila *et al.*, 2002), *Capsicum annum*, *Solanum lycopersicum* (Jalink *et al.*, 1999), *Hordeum vulgare* (Konstantinova *et al.*, 2002), *Glycine max* (Cícero *et al.*, 2009), *Daucus carota* (Groot *et al.*, 2006) y *Oryza sativa* L. (Hay *et al.*, 2015). Esta técnica también se utiliza para el análisis de las variaciones de la señal de FC durante la dinámica de imbibición y germinación (Figura 7). La fluorescencia de clorofila es una tecnología rápida y no destructiva, que tendría potencial de uso en la producción, clasificación, limpieza y análisis de calidad de semillas.

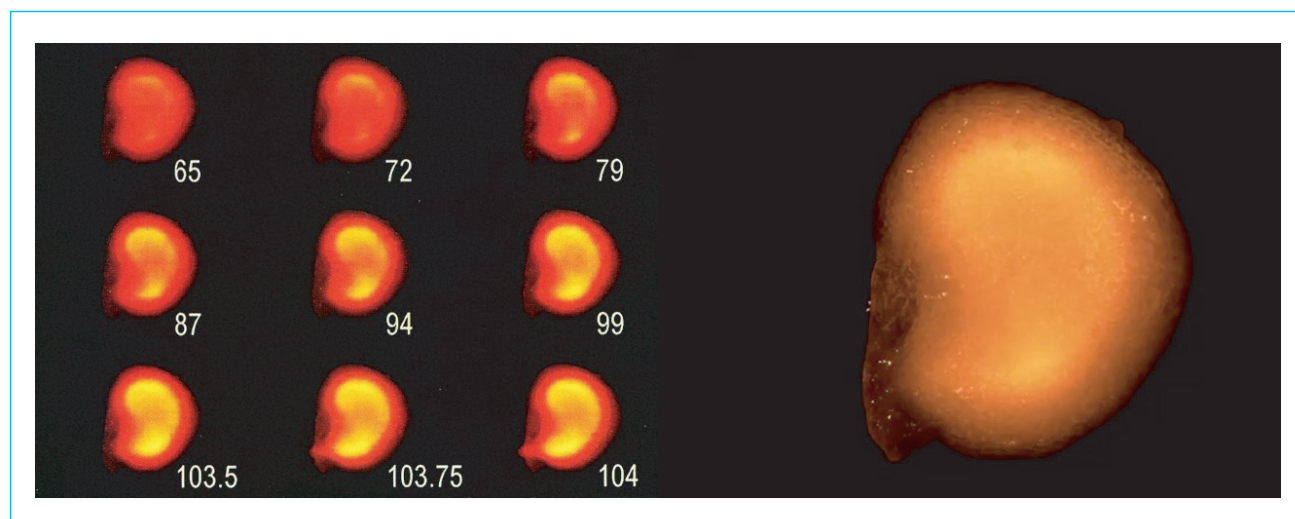


Figura 7. Imagen de la fluorescencia de clorofila de semillas de pimienta en la imbibición y germinación a lo largo del tiempo (h). <https://www.phenovation.com/seed-videos/>





Conclusión

Las semillas representan un sistema biológico complejo, cuyo potencial se evalúa mediante componentes de calidad que incluyen aspectos fisiológicos, bioquímicos, moleculares y morfológicos. La aplicación de las nuevas tecnologías no destructivas, mencionadas en este artículo, permite obtener información consistente del estado de la semilla de manera más integral y brinda la posibilidad de corroborar los resultados con pruebas tradicionales. El uso del análisis por imágenes y de las nuevas tecnologías contribuye a mejorar los procedimientos y ampliar la diversidad de opciones para los analistas, los investigadores y los tecnólogos de semillas.

Referencias

- Boelt, B.; Shrestha, S.; Salimi, Z.; Jørgensen, J.R.; Nicolaisen, M. and Carstensen, J.M. (2018). Multispectral imaging – a new tool in seed quality assessment? *Seed Science Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0960258518000235>
- Choudhary, R.; Paliwal, J. and Jayas, D.S. (2008). Classification of cereal grains using wavelet, morphological, colour, and textural features of non-touching kernel images. *Biosystems Engineering*, 99, 330-337.
- Cicero, S. M.; van der Schoor, R. and Jalink, H. (2009). Use of chlorophyll fluorescence sorting to improve soybean seed quality. *Revista Brasileira de Sementes*, 31(4), 145-151.
- Dell'Aquila, A. (2009). New perspectives for seed germination testing through digital imaging technology. *The Open Agriculture Journal*, 3(1).
- Dell'Aquila, A.R.; van der Schoor, R. and Jalink, H. (2002). Application of chlorophyll fluorescence in sorting controlled deteriorated white cabbage (*Brassica oleracea* L.) seeds. *Seed Science and Technology*, 30, 689-695.
- Granitto, P. M.; Verdes, P. F. and Ceccatto, H. A. (2005). Large-scale investigation of weed seed identification by machine vision. *Computers and Electronics in Agriculture*, 47(1), 15-24.
- Groot S.P.C.; Birnham, Y.; Rop, N.; Jalink, H.; Forsberg G.; Kromphardt C., Werner, S. and Koch E. (2006) Effect of seed maturity on sensitivity of seeds towards physical sanitation treatments. *Seed Science and Technology*, 34, 403-413.

- Guevara-Hernandez, F.; and Gil, J. G. (2011). A machine vision system for classification of wheat and barley grain kernels. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (3), 672-680.
- Hay, F. R.; Timple, S. and van Duijn, B. (2015). Can chlorophyll fluorescence be used to determine the optimal time to harvest rice seeds for long-term genebank storage? *Seed Science Research*, 25(3), 321-334.
- Jaillais, B.; Roumet, P.; Pinson-Gadais, L. and Bertrand, D. (2015). Detection of *Fusarium* head blight contamination in wheat kernels by multivariate imaging. *Food Control*, 54, 250-258.
- Jalink, H.; van der Schoor, R.; Birnbaum, Y. E. and Bino, R. J. (1999). Seed chlorophyll content as an indicator for seed maturity and seed quality. *Acta Horticulturae*, 504, 219-227.
- Konstantinova, P.; van der Schoor, R.; van den Bulk, R.W. and Jalink, H. (2002). Chlorophyll fluorescence sorting as a method for improvement of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed health and germination. *Seed Science and Technology*, 30, 411-421.
- Olesen, M.H.; Carstensen, J.M. and Boelt, B. (2011) Multispectral imaging as a potential tool for seed health testing of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Seed Science and Technology*, 39, 140–150.
- Vrešak, M.; Olesen, M.H.; Gislum, R.; Bavec, F. and Jørgensen, J.R. (2016). The use of image-spectroscopy technology as a diagnostic method for seed health testing and variety identification. *PLoS ONE* 11, e0152011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152011>
- Yi, X.; Eramian, M., Wang, R.; Neudorf, J.; Salzl, A. and Maruschak, J. (2016). Seed Identification Using Computer Vision — A Proof of Concept Study. *Seed Technology*, 37(1), 93-100. www.jstor.org/stable/26625377