



## Uso de Microtomografía de rayos X para la identificación de daños en semillas de soja.

Gallo C.<sup>1</sup>, Martínez M.<sup>2</sup>, Arango.<sup>1</sup>, Rubino G.<sup>3</sup>, Peralta M.<sup>3</sup>, Airaldo G.<sup>3</sup>

1 INTA EEA Oliveros, Ruta Nacional 11 km 353, Oliveros, Argentina. - 2 UNR, Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Campo Experimental José Villarino, CC14, Zavalla, Argentina - 3 INTI Rafaela, Ruta Nacional 34 km 227,6, Rafaela, Argentina

gallo.carina@inta.gob.ar, arango.miriam@inta.gob.ar



Palabras clave: *Glycine max* L., microtomografía, daños, calidad.

La relación entre las características físicas de las semillas y su calidad se investiga ampliamente mediante *Glycine max*, microtomografía, daños, calidad técnicas de imagen basadas en rayos X. La radiología es una técnica no destructiva, empleada para el análisis de características internas y externas de las semillas. Estas características se refieren, principalmente, a la anatomía de las estructuras seminales y a defectos o daños que no pueden visualizarse fácilmente. Además, la radiología aplicada en el análisis de calidad de semillas permite identificar cambios fisiológicos que se producen en las simientes durante el proceso de maduración y que pueden tener una importante influencia sobre la capacidad de germinación (Simak, 1991).

La radiografía de rayos X proporciona imágenes bidimensionales de la semilla, siendo útil para caracterizar la morfología de la semilla y los **Uso de Microtomografía de rayos X para la identificación de daños en semillas de soja.** daños en especies de semillas grandes y planas. En tanto, la microtomografía de rayos X (micro-TC) se basa en los mismos principios que los rayos X, pero obtiene un set de imágenes transversales bidimensionales que, a través de un algoritmo, se combinan para dar una imagen tridimensional, permitiendo inspeccionar las diferentes secciones de la semilla y hacer mediciones internas (Stuppy *et al.*, 2003). Este tipo de imagen

tridimensional de alta resolución brinda la posibilidad de hacer una visualización precisa de la morfología interna y los tejidos seminales, así como también de los daños en semillas voluminosas, de formas irregulares y pequeñas (Gomes & van Duijn, 2017). La obtención de imágenes tridimensionales con rayos X en Ciencia y Tecnología de Semillas es cada vez más frecuente. El uso de la micro-TC se emplea cada vez más para lograr una caracterización más precisa de la morfología y anatomía interna de las semillas, la detección de daños internos debidos a la presencia de insectos, daños ambientales o mecánicos, tales como la presencia microfisuras internas no observables por la radiografía de rayos X convencional (Gomes & van Duijn, 2017). De hecho, las imágenes de rayos X en 3D han sido reconocidas como una herramienta potencial para la clasificación de semillas basada en la caracterización de la morfología interna (Xia *et al.*, 2019).

Por ser un método no destructivo, las semillas analizadas con micro-TC pueden ser sometidas a pruebas fisiológicas, con la finalidad de establecer patrones que permitan estudiar la relación causa-efecto de la presencia de distintos daños en las semillas. La Prueba topográfica por Tetrazolio (TZ) es una prueba bioquímica que puede ser utilizada para hacer una rápida estimación de la viabilidad y vigor de las semillas y para detectar la presencia de daños causados por distintos factores como el ambiente de producción, las picaduras de chinches y maquinarias (ISTA, 2022).



El objetivo del trabajo fue identificar daños en semillas de soja (*Glycine max* L.) mediante el uso de microtomografías de rayos X y comparar con los resultados la Prueba topográfica por Tetrazolio.

### Materiales y Métodos

La obtención de las imágenes de micro-TC se realizó en el Departamento de Validación de Equipos y Componentes del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), Rafaela, Santa Fe, Argentina. La selección del material y la Prueba topográfica por Tetrazolio se realizó en el Laboratorio de Semillas de la Estación Experimental Oliveros del INTA, Oliveros, Santa Fe, Argentina.

Se seleccionaron semillas de soja con daños visibles del ambiente, caracterizados por la presencia de arrugas en la zona periférica de los cotiledones, abolladuras en zona periférica y central de cotiledones y eje embrionario. También se escogieron semillas con lesiones visibles originadas por picaduras de chinches.

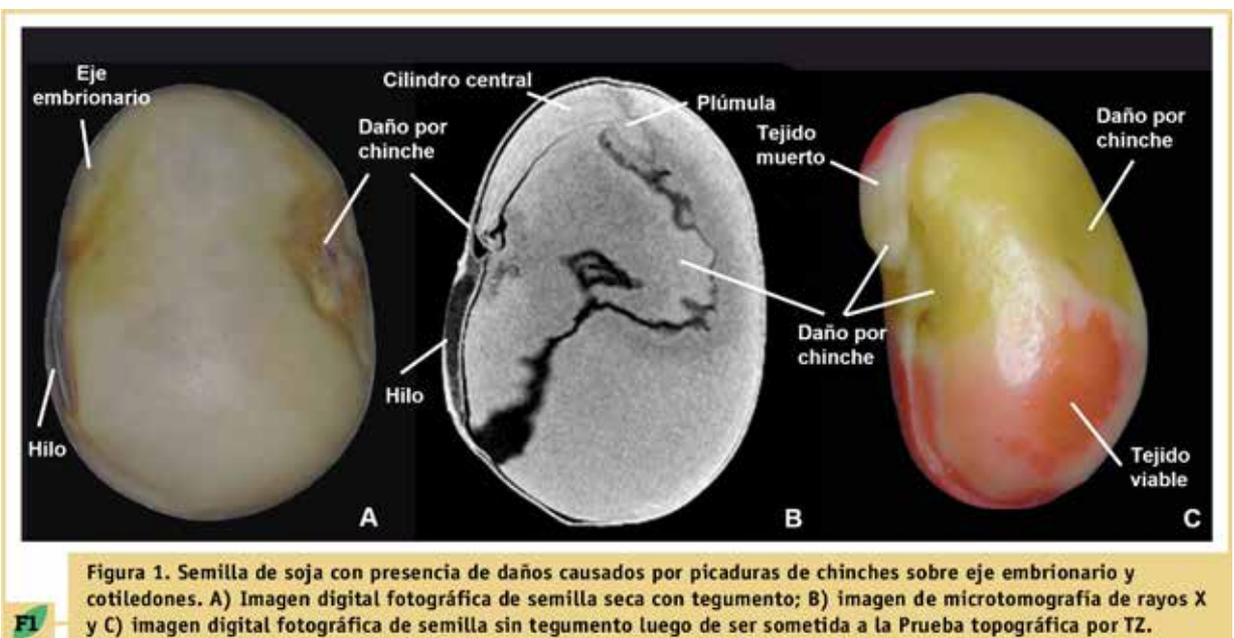
Las imágenes de rayos X se tomaron en semillas individuales con el equipo Imax 70 y se procesaron con el software Dental Imaging 6130. Las micro-CT se realizaron con el sistema Phoenix V tome x s - General Electric, bajo una tensión de 45 kV y una corriente de 140  $\mu$ A, y la reconstrucción de la imagen tridimensional se realizó utilizando el software VG Studio Max 3.0.

Una vez obtenidas las imágenes de micro-TC, las semillas se sometieron a la Prueba topográfica por Tetrazolio (ISTA, 2022). Cada semilla se colocó entre papeles humedecidos durante 16 horas y luego se sumergió en una solución de 2,3,5 trifenil cloruro de tetrazolio, con una concentración del 1% a 35°C durante 3 horas y en oscuridad. Finalizado este período de tinción se eliminó la solución, se realizó el enjuague con agua de red y se retiró el tegumento. De cada semilla se tomaron imágenes fotográficas digitales. Se identificaron los daños presentes en cada semilla mediante el reconocimiento de determinados patrones. Estos patrones de daños son específicos para las distintas especies; en este caso, para soja, son los síntomas con los cuales el factor causante del daño manifiesta su acción sobre las semillas de una manera física y repetida en el tiempo.

Antes de someterlas a la Prueba de TZ, se obtuvieron imágenes fotográficas digitales de cada semilla seca con los diferentes daños, y luego de finalizado el período de tinción, empleando una cámara Hayear 51 MP con sensor de imagen CMOS Panasonic de 51 megapíxeles de 1/2", 33 pulgadas. La cámara posee 3 lentes: Navitar 1-6010; Navitar (1X) 1-615 y Navitar (05X) 1-6232.

### Resultados

La inspección visual de las imágenes de micro-CT permitió reconocer la naturaleza del daño en cada semilla individual y caracterizar la localización, la ex-





tensión y la profundidad, estimando el estado fisiológico y la integridad física de las semillas.

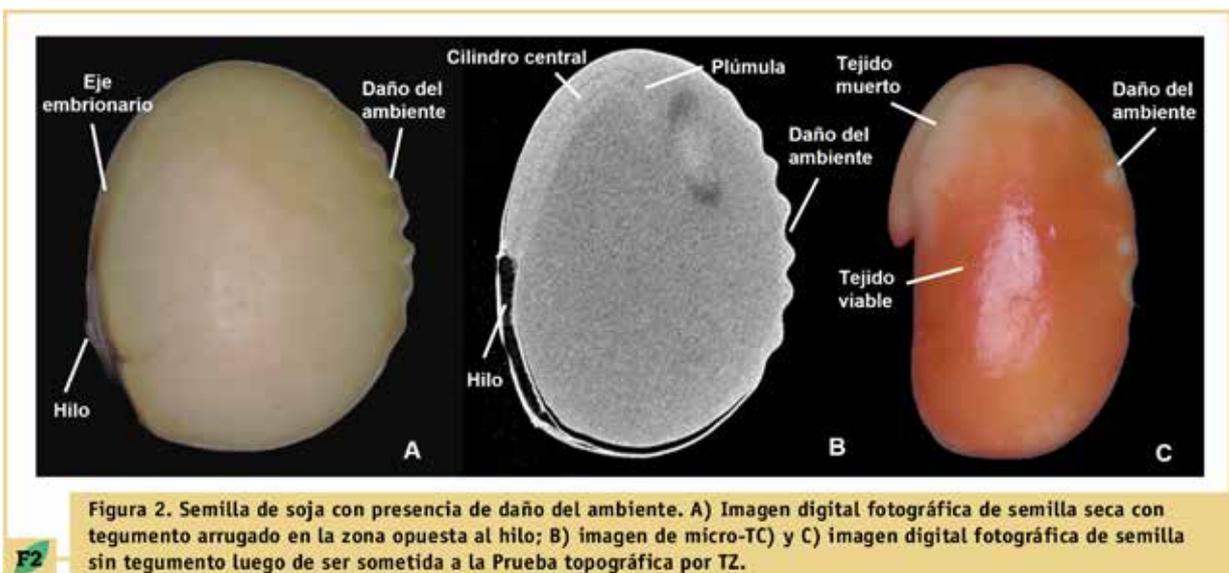
En la Figura 1 se observa un conjunto de tres imágenes de la misma semilla de soja, que corresponden a una foto digital: la imagen de micro-CT y una foto digital de la semilla luego de la Prueba TZ. La semilla de la Figura 1 presenta daños causados por picaduras de chinche ubicadas en el extremo distal del eje embrionario y en cotiledones. Este daño en las semillas secas se observa, generalmente, como áreas deprimidas de color blanco o crema que pueden o no estar necrosadas y, a veces, manifiestan cierta depresión en el área afectada (Figura 1 A). En la imagen de micro-TC se observa con nitidez el daño presente en el extremo del eje embrionario que afecta su normal morfología, así como también en el área central del cotiledón, evidenciando áreas deprimidas de contornos irregulares que afectan la forma esférica tradicional de la semilla de soja (Figura 1 B). Además, se observa el daño producto de la picadura de chinche en la zona terminal de la radícula y en la plúmula.

En la imagen de la semilla sometida a la Prueba de TZ se observan tejidos con diferentes coloraciones, asociadas a la actividad respiratoria de los mismos. Los tejidos de color rosado intenso indican una buena hermeticidad y permeabilidad de la semilla, características de tejidos fisiológicamente sanos y viables. Por el contrario, el color blanco aparece en los tejidos como consecuencia de falta completa de actividad respiratoria y, por lo tanto, estos tejidos se consideran muertos. Corroborando, de esta mane-

ra, la muerte de tejidos producto de las picaduras de chinche (Figura 1 C).

La presencia de chinches y la falta de control apropiado en el momento oportuno en los lotes de producción, provoca un daño que presenta un patrón característico y fácil de diagnosticar tal como se muestra en la Figura 1 C. Este patrón es de ocurrencia azarosa sobre la semilla y, además, posee síntomas muy bien definidos y de fácil visualización. Las áreas afectadas por las picaduras de chinches son generalmente de color blanco, amarillo o crema y poseen una consistencia granulosa o corchosa. Además, suelen ser áreas deprimidas y con frecuencia con una apariencia de estrella dada por líneas de fisuras radiales, que parten desde el centro de la picadura hacia los bordes de la misma. El borde de estas lesiones suele ser de contornos irregulares y pueden aparecer varias picaduras de distintos tamaños en la misma semilla. La profundidad y gravedad del daño por picadura de chinche está relacionado con el momento de aparición del insecto, cuanto más temprano es el ataque mayor serán los daños, llegando incluso al aborto de la semilla.

En la Figura 2 se observa un conjunto de tres imágenes de la misma semilla de soja, que corresponden a una foto digital: la imagen de micro-CT y una foto digital de la semilla luego de la Prueba TZ. En estas imágenes se observa una semilla de soja con presencia de daño del ambiente en la zona periférica de los cotiledones, en la zona opuesta al eje embrionario. En la semilla seca (Figura 2 A) se identifica el daño causado por el ambiente de producción, con un marcado arrugamiento del tegumento que genera





garras claramente visibles que pueden observarse con nitidez en la imagen de micro-TC. En la misma, también se puede identificar el área del hilo y en el eje embrionario se observan, en detalle, el cilindro central y la plúmula protegida entre ambos cotiledones (Figura 2 B).

La imagen de micro-TC (Figura 2 B) permite observar, claramente, la profundidad de las garras lo largo del perímetro dorsal de la semilla, que se manifiestan de manera homóloga en la periferia de los cotiledones, afectando la convexidad de los bordes de la semilla. Se detecta un área de diferente nivel de gris en el área proximal del cotiledón, próxima a la zona de unión de los cotiledones con el eje embrionario. Por otra parte, en los patrones de tinción en la Prueba de TZ, se evidenciaron las garras de tejido muerto características de daño ambiental, y un área sin tinción en el casquete superior y en el eje embrionario (Figura 2 C).

El ambiente de producción puede generar lesiones en las semillas durante el proceso permanente de hidratación y deshidratación que experimentan las estructuras seminales con los ciclos propios de la humedad relativa del ambiente. Durante estos ciclos, la semilla gana y pierde humedad con mayor o menor intensidad y/o aceleración del proceso a lo largo de las horas del día y del período de crecimiento. Esta mecánica de hidratación y deshidratación produce

expansión y compresión de las estructuras seminales, generando lesiones que se visualizan como “garras”. Estas lesiones pueden estar presentes en todo el perímetro de la semilla, pero principalmente y con mayor frecuencia, en el área dorsal de los cotiledones opuesta al eje embrionario (Figura 2 C).

Las condiciones ambientales excesivamente severas son capaces de provocar serios problemas de calidad en la semilla de soja. Las temperaturas elevadas y el estrés hídrico en el suelo, durante períodos prolongados en la etapa de activo crecimiento de las semillas, pueden provocar alteraciones físicas y fisiológicas. Con respecto a las alteraciones físicas de las semillas de soja, los síntomas característicos corresponden a la alteración de la forma natural esférica de la semilla y la producción de arrugamientos y abolladuras pronunciadas (Figura 3 A).

En la imagen de micro-TC se observan profundas abolladuras y arrugas en el tegumento, tanto en los cotiledones como en el eje embrionario, que afectan la forma esférica natural de la semilla. La misma se encuentra aplanada sobre su eje longitudinal con una depresión más pronunciada en la zona distal del cotiledón izquierdo. En dicha zona de los cotiledones se visualizan áreas oscurecidas, producto de daños por picadura de chinche (Figura 3 B).

La observación de la semilla teñida luego de la Prueba de TZ, permite identificar los daños causados

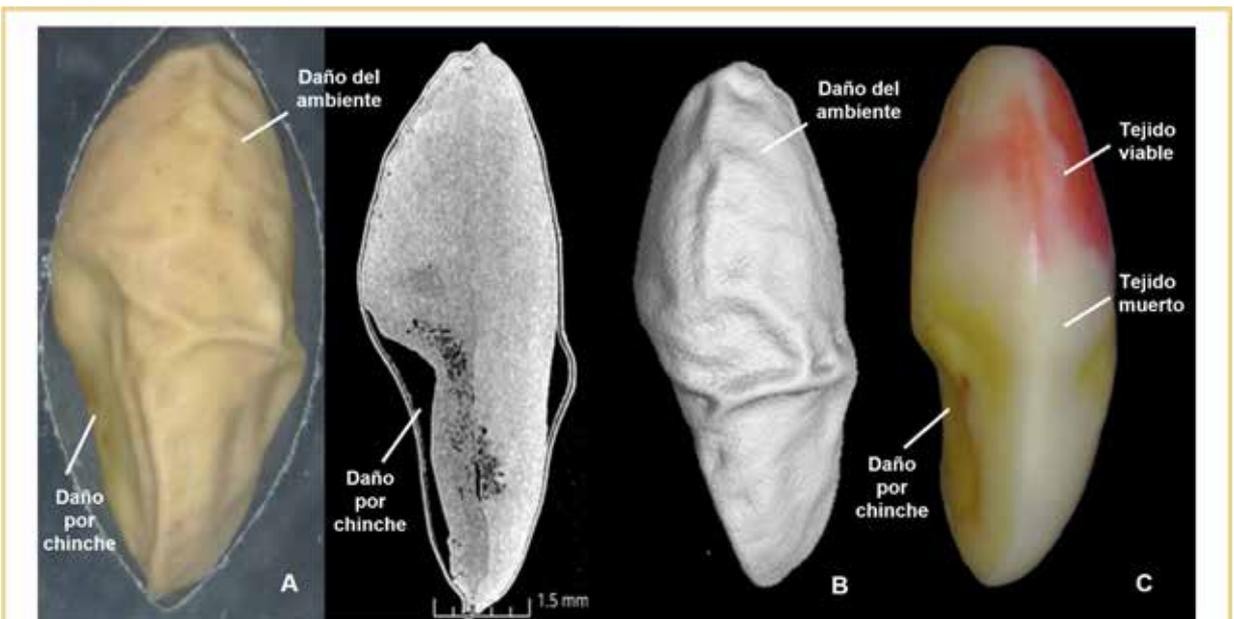


Figura 3. Semilla de soja con presencia de daños del ambiente (arrugado y abollado) y de chinche. A) Imagen digital fotográfica de vista dorsal de una semilla seca con tegumento; B) imágenes de micro-TC de la semilla en su vista dorsal y C) imagen digital fotográfica de vista dorsal de la semilla sin tegumento luego de sometida a la Prueba topográfica por TZ.

F3



por el ambiente y por la picadura de chinche en los cotiledones (Figura 3 C). El daño de la picadura de chinche se observa como un área de tejido amarillo fuertemente deprimida, que genera una importante deformación del cotiledón. Respecto al daño causado por el ambiente, se pueden observar extensas áreas de tejido muerto en ambos cotiledones como resultado del severo estrés sufrido por la semilla a causa del ambiente (Figura 3 C).

## Conclusiones

La inspección por micro-CT proporciona imágenes de alta resolución, siendo una herramienta eficiente para investigar los daños ambientales y por picaduras de chinches en las semillas de soja, permitiendo la asociación con patrones de tinción de la Prueba topográfica por Tetrazolio.

## Bibliografía

Gomes-Junior, F.G, van Duijn B. 2017. Three-dimensional (3- D) X-ray imaging for seed analysis. *Seed Testing International*, 154, p. 48-52

International Seed Testing Association. 2022. *International Rules for Seed Testing*. Zürichstr. 50, CH-8303 Basersdorf, Suiza. ISSN 2310-3655

Simak, M. 1991. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. En: *Tree and Shrub Seed Handbook*. Ed. Gordon, A.G.; Gosling P; Wang, B.S.P. Zurich, Suiza, p. 96.

Stuppy, W. H., Maisano, J. A., Colbert, M. W., Rudall, P. J., & Rowe, T. B. 2003. Three-dimensional analysis of plant structure using high-resolution X-ray computed tomography. *Trends in Plant Science*, 8(1), p. 2-6.

Xia Y., Xu Y., Li J., Zhang C, Fan S. 2019. Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: A review *Artificial Intelligence in Agriculture*, 1, p. 35-47.