

Determinación de la viabilidad de las semillas de *Juglans nigra* a través de imágenes obtenidas usando Tomografía Computarizada y Resonancia Magnética.

J.A. Vozzo, PhD¹,
Ramesh Patel, M.D.²,
Allen Terrel, C.R.T.²

INTRODUCCION

La obtención de imágenes mediante el uso de resonancia magnética (RM) es una técnica no destructiva que puede ser utilizada en semillas. Esta técnica permite localizar los protones (nucleo de los iones de hidrógeno) que conforman las moléculas de agua y las cadenas de ácidos grasos, permitiendo crear imágenes que ayudan a interpretar la fisiología de las semillas. Las propiedades fisiológicas de las semillas tales como latencia (Vozzo y Young 1993), cualidades potenciales del embrión (Vozzo y Song 1989) y anomalías del embrión (Vozzo 1973) son características que pueden ser estudiadas por esta vía.

Halloin, Cooper, Potchen y Thompson (1993) estudiaron la distribución de los lípidos en las semillas de pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), usando imágenes obtenidas mediante RM. Vozzo (1996) usó la técnica de RM y resonancia magnética nuclear (RMN), para determinar el contenido de agua y lípidos en las semillas de walnut negro (*Juglans nigra* L.), relacionándolos luego con su viabilidad. Otros autores han usado exitosamente la técnica de RM en diferentes semillas de especies agrícolas (Foucat, Chavagnat, Renou 1993).

MATERIALES Y METODOS

La semilla de walnut negro se caracteriza por tener aproximadamente 30mm de largo, con cotiledones, eje embrionario y testa claramente definidos. Las semillas

utilizadas en este estudio fueron colectadas en la ciudad de Starkville, situada en la parte central-este del estado de Mississippi (ubicado en el sur-este de USA). Después de haber eliminado el pericarpio, las semillas fueron rápidamente almacenadas en seco a 4°C hasta el momento de los análisis. Las semillas fueron radiografiadas, mediante radiografía convencional (RC) a 30 kVp, 3 mA, 180 sec a 65 cm con película Kodak3 Industrex tipo M, el cual fue develado manualmente. Cada semilla fue individualmente identificada para la posterior obtención de imágenes mediante la técnica de RM, así como para la determinación de la germinación. Inicialmente, las semillas con embriones bien desarrollados fueron embebidas en agua por 24 horas y luego sometidas a RM, tomografía computarizada (TC) y espectroscopia por RMN. Posteriormente para las pruebas de germinación las semillas fueron pretratadas; estratificándolas por 90 días a 4°C dentro de bolsas plásticas negras húmedas. Las pruebas de germinación fueron conducidas en cajas de germinación con papel kimpack³ húmedo. Durante el proceso de germinación fueron aplicados regímenes de temperaturas alternas de 20° C y 30° C, con periodos de 8 horas de luz durante 30° C y 16 horas de luz durante 20° C (Brinkman 1974). Después del proceso de estratificación las semillas fueron expuestas nuevamente a RM.

RESULTADOS

Las semillas examinadas usando RC fueron fácilmente divididas en dos grupos basados en la densidad de las radiografías; semillas vacías (embriónes no suficientemente desarrollados) y semillas con embriones bien desarrollados. Los experimentos iniciales mostraron que las semillas clasificadas como vacías mediante RC, fueron también clasificadas como vacías cuando se usaron las técnicas de TC y RM. Estas semillas clasificadas como vacías, generalmente no germinaron después de haber sido expuestas al proceso de estratificación. Por esta razón los estudios siguientes de TC y RM se realizaron solo con aquellas semillas que habían sido clasificadas como de embriones bien desarrollados durante los estudios de RC.

¹ U. S. Department of Agriculture-Forest Service, Starkville, Mississippi,

² University Medical Center, Department of Radiology, Jackson, Mississippi.

³ El uso de nombres comerciales en este artículo es solo para información de los lectores. Esto no constituye ninguna recomendación o aprobación oficial por el Departamento de Agricultura, de los productos o servicios mencionados.



En este estudio se pudo demostrar que existe una relación entre la anatomía (TC) y la fisiología (RM) denotada por la interrelación que hay entre la densidad y la distribución de los protones de las semillas.

Reconstrucciones seriadas a través de computadora generaron imágenes a tres dimensiones, ilustrando la localización y densidades de las principales partes de la semilla: testa, cotiledones y embrión. Aplicación de color artificialmente asignado por distribución de rangos de energía espectral permitió la separación de las formas oscuras que de otra manera no eran visibles. Comparando tanto las semillas vacías, como las llenas pero no germinables, con las llenas y germinables, se determinó una clara distinción basada en la cantidad y localización del color verde aplicado. La energía de longitud de onda del color verde representa la mínima viabilidad de la semilla para germinar, cuando se asignó densimétricamente a los niveles de gris obtenidos con radiografía TC. Las semillas vacías mostraron trazos o ninguna coloración verde. Las semillas llenas pero no germinables, mostraron un poco más de coloración verde. En tanto que las llenas y germinables, fueron distinguidas rápidamente por mostrar abundante coloración verde (Fig. 1).

Con el propósito de definir las densidades representadas por longitud de ondas del color verde, las imágenes obtenidas por RM muestran una distribución móvil de los

protones del núcleo de hidrógeno (H). Comparando los patrones de densidad obtenidos con la técnica de TC, con la distribución de protón obtenida con la técnica de RM, la coloración verde representa la localización del contenido de agua y de las largas cadenas de lípidos presentes en las semillas

Inicialmente, RM daba una imagen conjunta tanto de los protones del agua como de los protones de los lípidos (Fig. 2). Posteriormente, sin embargo, ha sido posible separar las dos entidades alterando las constantes de relajación, lo cual implica una diferencia en el tiempo de relajación de los lípidos y del agua (Fig. 3). Las imágenes resultantes verificaron que los protones de los lípidos y los del agua fueron los factores más importantes en conformar la intensidad de la imagen.

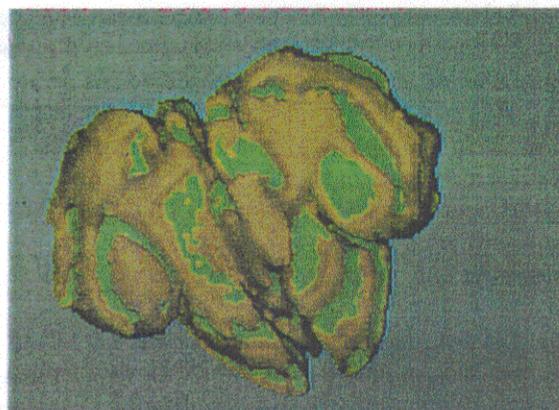


Figura 2. Representación de la disponibilidad de agua y ácidos grasos en las semillas de *Juglans nigra* usando resonancia magnética.

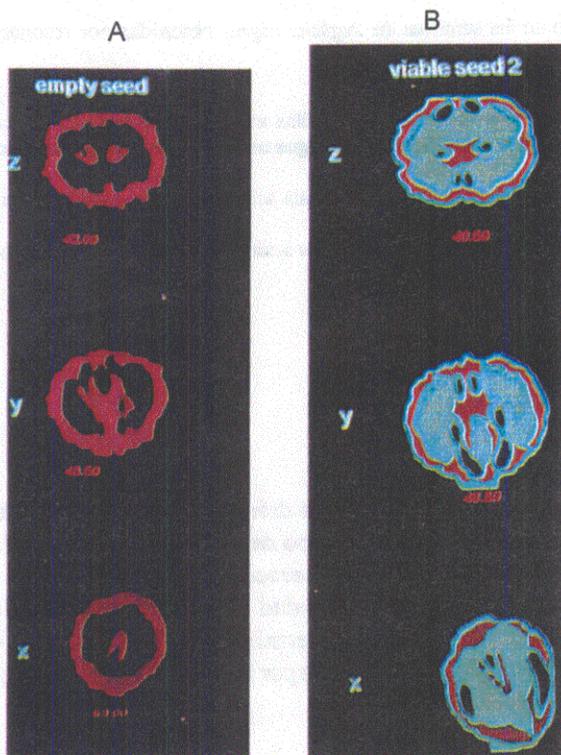


Figura 1. Tomografía computarizada de las semillas de *Juglans nigra*. A. vacía, no viable; B. Llena, viable.

Las imágenes adquiridas después del proceso de estratificación de las semillas fueron más intensas que las adquiridas antes de la estratificación. La intensificación de las imágenes se puede explicar por el incremento en los contenidos de agua y grasa ocurrido durante el proceso de estratificación (Fig. 4). Este incremento es interesante porque refleja no solo la cantidad si no también la distribución interna de los ácidos grasos y del agua. La unión de las moléculas de agua como resultado de la estratificación fue descrita por Faust, Liu, Millard, Stute (1991).

Los resultados de germinación indican que todos los embriones que mostraban cantidad mínima y distribución de lípidos (como lo indicaron las imágenes obtenidas antes del proceso de estratificación) fallaron en germinar.

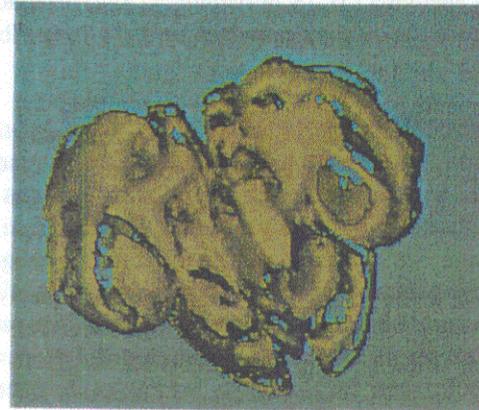
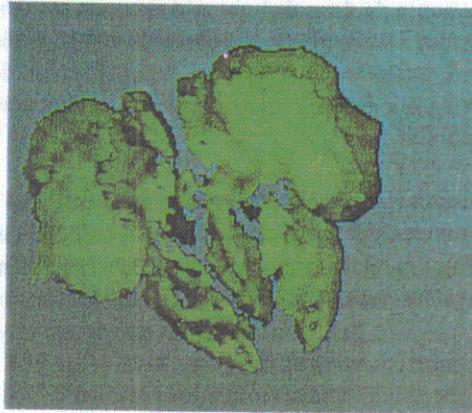


Figura 3. Imágenes de las semillas de *Juglans nigra* obtenidas por resonancia magnética

- A. Movimiento en la distribución de los protones del hidrógeno del agua;
- B. Movimiento en la distribución de los protones del hidrógeno de los ácidos grasos.

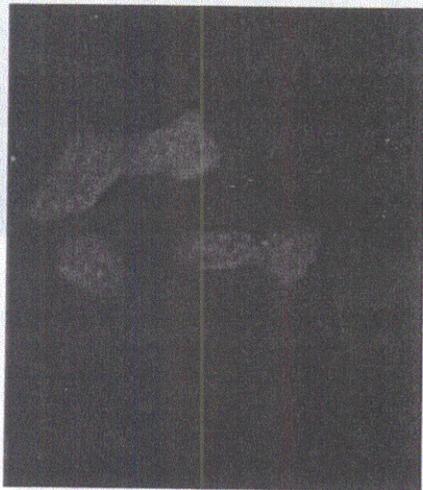


Figura 4. Imágenes de las semillas de *Juglans nigra*, obtenidas por resonancia magnética.

- A. Distribución de los protones del agua en las semillas antes del proceso de estratificación;
- B. Distribución de los protones del hidrógeno del agua en las semillas después del proceso de estratificación;
- C. Distribución de los protones del hidrógeno de los ácidos grasos en semillas antes del proceso de estratificación;
- D. Distribución de los protones de hidrógeno de los ácidos grasos en las semillas después del proceso de estratificación.

DISCUSION

La relación entre abundancia de protones, disminución en las constantes de protón, el papel de los instrumentos usados, y la intensidad de las imágenes obtenidas, ha sido discutida detalladamente por Werhli, *et al* (1983); Halloin, *et al* (1994); y MacFall, *et al* (1994). Como resultado final de esta interacción se puede apreciar que los componentes con mas alta constante de relajación (T2) proveen proporcionalmente, la mayor contribución en la adquisición de imágenes intensas. Al momento de obtener los datos para la conformación de las imágenes, la selección de una frecuencia de resonancia con un rango común a la frecuencia de resonancia del agua y la de los lípidos, hace que ambos componentes contribuyan a la intensidad de la

imagen. Sin embargo, las diferencias en las constantes de relajación (T2) y el tiempo de relajación del agua y de los lípidos, permite la separación del aporte de los dos componentes a la intensidad de las imágenes obtenidas. En este estudio se determinó que los lípidos fueron mayormente responsables por la intensidad de las imágenes de los embriones.

Las imágenes adquiridas después del proceso de estratificación fueron mas intensas que las adquiridas antes del proceso de estratificación de las semillas. Faust *et al* (1991) mencionan que este cambio puede ser atribuido al incremento en el tiempo de relajación de los protones,

conjuntamente con los cambios atribuidos a la desasociación de las moléculas del agua como resultado de la vernalización. En este estudio el incremento en la intensidad de las imágenes se puede relacionar indudablemente con el aumento en la disponibilidad de las moléculas de agua, ya que ningún exceso de lípido pudo ser detectado en el espectro del embrión obtenido por RMN después de aplicar el proceso de estratificación a las semillas.

Previamente los datos de germinación mostraron que todos los embriones (28 de 54 semillas) que habían perdido una cantidad significativa de lípidos, demostrado en el espectro por RMN y por las pobres imágenes obtenidas por RM antes del proceso de estratificación, fallaron en germinar. También muchos de los embriones (14 de 54 semillas) que exhibieron un espectro "normal" y que mostraron imágenes intensas en RM no germinaron. Sin embargo, cuando se detectaron suficientes lípidos en el espectro por RMN, fue imposible diferenciar entre los embriones germinables y no germinables antes o después del proceso de estratificación (Vozzo *et al.* 1960).

La densidad de los tejidos se pueden estudiar con procedimientos de radiografía convencional, lográndose buenas interpretaciones de la estructura y de los daños en las semillas. Como herramienta para el control de calidad, esta técnica está limitada a una observación general para distinguir entre semillas con embrión bien desarrollado y aquellas con embrión poco desarrollado o sin el RC puede ser también útil para detectar semillas infestadas con insectos y semillas mecánicamente dañadas. Por otra parte la técnica de TC provee imágenes en un solo plano las cuales permiten la interpretación por estratos de los tejidos densamente estructurados. La hidratación afecta la interpretación de las imágenes obtenidas por RC y TC, debido a que el agua es por naturaleza un agente radioopaco. Sin embargo, el agua es un elemento esencial tanto para el proceso de germinación como para el proceso de almacenamiento. Finalmente, la técnica de RM da una ventaja en la interpretación del movimiento interno del agua. La correlación descrita en este estudio usando semillas de walnut son también válidas para detectar y localizar agua y largas cadenas de lípidos en otras semillas.

La obtención de imágenes a través de RM brinda una técnica alternativa a la radiografía convencional para el estudio no destructivo de los embriones de semillas (Foucat *et al.* 1993) Esta tecnología da imágenes de alta resolución de los tejidos vegetales (Connelly *et al.* 1987; Veres *et al.* 1991) y tiene además la ventaja potencial de dar información fisiológica importante de los tejidos en estudio. Cambios de la disponibilidad del agua en las yemas del árbol de manzana durante la vernalización, un proceso muy parecido a la estratificación, fueron demostrados con RM por Faust *et al.* (1991). Gussoni *et al.* (1993) y Halloin *et*

al. (1993) usaron RM para demostrar la estructura y distribución de los lípidos en semillas de oliva (*Olea europaea* L.) y pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), respectivamente.

En la industria del walnut, por ejemplo, con esta técnica se puede identificar la cantidad y distribución de los depósitos de aceites (largas cadenas de ácidos grasos) en semillas de diferentes fuentes. Por lo que esta técnica puede ser utilizada para la selección entre varios grados/calidades del walnut comercializado para la producción de alimentos.

El control de calidad se puede basar en la cuantificación del estado y estatus del contenido de agua interna. Específicamente, TC y/o RM pueden ser procedimientos beneficiosamente usados para determinar la germinación potencial en semillas de walnut. TC no solamente provee una clara definición de los gradientes de densidad relacionados con la viabilidad de las semillas, sino que también es altamente confiable para medir estructuras internas (con una precisión dentro de 0.25 mm). Ninguna de estas técnicas, TC o RM son destructivas para las muestras en estudio y ambas son de gran ayuda y tienen aplicación práctica en control de calidad de las semillas.

REFERENCIAS

- Brinkman, K. A. 1974. *Juglans L.* In: Seeds of Woody Plants (coord. C. S. Schopmeyer), Washington, DC. USDA Forest Service, Agricultural Handbook 450, p. 454-459.
- Connelly, A., Lohman, J. A. B., Loughman, B. C., Quiquampoix, H., y Ratcliffe, R. G. 1987. High resolution imaging of plant tissues by NMR. *Journal of Experimental Botany* 38:1713-1723.
- Faust, M. Liu, D., Millard, M. M., y Stutte, G. W. 1991. Bound versus free water in dormant apple buds---a theory for endodormancy. *HortScience* 26:887-890.
- Foucat, I., Chavagnat, A., y Renou, J. P. 1993. Nuclear magnetic resonance microimaging and x-radiography as possible techniques to study seed germination. *Scientia Horticulture* 55:323-331.
- Gussoni, M., Greco, F., Consonni, R., Molinari, H., Zannoni, G., Bianchi, G., y Zetta, L. 1993. Application of NMR microscopy to the histochemistry study of olives (*Olea europaea* L.). *Magnetic Resonance Imaging* 11:259-268.
- Halloin, J. M., Cooper, T. G., y Potchen, E. J. 1994. Magnetic resonance imaging, a technology for noninvasive plant analysis. In: *Research and Applications of Chemical Sciences in Forestry* (comp. J. A. Vozzo). New Orleans, LA. USDA Forest Service, General Technical Report SO-104. p. 1-9.

Halloin, J. M., Cooper, T. G., Potchen, E. J., y Thompson, T. E. 1993. Proton magnetic resonance imaging of lipid in pecan embryos. *Journal of the American Oil Chemists Society* 70:1259-1262.

MacFall, J. S., Spaine, P., Doudrick, R., y Johnson, G. A. 1994. Alterations in growth and water-transport processes in fusiform rust galls of pine determined by magnetic resonance microscopy. *Phytopathology* 84:288-293.

Veres, J. S., Cofer, G. P., y Johnson, G. A. 1991. Distinguishing plant tissues with magnetic resonance microscopy. *American Journal of Botany* 78:1704-1711.

Vozzo, J. A. 1973. Germination analyses of excised embryo cylinders and whole acorns of water oak. New Orleans, LA. USDA Forest Service, Research Note SO-153. 3 p.

Vozzo, J. A. 1988. Seed radiography. *Materials Evaluation* 46(11):1450-1455.

Vozzo, J. A., Halloin, J. M., Cooper, T. G., y Potchen, E. J. 1996. Use of NMR spectroscopy and magnetic resonance imaging for discriminating *Juglans nigra* L. seeds. *Seed Sci. and Technol.* 24:457-463.

Vozzo, J. A., y Song, M. J. 1989. High-voltage electron microscopy of cell walls in *Pinus taeda* seeds. *In: Tropical Seed Research*, J. W. Turnbull, ed. Canberra, Australia. Australian Center for International Agricultural Research, Proceedings No. 28. p. 78-80.

Vozzo, J. A., y Young, R. W. 1975. Carbohydrate, lipid, and protein distribution in dormant, stratified, and germinated *Quercus nigra* embryos. *Botanical Gazette* 136:306-311.

Werhli, F. W., MacFall, J. R., y Newton, T. H. 1983. Parameters determining the appearance of NMR images. *In: Newton, T. H., y Potts, D. G., eds. Modern neuroradiology, Vol. 2. Advanced imaging techniques.* San Anselmo, CA: Clavadel Press. p. 81-117.



Vozzo, J.A., Ph.D.; Patel, Ramesh, M.D.; Terrel, Allen, C.R.T. 2000. Determinacion de la viabilidad de las semillas de *Juglans nigra* a traves de imagenes obtenidas usando Tomografia Computarizada y Resonancia Magnetica. *In: Salazar, Rodolfo, coordinador. II Simposio sobre avances en la produccion de semillas forestales en America Latina—memorias; 1999 octubre 18-22; Santo Domingo, Republica Dominicana. Turrialba, Costa Rica: CATIE: 163-167.*