

# IMAGE ANALYSIS, QUALITY AND MATURATION OF JILÓ (*Solanum gilo*) SEEDS

## ANÁLISIS DE IMAGENES, CALIDAD Y MADURACIÓN DE SEMILLAS DE JILÓ (*Solanum gilo*)

M. Vinicius Prado-Alves, Édila Vilela-de Resende-Von Pinho, Heloisa Oliveira-dos Santos, Gustavo Costa-Prado-Alves, Maria Laene Moreira-de Carvalho, Fernanda de Oliveira-Bustamante\*

Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, Avenida Campus Universitário, s/n, 37200-000, Lavras - MG. fobustamante@hotmail.com

### ABSTRACT

Harvest time is correlated to the seed physiological quality and can be determined through germination and vigor tests. X-ray is a good technique for assessing seed quality, since it can reduce analysis subjectivity, making the process faster and more efficient. Our aim was to evaluate jiló (*Solanum gilo*) seed internal free area, through X-ray image analysis, and to relate results with seed germination in different stages of maturation. The variables evaluated were: object area, perimeter, standard deviation, and fraction area, which represents the internal free areas of seeds. The experimental design was completely randomized and treatments for each variety consisted of fruits harvested at: 35 d after anthesis (DAA); 40 DAA; 45 DAA and 45 DAA plus 7 d at rest in dark room. Four replicates of 50 seeds were used for each treatment. Data from germination test and seeds image analysis were used for ANOVA analysis, and treatments means were compared with the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ). Jiló seeds came from Morro redondo and Tinguá varieties. Jiló seeds from each treatment were analyzed by X-ray test and subsequently led to germination test. X-ray images were analyzed using ImageJ software, which was efficient. There were no statistically significant differences in each maturation stage between varieties. However, there was a statistically significant difference in seeds free areas of both varieties. Seeds with free area (embryo - endosperm)  $\leq 10\%$  produced normal seedlings, and harvest at 45DAA + 7 d was recommended and germination seeds was 100 %. Thus, radiographic image analysis of eggplant seeds allows measurement of internal free areas, as well as determination of the relationship between these and germination, allowing identification of seeds with greater potential to germinate, helping to reduce jiló seeds economic losses.

### RESUMEN

El momento de cosecha se correlaciona con la calidad fisiológica de la semilla y puede definirse a través de la germinación y las pruebas de vigor. Los rayos X son una buena técnica para evaluar la calidad de la semilla, ya que pueden reducir la subjetividad del análisis, volviendo el proceso más rápido y más eficiente. Nuestro objetivo fue evaluar el área libre interna de la semilla de jiló (*Solanum gilo*), a través del análisis de la imagen de rayos X, y relacionar los resultados con la germinación de la semilla en distintas etapas de maduración. Las variables evaluadas fueron: área del objeto, perímetro, desviación estándar, y área de fracción, que representa las áreas libres internas de las semillas. El diseño experimental fue completamente aleatorio y los tratamientos para cada variedad fueron frutos cosechados: 35 d después de la antesis (DDA); 40 DDA; 45 DDA; y 45 DDA más 7 d en descanso en un cuarto oscuro. Cuatro réplicas de 50 semillas se utilizaron para cada tratamiento. Los datos de las pruebas de germinación y el análisis de imágenes de semillas se usaron para realizar un análisis de ANOVA, y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ). Las semillas de jiló (berenjena) provinieron de las variedades Morro Redondo y Tinguá. Las semillas de jiló de cada tratamiento se analizaron con la prueba de rayos X y después se realizó la prueba de germinación. Las imágenes de rayos X se analizaron usando el programa ImageJ, que fue eficiente. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cada etapa de maduración entre las variedades. Sin embargo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en áreas libres de las semillas de ambas variedades. Las semillas con área libre (embrión-endospermo)  $\leq 10\%$  produjeron plántulas normales, y se recomienda la cosecha a 45 DDA + 7 d cuando la germinación de semillas fue de 100 %. Por lo tanto, el análisis de imagen radiográfico de semillas de jiló permite la medición de áreas libres internas, así como la definición de la relación entre las mismas y la germinación, permitiendo identificar las

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: October, 2016. Approved: September, 2017.

Published as NOTE in *Agrociencia* 52: 267-278. 2018.

**Key words:** Scarlet eggplant, X-ray, physiological maturity.

## INTRODUCTION

Jiló (*Solanum gilo* Raddi) (Solanaceae) is native from India and was introduced in Brazil by slaves. Its fruits, which are edible, are light green or dark green color, becoming reddish orange when ripe (Filgueira, 2003). Jiló, also known as Scarlet eggplant or Brazilian red eggplant, is a vegetable with good acceptance in the market, especially in the Southeast region of Brazil. However, there are few studies with this species, mostly addressed to seeds (Alves *et al.*, 2012).

The maturation degree of seeds influences their quality, and immature seeds have low vigor and germination power (Carvalho *et al.*, 2009). The period from anthesis to the physiological maturation varies from one species to another, and sometimes from one cultivar to another (Araújo *et al.*, 1982). For some species with fleshy fruits, seeds will continue their maturation after harvest (Barbedo *et al.*, 1994; Justino *et al.*, 2015). This is an advantage because it decreases the number of harvests and enables to harvest fruits with different ripeness stages (Mengarda and Lopes, 2012).

Defining the physiological maturation of seeds is important to estimate time of harvest. Thus, it is necessary to evaluate physiological quality of seeds and these evaluations are most commonly carried out through germination and vigor tests. However, X-ray analysis is a promising technique for seed quality evaluation (Gomes Júnior *et al.*, 2012), helping to estimate harvest time.

Simak and Gustafsson (1953) carried out the first evaluation of seeds with conifer species by using X-ray analysis. This technique analyzes the internal structure of the seed through its exposure to a source of low X-ray energy; the radiation fractions enter the seed and reach the film, allowing formation of an image characterized by different shades of gray. The principle of the technique is the absorption of X-rays in different amounts by the seed tissues due to its structure, composition and density, in addition to radiation exposure period (ISTA, 2004).

Image analysis to evaluate the physiological quality of seeds can help reducing the subjectivity of analysis, as it eliminates human error, making it a quicker and more efficient process. Image analysis of

**semillas con mayor potencial para germinar, y ayudando a reducir las pérdidas económicas de semillas de jiló.**

**Palabras clave:** jiló, rayos X, madurez fisiológica.

## INTRODUCCIÓN

El jiló (*Solanum gilo* Raddi) (Solanaceae) es originario de India y los esclavos lo introdujeron en Brasil. Sus frutos son comestibles, de color verde claro o verde oscuro, volviéndose rojizo anaranjados cuando maduros (Filgueira, 2003). El jiló, también conocido como berenjena escarlata o berenjena roja brasileña, es un vegetal con buena aceptación en el mercado, especialmente en la región sureste de Brasil. Sin embargo, existen pocos estudios sobre esta especie, en su mayoría dedicados a las semillas (Alves *et al.*, 2012).

El grado de maduración de las semillas impacta su calidad, y las semillas inmaduras tienen bajo vigor y poder de germinación (Carvalho *et al.*, 2009). El periodo de anthesis a maduración fisiológica varía de una especie a otra, y en ocasiones de una variedad a otra (Araújo *et al.*, 1982). Para algunas especies con frutos carnosos, las semillas continuarán su maduración después de la cosecha (Barbedo *et al.*, 1994; Justino *et al.*, 2015). Esta es una ventaja porque el número de cosechas disminuye y permite cosechar frutos con distintas etapas de maduración (Mengarda y Lopes, 2012).

La definición de la maduración fisiológica de las semillas es importante para estimar el tiempo de cosecha. Por ende, es necesario evaluar la calidad fisiológica de las semillas y estas evaluaciones generalmente se llevan a cabo a través de pruebas de germinación y de vigor. Sin embargo, el análisis de rayos X es una técnica prometedora para la evaluación de la calidad de la semilla (Gomes Júnior *et al.*, 2012), ayudando a estimar el tiempo de maduración.

Simak y Gustafsson (1953) realizaron la primera evaluación de semillas con especies coníferas utilizando el análisis de rayos X. Esta técnica analiza la estructura interna de la semilla a través de su exposición a una fuente de baja energía de rayos X; las fracciones de radiación entran en la semilla y llegan a la capa, permitiendo la formación de una imagen caracterizada por distintos tonos de gris. El principio de la técnica es la absorción de rayos X en distintas cantidades por los tejidos de la semilla debido a su

seedlings and seeds is outstanding in this regard for several species (Nunes *et al.*, 2014), but for Solanaceae seeds, such as jiló, there is still little information.

The results of the X-ray test have successfully related internal morphology of seeds with germination or morphology of tomato (*Lycopersicon esculentum*) (Van der Burg *et al.*, 1994), pepper (*Capsicum annuum*) (Gagliardi and Marcos-Filho, 2011; Dell'Aquila, 2007), eggplant (*Solanum melongena*) (Silva *et al.*, 2012), *Acca sellowiana* (Silva *et al.*, 2013) and pumpkin (*Cucurbita pepo*) seedlings (Silva *et al.*, 2014). However, in most cases, this classification is visually performed; therefore, in order to develop consistent assessment models to define extension categories of embryonic development or free space inside the seeds, there is a need for more accurate methods (Marcos-Filho *et al.*, 2010).

There are no studies for *S. gilo* that relate the internal morphology of the seeds with their maturation stage through X-ray image analysis. Thus, the aim of this study was to relate the internal morphology of jiló seeds at different stages of maturation, with germination, using radiographic images.

## MATERIALS AND METHODS

The jiló seed production was carried out between July/2014 and January/2015 at Palmital farm in Ijaci, MG, Brazil (21° 9' 24" S, 44° 55' 34" W). This farm has an average altitude of 918 m and its soil is classified as clayey Oxisol.

In the first stage of the study, jiló seedlings came from Morro redondo (dark green round - DGR) and Tinguá (light green long - LGL) varieties. Seeds of both varieties of jiló were sown in plastic trays (polystyrene) of 128 cells, with Tropstrato HA - Vegetables commercial substrate, and then covered with vermiculite. Forty days after sowing, seedlings were transplanted to a greenhouse and planted in 38 m long beds with 21 plants each, spaced 1 m between rows and 0.60 m between plants.

Flowers were daily labeled on the day of anthesis to obtain the number of fruits to guarantee enough amounts of seeds for all analyses. Treatments for each variety were: T1) fruits harvested at 35 d after anthesis (DAA); T2) 40 DAA; T3) 45 DAA and, T4) 45 DAA + 7 d. In T4, fruits harvested at 45 DAA remained at rest for 7 d in a dark and ventilated space in the seed laboratory (LAS). The experimental design was completely randomized with four replicates of 50 seeds from each treatment.

Seeds were manually extracted and washed in running water. After extraction, seeds were arranged in screens for 24 h in a

estructura, composición y densidad, además del periodo de exposición a radiación (ISTA, 2004).

El análisis de imagen para evaluar la calidad fisiológica de las semillas puede ayudar a reducir la subjetividad del análisis, ya que elimina el error humano, volviéndolo un proceso más rápido y más eficiente. El análisis de imagen de las plántulas y las semillas es extraordinario en este sentido para muchas especies (Nunes *et al.*, 2014), pero para las semillas de Solanaceae, como jiló, todavía hay poca información.

Los resultados de la prueba de rayos X han relacionado exitosamente la morfología interna de las semillas con la germinación o la morfología del jitomate (*Lycopersicon esculentum*) (Van der Burg *et al.*, 1994), pimienta (*Capsicum annuum*) (Gagliardi y Marcos-Filho, 2011; Dell'Aquila, 2007), berenjena (*Solanum melongena*) (Silva *et al.*, 2012), *Acca sellowiana* (Silva *et al.*, 2013) y plántulas de calabaza (*Cucurbita pepo*) (Silva *et al.*, 2014). Sin embargo, en la mayoría de los casos esta clasificación se realiza visualmente; por lo tanto, para desarrollar modelos de evaluación consistentes para definir categorías de extensión de desarrollo embrionario o espacio libre dentro de las semillas, se requieren métodos más precisos (Marcos-Filho *et al.*, 2010).

No existen estudios para *S. gilo* que relacionan la morfología interna de las semillas con su etapa de maduración a través del análisis de imagen de rayos X. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue relacionar la morfología interna de las semillas de jiló en distintas etapas de maduración, con la germinación, usando imágenes radiográficas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La producción de semilla de jiló se efectuó entre julio de 2014 y enero de 2015 en la granja Palmital en Ijaci, MG, Brasil (21° 9' 24" S, 44° 55' 34" O). Esta granja tiene una altitud promedio de 918 m y su suelo está clasificado como Oxisol arcilloso.

En la primera etapa del estudio, las plántulas de jiló provinieron de variedades de Morro redondo (verde oscuro redondos - VOR) y Tinguá (verde claro largo - VCL). Las semillas de ambas variedades de jiló se sembraron en charolas de plástico (poliestireno) de 128 celdas, con sustrato comercial Tropstrato HA - Vegetales, y después se cubrieron con vermiculita. Cuarenta días después de la siembra, las plántulas se trasplantaron a un invernadero y se plantaron en camas con 38 m de largo con 21 plantas cada una, espaciadas a 1 m entre filas y 0.60 m entre plantas.

laboratory environment and then treated to slow drying in an air circulation oven (Nova Ética - 420) at 35 °C until reaching about 8 % water content (Queiroz *et al.*, 2011). These seeds were X-rayed and subsequently submitted to germination test. In the radiographic analyzes four replicates of 50 seeds were placed on a transparent adhesive tape (double-sided) and fixed in transparent plastic foil. Seeds from each treatment were numbered according to the position occupied on the blade. The plastic foil was placed inside the digital X-ray equipment, Faxitron® brand MX-20 DC-12 Model, and subject to radiation for 12 s at 26 kV.

After removal from the transparent film, seeds were transferred to acrylic boxes (gerbox type) (110 x 110 x 35 mm) following the same order they were in the X-ray images. Afterwards, the germination test was carried out on two sheets of blotting paper moistened with distilled water in the proportion equivalent to 2.5 times the paper mass. Seeds were distributed in acrylic boxes (gerbox type) in the same positions they were in the radiographic images and kept in seed germinator chamber (B.O.D. type) under alternate temperature and light, 20 °C / 16 h dark, 30 °C / 8 h with light, according to RAS (BRASIL, 2009).

The count was made 14 d after sowing (BRASIL, 2009). Normal seedlings (NS), abnormal (AS) and dead seeds (DS) were photographed with a Canon SX50® digital camera. The images of X-rayed seeds were saved in JPEG format and analyzed with the ImageJ software, adapting the analysis methodology of analysis used in other studies to leaf area measurement and seed internal area of seeds (Silva *et al.*, 2013).

The Analysis steps in ImageJ program Version 1.50i were as follows: image opening and its conversion to grayscale type in 8 bits followed by a selection of interest area of interest for analysis; scale selection for image calibration, and in this study the amount in mm of each image (231 x 210 mm) was considered as a reference. Variables were: the object area, the perimeter, the standard deviation, and the fraction area, which represents the internal free areas of seeds. Color adjustment was made in order to separate the areas of interest from other image constituents; and finally, measurement of variables thus obtaining the results. All procedures were manually performed for each seed.

The free space in the internal seed cavity was calculated using the ImageJ software in four replicates of 50 seeds for each treatment. In order to prevent biases by possible damages in seeds due to manual extraction, we evaluated the averages of the free space in the internal cavity of the seed, germination, normal and abnormal seedlings and dead seeds of each treatment. Data from the germination test and the seeds image analysis were used for ANOVA analysis, and treatments means were compared with the Scott-Knott test ( $p \leq 0.05$ ).

Las flores se marcaron diariamente en el día de antesis para obtener el número de frutos para garantizar suficientes cantidades de semillas para todos los análisis. Los tratamientos para cada variedad fueron: T1) frutos cosechados 35 d después de antesis (DDA); T2) 40 DAA; T3) 45 DAA; y T4) 45 DAA + 7 d. En T4, los frutos cosechados 45 DDA permanecieron en descanso por 7 d en un espacio oscuro y ventilado en el laboratorio de semillas (LAS). El diseño experimental fue completamente aleatorio con cuatro réplicas de 50 semillas de cada tratamiento.

Las semillas se extrajeron manualmente y se lavaron en agua corriente. Después de su extracción, las semillas se colocaron en pantallas durante 24 h en un laboratorio ambiental y después se trataron con secado lento en un horno de circulación de aire (Nova Ética - 420) a 35 °C hasta llegar a un contenido de agua de alrededor de 8 % (Queiroz *et al.*, 2011). Se tomaron radiografías de estas semillas y subsecuentemente se sometieron a una prueba de germinación. En los análisis radiográficos se colocaron cuatro réplicas de 50 semillas en cinta adhesiva transparente (bifaz) y se fijaron en film de plástico transparente. Las semillas de cada tratamiento se numeraron de acuerdo a la posición ocupada en la hoja. El film de plástico se colocó dentro del equipo digital de rayos X, Faxitron® marca MX-20 modelo DC-12, y se sometió a radiación por 12 s a 26 kV.

Después de retirarlas del film transparente, las semillas se transfirieron a cajas de acrílico (tipo gerbox) (110 x 110 x 35 mm) siguiendo el mismo orden que tuvieron en las imágenes de rayos X. Después, se realizó la prueba de germinación en dos hojas de papel secante humedecidas con agua destilada en una proporción equivalente a 2.5 veces el peso del papel. Las semillas se distribuyeron en cajas acrílicas (tipo gerbox) en las mismas posiciones que estaban en las imágenes radiográficas y se mantuvieron en una cámara de germinación de semillas (tipo B.O.D.) bajo temperatura y luz alternadas, 20 °C / 16 h oscuridad, 30 °C / 8 h luz, según RAS (BRASIL, 2009).

El conteo se realizó 14 d después de la siembra (BRASIL, 2009). Las plántulas normales (PN), anormales (PA) y semillas muertas (SM) se fotografiaron con una cámara digital Canon SX50®. Las imágenes de las semillas radiografiadas se guardaron en formato JPEG y se analizaron con el programa ImageJ, adaptando la metodología de análisis utilizada en otros estudios a la medición del área foliar y las áreas internas de las semillas (Silva *et al.*, 2013).

Los pasos de análisis en el programa ImageJ Versión 1.50i fueron los siguientes: apertura de imagen y su conversión a escala de grises en 8 bits seguida de una selección del área de interés para su análisis; selección de escala para calibración de la imagen, y en este estudio el número de mm de cada imagen (231 x 210 mm) se consideró como referencia. Las variables fueron: área del

## RESULTS AND DISCUSSION

Tones in the radiographic image analysis are defined by the level of radiation absorption in different areas of the seed, which is determined by thickness, density and composition of tissues in the seed (Simak, 1991; ISTA, 1993). Thus, seeds lacking embryonic tissue provide dark images because they do not have resistance to X-rays.

Radiographic images show the inner area of jiló with different percentages of free areas between the seed coat and endosperm - embryo at different maturation stages. All treatments for both varieties had free areas within the seeds. Figure 1 shows seeds of Morro Redondo and Tinguá varieties, from fruits harvested at T1 (35 DAA), T2 (40 DAA), T3 (45 DAA) and T4 (45 DAA + 7 d).

Other studies also verified the efficiency of X-ray image analysis for assessing the internal area of bell pepper seeds (Gagliardi and Marcos-Filho, 2011), eggplant (Silva *et al.*, 2012), melon (*Cucumis melo*), pumpkin and watermelon (*Citrullus lanatus*) (Gomes Júnior *et al.*, 2012), and pumpkin (Silva *et al.*, 2014).

The ImageJ software allowed the measurement of internal free areas of seeds, which allowed evaluation of the relationship between the free inner area of seeds and germination. This result is interesting because the recommended software approaches for image analysis are: Tomato Analyzer® (Marcos-Filho *et al.*, 2010) and Image ProPlus® (Dell'Aquila, 2007; Silva *et al.*, 2012). However, we did not find image analysis studies with jiló seeds using the ImageJ software in the literature reviewed; there is only one study with *Acca sellowiana* seeds by Silva *et al.* (2013) using this software.

Therefore, the promising results of this study showed an alternative to explore different types of seeds, since computerized methods using high speed capture and image processing, are the most non-invasive advanced technique providing high efficiency level for analyzing quality of seeds (Dell'Aquila, 2009).

Regarding the fruit harvest season (days after anthesis), there was no statistically significant difference in each stage of maturation between Morro Grande and Tinguá varieties, which have different colors and shapes, dark green round and light green long, respectively. However, there was a statistically

objeto, perímetro, desviación estándar y área de fracción, que representa las áreas libres internas de las semillas. El ajuste de color se hizo para separar las áreas de interés de otros componentes de la imagen; y finalmente, la medición de variables para obtener resultados. Todos los procedimientos se realizaron manualmente para cada semilla.

El espacio libre en la cavidad interna de la semilla se calculó utilizando el programa ImageJ con cuatro réplicas de 50 semillas para cada tratamiento. Para prevenir sesgos por posibles daños en las semillas debido a la extracción manual, evaluamos los promedios de espacio libre en la cavidad interna de la semilla, la germinación, las plántulas normales y anormales, y las semillas muertas de cada tratamiento. Los datos de la prueba de germinación y del análisis de imagen de las semillas se usaron para realizar un análisis ANOVA, y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba Scott-Knott ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tonos en el análisis de imagen radiográfica se definen por el nivel de absorción de radiación en distintas áreas de la semilla, lo cual se determina por el grosor, la densidad y la composición de tejidos en la semilla (Simak, 1991; ISTA, 1993). Por ende, las semillas que carecen de tejido embrionario proporcionan imágenes oscuras porque no tienen resistencia a los rayos X.

Las imágenes radiográficas muestran el área interna de jiló con distintos porcentajes de áreas libres entre la capa y el endospermo de la semilla – embrión a distintas etapas de maduración. Todos los tratamientos para ambas variedades tuvieron áreas libres dentro de las semillas. La Figura 1 muestra semillas de variedades Morro Redondo y Tinguá, de frutos cosechados a T1 (35 DAA), T2 (40 DAA), T3 (45 DAA) y T4 (45 DAA + 7 d).

Otros estudios también verificaron la eficiencia del análisis de imagen de rayos X al evaluar el área interna de semillas de pimentón (Gagliardi y Marcos-Filho, 2011), berenjena (Silva *et al.*, 2012), melón (*Cucumis melo*), calabaza y sandía (*Citrullus lanatus*) (Gomes Júnior *et al.*, 2012), y calabaza (Silva *et al.*, 2014).

El programa ImageJ permitió la medición de las áreas libres internas de las semillas, que permitieron la evaluación de la relación entre el área interna libre de las semillas y la germinación. Este resultado es interesante porque las aproximaciones de software recomendadas para el análisis de imagen

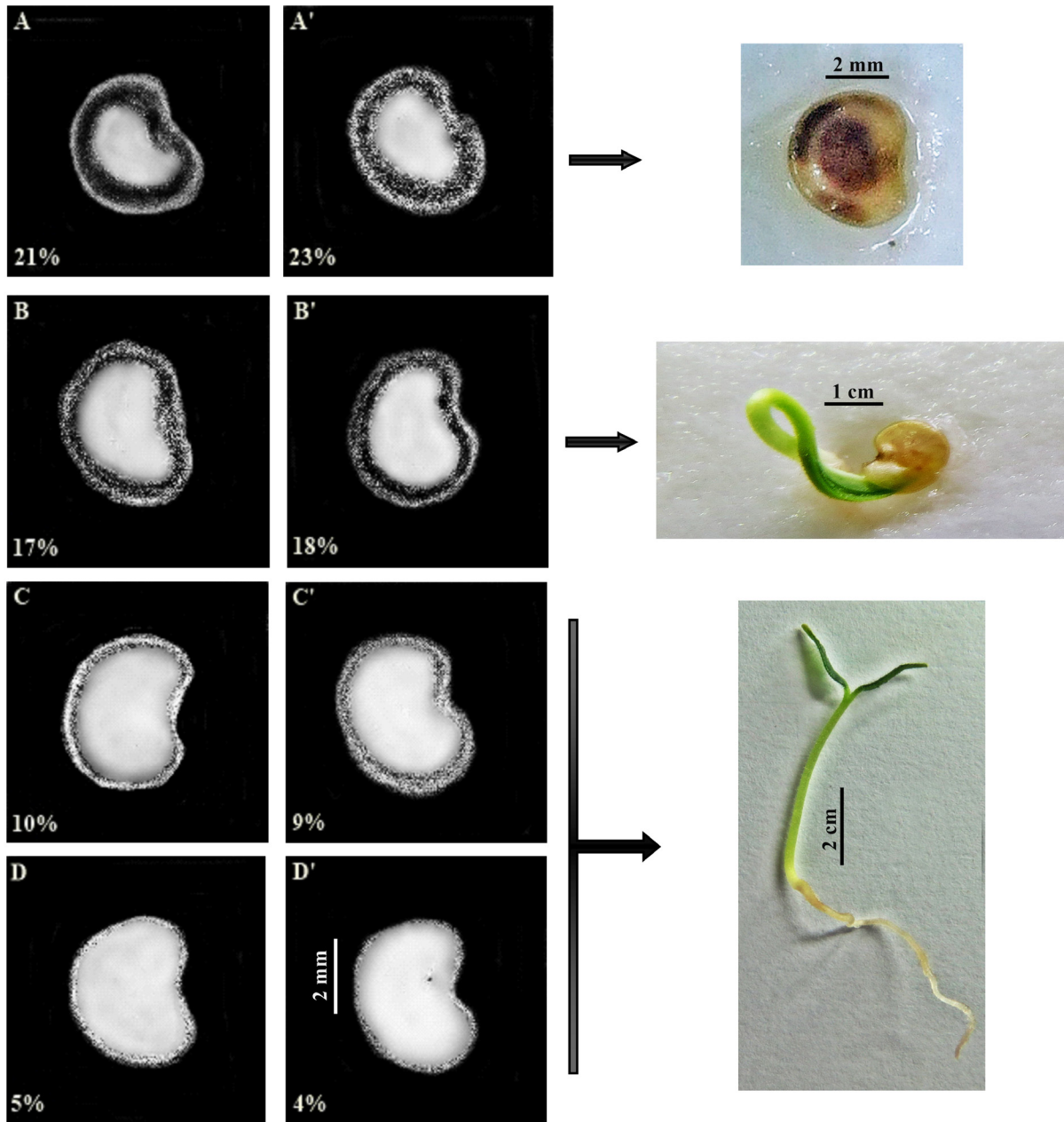


Figure 1. Radiographic images of jiló seeds (*Solanum gilo*), Morro Grande (A-D) and Tinguá (A'-D') varieties at different stages of maturation. Dead seeds in T1 - 35 DAA (A, A'), Abnormal seedlings in T2 - 40 DAA (B, B'), and Normal seedlings in T3 - 45 DAA (C, C'), and T4 - 45 DAA + 7 d. (D, D'). Percentage represents internal free area.

Figure 1. Imágenes radiográficas de semillas de jiló (*Solanum gilo*), variedades Morro Grande (A-D) y Tinguá (A'-D'), en distintas etapas de maduración. Semillas muertas en T1 - 35 DDA (A, A'), Plántulas anormales en T2 - 40 DDA (B, B'), y Plántulas normales en T3 - 45 DDA (C, C'), y T4 - 45 DDA + 7 d. (D, D'). El porcentaje representa el área libre interna.

significance difference in the free areas of seeds of both varieties (Table 1). T1 fruits of Morro Redondo and Tinguá varieties harvested at 35 DAA had a larger free average area of 21 and 23 %, respectively, as compared to fruits of T2 harvested at 40 DAA

son: Tomato Analyzer® (Marcos-Filho *et al.*, 2010) e Image ProPlus® (Dell'Aquila, 2007; Silva *et al.*, 2012). Sin embargo, no encontramos ningún estudio de análisis de imagen con semillas de jiló que utilice el programa ImageJ en la literatura revisada; solamente

**Table 1. Internal free area of seeds (FA) of jiló (*Solanum gilo*), germination percentage (G), normal seedlings percentage (NS), abnormal seedlings (AS) and dead seeds (DS) for Morro Grande and Tinguá varieties. Cuadro 1. Área libre (FA) interna de las semillas de jiló (*Solanum gilo*), porcentaje de germinación (G), porcentaje de plántulas normales (NS), plántulas anormales (AS), y semillas muertas (DS) para las variedades Morro Grande y Tinguá. (Siglas por el original en inglés).**

	STAGE	FA (%)	G (%)	NS (%)	AS (%)	DS (%)
Morro Grande	T1 - 35 DAA	21 d	0 d	0	0	100
	T2 - 40 DAA	17 c	10 c	0	20	80
	T3- 45 DAA	10 b	86 b	86	0	14
	T4- 45 DAA + 7 d	5 a	100 a	100	0	0
	CV	7.9	5.5			
Tinguá	T1 - 35 DAA	23 d	0 d	0	0	100
	T2 - 40 DAA	18 c	9 c	0	17	83
	T3- 45 DAA	9 b	84 b	84	0	16
	T4- 45 DAA + 7 d	4 a	100 a	100	0	0
	CV	6.8	5.2			

Averages with different letters in a column are statistically different (Scott-Knott;  $p \leq 0.05$ ) for each variety ♦ Los porcentajes con distintas letras en una columna son estadísticamente diferentes (Scott-Knott;  $p \leq 0.05$ ) para cada variedad.

with a free average area of 17 and 18 %. T3 fruits harvested at 45 DAA had free average area of 10 and 9 %, and T4 fruits harvested at 45 DAA and rested 7 d showed free average area of 5 and 4 %, for Morro Grande and Tinguá varieties, respectively (Table 1 and Figure 1). Thus, there was a reduction in the free area as seed maturity advanced in both varieties evaluated. Figures 2 and 3 show the distribution of free areas of seeds of Morro Redondo and Tinguá varieties ( $n=200$ ) for all treatments.

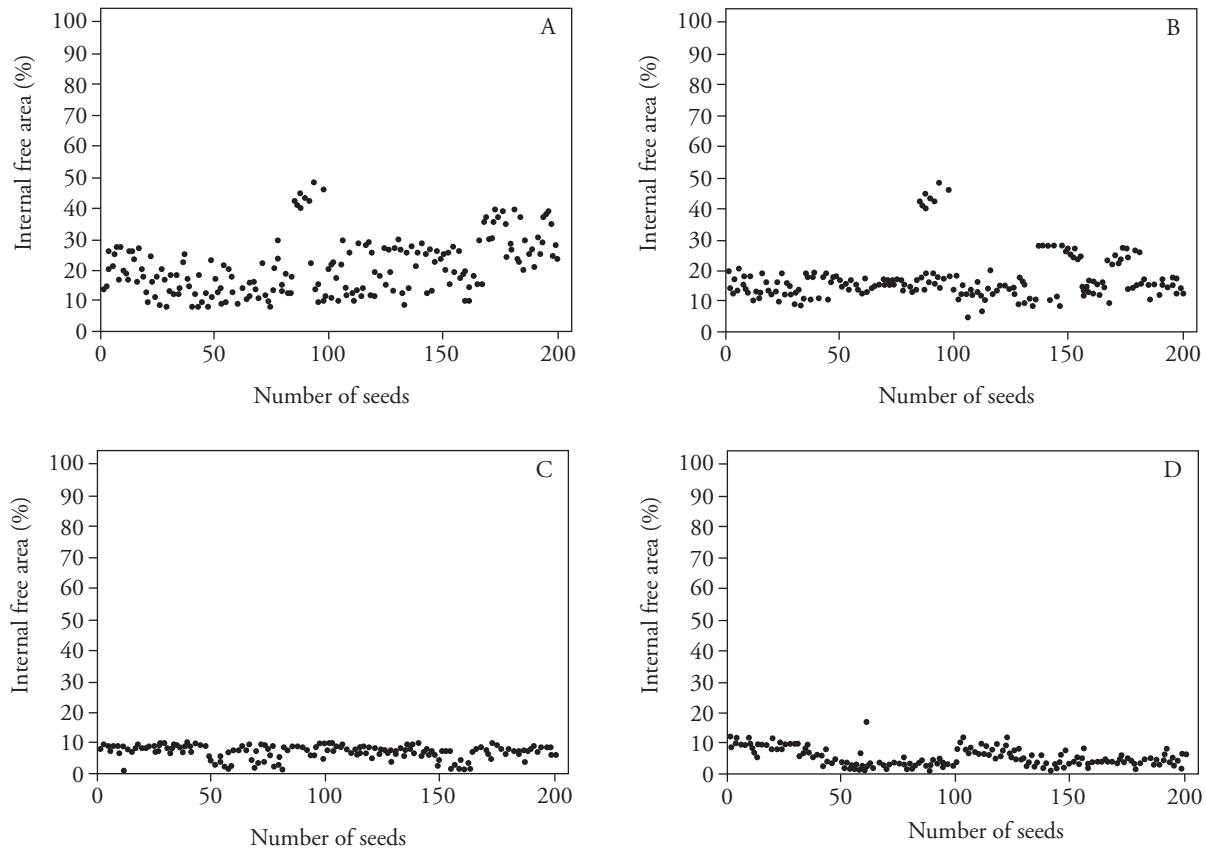
According to Carvalho and Nakagawa (2000), the further away from anthesis the seed is removed from the fruits, the heavier the seed is until reaching physiological maturity. Miranda *et al.* (1992) studied eggplant fruit maturation and concluded that there was no difference in dry weight gain between seeds collected at 50 DAA and in seeds harvested at 60 DAA. Paprika seeds at 55 DAA reached full physiological maturity, which is the point where the seeds reached the highest weight, and therefore, the best harvest time (Oliveira *et al.*, 1999). Similarly, for Morro Grande e Tinguá varieties of jiló seeds, with the advancement in the maturation stage, a greater reserve accumulation occurred, which was evidenced by the increase in the evaluated seed weight (Alves *et al.*, 2017).

Evaluation of seed internal morphology is important to characterize some understudied species, in order to improve quality of seed lots, regarding

hay un estudio con semillas de *Acca sellowiana* realizado por Silva *et al.* (2013) que utiliza este programa.

Por lo tanto, los resultados prometedores de este estudio mostraron una alternativa para explorar distintos tipos de semillas, ya que los métodos computarizados que usan captura de alta velocidad y procesamiento de imágenes, son la técnica no invasiva más avanzada que proporciona un alto nivel de eficiencia para analizar la calidad de las semillas (Dell'Aquila, 2009).

Con respecto a la temporada de cosecha del fruto (días antes de anthesis), no hubo una diferencia estadísticamente significativa en cada etapa de maduración entre las variedades Morro Grande y Tinguá, que tienen distintos colores y formas, verde oscuro redondo y verde claro largo, respectivamente. Sin embargo, hubo una diferencia estadísticamente significativa en las áreas libres de semillas de ambas variedades (Cuadro 1). Los frutos T1 de variedades Morro Redondo y Tinguá cosechadas a 35 DDA tenían una mayor área promedio libre de 21 y 23 %, respectivamente, comparadas con frutos T2 cosechados a 40 DDA con un área promedio libre de 17 y 18 %. Los frutos T3 cosechados a 45 DDA tuvieron un área promedio libre de 10 y 9 %, y los frutos cosechados T4 a 45 DDA y que descansaron 7 d mostraron un área promedio libre de 5 y 4 %, para variedades Morro Grande y Tinguá, respectivamente (Cuadro 1 y Figura 1). Por ende, hubo una reducción en



**Figure 2.** Internal free area (%) occupied by embryo and endosperm of each jiló seed (*Solanum gilo*) in a sample of 200 seeds, treatment – Morro Redondo. T1 - 35 DAA (A), T2 - 40 DAA (B), T3 - 45 DAA (C), and T4 - 45 DAA + 7 d (D).

**Figura 2.** Área libre interna (%) ocupada por embrión y endospermo de cada semilla de jiló (*Solanum gilo*) en una muestra de 200 semillas, tratamiento – Morro Redondo. T1 - 35 DDA (A), T2 - 40 DDA (B), T3 - 45 DDA (C), y T4 - 45 DDA + 7 d (D).

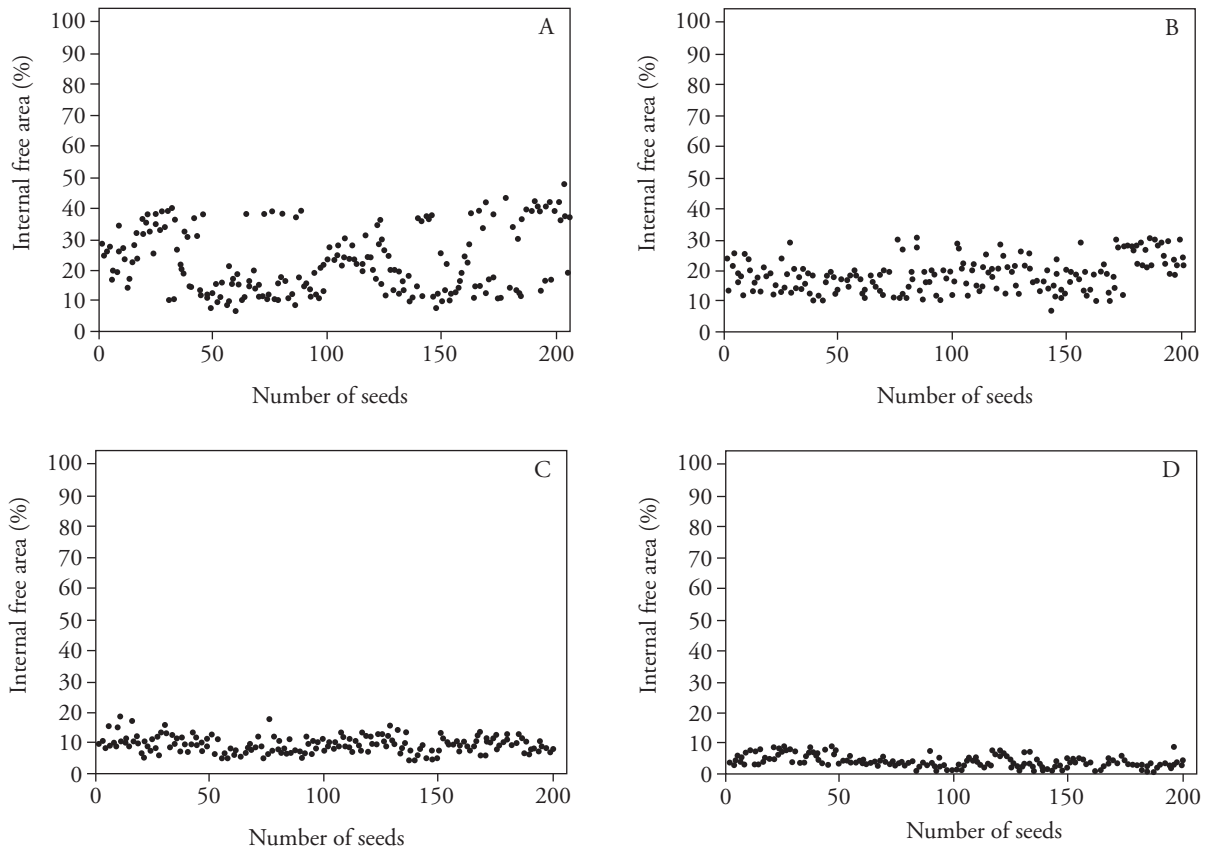
their physical and physiological attributes, since defective or empty seeds affects the germination results (Gomes Júnior, 2010). Thus, the analyses carried out in our study are useful to separate high and low quality seed lots, contributing to the jiló seeds quality control.

At the end of the germination test (14 d) we counted the percentage of normal and abnormal seedlings and dead seeds of Morro Redondo and Tinguá varieties. Results for both Morro Redondo and Tinguá varieties were: T1 had no germination and 100 % percentage of dead seeds for both varieties; T2 had a germination percentage of 10 and 9 %, without normal seedlings, 20 and 17 % of abnormal seedlings, and 80 and 83 % of dead seeds, respectively; T3 had germination rates and percentage of normal seedlings of 86 and 84 %, there were no

el área libre conforme avanzó la madurez en ambas variedades evaluadas. Las Figuras 2 y 3 muestran la distribución de áreas libres de semillas de variedades de Morro Redondo y Tinguá (n=200) para todos los tratamientos.

Según Carvalho y Nakagawa (2000), entre más lejos de la antesis se separe la semilla de los frutos, más pesada será la semilla hasta llegar a la madurez fisiológica. Miranda *et al.* (1992) estudiaron la madurez del fruto de berenjena y concluyeron que no hubo diferencia en el aumento de peso seco entre las semillas recolectadas a 50 DDA y las semillas cosechadas a 60 DDA. Las semillas de paprika a 55 DDA llegaron a una madurez fisiológica completa, que es el punto donde las semillas llegaron al mayor peso, y por lo tanto, el mejor momento de cosecha (Oliveira *et al.*, 1999). De manera similar, para las variedades





**Figure 3.** Internal free area (%) occupied by embryo and endosperm of each jiló seed (*Solanum gilo*) in a sample of 200 seeds, treatment - Tinguá. T1 - 35 DAA (A), T2 - 40 DAA (B), T3 - 45 DAA (C), and T4 - 45 DAA + 7 d (D).

**Figure 3.** Figura 3. Área libre interna (%) ocupada por embrión y endospermo de cada semilla de jiló (*Solanum gilo*) en una muestra de 200 semillas, tratamiento – Tinguá. T1 - 35 DDA (A), T2 - 40 DDA (B), T3 - 45 DDA (C), y T4 - 45 DDA + 7 d (D).

abnormal seedlings and resulted in a 14 and 16 % of dead seeds, respectively; T4 had 100 % normal seedlings for both varieties. There was no statistically significant difference between Morro Grande and Tinguá varieties for these characteristics. However, seeds from the T4 were statistically superior to T3, which was higher than T2 and T1 in both varieties for germination percentage (Figure 1 and Table 1).

There was a relation between germination and internal free area because, according to the moment of harvest (days after anthesis), the results were statistically higher from T1 to T4, meaning that seeds had a reduction in the empty area and an increase in germination percentage directly proportional to the maturity stage, as observed in Figure 1 and Table 1. Thus, harvest at 45DAA + 7 is recommended, since seed germination was 100 % and resulted in

Morro Grande y Tinguá de semillas de jiló, con el avance en la etapa de maduración, ocurrió una mayor acumulación de reserva, que se evidenció en el aumento en el peso de la semilla evaluado (Alves *et al.*, 2017).

La evaluación de la morfología interna de la semilla es importante para caracterizar algunas especies poco estudiadas, para mejorar la calidad de los lotes de semillas, respecto a sus atributos físicos y fisiológicos, dado que las semillas defectuosas o vacías afectan los resultados de germinación (Gomes Júnior, 2010). Por ende, los análisis que realizamos en nuestro estudio son útiles para separar los lotes de semillas de alta y baja calidad, contribuyendo al control de calidad de semillas de jiló.

Al final de la prueba de germinación (14 d) contamos el porcentaje de plántulas normales y anormales

100 % normal seedlings in both varieties. Similar results for dry weight gain, that is, free area reduction and increased germination from fruits harvested at different maturation stages and days after anthesis, were found by Oliveira *et al.* (1999), Carvalho and Nakagawa (2000), Nakada *et al.* (2011), and Santos *et al.* (2015).

It is noteworthy that the absence of normal seedlings for T1 and T2 can be directly related to the immaturity of the seeds and the high percentage of internal free area of the seed, as showed in the of X-ray images evaluation along with the program ImageJ. Furthermore, it is related to the physiological potential since, according to Sedyama *et al.* (1991), early harvest can result in reduced seed germination and increased number of immature seeds.

In a similar study, Dell'Aquila (2007) found that in paprika seeds, when the free space between the embryo and endosperm was higher than 2.7 %, that is, seeds with endosperm area and less than 97.3 % embryo, there was a reduction of germination with increased percentage of abnormal and non-germinated seedlings.

In studies with *Cecropia pachystachya* (Pupim *et al.*, 2008), aroeira (*Schinus terebinthifolius*) (Machado and Cicero, 2003), paprika (Dell'Aquila, 2007), eggplant (Silva *et al.*, 2012), watermelon (Gomes Júnior *et al.*, 2012) and pumpkin (Silva *et al.*, 2014), partially formed seeds with internal free area were unable to produce normal seedlings in the germination test. However, for many species of fleshy fruits, fruit harvest followed by a rest period of 7 or 10 d positively interfere in the seed quality (Dias and Nascimento, 2009).

Thus, radiographic image analysis with the ImageJ software appears as a good alternative for the identification of internal free areas of jiló seeds (*Solanum gilo*), assisting to a greater or lesser physiological potential of lots in different maturation stages.

## CONCLUSIONS

The radiographic image analysis for jiló seeds (*Solanum gilo*) using ImageJ software allows measurement of internal empty areas at different stages of maturation, as well as the determination of the relationship between emptiness degree and germination. Thus, it is possible to correlate these

y las semillas muertas de variedades Morro Redondo y Tinguá. Los resultados tanto para las variedades Morro Redondo como Tinguá fueron: T1 no tuvieron germinación y 100 % de las semillas muertas para ambas variedades; T2 tuvieron un porcentaje de germinación de 10 y 9 %, sin plántulas normales, 20 y 17 % de plántulas anormales, y 80 y 83 % de semillas muertas, respectivamente; T3 tuvieron tasas de germinación y porcentaje de plántulas normales de 86 y 84 %, no hubo plántulas anormales y resultaron en un 14 y 16 % de semillas muertas, respectivamente; T4 tuvieron 100 % de plántulas normales para ambas variedades. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las variedades Morro Grande y Tinguá para estas características. Sin embargo, las semillas T4 fueron estadísticamente superiores a las T3, que fueron mayores a las T2 y T1 en ambas variedades para el porcentaje de germinación (Figura 1 y Cuadro 1).

Hubo una relación entre la germinación y el área libre interna porque, de acuerdo al momento de cosecha (días después de antesis), los resultados fueron significativamente mayores de T1 a T4, lo cual significa que las semillas tuvieron una reducción en el área vacía y un aumento en el porcentaje de germinación directamente proporcional a la etapa de maduración, como se observó en la Figura 1 y el Cuadro 1. Por lo tanto, se recomienda la cosecha a 45 DDA + 7, ya que la germinación de semillas fue 100 % y resultó en 100 % plántulas normales en ambas variedades. Oliveira *et al.* (1999), Carvalho and Nakagawa (2000), Nakada *et al.* (2011) y Santos *et al.* (2015) encontraron resultados similares para aumento de peso seco, es decir, una reducción del área libre y mayor germinación de frutos cosechados en distintas etapas de maduración y días después de antesis.

Es de notarse que la ausencia de plántulas normales para T1 y T2 puede estar directamente relacionada a la inmadurez de las semillas y el alto porcentaje de área libre interna de la semilla, como se muestra en la evaluación de imágenes de rayos X junto con el programa ImageJ. Además, se relaciona con el potencial fisiológico, ya que, según Sedyama *et al.* (1991), la cosecha temprana puede resultar en menor germinación de la semilla y mayor número de semillas inmaduras.

En un estudio similar, Dell'Aquila (2007) encontró que en semillas de paprika, cuando el espacio libre entre el embrión y el endospermo era mayor de

data with other attributes of seed quality. Moreover, the use of image analysis systems, as reported in this study, may contribute to improving the quality of seed lots, allowing the identification of seeds with greater potential to germinate, assisting sellers in their quality control of jiló, and helping to reduce economic losses.

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors wish to thank Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

## LITERATURE CITED

- Alves, C. Z., A. R. Godoy, A. C. D. S. Candido, e N. C. D. Oliveira. 2012. Qualidade fisiológica de sementes de jiló pelo teste de envelhecimento acelerado. *Ciênc. Rural* 42: 58-63.
- Alves, M. V. P., E. V. R. Von Pinho, H. O. Santos, G. C. P. Alves, and R. W. Pereira. 2017. Physiological and biochemical characterization of jiló seeds (*Solanum gilo*) in different development stages. *Am. J. Plant Sci*, *in press*.
- Araújo, E. P., E. C. Montovani, e R. F. Silva. 1982. Influência da idade e armazenamento dos frutos na qualidade de sementes de abóbora. *Rev. Bras. Sement.* 4: 77- 87.
- Barbedo, A. S. C., A. C. W. Zanin, C. J. Barbedo, e J. Nakagawa. 1994. Efeitos da idade e do período de repouso pós-colheita dos frutos sobre a qualidade de sementes de berinjela. *Hort. Bras.* 12: 14-18.
- BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para Análise de Sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS. 395 p.
- Carvalho, N. M., e J. Nakagawa. 2000. Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP. 588 p.
- Carvalho, L. R. D., M. L. M. D. Carvalho, e A. C. Davide. 2009. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de espécies florestais de Lauraceae. *Rev. Bras. Sement.* 31: 57-66.
- Dell'Aquila, A. 2007. Pepper seed germination assessed by combined X-radiography and computer-aided imaging analyses. *Biol. Plantarum* 51: 777-781.
- Dell'Aquila, A. 2009. Digital imaging information technology applied to seed germination testing. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 29: 213-221.
- Dias, D. C. F. S., e W. M. Nascimento. 2009. Desenvolvimento, maturação e colheita de sementes de hortaliças. *In: Nascimento, W. M. (ed). Tecnologia de Sementes de Hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças. pp: 11-76.*
- Ferreira, D. F. 2008. SISVAR: um programa para análises ensino de estatística. *Rev. Symp.* 6: 36-41. <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/meusarquivospdf/art63.pdf>>. (Access: October 2016).
- Filgueira, F. A. R. 2003. Agrotecnologia Moderna na Produção de Tomate, Batata, Pimentão, Pimenta, Berinjela e Jiló. Solanáceas. Universidade Federal de Lavras: Lavras. 333 p.
- Gagliardi, B., and J. Marcos-Filho. 2011. Relationship between germination and bell pepper seed structure assessed by the X-ray test. *Sci. Agric.* 68: 411-416.
- 2.7 %, es decir, semillas con área de endospermo y menos de 97.3 % embrión, hubo una reducción de la germinación con mayor porcentaje de plántulas anormales y no germinadas.
- En estudios con *Cecropia pachystachya* (Pupim *et al.*, 2008), aroeira (*Schinus terebinthifolius*) (Machado y Cicero, 2003), paprika (Dell'Aquila, 2007), berenjena (Silva *et al.*, 2012), sandía (Gomes Júnior *et al.*, 2012) y calabaza (Silva *et al.*, 2014), las semillas parcialmente formadas con área libre interna no fueron capaces de producir plántulas normales en la prueba de germinación. No obstante, para muchas especies de frutos carnosos, la cosecha de frutos seguida de un periodo de descanso de 7 o 10 d interfiere positivamente en la calidad de la semilla (Dias y Nascimento, 2009).
- Por lo tanto, el análisis de imagen radiográfico con el programa ImageJ parece ser una buena alternativa para la identificación de áreas libres internas de semillas de jiló (*Solanum gilo*), ayudando a un mayor o menor potencial fisiológico de los lotes en distintas etapas de maduración.

## CONCLUSIONES

El análisis radiográfico de imágenes de semillas de jiló (*Solanum gilo*), utilizando el programa ImageJ, permite la medición de áreas vacías internas en distintas etapas de maduración, así como la determinación de la relación entre el grado de vacío y la germinación. Por ende, es posible correlacionar estos datos con otros atributos de calidad de la semilla. Además, el uso de sistemas de análisis de imagen, como se reporta en este estudio, puede contribuir a mejorar la calidad de los lotes de semillas, permitiendo la identificación de semillas con mayor potencial para germinar, ayudando a los vendedores en el control de la calidad de jiló, y permitiendo reducir las pérdidas económicas.

—Fin de la versión en Español—

-----\*-----

Gomes Júnior, F. G. 2010. Aplicação da análise de imagens para avaliação da morfologia interna de sementes. *Informativo Abrates* 20: 33-39. <<http://www.abrates.org.br/images/stories/informativos/v20n3/minicurso02.pdf>>. (Access: October 2016).

- Gomes Júnior, F. G., J. T. Yagushi, U. L. Belini, S. M. Cicero, and M. Tomazello-Filho. 2012. X-ray densitometry to assess internal seed morphology and quality. *Seed Sci Technol.* 40: 102-107.
- ISTA (International Seed Testing Association). 1993. *International Rules for Seed Testing.* Seed Science and Technology. 363 p.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2004. *Rules for Seed Testing.* International Seed Testing Association. 174 p.
- Justino, E. V., L. S. Boiteux, M. E. N. Fonseca, J. G. Silva Filho, e W. M. Nascimento. 2015. Determinação da maturidade fisiológica de sementes de pimenta dedo de moça *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. *Hort. Bras.* 33: 324-331.
- Machado, C. F., e M. S. Cícero. 2003. Metodologia para a condução do teste de germinação e utilização de raios-X para a avaliação da qualidade de sementes de aroeira branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.). *Informativo ABRATES* 12: 28-34.
- Marcos-Filho, J., F. G. Gomes Júnior, M. A. Bennett, A. A. Wells, and S. Stieve. 2010. Using tomato analyzer software to determine embryo size in x-rayed seeds. *Rev. Bras. Sem.* 32: 146-153.
- Mengarda, L. H. G., e J. C. Lopes. 2012. Qualidade de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de pimenta malagueta e sua relação com a posição de coleta de frutos. *Rev. Bras. Sem.* 34: 644-650.
- Miranda, Z. F. S., V. D. C. Mello, D. S. B. Santos, e M. A. A. Tillmann. 1992. Avaliação da qualidade de sementes de berinjela (*Solanum melongena* L.). *Rev. Bras. Sem.* 14: 125-129.
- Nakada, P. G., J. A. Oliveira, L. C. Melo, L. A. A. Gomes, e E. V. R. Von Pinho. 2011. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. *Rev. Bras. Sem.* 33: 113-122.
- Nunes, R. T. C., U. O. Souza, O. M. Morais, C. M. S. Lourenço. 2014. Análise de imagens na avaliação da qualidade fisiológica de sementes. *Ver. Verde Agroecol. Desenv. Sustent.* 9: 84-90.
- Oliveira, A. P., C. P. Gonçalves, R. L. A. Bruno, e E. E. U. Abreu. 1999. Maturação fisiológica de sementes de pimentão, em função da idade dos frutos após a antese. *Rev. Bras. Sem.* 21: 88-94.
- Pupim, T. L., A. D. L. C. Novembre, M. L. M. Carvalho, e S. M. Cicero. 2008. Adequação do teste de raios x para a avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). *Rev. Bras. Sem.* 30: 28-32.
- Queiroz, L. A. F., E. V. R. Von Pinho, J. A. Oliveira, V. F. Ferreira, B. O. Carvalho, e A. C. R. Bueno. 2011. Época de colheita e secagem na qualidade de sementes de pimenta Habanero Yellow. *Rev. Bras. Sem.* 33: 472-481.
- Santos, H. O., E. V. R. Von Pinho, I. V. Von Pinho, S. M. F. Dutra, T. Andrade, and R. M. Guimarães. 2015. Physiological quality and gene expression during the development of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacquin) seeds. *Genet. Mol. Res.* 14: 5085-5098.
- Scott, A., and M. Knott. 1974. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. *Biometrics* 30: 507-512.
- Sedyama, M. A. N., V. W. D. Casali, E. A. M. Silva, A. A. Cardoso, e R. F. Silva. 1991. Influência da época de colheita e estágio de maturação na germinação de sementes de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Banc). *Rev. Bras. Sem.* 13: 69-71.
- Silva, V. N., S. M. Cicero, and M. Bennett. 2012. Relationship between eggplant seed morphology and germination. *Rev. Bras. Sem.* 34: 597-604.
- Silva, V. N., M. B. Sarmiento, A. C. S. Silva, C. S. Silva, e S. M. Cicero. 2013. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. *Rev. Bras. Frutic.* 35: 1158-1169.
- Silva, P. P., R. A. Freitas, S. M. Cícero, J. Marcos-Filho, e W. M. Nascimento. 2014. Análise de imagens no estudo morfológico e fisiológico de sementes de abóbora. *Hortic. Bras.* 32: 210-214.
- Simak, M., A. Gustafsson. 1953. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. *Hereditas* 39: 458-468.
- Simak, M. 1991. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. *In: Gordon, A. G., P. Gosling, and B. S. P. Wang (eds). Tree and Shrub Seed Handbook: ISTA, Zurich.* pp: 1-28.
- Van der Burg, W. J., J. W. Aartse, R. A. V. Zwol, H. Jalink, and R. J. Bino. 1994. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119: 258-263.