

**PROTOCOLOS DEL Banco de Germoplasma de orquídeas (BGO)**

Titulo principal: BGO	Confeccionó:	Di Persia, Francisco, V. Lallana
Sub-titulo: 1. Semillas	Revisó:	V. Lallana
Nº: 1.6. Catalogo digital de semillas de orquídeas.	Publicado	SI     NO  x
Año de creación: 2015	Impreso	SI  x   NO

**CATALOGO DIGITAL DE SEMILLAS DE ORQUÍDEAS**

1. Seleccionar una muestra de semillas a incorporar al catálogo digital.
2. Colocar las semillas sobre papel de acetato transparente con escala cuadrículada de 1x1 mm impresa en acetato y montada sobre una platina de acetato traslúcida (Figura 1)
3. Conectar “USB Digital Microscope” (Figura 2) a PC.



**Figura 1.** Cuadrícula de acetato




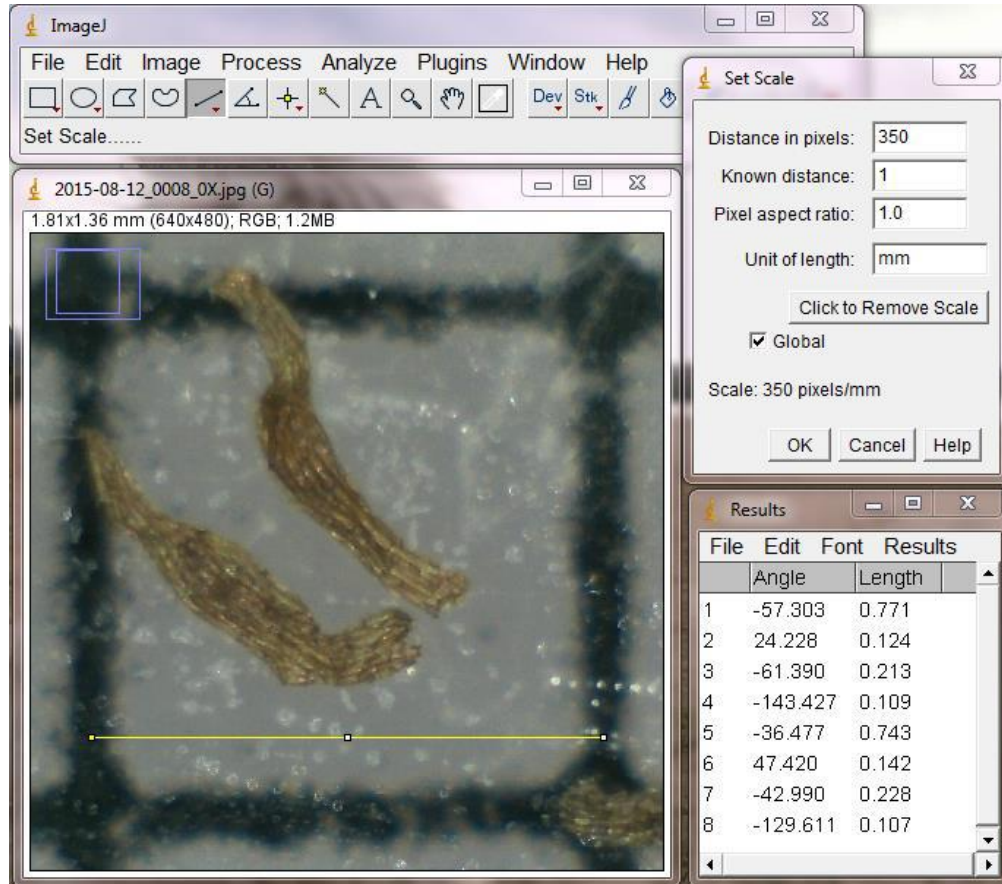
**Figura 2.** Vista del microscopio digital

4. Iniciar el programa “micam”, seleccionar “Device” → “Select device” y en “Select video device” seleccionar el microscopio en uso.
5. Apoyar sobre la platina donde se depositaron las semillas el microscopio (capuchón plástico) y con el botón giratorio del zoom (Figura 2) regular el foco y zoom del mismo hasta que se vea nítida la imagen. (en zoom mínimo 20X y máximo 800X hace foco)
6. Una vez observada la imagen en pantalla con la tecla F1 o el botón “Snapshot” se toman las fotos (aproximadamente 5 por especie o alrededor de 10 semillas).


7. Guardar las imágenes en la carpeta Catalogo Digital, dentro de una subcarpeta identificada con las tres primeras letras del género y las tres primeras de la especie (gen\_esp).

### Procesamiento de las imágenes

1. Se trabaja con el programa Image J (Ferreira y Rasband, 2011) el cual cuando se abre presenta una pequeña pantalla lineal de tres filas (Figura 3, parte superior), se carga la imagen (opción File/ Open) con las semillas que se van a medir. Una información más detallada del uso del software puede encontrarse en otro protocolo (Shimpf y Lallana, 2012).
2. Luego se define la escala trazando un segmento con la herramienta "Straight" ( ) sobre la escala impresa sobre el papel de acetato y en la pestaña "Analyze" se ingresa la opción "Set scale", donde se indica que la longitud marcada (medida en pixeles) corresponde a 1 milímetro (Figura 3, cuadro superior derecho).



**Figura 3.** Pantallas del programa Image J. Superior pantalla inicial, Derecha superior, escala, derecha inferior tabla con resultados. Parte central izquierda, imagen de las semillas con la cuadrícula de referencia.

3. Con la misma herramienta "Straight" () se traza un segmento desde un extremo al otro de la semilla, se presiona la tecla "M" para que el software mida y guarde dicho valor en una tabla de datos (Figura 3, imagen inferior derecha). De la misma manera se procede a medir el ancho de la semilla y el largo y ancho del embrión (siempre en el mismo orden, con cada semilla medida).
4. La tabla de resultados luego es guardada como un archivo de hoja de cálculo, donde posteriormente se ordenan los datos. Para ello se seleccionan los 4 primeros datos, correspondientes a las mediciones de la primer semilla y su embrión, se copian y pegan (en una tabla con una columna para cada longitud, en la misma secuencia que se obtuvieron los datos) utilizando el comando pegado especial y "transponer" para que los datos que estaban ordenados en filas pasen a estar en columnas. Se procede de igual manera con los siguientes grupos de 4 mediciones, hasta que todos los datos estén ordenados.
5. Guardar el archivo con los datos ("Resultados.xls") en la misma sub-carpeta donde están las imágenes.
6. A partir de los datos del archivo "Resultados.xls" ubicado en la carpeta Catálogo Digital, subcarpeta gen\_esp, se procede a calcular el volumen de la semilla y embrión, y volumen del porcentaje de aire, de acuerdo a las formulas propuestas por Arditti, 1979:

#### **Cálculo de volumen de semilla**

Se calcula su volumen utilizando la fórmula propuesta por Arditti *et al.* (1979), considerando a las semillas fusiformes (ahusadas), similares a 2 conos unidos por sus bases. Por lo tanto, la fórmula utilizada fue  $2 [(A/2)^2 (L/2) (1,047)]$ , donde A= Ancho, L = Largo,  $1,047 = \pi/3$ .

#### **Cálculo de volumen de embrión**

Para el volumen del embrión, por ser en general de forma elíptica en su sección transversal, se emplea la fórmula para un esferoide prolado ( $4/3 \pi ab^2$ , donde a =  $\frac{1}{2}$  largo y b =  $\frac{1}{2}$  ancho) Arditti *et al.* (1979).

#### **Cálculo de volumen de porcentaje de aire contenido**

El porcentaje de aire contenido en la semilla se calcula según:  $((\text{Volumen de semilla} - \text{volumen de embrión}) / \text{volumen de semilla}) * 100$  (Arditti et al. 1979).

#### **Características de color, forma y testa de las semillas de orquídeas**

- Observar las muestras completas en su envase de almacenamiento bajo lupa binocular Olympus SZ40 y realizar una descripción del color de manera subjetiva.

- Caracterizar las paredes de la testa en reticuladas o suaves como propone Swamy *et al.* (2004).
- Clasificar su forma como filiforme, fusiforme (ahusada), clavada, elipsoidal o prominentemente aladas según Molvray y Kores (1995).
- Clasificar según el grado de truncamiento basado en la relación L/A, de acuerdo a lo propuesto por Verma *et al.* (2014): alargadas si dicha relación es mayor a 6 o truncadas si es menor.

### Bibliografía

Arditti, Joseph; Michaud, Justine D. y Healey, Patrick L. 1979. Morphometry of Orchid Seeds. I. Paphiopedilum and Native California and Related Species of Cypripedium. *Am J Bot*, Vol 66, No. 10. pp. 1128-1137.

Ferreira, T. & W. Rasband. 2011. ImageJ userguide. IJ 1.45 m 152p. Disponible en: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/userguide.pdt>.

Molvray, Mia y Kores, Paul J. 1995. Character Analysis of the Seed Coat in Spiranthoideae and Orchidoideae, with Special Reference to the Diurideae (Orchidaceae). *Am J Bot*, Vol. 82, No. 11, pp. 1443-1454.

Schimpt, K. y Lallana, V.H. 2012. Medición digital de la longitud y ancho de semillas de orquídeas. Protocolo N° 4.1., 5 p.

Swamy, Krishna K.; Kumar, Krishna H. N.; Ramakrishna, T. M. and Ramaswamy S. N. 2004. Studies on Seed Morphometry of Epiphytic Orchids from Western Ghats of Karnataka. *Taiwania* 49(2): 124-140.

Verma, Jagdeep; Sharma, Kusum; Thakur, Kranti; Sembi, Jaspreet K.; Vij, Suraj P. 2014. Study on seed morphometry of some threatened Western Himalayan orchids. *Turk J Bot*, 38: 234-251 pp.

Confeccionó: Francisco Di Persia (07/12/15). Revisado y ampliado Víctor H. Lallana (23/12/15)

### Cómo citar este documento:

Di Persia, F.; Lallana, V.H. (2015). Protocolo N° 16 – BGO. Catálogo digital de semillas de orquídeas. Disponible en: <http://www.orquier.fca.uner.edu.ar/> [Consulta: dd/mm/aa]