

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Aplicación del software ImageJ® 1.43u en la caracterización de los síntomas de la mancha anular de la caña de azúcar

Application of ImageJ® 1.43u software in the characterization of the symptoms of the annular blotch of sugarcane

Osmany de la Caridad Aday Díaz, Roberto González Hernández, Félix René Díaz Mujica, Carlos Reyes Esquirol, Yulexi Gil Cruz, Susana Reyes Pérez y Javier Barroso Melillo

Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Carretera CUJAE Km 1½, Boyeros, La Habana, Cuba. CP 19390

E-mail: osmany@inicavc.azcuba.cu

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar la utilidad del procesador de imágenes ImageJ® 1.43u para caracterizar las lesiones de la mancha anular de la caña de azúcar (*Leptosphaeria sacchari* van Breda de Haan). Se partió de una muestra de 10 tallos del cultivar C89-147 y se separaron las hojas con síntomas de la enfermedad. Cada hoja fue seccionada en tres partes iguales a partir de la inserción de la hoja con la vaina hasta el ápice e identificadas como tercios 1, 2 y 3. Se midió el largo, ancho y área ocupada por *L. sacchari* en una muestra de 1000 lesiones; el área foliar de cada tercio por hoja y el área con lesiones en 55 hojas, seguidamente se calculó el porcentaje de Área Foliar Afectada y los parámetros biométricos de las variables evaluadas. Los valores más frecuentes de largo, ancho y área de las lesiones, fueron 10 mm, 2,78 mm y 10,71 mm² respectivamente. Las dimensiones de las lesiones y el Área Foliar Afectada se incrementaron significativamente a partir de la hoja +5. En los dos tercios superiores de las hojas se localizó la mayor cantidad de área afectada. El cultivar C89-147 exhibió una reacción intermedia con riesgo a presentar susceptibilidad en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. El procesador de imágenes resultó ser una herramienta útil para caracterizar los síntomas de esta enfermedad.

Palabras clave: *Leptosphaeria sacchari*, procesador de imágenes, *Saccharum officinarum*, software

ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of determining the utility of the processor of images ImageJ® 1.43u to characterize the lesions of the ring spot disease of sugarcane (*Leptosphaeria sacchari* Breda de Haan). Symptomatic leaves from a 10 stalks sample of the sugarcane cultivar C89-147 were separated and cut in three same parts and identified as third 1, 2 and 3, starting from the insert of the leaf with the sheath until the apex. The long, wide and area occupied by *L. sacchari* in a sample of 1000 lesions was measured. The foliage area and the area affected with lesions of each third of leaf, in 55 leaves, subsequently the percentage of Affected Foliolate Area and the biometrics parameters of the evaluated variables were calculated. The most frequent values of long, wide and area of the lesions, were 10 mm, 2.78 mm, and 10.71 mm², respectively. The dimensions of the lesions and the Affected Foliolate Area were significantly increased starting from leaf +5. In the two superior thirds of the leaves the biggest quantity of affected area was located.

The sugarcane cultivar C89-147 exhibited an intermediate reaction with risk to present susceptibility under favorable conditions for the development of the disease. The processor of images turned out to be a useful tool to characterize the symptoms of this disease.

Keywords: *Leptosphaeria sacchari*, processor of images, *Saccharum officinarum*, software

INTRODUCCIÓN

ImageJ® 1.43u es un programa de análisis y procesamiento de imágenes de dominio público desarrollado en Java por Wayne Rasband del National Institute of Health (Instituto Nacional de Salud) (Abramoff *et al.*, 2004; Ferreira y Rasband, 2015). Se utiliza como una herramienta que facilita el procesamiento de imágenes y su interpretación. Papadopulos *et al.* (2007), citan varios ejemplos del uso de este *software*, entre ellos mediciones de área en componentes de tejidos selectivamente teñidos, conteo de células y medidas de área a nivel de la célula o tejidos y cuantificación de antígenos y conteo de partículas observadas a través de microscopía electrónica.

Barry *et al.* (2009), lo utilizaron para cuantificar el desarrollo del hongo *Aspergillus oryzae*; Gimmen y García (2012) en la clasificación de insectos; Tamayo *et al.* (2014) en la caracterización morfológica y morfométrica de *Puccinia kuehnii* (Krüger) Butler y recientemente Fuente y Vera (2015), en estudios de arte rupestre y cerámicas arqueológicas.

La enfermedad llamada mancha anular causada por *Leptosphaeria sacchari* van Breda de Haan, (División Ascomycota, Subdivisión Pezizomycotina, clase Dothideomycetes, familia Leptosphaeriaceae), es una de las más antiguas de la caña de azúcar. Se detectó en Indonesia en el año 1890 (China y Rodríguez, 1994) y en la actualidad se encuentra presente, de forma endémica en 72 países, entre los que se encuentra Cuba (Croft, 2000). Se presenta con más frecuencia en condiciones de alta precipitación y elevada humedad relativa ambiental (Chavarría, 2006).

Como la enfermedad mayormente ataca a las hojas viejas, no constituye un problema para la producción cañera, por tanto, no es considerada de importancia económica y no se justifica la aplicación de medidas específicas para establecer su control (Croft, 2000). Sin embargo, debe evitarse llevar a la producción cultivares altamente susceptibles, el agente causal puede adaptarse a los mecanismos de resistencia del

hospedante, trayendo consigo un incremento de su propagación y desarrollo (China y Rodríguez, 1994).

El objetivo de la investigación fue valorar la utilidad del procesador de imágenes ImageJ® 1.43u para caracterizar las lesiones de la mancha anular de la caña de azúcar y en particular en el cultivar C89-147.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las evaluaciones se realizaron en el mes de noviembre de 2015, en áreas del bloque experimental de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar Centro - Villa Clara, del Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Se cortaron 10 tallos al azar del cultivar C89-147 con síntomas de mancha anular, en parcelas de un retoño de nueve meses de edad.

De cada tallo se separaron las hojas con síntomas de la enfermedad, desde la +2 a la +8 según notación de Kwijper (Van Dillewijn, 1952). Cada hoja fue cortada en tres partes iguales y cada una se identificó como tercio 1, 2 y 3, a partir de la inserción de la hoja con la vaina hasta el ápice.

Con una cámara fotográfica se capturó la imagen de los tres tercios de cada hoja sobre un papel milimetrado. El procesamiento de las imágenes se realizó con el programa ImageJ® 1.43u, se tomó como referencia 5 mm (área conocida). Se midió el largo, ancho y área de 1000 lesiones causadas por *L. sacchari*, área foliar de cada tercio y el área afectada con lesiones en 55 hojas, posteriormente se calculó el porcentaje de Área Foliar Afectada (AFA).

Para analizar la variación de las variables que se midieron se calcularon los parámetros biométricos (Valor mínimo, Valor máximo, Media, Mediana y Moda). Con los valores de estas variables se definieron además intervalos de clases para determinar su frecuencia. El procesamiento estadístico se realizó a través de paquete STATGRAPHICS Centurion XV.II. En la determinación de las diferencias estadísticas se realizó la comparación de las medianas de

las variables medidas en cada una de las hojas evaluadas y Prueba de Kruskal-Wallis.

Para clasificar la resistencia del cultivar C89-147 a *L. sacchari*, se empleó la escala de cinco grados propuesta por Chavarría (2006) que considera el porcentaje de daño que alcanza la enfermedad desde la hoja +1 hasta la hoja +5. Los detalles de esta escala son los siguientes: 1 (no se observan síntomas, Inmune), 2 (menos del 5 % del área foliar afectada, resistente), 3 (del 6 al 20 % del área foliar afectada, intermedia o moderadamente resistente), 4 (del 21 al 40 % del área foliar afectada, susceptible) y 5 (más del 41 % del área foliar afectada, altamente susceptible).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas de la enfermedad que se observaron en las hojas del cultivar C89-147, se corresponden con la descripción realizada por Abbott (1964) y Croft (2000). Inicialmente las lesiones son de color verde oscuro, aparecen como manchas de forma oval o alargada, posteriormente se tornan de color café y se rodean de un borde o halo amarillo. A medida que se agrandan, el centro adquiere un color paja o pardo claro con un borde bien definido, mientras que el contorno de toda la lesión puede llegar a ser irregular. Varias lesiones pueden unirse y forman grandes manchas o parches.

El largo de las lesiones causadas por *L. sacchari* en el cultivar C89-147 varió entre 1,28 y 18,96 mm y el ancho de 1,11 hasta 7,43 mm, con un área de 1,39 - 222,97 mm². Los valores promedios de todas las mediciones realizadas se encontraron muy próximos a la Mediana calculada. Los valores más frecuentes (moda) de largo, ancho y área de las lesiones fueron 10 mm, 2,78 mm y 10,71 mm², respectivamente (Tabla 1). Estos parámetros fueron los utilizados por Abbott (1964), para caracterizar la enfermedad.

El 57,1 % de las lesiones alcanzaron la longitud comprendida entre 7,17 y 13,06 mm, mientras que el 84,9 % entre 3,22 y 5,32 mm de ancho

(Tabla 2). Estos resultados indican que aunque se manifestaron lesiones de mayor tamaño, los valores superiores se pueden considerar como extremos y menos frecuentes. Asimismo el 67,3 % de las lesiones abarcaron hasta 23,55 mm² y un 25,8 % hasta 45,71 mm², estos valores constituyen las dimensiones de mayor frecuencia.

Los síntomas de mancha anular se observaron a partir de la hoja +2. Se determinó que las dimensiones de las lesiones se incrementan en las hojas más viejas de los tallos, sobre todo a partir de la +5. El largo y el ancho fueron significativamente mayores en las hojas +7 y +8 (Tabla 3), donde alcanzaron un valor medio de 9,75 mm y 2,80 mm, respectivamente, mientras que el área fue mayor en la hoja +6.

Las lesiones también fueron significativamente mayores en los dos primeros tercios de las hojas y alcanzaron mayor longitud hacia la porción más próxima a la inserción de la hoja con la vaina (Tabla 4).

Los valores de las mediciones que se realizaron y la descripción de la enfermedad están en correspondencia con la caracterización de Abbott (1964) y Croft (2000), según estos autores el tamaño de las lesiones es variable, de 4 - 18 mm de largo por 1 - 5 mm de ancho y son más comunes en las hojas viejas (+5 a la +8) pero pueden afectar las jóvenes. China y Rodríguez (1994) refieren que *L. sacchari* se desarrolla principalmente en las hojas de baja actividad fisiológica, pero en condiciones ambientales favorables y cultivares susceptibles, pueden afectarse las hojas jóvenes, aspectos también corroborados en esta investigación.

En los dos tercios superiores de la hoja se localizó la mayor cantidad de área afectada expresada en porcentaje (Tabla 5). El Área Foliar Afectada por la enfermedad fue significativamente mayor en las hojas +5 a la +8 (14,67 - 18,82 %) y alcanzó valores máximos entre un 23,94 y 38,02 % en correspondencia además, con el incremento del número de lesiones (Tabla 6). De acuerdo con la escala de evaluación de Chavarría (2006) y

Tabla 1. Parámetros biométricos que caracterizan las lesiones causadas por *L. sacchari* en el cultivar C89-147

Parámetros	Variables		
	Largo (mm)	Ancho (mm)	Área (mm ²)
Valor mínimo	1,28	1,11	1,39
Valor máximo	18,96	7,43	222,97
Media	8,46	2,53	24,47
Mediana	8,15	2,45	18,26
Moda	10,00	2,78	10,71

N: 1000 observaciones

Tabla 2. Frecuencias de los intervalos de clase y acumulada correspondiente a las variables largo, ancho y área de la lesión

Intervalo de clase (mm)	Frecuencia	%	Frecuencia acumulada	% Acumulado
Largo de la lesión				
1,28 ≥ x < 7,17	361	36,10	361	36,10
7,17 ≥ x < 13,06	571	57,10	932	93,20
13,06 ≥ x < 18,96	68	6,80	1000	100,00
Ancho de la lesión				
1,11 ≥ x < 3,22	849	84,90	849	84,90
3,22 ≥ x < 5,32	143	14,30	992	99,20
5,32 ≥ x < 7,43	8	0,80	1000	100,00
Área de la lesión				
1,39 ≥ x < 23,55	673	67,30	673	67,30
23,55 ≥ x < 45,71	258	25,80	931	93,10
45,71 ≥ x < 67,86	22	2,20	953	95,30
67,86 ≥ x < 90,02	11	1,10	964	96,40
90,02 ≥ x < 112,18	10	1,00	974	97,40
112,18 ≥ x < 134,39	8	0,80	982	98,20
134,39 ≥ x < 156,50	6	0,60	988	98,80
156,50 ≥ x < 178,65	4	0,40	992	99,20
178,65 ≥ x < 200,81	4	0,40	996	99,60
200,81 ≥ x < 222,97	4	0,40	1000	100,00

Tabla 3. Medias y comparación de las medianas de las variables medidas en cada una de las hojas evaluadas

Hoja*	N	Largo (mm)			Ancho (mm)			Área (mm ²)		
		Media	E.E.	Mediana	Media	E.E.	Mediana	Media	E.E.	Mediana
+2	60	5,37	0,34	5,41 d	1,93	0,09	1,77 e	8,29	0,32	8,83 d
+3	60	6,26	0,34	6,32 c	2,07	0,09	2,00 d	11,63	0,32	12,57 c
+4	120	6,69	0,24	6,58 c	2,28	0,06	2,20 c	12,29	0,27	14,16 c
+5	238	8,69	0,17	8,53 b	2,59	0,04	2,51 b	18,93	0,16	20,57 b
+6	234	8,90	0,17	8,74 b	2,53	0,05	2,50 b	22,25	0,16	41,77 a
+7	174	9,75	0,20	9,47 a	2,80	0,05	2,66 a	21,74	0,19	23,91 a
+8	114	9,74	0,24	9,63 a	2,79	0,06	2,78 a	21,78	0,23	23,34 a
Total	1000	8,46		8,15	2,53		2,45	24,47		18,26

Hoja*: según notación de Kwijper (Van Dillewijn, 1952)

N: número de observaciones

E.E.: error estándar de la media

(a, b, c, d, e) medianas con letras no comunes en una misma columna difieren según Prueba de Kruskal-Wallis (p<0,05)

Tabla 4. Medias y comparación de las medianas de las variables medidas en cada tercio de las hojas evaluadas

Tercio*	N	Largo (mm)			Ancho (mm)			Área (mm ²)		
		Media	E.E.	Mediana	Media	E.E.	Mediana	Media	E.E.	Mediana
1	332	9,44	0,15	9,48 a	2,68	0,03	2,60 a	27,37	0,15	22,03 a
2	334	8,86	0,15	8,53 b	2,71	0,03	2,60 a	28,51	0,15	19,98 a
3	334	7,09	0,15	6,85 c	2,19	0,03	2,10 b	17,56	0,15	12,35 b
Total	1000	8,46		8,15	2,53		2,45	24,47		18,26

Tercio de la hoja*: a partir de la inserción de la hoja con la vaina hasta el ápice

N: número de observaciones; E.E.: error estándar de la media

(a, b, c) medianas con letras no comunes en una misma columna difieren según Prueba de Kruskal-Wallis (p<0,05)

Tabla 5. Medias y comparación de las medianas del porcentaje de Área Foliar Afectada en cada tercio de las hojas evaluadas

Tercio*	N	% AFA				
		Media	E.E.	Mediana	Mínima	Máxima
1	55	6,70	0,14	5,71 b	0,00	17,83
2	55	12,25	0,14	8,91 a	0,29	41,61
3	55	15,29	0,14	10,05 a	0,99	61,19
Total	165	11,41		8,35	0,0	61,19

Tercio de la hoja*: a partir de la inserción de la hoja con la vaina hasta el ápice

N: número de observaciones; E.E.: error estándar de la media

(a, b) medianas con letras no comunes en una misma columna difieren según Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Tabla 6. Medias y comparación de las medianas del Área Foliar Afectada en cada una de las hojas evaluadas

Hoja*	N	% AFA				
		Media	E.E.	Mediana	Mínima	Máxima
+2	5	1,95	0,24	1,09 d	0,54	3,29
+3	9	3,85	0,18	2,92 c	1,38	6,02
+4	10	6,67	0,17	4,53 b	1,65	13,18
+5	10	14,67	0,17	10,05 a	3,07	25,67
+6	10	16,93	0,17	10,90 a	7,77	23,94
+7	7	18,82	0,20	17,40 a	6,55	38,02
+8	4	17,21	0,27	16,03 a	13,07	23,60
Total	55	11,41		8,35	0,54	38,02

Hoja*: según notación de Kwijper (Van Dillewijn, 1952)

N: número de observaciones; E.E.: error estándar de la media

(a, b, c, d) medianas con letras no comunes en una misma columna difieren según Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

su equivalencia con la escala internacional de la ISSCT, en el cultivar C89 -147 predomina el grado 3, lo que le clasifica como reacción intermedia a *L. sacchari* y con riesgo a presentar susceptibilidad en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Entre las ventajas del uso de este software se destaca la visualización, edición, análisis y facilidades de procesamiento e impresión de las imágenes analizadas. Además, ofrece al usuario los resultados numéricos en tablas que fácilmente pueden convertirse en formato Excel para trabajarlas posteriormente a nivel estadístico. Puede calcular áreas y realizar estadísticas de los valores de los píxeles analizados. Las facilidades que posee permiten su uso de forma rutinaria y la ejecución automática de procesamientos y análisis que por otros métodos visuales u ópticos resultan muy laboriosos. Por estas razones, además de su aplicación en estudios de fitopatología publicados por Barry *et al.* (2009) y Tamayo *et al.* (2014), ImageJ® 1.43u pudiera ser muy útil en la evaluación de enfermedades fúngicas de plantas con afectaciones foliares, para

caracterizar los síntomas que causa el patógeno y la resistencia del hospedante.

CONCLUSIONES

El procesador de imágenes ImageJ® 1.43u es una herramienta útil para caracterizar las lesiones de la enfermedad mancha anular de la caña de azúcar y evaluar cuantitativamente la resistencia a *Leptosphaeria sacchari* de cultivares de caña de azúcar.

El largo de las lesiones causadas por *Leptosphaeria sacchari* en el cultivar C89-147 varió entre 1,28 y 18,96 mm, el ancho de 1,11 hasta 7,43 mm y el área de 1,39 - 222,97 mm². Los valores más frecuentes de largo, ancho y área de las lesiones fueron 10 mm; 2,78 mm, y 10,71 mm², respectivamente.

Las dimensiones de las lesiones y el Área Foliar Afectada se incrementan en las hojas más viejas de los tallos, sobre todo a partir de la +5. En los dos tercios superiores de las hojas se localizó la mayor cantidad de área afectada.

En el cultivar C89 -147 predomina el grado 3 de afectación del área foliar que le clasifica

como de reacción intermedia a *Leptosphaeria sacchari* y con riesgo a presentar susceptibilidad en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBOTT, E.V. Ring spot. In: Hughes, C. G., Abbott, E. V. and Wismer, C. A. (Eds.). Sugar cane diseases of the world. Volume II. Elsevier Publishing Co., Amsterdam, Netherlands. Pp. 53-58, 1964.
- ABRAMOFF, M.D., MAGALHAES, P. J. and RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11 (7): 36-42, 2004.
- BARRY, D.J., CHAN, C. and WILLIAMS, G.A. Morphological quantification of filamentous fungal development using membrane immobilization and automatic image analysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36 (6): 787-800, 2009.
- CHAVARRÍA, E. Escalas Descriptivas para la Evaluación de Enfermedades de la Caña de Azúcar. Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar (LAICA), Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar, San José, Costa Rica. 2006, 46 p.
- CHINEA, A. y RODRÍGUEZ, E. Enfermedades de la caña de azúcar. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar. Publicaciones IMAGO, Ciudad de la Habana, Cuba. 1994, 100 p.
- CROFT, B. J. Ring spot. In: ROTT, P., BAILEY, R.A., COMSTOCK, J.C., CROFT, B.J., SAUMTALLY, A.S. (Eds.). D-CAS 1.2, a guide to sugarcane diseases. Copyright CIRAD and ISCCT, Montpellier, France: ISBN 2-87614-386-0, 2000.
- FERREIRA, T. and RASBAND, W. ImageJ User Guide. IJ146r, 2012. En sitio web: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>. Fecha de consulta: 25 de junio, 2015.
- PAPADOPULOS, F., SPINELLI, M., VALENTE, S., FORONI, L., ORRICO, C., ALVIANO, F., Pasquinelli, G. Common Tasks in Microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastructural Pathology*, 31 (6): 401-407, 2007.
- FUENTE, G. A. y VERA, S. D. Aplicación de software de análisis de imágenes (SAI) en la caracterización tecnológica de cerámicas arqueológicas: alcances, limitaciones y perspectivas. *Chungará (ARICA)*, 47 (2), 2015. ISSN 0717-7356, <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73562015005000022>.
- GIMMEN, J. and GARCIA, S. Generating Color Vignettes and Metadata for Insect Auto-Classification. In: *Proceedings of The National Conference on Undergraduate Research (NCUR)*. Weber State University, Ogden Utah, University of Guam, Mangilao, GU 96923, USA, March 29 – 31, 2012: 505-509.
- TAMAYO, M., PUCHADES, Y., ECHAVARRÍA, M., RODRÍGUEZ, R., CHACÓN, V., ALFONSO, I. Caracterización morfológica y morfométrica del organismo causal de la roya naranja de la caña de azúcar. *Cuba & Caña*, 1: 12-16, 2014.
- VAN DILLEWIJN, C. Botany of sugarcane. Chronics Botanical Company, Waltham Massachusetts, USA, 371 p., 1952.

Recibido el 25 de abril de 2016 y aceptado el 9 de marzo de 2017