

## Sistema automatizado para el conteo y clasificación de células en suspensiones de Caña de Azúcar

Evelio Báez Pérez

Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Avila, Carretera a Morón, Km 9, 069450.  
e-mail: ebaez@bioplantas.cu

### RESUMEN

El número y tipo (embriogénica y no embriogénica) de células son variables muy importantes para evaluar el crecimiento de suspensiones de células vegetales y determinar la mejor suspensión en la regeneración de plantas por embriogénesis somática. Estos parámetros se determinan normalmente por inspección visual en el microscopio, provocando fatiga y pérdida de tiempo a los investigadores. Para resolver este problema un sistema automatizado fue implementado. Una cámara de TV CCD fue acoplada al microscopio y una imagen con 256 niveles de grises fue digitalizada. La segmentación de los agregados en la imagen y su posición se calcularon usando las técnicas del aprendizaje competitivo y seguimiento de contornos, respectivamente. Los agregados celulares con poco contenido de almidón son contados y clasificados por la información topológica extraída de su *Esqueleto*. Los agregados celulares con alto contenido de almidón son contados y clasificados por los *Puntos Críticos* del contorno. El sistema fue validado en Suspensiones Celulares de Caña de Azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). var. CP 5243. Los resultados obtenidos por la inspección visual humana y por el sistema automatizado implementado fueron similares.

Palabras clave: conteo de células, reconocimientos de patrones, visión computarizada

### ABSTRACT

The quantity and types (embryogenic and non-embryogenic) of cells are very important parameters to evaluate plant cell suspension growth for determine the best suspension to obtaining plant regeneration by somatic embryogenesis. These parameters are determined normally by visual human inspection in the microscope. It provokes fatigue and time lost to biologist and non-precise results. By solve these problems an automatic system was implemented. A CCD-camera is attached at the microscope and a 256 grey level image is digitised. The cell clusters segmentation and position in the image are calculated using the competitive learning and contour tracking technique. The cell cluster with a little starch content are counting and classify by the topological and directional information extracted of cell cluster skeleton. The cell clusters with high starch content are counting and classify by the critical point of cluster contour. The system was validate in Sugar-cane suspension (*Saccharum* sp.). var. CP 52-43. The final result obtained by human visual inspection and by the automatic system implemented by us was found similar.

Key works cell counting, computerized vision, parameters` recognition

### INTRODUCCIÓN

La cantidad y tipo (embriogénica y no embriogénica) de células son variables muy importantes para evaluar el crecimiento de suspensiones de células vegetales y determinar la mejor suspensión en la regeneración de plantas por embriogénesis somática. Estos parámetros son determinados normalmente por inspección visual en el microscopio, provocando fatiga y pérdida de tiempo a los investigadores.

Sistemas basados en el análisis de imágenes aplicados a cultivos de células y plantas micropropagadas han probado ser excepcionalmente sensitivos y precisas correlaciones entre los resultados del análisis de las imágenes y mediciones manuales o destructivas convencionales (peso seco o fresco, número de células, longitud de los brotes, etc) han

sido repetitivamente establecidas en diversos sistemas de microcultivo en plantas (Smith *et al.*, 1989, 1990; Smith y McClelland, 1991; Olfsdotters, 1993).

En el conteo y clasificación de células vegetales, como las mismas tienden a formar agregados, los sistemas disponibles sólo aproximan el número de células presentes de acuerdo con el tamaño de éste. Esta comunicación trata sobre un sistema automatizado basado en técnicas de procesamiento digital de imágenes para el conteo y clasificación de células vegetales en suspensiones celulares sin aproximaciones.

### Implementación del sistema

Se trabajó con suspensiones embriogénicas celulares de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). var. CP 5243. Debido a que las células

vegetales tienden a formar agregados, éstos se separaron utilizando el método del Trióxido de Cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) descrito por King *et. al.* (1973). Se obtienen agregados con cinco células aproximadamente, El conteo se realiza en un hematocitómetro Nageotte (0.5 mm de profundidad). Un microscopio poco costoso se usó para observar las muestras. Para automatizar el proceso una cámara de TV CCD (model DXC-151) se acopló al microscopio y la señal de televisión se digitalizó, a través de una tarjeta miroVideo DC30 plus. Se obtuvo una imagen digital con 256 tonos de grises y 512 X 512 pixeles de resolución, donde se observaron las células a clasificar.

Las imágenes se segmentaron a solo dos tonos de grises, blanco para el Background y negro para los objetos, usando un método de segmentación no supervisada basado en el "Aprendizaje competitivo" (Uchiyama y Arbid, 1994). Los objetos en la imagen se detectaron y clasificaron, en tres tipos: agregado o célula con bajo contenido de almidón, agregado o célula con alto contenido de almidón y objeto sin interés.

Se crearon los algoritmos y técnicas que permiten el conteo y la clasificación de células en agregados con poco contenido de almidón, basados en la información topológica extraída del Esqueleto de los agregados. Se crearon además los algoritmos y técnicas que permiten el conteo y la clasificación de células en agregados con alto contenido de almidón, basados en la detección de los *Puntos Críticos Exteriores*. Todos los algoritmos tienen en cuenta el conocimiento específico de la forma de las células vegetales.

Se implementó un sistema automatizado utilizando los algoritmos y técnicas anteriores que permite el conteo y clasificación de células vegetales en suspensiones. El sistema fue validado en suspensiones celulares de Caña de Azúcar obteniéndose resultados satisfactorios.

La eficiencia del sistema fue de 91.3 % y está en el rango de efectividad aceptado para sistemas de Visión Computarizada que reconocen y clasifican estructuras vegetales (Agam y Dinstein, 1997).

## REFERENCIAS

- Agam, G y Dinstein I (1997) Geometric Separation of Partially Overlapping Nonrigid Objects Applied to automatic Chromosome Classification, IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 19 (11): 1212-1221
- King, P.J, Mansfield K J y Street, H E (1973) Control of growth and cell division in plant cell suspension cultures. Can. J. Bot. 51: 1807-1823
- Olofsdotter, M (1993) Image processing: a non-destructive method for measuring growth in cell and tissue culture. Plant Cell Report 12: 216-219
- Smith, M A L y McClelland M T (1991) Gauging the quality and performance of woody plants produced *in vitro*. *In Vitro* Celular and Developmental Biology 27: 52-56
- Smith, M.A.L, Spomer L.A, Meyer M J y McClelland M T (1989) Non-invasive evaluation of growth during plant micropropagation", Plant Cell Tissue and Organ Culture 19: 91-102
- Smith, M.A.L, L.A Spomer y McClelland M T (1990) Direct analysis of root zone data in a microculture system, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23: 21-26
- Uchiyama, T, Arbid A (1994) Color Image Segmentation Using Competitive Learning. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 16 (12): 45-60