

PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES PARA LA ESTIMACIÓN DE TEXTURA DE ENDOSPERMO EN LÍNEAS DE MAÍZ

DIGITAL IMAGE PROCESSING FOR ENDOSPERM TEXTURE ESTIMATION IN MAIZE LINES

Otto Raúl Leyva Ovalle^{1*}, Aquiles Carballo Carballo², José Apolinar Mejía Contreras² y María Gricelda Vázquez Carrillo³

¹ Campus Córdoba, Colegio de Postgraduados, Apartado Postal 143. C.P. 94500. Córdoba, Ver. Correo electrónico: oleyva@colpos.mx. ² Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230. Montecillo, Edo. de México. Fax: 01 (595)952-0262. ³ Laboratorio de Maíz, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Apartado Postal No. 10. C.P. 56230. Chapingo, Edo. de México. Tel: 01 (595) 952-1500 Ext. 5211.

*Autor responsable

RESUMEN

Con la finalidad de realizar selección para textura de endospermo en líneas de maíz, utilizando como parámetros los porcentajes de endospermo córneo y endospermo harinoso en granos, se evaluó una técnica que permite la estimación de estos componentes estructurales de manera rápida y confiable, basada en la aplicación de un método de procesamiento digital de imágenes, al que se conoce como umbral "threshold"; generalmente aplicado a las imágenes en escala de grises para posteriormente transformarlas a binarias mediante un contraste entre el fondo y los objetos. Su aplicación en 22 líneas de maíz fue comparada estadísticamente con la técnica de textura por disección, adoptada por la industria de la harina de maíz nixtamalizado. Se evaluaron granos con diferente proporción de endospermo córneo y harinoso, desde cristalinos hasta completamente harinosos. La técnica de procesamiento de imágenes también permite la posibilidad de la estimación de los porcentajes de embrión y pedicelo. Los resultados indicaron que los valores porcentuales de endospermo córneo y harinoso, obtenidos con la técnica de procesamiento de imágenes, sobrestiman en alrededor de 4 y 8 % respectivamente, a los obtenidos con los de textura por disección, pero no hubo diferencias estadísticas entre ellos.

Palabras clave: *Zea mays* L., endospermo córneo, endospermo harinoso, textura por disección.

SUMMARY

In order to select for endosperm texture in maize lines, using the percentages of horny and floury endosperm in grains as parameters, a technique that allows the estimation of these structural components in a fast and reliable way, was evaluated. This technique is based on digital image processing, known as "threshold", applied to images in a gray scale and afterwards transformed to a binary scale to generate a contrast between background and objects. Its application on 22 lines of maize was compared to the technique of texture by dissection, adopted by the industry of the "nixtamalized" maize flour. It was possible to evaluate grains with different horny and floury endosperm proportions, ranging from crystalline to completely floury. The technique of image processing also allows the estimation of embryo and pedicel percentages. The results indicated that percentages of horny and floury endosperm, obtained by image processing, were overestimated by 4 and 8 % respectively, as compared with those of texture

by dissection; although there were not statistically differences between them.

Index words: *Zea mays* L., horny endosperm, floury endosperm, texture by dissection.

INTRODUCCIÓN

El principal objetivo del fitomejoramiento es incrementar el rendimiento y las características de calidad de los productos agrícolas; en este sentido, la selección es uno de los procedimientos de mejoramiento más antiguo y que constituye la base del mejoramiento de plantas. Sin embargo, cuando se realiza mejoramiento hacia características específicas, como es el caso de generar variedades cuyos granos posean atributos deseables en la elaboración de harina de maíz nixtamalizado, el fitomejorador se enfrenta al problema de la cuantificación de los parámetros relacionados con la distribución y proporción de los tipos de endospermo, que le permitan hacer una correcta selección de los individuos que servirán como progenitores en la siguiente generación.

La proporción relativa de endospermo córneo y harinoso en un grano de maíz está asociada a la textura del endospermo, la cual influye sobre el potencial de almacenamiento, las características de procesamiento y las propiedades de cocción (Kirleis *et al.*, 1984).

La evaluación de la dureza de los cereales incluyen métodos tanto destructivos como no destructivos. La determinación de la densidad por el desplazamiento de etanol (Kniep y Mason, 1989; Lopes y Larkins, 1991) o la flotación en soluciones salinas son métodos no destructivos (Felker y Paulis, 1993); en cambio, las técnicas de molienda usadas como indicadores de dureza (Pomeranz,

1986; Fox *et al.*, 1992), son destructivas. Aunque la densidad y la resistencia a la molienda están correlacionadas con la proporción de endospermo vítreo, esas aproximaciones no están basadas en la visualización directa del endospermo córneo (Felker y Paulis, 1993).

La industria de la harina de maíz nixtamalizado, para tratar de subsanar este problema, adoptó la técnica denominada Textura por Disección para cuantificar cada uno de los componentes estructurales del grano de maíz. No obstante, dicha técnica resulta poco conveniente cuando se realiza mejoramiento genético, ya que ésta consiste en la separación y pesado, de manera individual, del pericarpio, pedicelo, embrión y endospermo córneo de los granos de maíz, operaciones que requieren una gran cantidad de tiempo; además, tiene un alto porcentaje de variabilidad que depende de la habilidad del personal que lo realice.

La proporción de endospermo córneo en maíz y sorgo también puede ser medida directamente por bisección o seccionamiento de los granos, seguida de la cuantificación de endospermo harinoso en relación con el endospermo córneo, mediante dibujos hechos con una cámara lúcida (Kirleis *et al.*, 1984), fotografías ampliadas (Louis-Alexandre *et al.*, 1991), o por análisis de imágenes de vídeo (Hallgreen y Murty, 1983; Gunasekaran *et al.*, 1988). Si bien esta aproximación es la más específica porque el tejido interno del endospermo es visto directamente, esta metodología resulta relativamente laboriosa y destructiva.

En este sentido, el análisis de imágenes es considerado para su uso en un amplio rango de situaciones, como son: determinación de la identidad varietal de lotes de grano, detección de granos contaminantes en muestras de trabajo, evaluación de descriptores varietales para otorgar los derechos y el registro de nuevas variedades a los fitomejoradores (Zayas *et al.*, 1985; Keefe y Draper, 1986; García y Estrada, 1999), selección de embriones somáticos (Kurata *et al.*, 1993), separación de granos rotos (Liao *et al.*, 1993) y, por supuesto, la estimación de tipos de endospermo en maíz (Felker y Paulis, 1993). Según García y Estrada (1999), en la mayoría de las situaciones anteriores se utilizó equipo muy complicado y caro que constaba de cámara de vídeo, computadora personal y programas de cómputo muy restringidos. En la actualidad el uso de la cámara de vídeo se ha sustituido por el "escáner" y el "software", que con la disponibilidad de las computadoras personales presentan una amplia gama de posibilidades en el análisis de imágenes.

Considerando lo anterior, el objetivo que se planteó en este trabajo fue evaluar una metodología alterna a la utilizada por la industria de la harina de maíz nixtamalizado, que facilite la caracterización de granos y selección de lí-

neas de maíz, en cuanto a la proporción de endospermo cristalino y harinoso.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio, en la fase de procesamiento digital de imágenes, se efectuó en campo y laboratorio en el Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Estado de México (19° 29' L N, 98° 54' L O, 2250 msnm), caracterizado por un clima tipo C(w_o)(w)b(i')g; temperatura media anual de 15 °C y precipitación media anual de 644.8 mm (García, 1987). La fase correspondiente a la estimación de los componentes del grano con la técnica de textura por disección se realizó en el Laboratorio de Maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias en Chapingo, México.

A finales de 1997 se realizó selección visual en 628 líneas de maíz, de un total de 5200, en donde se manejó como principal criterio el color de grano blanco. En el ciclo primavera-verano de 1998 se sembraron las líneas seleccionadas, para evaluar su comportamiento en campo, además de avanzar en endogamia. Después de valorar los materiales por su comportamiento en campo y color, solamente 218 líneas se consideraron para seguir con el proceso de mejoramiento y aplicar en éstas la técnica de procesamiento de imágenes. Considerando que la aplicación de la técnica de textura por disección en 218 líneas implicaría una gran cantidad de tiempo, se decidió realizar el estudio en únicamente 10 % (22) líneas tomadas completamente al azar, mismas que se utilizaron en las etapas descritas a continuación.

Procesamiento digital de imágenes

Las mazorcas cosechadas en octubre de 1998 fueron desgranadas manualmente una vez que el contenido de humedad era alrededor de 12 %. Del total de granos obtenidos se extrajo una muestra de 50, procurando que no presentaran ataque por hongos o plagas y que no estuvieran vanos. De cada línea se tomaron completamente al azar cinco granos, los cuales fueron colocados en una base metálica que se diseñó con el objetivo de sujetarlos y poder realizar su disección. La base se elaboró con una sección de fierro denominada "solera" (largo: 20.0 cm, ancho: 2.0 cm y espesor: 0.4 cm), la cual fue sujeta a un trozo de madera (largo: 33.5 cm, ancho: 5.0 cm y espesor: 2.0 cm) con dos tornillos. La solera fue perforada con una broca de 0.95 cm, y se procuró que los cinco orificios resultantes tuvieran forma oblonga. En el fondo de cada orificio se colocó hule de 1 mm de grosor para dar mayor sujeción a los granos (Figura 1).



Figura 1. Base metálica en la que se colocaron los granos de maíz para realizar la disección por abrasión.

La manera de realizar la disección de los granos fue por abrasión; esto es, los granos colocados con el embrión hacia abajo en cada uno de los orificios de la base, fueron tallados con una lija de agua del número 150. La lija fue sujeta en una base de hule (largo: 12.0 cm, ancho: 6.5 cm y espesor: 3.5 cm) (Figura 2). La disección se realizó desplazando la lija y ejerciendo presión a lo largo de la base metálica que contenía los granos.



Figura 2. Base de hule en la que se colocó la lija para producir la abrasión en granos de maíz.

Los cinco granos de cada línea, con el corte transversal, fueron adheridos en una hoja de papel “bond” azul con la identificación correspondiente, y digitalizados en un escáner marca Hewlett Packard Scan Jet, modelo 4100C y una computadora personal con procesador 80486 y 86 mega bits en memoria Ram, que produjo imágenes como la que se muestra en la Figura 3.

Se eligió el color azul de las hojas debido a que el color de fondo debe contrastar con los objetos a evaluar; como el color del endospermo harinoso es blanco, en este caso se debe evitar utilizar fondo blanco.

La imagen digitalizada en millones de colores (32 bits) y almacenada en formato “JPG” debió ser convertida a escala de grises (8 bits), ya que el programa de cómputo utilizado en el análisis sólo procesa imágenes de este tipo. La conversión se realizó con el programa denominado “Irfan

View” versión beta 3.2, el que además sirvió para realizar las operaciones de marcado y copiado de cada una de las imágenes antes de ser procesadas. Es conveniente señalar que la digitalización de imágenes puede almacenarse directamente, del escáner, en escala de grises (8 bits).

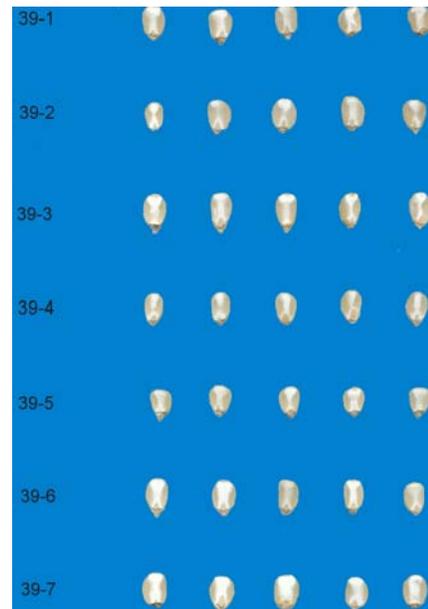


Figura 3. Hoja digitalizada con los granos disectados.

Para el procesamiento de imágenes se utilizó el programa de cómputo conocido como “UTHSCSA Image Tool” versión beta 1.28 desarrollado por el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas y se encuentra disponible, al igual que el “Irfan View”, de manera gratuita en la internet.

La imagen de cada una de los granos pertenecientes a la misma línea fue marcada y copiada en “Irfan View” (Figura 4) y pegada en “Image Tool” (Figura 5).

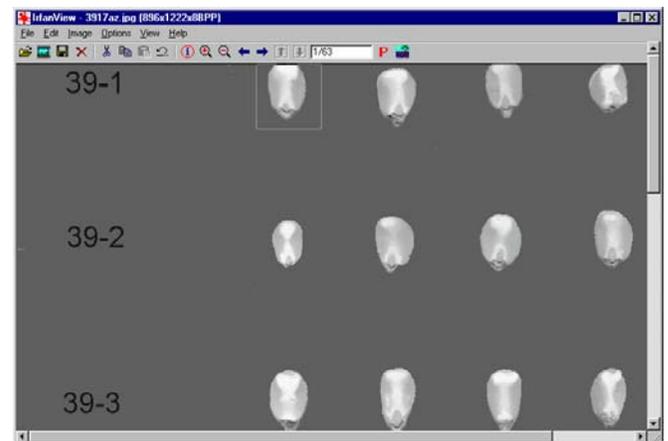


Figura 4. Selección y copiado, en “Irfan View”, de la imagen del grano a evaluar.

Con el procedimiento anteriormente mencionado se inicia el procesamiento de imágenes digitales.

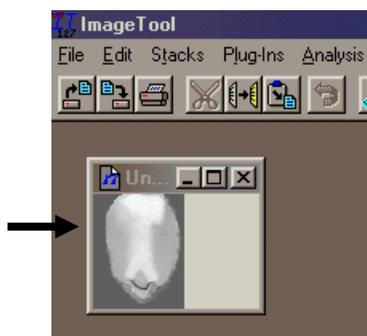


Figura 5. Pegado de la imagen en “Image Tool” para su procesamiento.

La estimación de los componentes estructurales de los granos se realizó con el método de procesamiento de imágenes conocido como umbral “threshold”, el cual se sustenta en las siguientes consideraciones. El umbral se refiere a la separación de áreas dentro de una imagen mediante un histograma que contiene las frecuencias en escala de grises de la imagen. Lo anterior se logra al seleccionar en el histograma el nivel de frecuencias que permitirá separar el área de interés del resto de la imagen. Al respecto, Rosenfeld y Kak (1982) mencionan que existen tipos de imágenes compuestas por dos tipos de regiones con diferentes rangos en la escala de grises (la cual va de cero a 255, donde el color negro vale cero y el blanco vale 255). Por ejemplo, en la imagen de una hoja escrita las letras son generalmente más oscuras que el papel; en este caso, el histograma de la imagen puede mostrar dos picos, correspondientes a dos rangos en niveles de grises (las letras y el papel). La imagen puede ser segmentada al seleccionar el umbral que separe esos picos. Cuando una imagen contiene más de dos tipos de regiones, es factible la segmentación a través de la aplicación de varios umbrales. Un histograma con dos picos es llamado bimodal, mientras que el que tiene varios picos es conocido como multimodal.

Según Davies (1990), si la iluminación del fondo de la imagen es uniforme y se buscan objetos planos para delinear su contorno de tal manera que la silueta contraste con el fondo, la segmentación puede ser hecha simplemente por el manejo del umbral de la imagen a un nivel particular de la intensidad. El resultado básico entre la imagen inicial en escala de grises es convertido en una imagen binaria en la que los objetos aparecen como figuras negras en un fondo blanco, o como figuras blancas en un fondo negro. El análisis de la imagen se vuelve entonces un análisis de formas y dimensiones de las figuras, en el cual la identificación del objeto puede ser directa.

El componente más pequeño de una imagen digital es conocido como elemento de la imagen, generalmente abreviado como *píxel* o *pel*, al que usualmente se hace referencia como un punto en la imagen (Rosenfeld y Kak, 1982).

El siguiente paso consiste en obtener el umbral de la imagen, lo que permite realizar una estimación del área, ya que el área de una región puede ser expresada como el número de píxeles en esa región, en donde un píxel es la unidad básica en la imagen de un monitor. Un monitor de alta definición contiene 1024 x 768 píxeles (largo x ancho). El área física se estima con la multiplicación del número de píxeles por el área que fue ocupada por cada píxel. Si el tamaño de un píxel es conocido, el área física puede ser analizada, aunque es más común que el área sea expresada como número de píxeles (Parker, 1994).

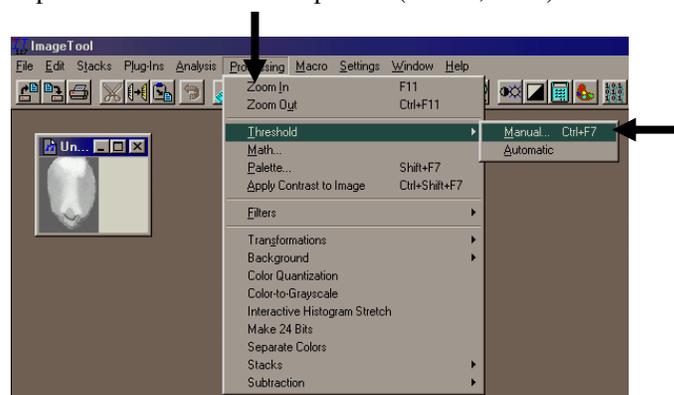


Figura 6. Ventana principal del programa “Image Tool”. En la parte superior de la imagen se observa la barra de menús, y dentro de “processing” la herramienta para hacer la estimación del umbral.

En la Figura 6 se muestra que la opción Procesamiento o “Processing” de la barra de menús en la parte superior de la imagen, despliega varias alternativas, en la que deberá escogerse la referente a “Threshold”, el cual a su vez despliega un submenú que contiene las alternativas Manual (“Manual”) y Automático (“Automatic”); la opción Manual permite una mayor eficiencia en la ubicación del pico deseado en el histograma.

Una vez hecho lo anterior, aparece el histograma con las frecuencias de las tonalidades de gris de la imagen que fue colocada en “Image Tool” (Figura 7), en la escala de cero a 255. Para determinar el umbral que comprende el área total del grano, se desplaza de izquierda a derecha el indicador de frecuencias (flecha 1, en Figura 7). Se considera totalmente definida el área del grano cuando al desplazar el indicador de frecuencias el relleno de la imagen del grano cambia de color; en un monitor a color se torna rojo (flecha con el número dos). Si el desplazamiento continuara hacia la derecha la superficie coloreada disminuirá

debido a que se están seleccionando otras frecuencias en escala de grises.

“Threshold”, se genera la imagen binaria para esta área (Figura 10).

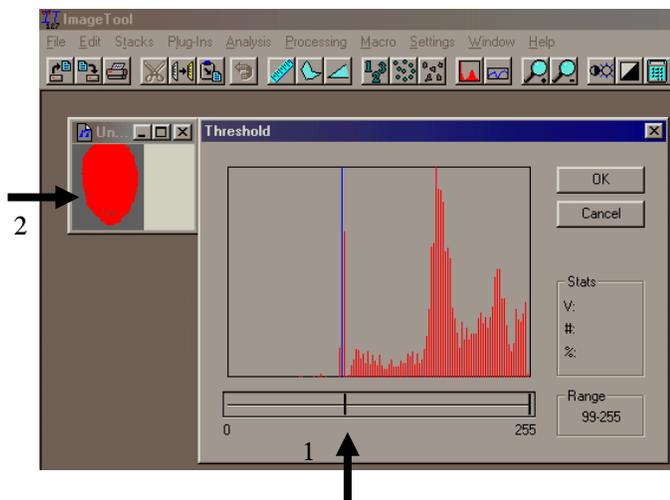


Figura 7. En la ventana interior, la flecha con el número uno indica el punto del histograma del grano. La flecha 1 indica el punto del área total del grano y la flecha dos señala el área.

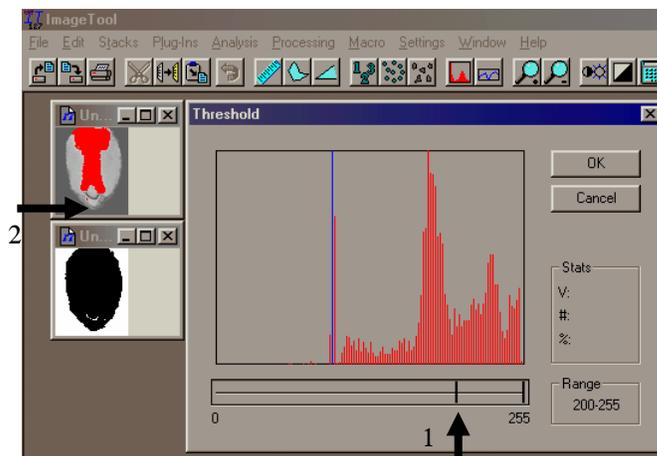


Figura 9. Definición del umbral (flecha con el número uno) para el área que ocupa el endospermo harinoso (flecha con el número dos).

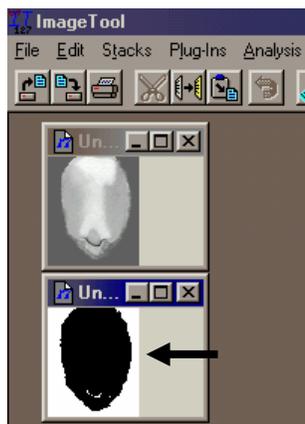


Figura 8. La ventana indicada con la flecha se refiere a la imagen binaria que corresponde al área total del grano.

Una vez que se ha definido el umbral del área total del grano se presiona el botón “OK” ubicado en la ventana de “Threshold” (Figura 7), y entonces “Image Tool” genera la imagen binaria del total del área del grano (Figura 8).

A continuación se define el punto en el histograma que ocupa el área del endospermo harinoso en el grano, lo cual se logra al repetir la operación que se mencionó para las Figuras 6 y 7; el desplazamiento del indicador de frecuencias deberá hacerse hacia la derecha hasta que la coloración roja cubra únicamente al endospermo harinoso (Figura 9). Posteriormente al presionar “OK” en la ventana de



Figura 10. Generación de la imagen binaria correspondiente al área del endospermo harinoso.

Cuando se ha obtenido la imagen binaria tanto del área total del grano como la del endospermo harinoso, se procede al conteo de los píxeles de cada una de las imágenes binarias. “Image Tool” incluye dentro de sus herramientas de análisis el conteo de los píxeles blancos y negros que conforman cada imagen binaria. Esto se realiza al seleccionar en la barra de menú la herramienta “Analysis”, en la que se coloca el cursor para desplegar un submenú con varias alternativas, de las cuales la que realiza el conteo es la que aparece al final con la leyenda “Count Black / White Pixels ...” (Conteo de píxeles negros / blancos) (Figura 11).

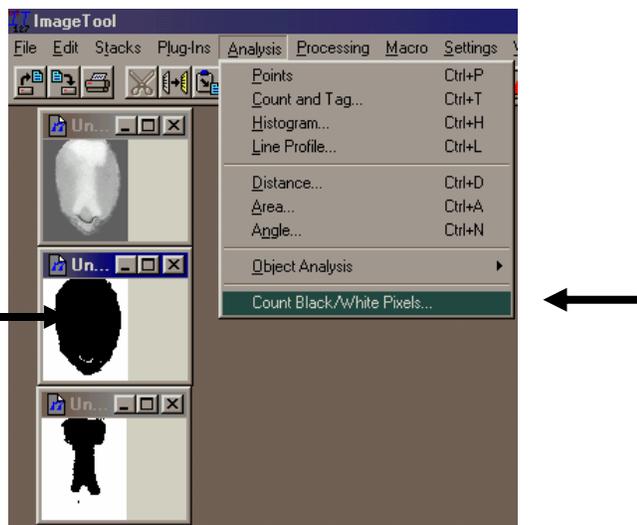


Figura 11. Selección de la herramienta que realiza el conteo de píxeles de las imágenes binarias.

“Image Tool” cuenta con una hoja de cálculo donde despliega los datos de los conteos, y se activa presionando maximizar en la pequeña barra que se encuentra en la esquina inferior izquierda de la pantalla, la cual contiene la leyenda “Results” (Resultados) (Figura 11).

Una vez que se ha maximizado la hoja de cálculo de “Image Tool” se puede observar que esta tiene varias filas y columnas. En las columnas, de izquierda a derecha se encuentra el título “Black Count”, sobre el cual aparecerá, hacia abajo, el número de píxeles de color negro en la imagen binaria. El título “White Count” hace referencia al número de píxeles de color blanco en la imagen. Al lado derecho de esta columna aparece el encabezado “Black %” y al final “White %”; ambos se refieren al porcentaje de píxeles de color blanco y negro respectivamente, en la imagen binaria. En las filas se puede observar en primer término la Media “Mean”, seguido por la desviación estándar “Std. Dev.” El número 1 se refiere a la imagen binaria del área total del grano, y el número 2 indica que los valores corresponden a la imagen binaria referida al área del endospermo harinoso (Figura 12).

	Black Count	White Count	Black %	White %
Mean	1843.00	2610.00	41.38	58.62
Std. Dev.	1091.77	1091.77	24.52	24.52
1	2615	1838	58.72	41.28
2	1071	3382	24.05	75.95
3				

Figura 12. Hoja de cálculo de “Image Tool” donde se concentran los resultados del conteo de píxeles correspondientes al grano entero (1) y al endospermo harinoso (2).

Para estimar los porcentajes de endospermo harinoso y córneo, se procedió a hacer la siguiente consideración: 1 píxel negro = 1 %. El total del área del grano fue de 2615 píxeles y el del endospermo harinoso fue de 1071; entonces, si 2615 es igual a 100 %, el porcentaje que corresponde a 1071 es 40.95 %.

Para obtener los porcentajes de endospermo córneo, pedicelo y embrión, es necesario realizar otra estimación en “Image Tool”, mediante el determinador de área que se activa seleccionando en la barra de menús la herramienta “Analysis” y la alternativa del submenú “Area”. De esta manera, el cursor se convertirá en un lápiz con el cual se debe de marcar el área que se quiera estimar, teniendo cuidado de cerrar el área seleccionada con las líneas que traza el cursor. Una vez hecha esta operación se presiona dos veces el botón izquierdo del ratón, y aparecerá una ventana indicando el área en píxeles al cuadrado (Figura 13).

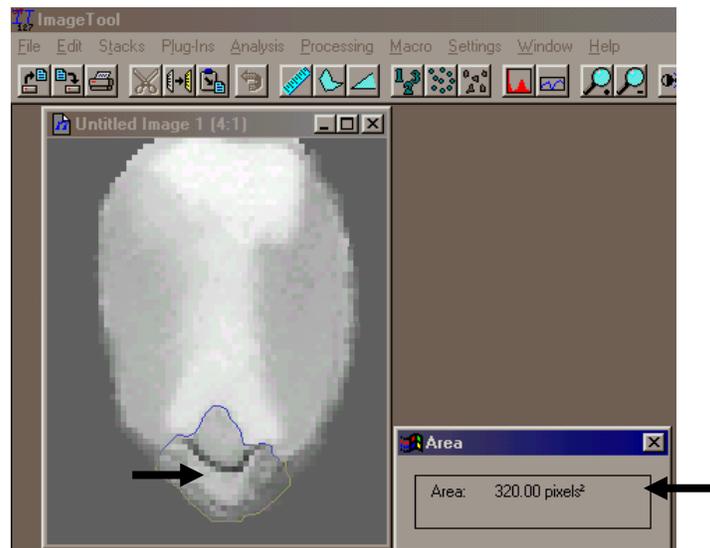


Figura 13. Estimación del área de embrión y pedicelo mediante “Image Tool”.

Para la estimación del porcentaje de embrión y pedicelo, es necesario que la disección se haga en granos completos y aplicar la abrasión hasta que el embrión quede expuesto. Para la estimación en “Image Tool” se debe de repetir el procedimiento indicado para la Figura 13, procurando marcar con la herramienta de área, únicamente el embrión (Figura 14).

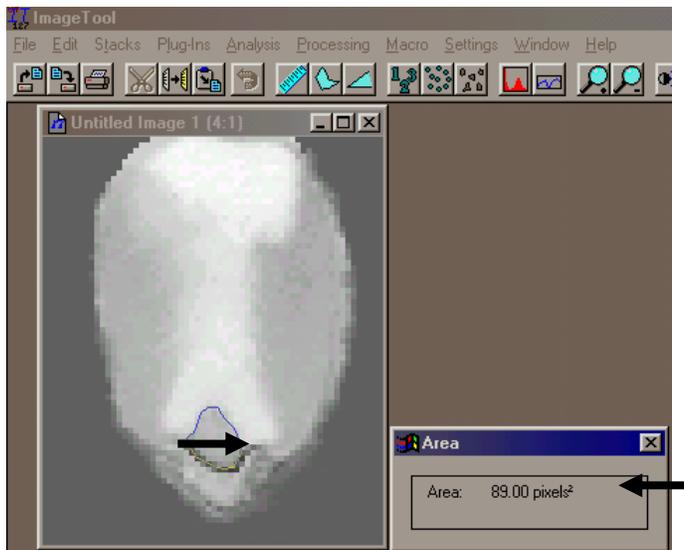


Figura 14. Estimación del área del embrión mediante "Image Tool".

La estimación porcentual del endospermo córneo, pedicelo y embrión requiere retomar los datos obtenidos anteriormente. Si 2615 píxeles equivalen a 100 % del área del grano, entonces 320 píxeles corresponderán a 12.23 %; si además se estima el porcentaje de embrión que es igual a 89 píxeles, su valor porcentual es de 3.40 %. Con estos datos se puede obtener el valor del endospermo córneo mediante una resta. El total (100 %) – endospermo harinoso (40.95 %) – pedicelo (8.83 %) – embrión (3.40 %) = endospermo córneo (46.81 %).

Textura por disección

Con la finalidad de tener un punto de comparación con la técnica anteriormente descrita se realizó la técnica de textura por disección en 22 (10 %) de las líneas evaluadas por análisis de imágenes.

La técnica de textura por disección se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por el Laboratorio Central de Desarrollo Industrial y Tecnológico, S.A. de C.V. S/A (Inédito), con la cual se determinan los porcentajes de pedicelo (pico), pericarpio, embrión (germen), almidón harinoso y almidón córneo, en granos de maíz. Para ello, se tomaron al azar 25 granos que no presentaran daño por plagas o enfermedades y se registró su peso en una balanza analítica digital marca AND, modelo GR200 con capacidad de 210 g.

Antes de proceder al siguiente paso, 30 cápsulas de aluminio fueron identificadas con un número y se registró el peso de cada una.

En un vaso de precipitado de 200 mL se calentó 100 mL de agua a 85 °C, y después se introdujeron los 25 granos por un periodo de 15 minutos; con esta acción el pericarpio de los granos se reblandece y facilita su separación mediante un pequeño corte en la superficie del grano con la ayuda de un bisturí con navaja del No. 23. El pericarpio separado de cada uno de los 25 granos fue colocado en una sola cápsula.

El pedicelo y el embrión de cada uno de los granos también fueron retirados con el bisturí y colocados por separado; esto es, en una cápsula se colocó el pedicelo de los 25 granos y en otra los embriones. Al retirar el embrión de los granos se tuvo la precaución de no remover endospermo harinoso.

El endospermo (córneo y harinoso) de cada uno de los 25 granos se colocó en una cápsula y se registró su peso. Luego se constituyeron tres grupos al azar, el primero con 15 granos para determinar el contenido de humedad, y los otros dos como repeticiones de cinco granos cada uno, para almidón harinoso.

Con la ayuda de un taladro manual, de velocidad variable, marca Kumas modelo MG-012V se eliminó el endospermo harinoso de cada uno de los 5 granos, en ambas repeticiones; para facilitar la remoción se partió a los granos por la mitad. Cada repetición fue pesada con su respectiva cápsula.

Las muestras de pedicelo, pericarpio y embrión fueron secadas en sus cápsulas, en una estufa de convección marca FELISA durante 45 minutos a 140 °C. Posteriormente las cápsulas fueron colocadas en un desecador marca Kimble hasta que se enfriaron, por un periodo de 20 a 30 minutos, y finalmente fueron pesadas.

Para obtener los porcentajes de cada una de las fracciones se utilizaron las siguientes formulas:

$$\text{Factor} = \left[A - \left(\frac{Z}{100} A \right) \right] + (J + K + L)$$

donde: A = Peso de 25 granos sin pericarpio, pedicelo y embrión, en base húmeda; Z = Humedad de los granos; J = Peso de pedicelo en base seca; K = Peso de pericarpio en base seca; L = Peso de embrión en base seca.

$$\text{Porcentaje de pedicelo} = \frac{J}{\text{Factor}} 100$$

$$\text{Porcentaje de pericarpio} = \frac{K}{\text{Factor}} 100$$

$$\text{Porcentaje de embrión} = \frac{L}{\text{Factor}} 100$$

Porcentaje de almidón harinoso repetición 1 =

$$\frac{\left[B - \left(\frac{Z}{100} B \right) \right] - \left[C - \left(\frac{X}{100} C \right) \right]}{\left[B - \left(\frac{Z}{100} B \right) \right]} 100$$

Porcentaje de almidón harinoso repetición 2 =

$$\frac{\left[E - \left(\frac{Z}{100} E \right) \right] - \left[F - \left(\frac{Y}{100} F \right) \right]}{\left[E - \left(\frac{Z}{100} E \right) \right]} 100$$

donde B = Peso de 5 granos sin pericarpio, pedicelo y embrión en base húmeda, repetición 1; C = Peso de 5 granos, únicamente endospermo córneo en base húmeda, repetición 1; E = Peso de 5 granos sin pericarpio, pedicelo y embrión en base húmeda, repetición 2; F = Peso de 5 granos, únicamente endospermo córneo en base húmeda, repetición 2.

$$X = \frac{C - D}{C} 100$$

$$Y = \frac{F - G}{F} 100$$

$$Z = \frac{H - I}{H} 100$$

donde H = Peso de 15 granos con endospermo córneo y harinoso, en base húmeda; I = Peso de 15 granos con endospermo córneo y harinoso, en base seca.

% de Almidón Córneo = 100 - (% Pedicelo + % Pericarpio + % de Embrión + % Almidón harinoso promedio).

Análisis estadístico

Para realizar la comparación entre ambas técnicas se utilizó la prueba de t, considerando dos poblaciones y dos muestras aleatorias independientes. En esta prueba se asignó la letra X a los porcentajes obtenidos con la técnica de textura por disección e Y para los porcentajes obtenidos con el de análisis de imágenes.

La hipótesis que se probó fue que las medias de porcentaje de endospermo harinoso son iguales, contra la al-

ternativa de que son diferentes al utilizar dos técnicas de estimación. Es decir:

Ho: $\bar{\delta} = 0$ en oposición a Ha: $\bar{\delta} \neq 0$

Los estadísticos que se calcularon fueron:

$$\bar{X} = 39.8893515; S_x^2 = 655.711766; n = 22$$

$$\bar{Y} = 47.741169; S_y^2 = 624.672854; m = 22$$

donde: \bar{X} e \bar{Y} = valor medio de las observaciones de la población 1 y 2, respectivamente; \square = es un número cualquiera; n y m = número de individuos de la población 1 y 2, respectivamente; S_x^2 y S_y^2 = son las varianzas muestrales de cada una de las poblaciones.

El estimador ponderado de la varianza fue:

$$S_p^2 = \frac{(21)(655.71) + (21)(624.67)}{42} = 640.19231$$

Se calculó t_0 .

$$t_0 = \frac{(39.89 - 47.74) - 0}{\sqrt{640.19 \left(\frac{1}{21} + \frac{1}{21} \right)}} = \frac{-7.85}{60.97} = -0.13$$

Se eligió un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Con 42 grados de libertad el valor tabular $t_{0.05(41)} = 1.6829$, por lo que la regla de decisión consistió en rechazar Ho si $t_0 > 1.6820$ o $t_0 < -1.6820$. Puesto que $t_0 = -0.13$, se concluyó que se acepta Ho con $\alpha = 0.05$. Para el resto de las comparaciones, endospermo córneo, embrión y pedicelo, se siguió el mismo procedimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos al aplicar la técnica de textura por disección muestran la gran variabilidad de las fracciones del grano de maíz entre las líneas evaluadas (Cuadro 1). Se observan líneas con alto porcentaje de endospermo córneo (70.20 %) y otras completamente harinosas. Las proporciones de embrión variaron desde 8.5 hasta 12 %; el pericarpio por su parte presentó un rango de variación entre 3.5 y 6.5 %. El pedicelo fue la fracción que constituyó la menor proporción en los granos (de 0.58 a 2.61 %). Esta situación indica que aunque las líneas evaluadas fueron tomadas completamente al azar de entre un total de 218, éstas representan un amplio rango de variación, lo cual es muy conveniente en este tipo de trabajos; de igual manera los resultados obtenidos tienen un amplio rango de aplicación.

La desviación estándar entre las repeticiones 1 y 2 de los porcentajes de endospermo harinoso no fue mayor a 7 %, situación que es considerada por la industria como un parámetro de eficiencia en la evaluación de las repeticiones de una misma muestra; es decir, si la variación resulta mayor a este porcentaje, se considera que la técnica fue mal conducida (Cuadro 1).

Cuadro 1. Componentes estructurales de líneas de maíz, obtenidos utilizando la técnica de textura por disección. Montecillo, Méx. 1999.

L	Pedi- celo (%)	Peri- carpio (%)	Embrión (%)	AH R 1 (%)	AH R 2 (%)	AH promedio (%)	Almidón córneo (%)	DE
1	1.38	5.14	12.00	12.82	11.92	12.37	69.11	0.64
2	1.18	4.55	10.77	15.58	13.14	14.36	69.14	1.72
3	0.58	5.10	8.49	17.53	13.75	15.64	70.20	2.67
4	1.49	6.44	10.38	16.17	15.44	15.80	65.89	0.52
5	1.38	5.66	9.76	21.33	14.75	18.04	65.17	4.65
6	1.53	4.58	9.23	18.18	18.23	18.20	66.45	0.03
7	1.55	5.35	9.79	21.79	23.83	22.81	60.51	1.45
8	1.35	4.61	11.47	24.56	23.62	24.09	58.48	0.67
9	0.71	3.91	11.45	23.74	25.28	24.51	59.42	1.09
10	2.12	4.95	11.05	26.14	28.39	27.27	54.61	1.59
11	1.40	4.39	9.35	28.98	29.91	29.45	55.41	0.66
12	1.26	4.47	10.36	31.90	29.08	30.49	53.42	1.99
13	1.65	5.67	8.62	37.60	34.30	35.95	48.11	2.33
14	2.03	4.39	12.01	37.61	38.55	38.08	43.49	0.66
15	0.80	3.34	9.88	35.62	45.32	40.47	45.51	6.86
16	1.36	4.24	9.41	47.56	47.58	47.57	37.42	0.01
17	2.61	3.39	10.84	59.99	50.59	55.29	27.87	6.65
18	1.24	5.85	9.90	65.40	75.10	70.25	12.76	6.86
19	2.31	4.51	10.85	79.85	84.79	82.32	0.00	3.49
20	1.22	5.13	9.74	81.38	86.42	83.90	0.00	3.56
21	1.62	4.32	9.90	82.90	85.42	84.16	0.00	1.79
22	1.07	4.13	8.26	84.81	88.27	86.54	0.00	2.45

L: Línea, AH: Almidón harinoso; R: Repetición; DE: Desviación estándar entre AH R 1 y AH R 2

En el Cuadro 2 se presentan los porcentajes de cuatro estructuras del grano de maíz estimadas mediante el procesamiento de imágenes digitales. Al igual que con la técnica de textura por disección, los porcentajes de estas estructuras muestran un amplio rango de variación entre las líneas evaluadas. Sin embargo, se puede notar que la variación del porcentaje de pedicelo entre líneas es mayor en comparación a la obtenida por la técnica de textura por disección, variación que puede ser atribuida al hecho de que en 11 de las 22 líneas evaluadas no se pudo estimar el porcentaje de embrión debido a que no se tuvo la precaución de disectar los granos hasta que todas las estructuras fueran visibles; por consiguiente la estimación a partir de las imágenes digitales no se hizo. De esta manera, el valor correspondiente al embrión puede estar incluido en los porcentajes de endospermo harinoso o bien en los de pedicelo.

Cuadro 2. Componentes estructurales de granos de maíz, obtenidos utilizando la técnica de análisis de imágenes. Montecillo, Méx. 1999.

Línea	Pedicelo (%)	Embrión (%)	Endospermo córneo (%)	Endospermo harinoso (%)
1	3.81	12.31	63.41	20.48
2	15.50	NES ¹	59.98	24.53
3	0.42	0.60	75.00	23.99
4	7.49	NES	69.23	23.92
5	2.06	8.71	62.09	27.14
6	11.85	NES	61.23	27.09
7	2.76	11.53	54.59	31.13
8	6.86	0.00	60.74	32.40
9	0.93	5.26	60.64	33.19
10	1.80	5.74	55.89	36.57
11	0.77	0.50	59.38	39.34
12	0.74	0.49	60.29	38.58
13	1.38	3.96	49.72	44.93
14	1.23	2.35	51.87	44.55
15	8.68	NES	41.18	50.15
16	10.90	NES	44.60	44.60
17	17.13	NES	18.66	64.20
18	0.64	1.23	18.18	79.98
19	8.66	NES	0.00	91.34
20	7.60	NES	0.00	92.41
21	5.70	NES	9.83	84.46
22	4.69	NES	0.00	95.31

¹ NES: No estimado

Como resultado de los análisis estadísticos se observa que, para el caso de endospermo harinoso, debido a que t es menor que $t_{0.05(42)}$, la hipótesis H_0 se acepta; ello indica que la técnica de procesamiento de imágenes digitales estima porcentajes de manera muy similar a la de textura por disección, con una certeza de 95 %. El mismo comportamiento se aprecia en el caso de endospermo córneo. Esta situación fue corroborada mediante el coeficiente de correlación, que en ambos casos fue superior a 90 %. En las pruebas de hipótesis para embrión y pedicelo, la H_0 fue rechazada y por lo tanto las determinaciones entre las dos técnicas, para estos parámetros, son diferentes. El coeficiente de correlación para ambos casos fue cercano a 30 % (Cuadro 3).

En la Figura 15 se observan los porcentajes de endospermo harinoso en las 22 líneas evaluadas, ordenadas de menor a mayor, para comparar la estimación de ambas técnicas. Aunque los valores de la técnica de procesamiento digital de imágenes son cercanos a los obtenidos en textura por disección, los primeros sobrestiman en alrededor de 8 % a los valores. Esta situación puede deberse en gran medida a que en el caso de textura por disección se utilizaron 25 granos para la estimación de pedicelo, pericarpio y embrión, en tanto que para la estimación de endospermo córneo y harinoso fueron dos repeticiones de cinco granos cada una. Si se quisiera mayor precisión se debería realizar la técnica de procesamiento de imágenes con tamaños de muestra mayores.

Cuadro 3. Estadísticos utilizados en la comparación, por prueba de t, de dos técnicas de estimación porcentual de componentes estructurales en grano de maíz.

Variable	Media	Varianza	No. obs.	S ² _p	t ₀	t _{0/2(n+m-2)}	Correlación (r)
Endospermo harinoso							
Textura por disección	39.89	655.71	n=22	640.19	-0.13	1.6820	0.992
Análisis de imágenes	47.74	624.67	m=22				
Endospermo córneo							
Textura por disección	43.77	641.58	n=22	619.60	-0.12	1.6820	0.976
Análisis de imágenes	44.39	597.62	m=22				
Embrión							
Textura por disección	10.25	1.54	n=11	10.39	3.98	1.7247	0.341
Análisis de imágenes	4.79	19.24	m=11				
Pedicelo							
Textura por disección	1.45	0.24	n=22	12.56	-3.82	1.6820	0.303
Análisis de imágenes	5.53	24.87	m=22				

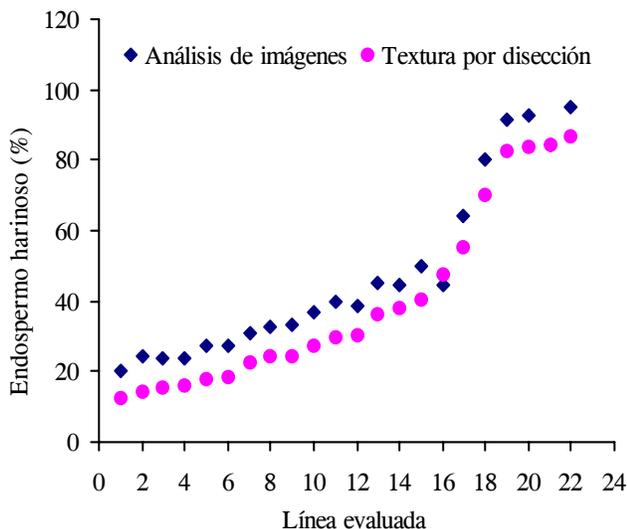


Figura 15. Contenido de endospermo harinoso, en 22 líneas de maíz, estimado por dos técnicas.

En la Figura 16 se muestra la comparación de ambas técnicas con respecto al endospermo córneo; el comportamiento es muy similar a lo observado en la Figura 15, lo cual puede atribuirse al hecho de que si la abrasión aplicada para disectar los granos no es hecha hasta un nivel en el cual se puedan diferenciar perfectamente los dos tipos de endospermo, se estará incurriendo tanto en una subestimación de endospermo harinoso como en una sobrestimación de endospermo córneo. En este caso la diferencia promedio, entre valores de una y otra técnica, fue de 4.5 %.

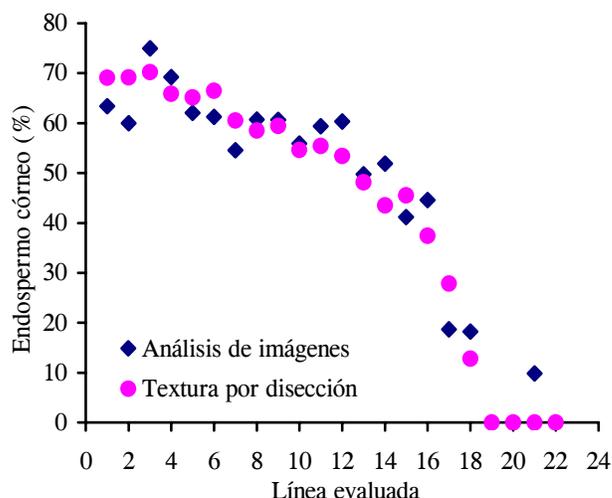


Figura 16. Contenido de endospermo córneo, en 22 líneas de maíz, estimado por dos técnicas.

CONCLUSIONES

La técnica de procesamiento digital de imágenes descrita provee porcentajes altamente confiables que permiten cuantificar al menos dos componentes estructurales de los granos de maíz, el endospermo córneo y el endospermo harinoso.

Ambas técnicas son destructivas; sin embargo, al comparar el tiempo requerido para la estimación, la técnica para determinar textura por disección es 20 veces mayor.

El procesamiento digital de imágenes resulta altamente apropiado en investigaciones donde se trabaja con una cantidad de muestras grande y donde se requiere una estimación objetiva del porcentaje de endospermo córneo y harinoso; además el equipo utilizado es de fácil acceso y relativamente barato.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado al proyecto 29059-B, del cual forma parte el presente estudio. Se agradece también al M.C. Ángel Leyva Ovalle por sus aportaciones y recomendaciones en el procesamiento de imágenes digitales y al Dr. Héctor González Hernández por su ayuda en la elaboración de las Figuras 1 y 2.

BIBLIOGRAFÍA

Davies E R (1990) Machine Vision: Theory, Algorithms, Practicalities. Academic Press. London. 547 p.
 Felker F C, J W Paulis (1993) Quantitative estimation of corn endosperm vitreosity by video image analysis. Cereal Chem. 70(6):685-689.

- Fox S R, L A Johnson, C R Jr Hurburgh, C Dorsey-Redding, T.B. Bailey (1992)** Relations of grain proximate composition and physical properties to wet-milling characteristics of maize. *Cereal Chem.* 69:191-194.
- García de los S G, Estrada G J A (1999).** Caracterización de frijol de la variedad Bayomex mediante descriptores agronómicos y análisis de imágenes de morfología de semillas. *Rev. Fitotec. Mex.* 22(1):63-74.
- García E (1987)** Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. UNAM. Instituto de Geografía. 635 p.
- Gunasekaran S, T M Cooper, A G Berlage (1988)** Evaluating quality factors of corn and soybeans using a computer vision system. *Transactions of the ASAE* 31:1264-1269.
- Hallgreen L, D S Murty (1983)** A screening test for grain hardness in sorghum employing density grading in sodium nitrate solution. *J. Cereal Sci.* 1:265-269.
- Keefe P D, S R Draper (1986)** The measurement of new characters for cultivar identification in wheat using machine vision. *Seed Sci. & Technol.* 14:715-724.
- Kirleis A W, K D Crosby, T L Housley (1984)** A method for quantitatively measuring vitreous endosperm area in sectioned sorghum grain. *Cereal Chemi* 61(6): 556-558.
- Knief K R, C C Mason (1989)** Kernel breakage and density of normal and opaque-2 maize grain as influenced by irrigation and nitrogen. *Crop Sci.* 29:158-162.
- Kurata K, M Komine, H Liyanage, Y Ibaraki (1993)** A thinning-based algorithm for evaluating somatic embryos. *Transac. ASAE* 36(5):1485-1489.
- Liao K, M R Paulsen, J F Reid, B C Ni, E P Bonifacio-Maghirang (1993)** Corn kernel breakage classification by machine vision using neural network classifier. *Transac. ASAE* 36(6):1949-1953.
- Lopes M A, B A Larkins (1991)** Gamma-zein content is related to endosperm modification in quality protein maize. *Crop Sci.* 31:1655-1659.
- Louis-Alexandre A, C Mestres, J Faure (1991)** Measurement of endosperm vitreousness of corn: A quantitative method and its application to African cultivars. *Cereal Chem.* 68:614-618.
- Parker J R (1994)** *Practical Computer Vision Using C.* John Wiley & Sons, Inc. New York. 476 p.
- Pomeranz Y (1986)** Comparison of screening methods for indirect determination of sorghum hardness. *Cereal Chem.* 63:36-38.
- Rosenfeld A, A C Kak (1982)** *Digital Picture Processing.* Academic Press, Inc. San Diego, California. 349 p.
- Zayas I, Y Pomeranz, F S Lai (1985)** Discrimination between Arthur and Arkan wheats by image analysis. *Cereal Chem.* 62(6):478-480.