

MACF-IJ, MÉTODO AUTOMATIZADO PARA MEDIR COLOR Y ÁREA FOLIAR MEDIANTE IMÁGENES DIGITALES

MACF-IJ, AUTOMATED METHOD FOR MEASURING COLOR AND LEAF AREA THROUGH DIGITAL IMAGES

Carlos P. Saucedo-Acosta¹, Víctor A. González-Hernández², Bardo H. Sánchez-Soto¹, Raúl H. Saucedo-Acosta³, Hugo M. Ramírez-Tobías⁴, José G. Quintana-Quiroz^{1*}

¹Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa, Calle 16 Avenida Japaraqui S/N, 81110. Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa (quintana.josegpe@gmail.com). ²Genética. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados, 56230. Estado de México. ³Campo Experimental Valle del Fuerte, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 1609, Carretera Internacional México-Nogales, 81110. Juan José Ríos, Guasave, Sinaloa. ⁴Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Carretera San Luis Potosí-Matehuala km 14.5, 78321. Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí.

RESUMEN

El color y área foliar (AF) son importantes en estudios fisiológicos y fitogenéticos, pero su obtención es laboriosa, incluso con integradores y colorímetros. Ambas características pueden medirse con análisis de imágenes digitales (AID), pues, aunque existen programas gratuitos específicos para obtener el AF éstos requieren intervención del usuario, no registran las dimensiones ni coloración foliar. El objetivo de este estudio fue mostrar el funcionamiento de Macf-IJ para medir área y color foliar mediante AID. Los resultados se compararon con mediciones manuales y del integrador Li-Cor 3000[®] del área de siete figuras geométricas. También AF se midió en 13 herbáceas; el color y el contenido relativo de clorofila (CRC), con SPAD 502[®], en *Rhynchosia minima* (L.) DC. El AID se realizó con Digimizer 4.3.5[®] y Black Spot Leaf. El tiempo se registró para cada caso. El área obtenida con integrador para una misma figura mostró variación inferior a 8.96 %, con Macf-IJ y con fotografías fue menor a 1.82 %; el R² entre métodos fue 0.999 ($p \leq 0.001$). El AF se correlacionó entre el integrador y Macf-IJ ($r > 0.989$, $p \leq 0.001$); excepto en cinco gramíneas, Macf-IJ, Black Spot Leaf y Digimizer[®] presentaron $R^2 \geq 0.99$ ($p \leq 0.001$). El tiempo no mostró significancia entre métodos, pero Macf-IJ registra longitud (cm), anchura (cm), perímetro (cm), circularidad (0-1), así como el color rojo (R), verde (G) y azul (B). Existió correlación del CRC con el verde ($r = -0.946$, $p \leq 0.01$), con el rojo ($r = -0.941$) y el azul ($r = -0.881$), entre el RGB obtenido

ABSTRACT

Leaf color and area are important characteristics in plant physiology and genetic studies, but data collection is laborious and requires optical integrators and colorimeters. Nowadays, data collection could be automated through digital image analysis (DIA). Free software for DIA to measure leaf area or color is available, but user intervention is required to record dimensions or leaf color. This study shows the Macf-IJ routine for DIA to measure leaf area and color. Results from DIA of seven geometric figures were compared to physical measurements with a LI-COR 3000[®] Leaf Area Integrator. Additionally, leaf area was measured in 13 herbaceous plants, and color and relative chlorophyll content (RCC) was recorded for *Rhynchosia minima* (L.) DC with a SPAD 502[®]. DIA was performed with Digitizer 4.3.5[®] and Black Spot Leaf. Duration of each measurement was recorded for each case. The area measured with the integrator for any figure varied less than 8.96 % with Macf-IJ and less than 1.82 % with photographs. R² between methods was 0.999 ($p \leq 0.001$). With exception of five grasses, leaf area measured with the integrator correlated well with the Macf-IJ ($r > 0.989$, $p \leq 0.001$); Macf-IJ, Black Spot Leaf and Digimizer[®] had an R² greater than 0.99 ($p \leq 0.001$). Duration was not significantly different between methods, but Macf-IJ registered additional data such as length (cm), width (cm), circularity (0-1), and red (R), green (G), and Blue (B) colors. There was correlation between RCC and green ($r = -0.946$, $p \leq 0.01$), red ($r = -0.941$) and blue ($r = -0.881$) colors and between RGB obtained the Digimizer[®] and CRC ($r = -0.939$, -0.942 and -0.811 for red, green and blue colors, respectively).

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2016. Aprobado: noviembre, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 51: 409-423. 2017.

con Digimizer® e CRC ($r=-0.939$, -0.942 y -0.811 para rojo, verde y azul, respectivamente). Macf-IJ utilizó 4.43 s por hoja y 38.37 s para CRC ($p\leq 0.001$). Macf-IJ es un método rápido y preciso para medir el área, dimensiones y color foliar mediante imágenes escaneadas y fotografía digital.

Palabras clave: área foliar, color, imágenes digitales, Li-Cor 3000, SPAD 502.

INTRODUCCIÓN

La hoja es, en la mayoría de las plantas, el principal órgano fotosintético y realiza funciones importantes relacionadas con la transferencia de radiación y flujo de gases (Dornbusch y Andrieu, 2010). El tamaño del área foliar es relevante en la mayoría de los estudios ecofisiológicos, por ser indicador del crecimiento y desarrollo de la planta y por estar relacionado con la intercepción de radiación solar, intercambio de CO_2 , evapotranspiración y eficiencia fotosintética (Backhaus *et al.*, 2010; Misle *et al.*, 2013).

Los métodos para medir el área foliar incluyen el uso de papel milimétrico, gravimetría, planimetría manual y fotoeléctrica, registro de largo y ancho (Pandey y Singh, 2011) o mediante la combinación de dos o más de estos procedimientos y análisis con regresión lineal para obtener modelos empíricos, que facilitan e incluso permiten estimar el área foliar de manera no destructiva y con exactitud, pero la estimación es errónea cuando la variación en el tamaño y forma de la hoja es amplia (Bylesjö *et al.*, 2008). Además, los métodos convencionales son laboriosos y tardados (Chaudhary *et al.*, 2012; Varma y Osuri, 2013), pues miden por separado cada hoja.

El área foliar medida con equipos electrónicos es una medición directa, con precisión de mm^2 , y hay equipos portátiles aunque su uso es complicado cuando las hojas son pequeñas, como en trigo, o están en las primeras etapas de su desarrollo (Cogliatti *et al.*, 2010). Otra limitante en México es el precio, y algunos como el Li-Cor 3000® (LI-COR BioSciences, Lincoln, Nebraska, USA) no proporcionan perímetro, ni largo y ancho de la hoja.

El procesamiento y análisis de imágenes digitales (AID) es una alternativa para evaluar el tamaño de las hojas, ya que la digitalización se puede realizar con dispositivos poco costosos, como escáneres de

Macf-IJ took 4.43 s to measure leaves, while RCC took 38.37 s ($p\leq 0.001$). Macf-IJ is a quick and precise method that measures area, dimensions and leaf color through scanned images and digital photography.

Key words: leaf area, leaf color, digital images, LI-COR 3000, SPAD 502.

INTRODUCTION

In most plants, the leaf is the main photosynthetic organ that performs important energy transfer and gas exchange functions (Dornbusch and Andrieu, 2010). Leaf area size is highly relevant to ecophysiological studies as an indicator of plant growth and development: it relates to interception of solar radiation, CO_2 exchange, evapo-transpiration rate and photosynthetic efficiency (Backhaus *et al.*, 2010; Misle *et al.*, 2013).

Leaf area may be estimated using ruled paper, gravimetric techniques, manual and photoelectric measurements, calculation by leaf length and width (Pandey and Singh, 2011), or a combination of one or more of these procedures. Empirical models constructed with collected data estimate leaf area in a precise and non-destructive manner. However, if leaf size and shape vary greatly, estimated values might be incorrect (Bylesjö *et al.*, 2008). Besides, conventional leaf area estimation methods are laborious and prolonged (Chaudhary *et al.*, 2012; Varma and Osuri, 2013) as each leaf must be measured separately.

Leaf area measured with an electronic device is precise (in mm^2) and immediate, and the device may be portable. However, usage of these devices on small leaves, like those found on wheat or early-developing leaves, is rather complicated (Cogliatti *et al.*, 2010). For research in Mexico, the price of these devices is a limiting factor for widespread usage. Additionally, devices like the LI-COR 3000 (LICOR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA) do not measure leaf perimeter, width or length.

Digital image analysis (DIA) and processing is an alternative method to measure leaf area. Low cost devices, like desktop image scanners, could be employed for image acquisition (Varma and Osuri, 2013). Additionally, leaf color, an indicator of the nutritional state, health and senescence of the leaves (Riccardi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), could be

escritorio (Varma y Osuri, 2013). También permite medir color, el cual es indicador del estado nutricional, sanidad y senescencia de las hojas (Riccardi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), variables que se estiman o evalúan con el SPAD 502® (Soil Plant Analysis Development. Konica-Minolta Inc. Osaka, Japan). Easlon y Bloom (2014) señalan que los métodos basados en el AID son rápidos, precisos, y están desplazando a equipos que utilizan la obstrucción de la luz para estimar el área foliar.

Las características morfológicas y del color de las hojas se pueden obtener en forma directa o indirecta con el programa comercial Matlab® (MathWorks, Inc. Natick, Massachusetts, USA), que tiene un uso amplio (Dornbusch y Andrieu, 2010; Price *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2012; Corney *et al.*, 2012; Chaudhary *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). El programa libre de mayor uso para el registro de dichas variables es ImageJ (Warman *et al.*, 2011; Green *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2012; Maloof *et al.*, 2013; Easlon y Bloom, 2014; Saucedo *et al.*, 2015).

El área foliar se puede obtener con programas específicos y gratuitos como Black Spot Leaf, creado en Python (Python Software Foundation), que funciona en MS-DOS® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), y sólo registra el área total por imagen (Varma y Osuri, 2013). El programa LAMINA, desarrollado en Java®, reporta el área, el largo, el ancho y la pérdida de área foliar (Bylesjö *et al.*, 2008). Easy Leaf Area, escrito en Python, mide área total por imagen, el área y largo por hoja (Easlon y Bloom, 2014). LeafJ, un complemento para ImageJ, proporciona el área y las dimensiones de la hoja y del peciolo (Maloof *et al.*, 2013).

El inconveniente de esos programas es que no registran el color de las hojas y ocupan la intervención del usuario en varias partes del proceso, lo cual requiere tiempo. Por ello se necesita una mayor automatización, que facilite y apresure la medición de las hojas, lo que motivó el desarrollo de una rutina, en el programa ImageJ, para medir el área y color foliar (Macf-IJ) mediante imágenes digitales. El objetivo del este estudio fue describir en detalle el funcionamiento de Macf-IJ y comparar la precisión y rapidez con las de otros métodos. La hipótesis fue, que con Macf-IJ se pueden obtener con exactitud, y en un solo paso, las variables morfológicas y de color foliar.

estimated instead of using portable reflectometers such as SPAD 502® (Soil Plant Analysis Development. Konica-Minolta Inc. Osaka, Japan). Easlon and Bloom (2014) pointed out that methods based on DIA are fast and precise, and they they are replacing equipment that use light obstruction to estimate the leaf area.

Leaf morphological traits and color can be obtained with widely used commercial software like Matlab® (MathWorks, Inc. Natick, Massachusetts, USA) (Dornbusch and Andrieu, 2010; Price *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2012; Corney *et al.*, 2012; Chaudhary *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). A free-software option to record leaf characteristics is ImageJ (Warman *et al.*, 2011; Green *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2012; Maloof *et al.*, 2013; Easlon and Bloom, 2014; Saucedo *et al.*, 2015).

Leaf area can also be measured with Black Spot Leaf created in Python (Python Software Foundation), a free and specific software that runs under MS-DOS® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). Black Spot Leaf can only calculate total area per image (Varma and Osuri, 2013). Instead, LAMINA, a software developed under Java®, can measure leaf area, length, width, and leaf area loss (Bylesjö *et al.*, 2008). Easy Leaf Area, also Python software, can estimate total area per image, as well as area and length per leaf (Easlon and Bloom, 2014). LeafJ, a complement for ImageJ, calculates area and dimensions for leaves and petioles (Maloof *et al.*, 2013).

However, the software noted above do not measure leaf color and require user intervention along several parts of the process that consumes more time. Greater automation could facilitate leaf area and color measurement, thus this research developed an ImageJ routine (Macf-IJ) that measures leaf area and leaf color through digital images. The objective of our study was to perform a detailed description of the operation of the Macf-IJ routine and compare its precision and efficiency against other methods reported in the scientific literature. Our hypothesis was that the Macf-IJ routine estimates morphological variables and leaf color with precision, in one single pass.

MATERIALES Y MÉTODOS

Macf-IJ es una rutina o macro desarrollada en ImageJ 1.50b, la cual se integra como un botón a la barra de herramientas, o bien como una instrucción seleccionable en el menú *plugins*; de ambas maneras permite procesar y analizar con un sólo clic imágenes individuales o todas las contenidas dentro de una carpeta. Requiere imágenes de hojas digitalizadas con escáner de cama plana, de preferencia, aunque no necesario, que no estén en contacto con los bordes del cristal, guardadas en formato de imagen jpeg u otro (tiff, bmp, pgm, png). El uso de imágenes digitales fotográficas necesita de fondo blanco, captura con la mayor nivelación posible de la cámara y que incluya un objeto color rojo en la imagen para referencia de la escala.

El método necesita el *plugin* o complemento Color_Transformer.java para registrar el color en el espacio CIELab, el cual es más popular para medir la reflectancia y transmitancia de los objetos (Graeff *et al.*, 2008), y de acuerdo con Rodríguez *et al.* (2012), se utiliza en colorímetros, espectrofotómetros y radiómetros. El uso de dicho espacio permite la comparación de valores de color entre dispositivos que analizan la coloración (Whan *et al.*, 2014).

La rutina establece la escala en forma automática, con base en la resolución de la imagen. Define las medidas requeridas con la instrucción *Set Measurements...* El procesamiento para obtener las dimensiones de la hoja consiste en duplicar la imagen original y convertir la nueva imagen a escala de grises a 8 bits (*run("8-bit")*), luego efectúa la segmentación mediante el ajuste de los umbrales de color con el método por defecto (*setAutoThreshold("Default")*); lo anterior crea una imagen binaria que permite discriminar entre el fondo (negro) y las hojas o regiones de interés (blanco). El análisis de partículas de las imágenes se realiza con la función *Analyze Particles...*, con restricción por tamaño de 0.5 a 500 cm² y se excluyen los agujeros dentro de la lámina foliar y añade las regiones de interés al manejador (*Roi Manager*).

El color en el espacio RGB se obtiene de la imagen original. Para ello es necesario separar los tres canales mediante la instrucción *Make Composite*, o bien en el espacio CIELab (medida más utilizada por los colorímetros comerciales), mediante la transformación del RGB con el uso del complemento *Color_Transformer*; en ambos casos para cada componente del color se ejecuta el análisis de las regiones de interés añadidas al manejador (*roiManager("Measure")*). En cada hoja se registra el área (cm²), largo (cm), ancho (cm), perímetro (cm), y circularidad (0 a 1); así como también la intensidad del rojo (R), verde (G), azul (B) y el promedio del color (RGB). El conjunto de observaciones para cada variable se almacena en matrices (*arrays*), para después utilizarlas en un cuadro de resultados personalizado.

MATERIALS AND METHODS

Macf-IJ is a routine or macro developed under ImageJ 1.50b and is accessible in the toolbar or in a selectable command through the *Plugins* menu. In either case, the user can process and analyze individual images or all the contents in a folder, with just one click. The routine requires digitized images of the leaves. The images should preferably be scanned flat-faced on the middle of the scanner bed and saved in image format (jpeg, tiff, bmp, pgm, png). Alternatively, digital photographic images could be used. These photographs should frame the leaves on a white background, capture the image with the highest possible camera balance, and include a red object of known area in each image as a calibration reference.

This routine employs the Color_Transformer.java plug-in to record the color in the popular CIELab space that measures reflectance and transmittance of objects (Graeff *et al.*, 2008). According to Rodríguez *et al.* (2012), it is used in colorimeters, spectrophotometers and radiometers. The use of such space allows for color comparison between devices that analyze coloration (Whan *et al.*, 2014).

The routine automatically sets the scale based on image resolution. Required measurements are defined with the *Set Measurements* command... The process initiates by duplication of the original image and conversion of the duplicate to an 8-bit grayscale image (*run("8-bit")*). The image is then segmented through adjustment of color thresholds with the default method (*setAutoThreshold("Default")*). This process creates a binary image that differentiates between background (black) and leaves or regions of interest (white). Image particle analysis starts with the *Analyze Particles...* function, with size restriction of 0.5 to 500 cm². Holes inside the canopy are excluded and regions of interest are added to the manager (*Roi Manager*).

The color in the RGB (Red, Green, Blue) space is obtained from the original image. The color image is separated into the three channels with the command *Make Composite*, alternatively the image could be transformed to the CIELab space (a more common method in commercial colorimeters), through RGB transformation with the *Color Transformer* complement. In both cases, for each color component, the analysis of the regions of interest added to the manager is executed (*roiManager("Measure")*). For each leaf, the values of area (cm²), length (cm), width (cm), perimeter (cm), and circularity (0 a 1) are recorded, as well as the intensity of red (R), green (G), blue (B) and the average color (RGB). The set of observations for each variable is stored in arrays, so they can be used afterwards in a of personalized results table.

Results are automatically saved in a comma delimited file (.csv), with the prefix Leaf Area Results, plus the name of the

Los resultados se guardan automáticamente en un archivo delimitado por comas (.csv), con el prefijo Resultados Área Foliar, más el nombre de la imagen procesada (sin la extensión jpg). Este archivo es abierto por cualquier hoja electrónica de cálculo (MS Excel®, Gnumeric, OpenCalc OpenOffice y LibreOffice Calc). En la primera columna, nombrada *Muestra*, se identifica el nombre de la imagen, la duración (s), fecha y hora del muestreo. También se genera un cuadro de resumen llamado Resumen Área Foliar, que muestra el total de hojas analizadas, el promedio del tamaño de las hojas (cm²), largo (cm), ancho (cm), perímetro (cm), circularidad (0 a 1), color y el tiempo (s) requerido para el análisis de cada imagen.

La precisión y rapidez de Macf-IJ se comparó con el integrador Li-Cor 3000® y con los programas Black Spot Leaf y Digimizer 4.3.5® (MedCalc Software bvba; Ostend, Belgium), este último mide el color, es de distribución libre y facilita el análisis de imágenes. El tiempo se registró para cada caso. Al azar se recolectaron hojas frescas de 13 especies (Cuadro 1) en las áreas verdes del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Estado de México, y se identificaron con base en la descripción morfológica de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2009). El área de cada hoja se obtuvo con el integrador y después se digitalizaron con un escáner multifuncional marca HP® modelo M1132 MFP.

Las imágenes de las hojas se guardaron en formato jpeg a color (RGB), con resolución de 300 ppp y dimensiones de 2550 x 3507 pixeles. El tiempo promedio para obtener la imagen fue 40 s y el peso por archivo fue alrededor de 655 Kb. El color foliar en el espacio CIELab y RGB se evaluó en las 13 especies (datos no mostrados), pero con el fin de obtener deducciones útiles y prácticas para la comparación del color (RGB) se utilizó

processed image (without the jpg extension). This file can be opened by any electronic spreadsheet (MS Excel®, Gnumeric, OpenCalc OpenOffice, and LibreOffice Calc). In the first column, called *Sample*, the image name is shown, followed by the duration (s), date and hour of the sample. A summary table, named Leaf Area Summary, is also created and shows total number of analyzed leaves, average leaf area (cm²), leaf length (cm), leaf width (cm), leaf perimeter (cm), leaf circularity (0 to 1), leaf color and duration (s) of image analysis.

The precision and speed of the Macf-IJ routine was assessed by comparison of data recorded with the LI-COR 3000® integrator, and the software Black Spot Leaf and Digimizer 4.3.5® (MedCalc Software bvba; Ostend, Belgium). Digimizer 4.3.5® measures color, it is free, and it facilitates image analysis. The duration for each measurement was registered for each case. Fresh leaves were randomly collected from 13 species (Table 1) from gardens at Colegio de Posgraduados, Montecillo Campus, Estado de Mexico. The species were identified based on the morphological description from the National Commission for the Knowledge and Use of Biodiversity (CONABIO, for its Spanish acronym, 2009). Area for each leaf was measured using the LI-COR integrator, and then it was digitalized with an HP® scanner, model M1132 MFP.

Color leaf images (RGB) were saved in jpeg format, at 300 dpi resolution, and dimensions of 2550 x 3507 pixels. Image acquisition lasted an average of 40 s, and file size was around 655 kb. Leaf color in the CIELab and RGB spaces was evaluated in the 13 species (data not shown), but only *Rhynchosia minima* (L.) DC, commonly named least snout-bean, was used for practical deductions for color comparison (RGB). Sampled leaves were under virus attack and were intense green, yellow and spotted.

Cuadro 1. Especies de plantas utilizadas.
Table 1. Plant species used.

ID	Nombre común	Nombre científico
1	Hierba mora o Chichiquelite	<i>Solanum nigrescens</i> M. Martens & Galeotti
2	Lechuguilla común o Borraja	<i>Sonchus oleraceus</i> (L.) L.
3	Malva	<i>Malva parviflora</i> L.
4	Mala mujer	<i>Solanum rostratum</i> Dunal
5	Girasol	<i>Helianthus annuus</i> L.
6	Maravilla	<i>Mirabilis jalapa</i> L.
7	Choal cenizo	<i>Chenopodium album</i> L.
8	Setaria	<i>Setaria grisebachii</i> E.Fourn.
9	Avena loca	<i>Bromus carinatus</i> Hook. & Arn.
10	Zacate casamiento	<i>Eragrostis mexicana</i> (Hornem.) Link
11	Zacate pata de ganso	<i>Eleusine multiflora</i> Hochst. ex A.Rich.
12	Pasto estrella africana	<i>Cynodon nlemfuensis</i> Vanderyst
13	Avena	<i>Avena sativa</i> L.

la especie *Rhynchosia minima* (L.) DC, o frijolillo, debido a que por efecto de virosis presentaba hojas de colores verde intenso, amarillo y moteado; en estas hojas también se midió el contenido relativo de clorofila con el SPAD 502® y en ambos casos se registró el tiempo.

El área de siete figuras geométricas se obtuvo en forma manual y con el Li-Cor 3000® se midieron al menos en 30 ocasiones, los resultados se compararon con el AID de dichas figuras escaneadas a resolución de 100, 150, 200, 300 y 400 ppp y con fotografías obtenidas con cámara digital marca Fujifilm® modelo Finepix Z20fd (Fujifilm Corporation, China) y guardadas en formato jpeg. La captura se realizó en condiciones de luz natural a la sombra, con un fondo blanco, y se utilizó un objeto circular de color rojo, con diámetro de 3.09 cm, como referencia para calibrar la escala y luego discriminarla del análisis por restricción de circularidad. El tiempo requerido por fotografía fue 3.5 s más 1.5 s utilizados para mostrarla en pantalla y con tamaño medio de 1.08 MB. El análisis de las imágenes fue en el sistema operativo Windows 8® de 64 bits, en un equipo con procesador Intel Pentium® G630 a 2.7 GHz y 3 GB de RAM.

El análisis de los resultados se hizo con InfoStat 2014 (Di Rienzo *et al.*, 2014), mediante la prueba descrita por Shapiro y Wilk (1965) para determinar normalidad y la prueba de Bartlett (1937) para comprobar la homogeneidad de varianzas (estadística paramétrica) de las variables evaluadas, que no se cumplieron para la variable tiempo (s) y en ésta se realizó la transformación recíproca; se analizó con ANDEVA y prueba de comparación de medias por Tukey ($p \leq 0.05$) para el tiempo requerido en la obtención del color y del CRC. Las otras variables se comparan entre métodos mediante estadísticas descriptivas, correlación simple de Pearson (r), coeficientes de determinación (R^2), raíz del error cuadrático de la media (RECM) y error relativo medio (ERM).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El área de la misma muestra analizada con Li-Cor 3000® presentó variación en las figuras de menor tamaño, aunque inferior a 8.96 %, mientras que con el uso de fotografías y Macf-IJ la variación fue menor a 1.82 % (Cuadro 2). El triángulo pequeño tuvo el mayor error relativo medio (ERM=2.43 %) entre el integrador y la obtención manual de la superficie, con desviación estándar (DE) de 7.45 %. Easton y Bloom (2014) reportan un ERM de $-11.56 \% \pm 2.16 \%$ con el uso del Li-Cor 3000®, por lo cual señalan que es menos conveniente que el AID para medir el área de hojas pequeñas.

En nuestros resultados el ERM fue bajo y similar entre el Li-Cor 3000® y el AID de fotografías

Relative chlorophyll content (RCC) was also quantified on these leaves with a SPAD 502®, and the duration of sampling was registered in both cases.

The area of seven geometric shapes was measured manually and with the aid of the LI-COR Li-3000®; in both cases, each shape was measured at least 30 times. These results were compared to DIA results of the scanned shapes at 100, 150, 200, 300 and 400 dpi resolution and to photographs from a Fujifilm® digital camera, model Finepix Z20fd (Fujifilm Corporation, China) in jpeg format. Digital images were captured under shaded conditions using ambient lighting. A white background was used, and a circular, red object, with a 3.09 cm diameter was placed in the frame as reference to calibrate the scale. This object was removed from the analysis by circularity restriction. The length of time required to take the photograph was 3.5 s, plus 1.5 s used to display it on the camera screen. Average file size was 1.08 MB. Image analysis was carried out in a computer with a 2.7GHz Intel Pentium® G630 processor, 3 GB of RAM, and Windows 8® 64-bit operating system.

Data analysis was performed with InfoStat 2014 (Di Rienzo *et al.*, 2014). Data normality was determined via the test described by Shapiro and Wilk (1965), while homogeneity of variances was verified with the Barlett test (1937). The variable "Duration" did not fulfill the normality and homogeneity of variances tests, and it was transformed by reciprocal transformation. ANOVA and Tukey's means comparison ($p \leq 0.05$) were performed for the length of time required to obtain leaf color and RCC. Other variables were compared through descriptive statistics, simple Pearson correlations (r), determination coefficients (R^2), root mean squared errors (RMSE) and mean relative errors (MRE).

RESULTS AND DISCUSSION

Regarding precision, the area of the small geometrical shapes varied less than 8.96 % when measured with the LI-COR LI-3000®, compared to less than 1.82 % variation when measured with photographs and the Macf-IJ routine (Table 2). The small triangle had the greatest mean relative error (MRE= 2.43 %) between the integrator and the manual procedure for the area, with standard deviation (SD) of 7.45 %. Easton and Bloom (2014) reported an MRE of $-11.56 \% \pm 2.16 \%$ for the LI-3000®, and they claim this method is less convenient than DIA to measure the area of small leaves.

According to our results, MRE was smaller and similar between the LI-3000® readings and the DIA of photographs (Table 2). This behavior could be the result of repeated readings when the operator considered the value erroneous: for the

Cuadro 2. Estadísticas descriptivas del área de siete figuras geométricas, obtenida con Li-Cor 3000® y AID (Macf-IJ) de fotografías digitales.**Table 2. Descriptive statistics of the area of seven geometric shapes measured with an LI-3000® and DIA (Macf-IJ) of digital photographs.**

Método	Figura	n	Área					ERM
			Mínima	Máxima	Media	DE	CV (%)	
Li-Cor 3000®	Triángulo	35	0.85	1.25	0.89	0.06	7.27	2.43
	Cuadrado	34	0.97	1.36	1.05	0.09	8.95	1.86
	Círculo	31	11.72	12.42	12.06	0.19	1.56	-0.05
	Triángulo	31	16.46	17.34	16.91	0.2	1.19	0.55
	Rectángulo	31	18.84	21.47	21.01	0.51	2.45	-0.78
	Polígono	31	23.94	24.72	24.23	0.19	0.77	1.21
	Cuadrado	30	24.88	25.94	25.23	0.19	0.75	0.73
Macf-IJ con fotografías	Triángulo	30	0.87	0.91	0.89	0.01	1.24	2.06
	Cuadrado	30	1.01	1.05	1.03	0.01	1.29	-0.18
	Círculo	30	11.79	12.23	12.04	0.1	0.86	-0.22
	Triángulo	30	16.06	17.11	16.59	0.26	1.55	-1.35
	Rectángulo	30	21	21.69	21.25	0.15	0.69	0.36
	Polígono	30	23.43	24.61	24.13	0.32	1.33	0.79
	Cuadrado	30	24.03	25.84	24.86	0.45	1.81	-0.74

N: número de observaciones; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; ERM: error relativo medio con respecto a la medición manual ♦ N: Number of observations; SD: standard deviation; CV: coefficient of variation; MRE: mean relative error with respect to manual measurement.

(Cuadro 2) debido a que se repitió la lectura con el integrador cuando se consideró errónea, lo cual sucedió hasta en un 23.3 % de los casos para el triángulo pequeño. En las figuras de menor tamaño el error fue porque la unión de la banda transparente del integrador proyecta sombra que es considerada como área, situación que afecta en menor proporción a las figuras de mayor superficie, pero de manera eventual en éstas ocurrió pérdida por doblamiento. Otra fuente de error al registrar hojas individuales es omitir el reinicio de la memoria del integrador.

El área de las figuras geométricas presentó alta correlación entre los valores obtenidos de manera manual y con el Li-Cor 3000® ($R^2=0.999$, $p\leq 0.001$), con error relativo medio (ERM) de 0.83 % y desviación estándar (DE) de 1.08 %. Entre el programa Digimizer® y la obtención manual el ERM fue $-0.50\% \pm 0.85$ (DE) y $R^2=0.999$ ($p\leq 0.001$), mientras que con Macf-IJ fue de $0.32\% \pm 1.0$ y $R^2=0.999$ ($p\leq 0.001$). Los valores de ERM obtenidos en nuestro estudio son inferiores que los reportados por Easlon y Bloom (2014), quienes al comparar el área estimada por gravimetría con la evaluada con ImageJ obtuvieron ERM de 1.67 % y 7.21 %, indican que el área fue sobrestimada con ImageJ

small triangle, 23.3 % of the readings were repeated. Small geometrical shapes project a shadow from the transparent band on the integrator that is recorded as additional area. Such error affects larger shapes too, but to a lesser degree. Occasionally, area is lost due to shape folding in the integrator bands. Another source of error for registering individual leaves occurs when the operator forgets to reset the integrator counter.

Average area of the geometric shapes showed a high correlation between manually measured values and those measured with the LI-3000® ($R^2=0.999$, $p\leq 0.001$), with a mean relative error (MRE) of 0.83 % and a standard deviation (SD) of 1.08 %. Comparison between the values obtained with the Digimizer® software and the manual method showed that MRE was $-0.50\% \pm 0.85$ (DE) and $R^2=0.999$ ($p\leq 0.001$), while with the Macf-IJ MRE it was $0.32\% \pm 1.0$ and $R^2=0.999$ ($p\leq 0.001$).

The MRE values in our study are smaller than those reported by Easlon and Bloom (2014). The authors compared the calculated area by a gravimetric technique and the area obtained with ImageJ and found that the corresponding MRE's were 1.67 % and 7.21 %, respectively. These results indicate that the area was underestimated with ImageJ due to

debido a sombras producidas al escanear, y que éstas no se eliminaron previo al análisis de la imagen por implicar el uso del programa GIMP (GNU Image Manipulation Program). Dicho argumento no es práctico ni necesario porque con ImageJ es posible discriminar entre el fondo de la imagen y las hojas u objetos de interés.

La mayor exactitud con respecto a la medición manual se tuvo con imágenes escaneadas y analizadas con Macf-IJ (RECM=0.08), seguido por Digimizer® (Cuadro 3). Estos resultados concuerdan con Ali *et al.* (2012), quienes obtuvieron mayor correspondencia entre la medición manual del área de cinco figuras geométricas y la metodología de análisis de imágenes Optileaf (desarrollada con Matlab®), en comparación con Li-Cor 3100®.

Las diferencias porcentuales del área en las cinco resoluciones de imágenes fueron menores a 0.25 % con respecto al cálculo manual; en relación con Li-Cor 3000® el error relativo medio fue 0.91 % a 1.08 % (Cuadro 4). El área de las figuras geométricas en todas las resoluciones muestra exactitud con la medición manual ($RECM \leq 0.056$) y también comparado con el integrador, aunque el RECM se incrementa alrededor del doble (Cuadro 4). El coeficiente de determinación entre el área observada en cada resolución y la obtención por geometría fue 1, y con Li-Cor 3000® fue 0.999. Estos resultados son similares a los descritos por Bradshaw *et al.* (2007), quienes reportan un R^2 de 0.972 entre el área de hojas de soya (*Glycine max* L.) registrada con integrador (Li-Cor 3100®) y el análisis con Adobe® Photoshop®

shadows produced by the scanner. The elimination of shadows prior to image analysis by software (GIMP, GNU Image Manipulation Program, for example) is implied. This procedure is not practical or necessary because ImageJ can differentiate between image background and sample leaves or objects of interest.

Compared to manual measurement, the highest accuracy was obtained analyzing scanned images with Macf-IJ (RMSE = 0.08), followed by Digimizer® (Table 3). These results agree with Ali *et al.* (2012), who obtained higher relationship between the manual area measurements of five geometric shapes and image analysis by Optileaf (developed with Matlab®), compared to areas measured with LI-3100®.

Relative area differences between the five image resolutions were less than 0.25 % compared to manual calculations. Areas measured with the LI-3000® had a relative mean error which varied from 0.91% to 1.08% (Table 4). The area of the geometric shapes in all resolutions were accurate compared to the manual measurements ($RMSE \leq 0.056$) and to the integrator values, even though RMSE was almost double (Table 4). The coefficient of determination between the measured area in each resolution and the value measured by geometry was 1.0, while the coefficient of determination for the LI-3000® values and geometry values was 0.999. These results are similar to those described by Bradshaw *et al.* (2007) who reported an R^2 of 0.972 between area of soybean leaves (*Glycine max* L.) measured with an integrator (LI-3100®) and the image analysis with Adobe® Photoshop® (Adobe Systems Incorporated,

Cuadro 3. Comparación del área obtenida en forma manual, con el Li-Cor 3000® y mediante análisis de imágenes (300 ppp) de siete figuras geométricas.

Table 3. Comparison of manually measured area with a LI-3000®, and through image analysis (300 dpi) of seven geometric shapes.

Figura	Geometría (cm ²)	Li-cor 3000® (cm ²)	Error (%)	Digimizer® (cm ²)	Error (%)	Macf-IJ (cm ²)	Error (%)
Triángulo	0.87	0.89	2.36	0.87	0.59	0.89	2.42
Cuadrado	1.03	1.05	1.82	1.01	-1.98	1.03	-0.10
Círculo	12.07	12.06	-0.07	12.03	-0.31	12.08	0.10
Triángulo	16.82	16.91	0.56	16.68	-0.81	16.75	-0.36
Rectángulo	21.18	21.01	-0.79	20.95	-1.05	21.04	-0.63
Polígono	23.94	24.23	1.20	23.97	0.11	24.06	0.48
Cuadrado	25.05	25.23	0.71	25.04	-0.03	25.13	0.30
RECM			0.15		0.10		0.08

RECM: raíz del error cuadrático de la media ♦ RMSE: root mean squared error.

Cuadro 4. Diferencias porcentuales y RECM entre el área obtenida con Macf-IJ en una imagen a diferente resolución comparado con el método manual y con Li-Cor 3000®.**Table 4. Percentage differences and RMSE between the area obtained with Macf-IJ in at different resolutions compared to the manual method and to LI-3000®.**

Referencia	Resolución (ppp)	Error relativo (%)				RECM
		Mínimo	Máximo	Media	DE	
Geometría	100	-1.16	0.38	-0.13	0.55	0.055
	150	-1.26	0.36	-0.25	0.58	0.053
	200	-1.17	0.39	-0.20	0.54	0.050
	300	-1.07	0.43	-0.14	0.50	0.054
	400	-0.87	0.44	-0.08	0.44	0.056
Li-Cor 3000®	100	-3.48	0.53	-0.96	1.43	0.104
	150	-3.06	0.35	-1.08	1.41	0.106
	200	-2.97	0.47	-1.03	1.39	0.107
	300	-2.87	0.43	-0.96	1.29	0.102
	400	-2.68	0.43	-0.91	1.23	0.101

n=7; DE: desviación estándar; RECM: raíz del error cuadrático de la media ♦ n=7; SD: standard deviation; RMSE: root mean squared error

(Adobe Systems Incorporated, San José, CA.) de imágenes con resolución de 300, 600 y 1200 ppp.

La obtención de imágenes de 100 ppp ocupó 17.5 s, mientras que la digitalización a 150, 200 y 300 ppp duró de 36.4 s a 40.3 s, y para 400 ppp fue 106.8 s. Existe una estrecha relación entre la resolución y el tiempo de requerido para el AID con Macf-IJ ($r=0.99$, $p\leq 0.01$), lo cual coincide con Dornbusch y Andrieu (2010), quienes mencionan que el tiempo de procesamiento depende del tamaño y resolución de la imagen. También concuerda con Chen *et al.* (2011) quienes reportan que para obtener el área de hojas de *Euonymus japonicus* Thunb a mayor resolución de las fotografías digitales se incrementa la duración del AID con Adobe® Photoshop®. Así, el uso de imágenes escaneadas con resolución menor a 300 ppp, reduciría tiempo en digitalización, en el AID y en tamaño de archivo.

Para la mayoría de las especies, el área foliar registrada con Li-Cor 3000® presentó alta correlación con la obtenida mediante Macf-IJ; con excepción de cinco de las gramíneas, el R^2 fue mayor a 0.98 (Cuadro 5). Green *et al.* (2012) señalan resultados similares, ya que obtuvieron un R^2 de 0.979 entre el área en hojas de *Brassica rapa* obtenida con el programa PhenoPhyte y la registrada con un integrador. También coincide con la alta correlación ($r=0.999$) entre el área medida con optileaf y el Li-Cor 3100® en 40 hojas de diferente forma y tamaño

San José, CA.) with resolution of 300, 600 and 1200 dpi.

Acquisition of 100 dpi images took 17.5 s; 150, 200 and 300 dpi images required between 36.4 s and 40.3 s; and a 400 dpi image took 106.8 s. There is a close relationship between image resolution and time required for DIA with Macf-IJ ($r=0.99$, $p\leq 0.01$), as pointed out by Dornbusch and Andrieu (2010). They reported that processing time depends on image size and resolution. Our results also agree with Chen *et al.* (2011) who reported that when performing DIA with Adobe® Photoshop® to estimate leaf area of *Euonymus japonicus*, greater resolution digital photographs increase DIA duration. Thus, DIA on lower than 300 dpi images would decrease digitalization time and file size.

For most species, leaf area recorded with the LI-3000® showed high correlation with the area obtained by the Macf-IJ routine. Except for estimated areas on five grass species, R^2 was greater than 0.98 (Table 5). Green *et al.* (2012) showed similar results using leaves of *Brassica rapa*; they achieved R^2 of 0.979 between the area obtained with the PhenoPhyte software and the area measured with an integrator. Results also coincide with the high correlation ($r=0.999$) between the area measured with Optileaf and an LI-3100® in 40 leaves of different form and size, as shown by Ali *et al.* (2012). Chaudary *et al.* (2012) also obtained an accuracy above 99 % between the area of 70

Cuadro 5. Coeficiente de determinación y RECM entre el área foliar obtenida con Li-Cor 3000® y mediante el AID (300 ppp) de hojas recolectadas en 13 especies de plantas.**Table 5. Coefficient of determination and RMSE between the leaf area obtained with LI-3000® and with DIA (300 dpi) of leaves of 13 plant species.**

Nombre común	Li-Cor® Vs Macf-IJ		Li-Cor® Vs Digim�zer®		Macf-IJ Vs Digim�zer®	
	R ²	RECM	R ²	RECM	R ²	RECM
Chichiquelite	0.99	0.48	0.98	0.72	0.99	0.48
Borraja	0.99	8.92	0.99	14.45	1.00	6.49
Malva	1.00	1.53	0.99	1.68	1.00	0.50
Mala mujer	1.00	4.00	1.00	10.76	1.00	7.09
Girasol	1.00	2.54	1.00	2.87	1.00	0.59
Maravilla	1.00	0.29	1.00	0.38	1.00	0.30
Choal cenizo	1.00	0.27	1.00	0.26	1.00	0.10
Setaria	0.93	2.06	0.92	2.00	0.99	0.59
Avena loca	0.73	2.30	0.73	2.18	1.00	0.18
Zacate casamiento	0.89	2.31	0.89	2.30	1.00	0.03
Zac. pata de ganso	0.68	2.57	0.67	2.59	0.98	0.98
Estrella africana	0.50	2.10	0.50	2.11	1.00	0.05
Avena	0.99	1.63	1.00	1.96	1.00	0.71

RECM: raíz del error cuadrático de la media ♦ RMSE: root mean squared error.

indicada por Ali *et al.* (2012). Chaudary *et al.* (2012) también obtuvieron una precisión superior a 99 % entre el área de 70 hojas medidas con Matlab 2010a® y mediante estimación con papel milimétrico. Green *et al.* (2012) reportaron una relación estrecha entre los registros de área con PhenoPhyte e ImageJ ($r=0.998$), lo cual concuerda con los coeficientes aquí observados entre Digim�zer® y Macf-IJ (Cuadro 5).

Las hojas de mala mujer y de borraja son difíciles de medir con Li-Cor 3000®; las primeras poseen espinas duras y agudas, y sólo se usaron 15 muestras para evitar un eventual daño a la banda transparente del Li-Cor 3000®, y fue necesario invertir tiempo para solventar dicha situación. Las hojas de borraja se doblan al pasar por la banda transparente, y cuando ocurrió, se repitió el proceso e implicó mayor tiempo (23.4 s). Pese a ello hubo pérdida en el registro del área, lo cual se refleja en mayor valor del RECM (Cuadro 5). Ambos casos no fueron relevantes en el AID, pero sí aumentaron el tiempo requerido para digitalización, debido al mayor tamaño de la lámina foliar (Cuadro 6) ya que sólo se pudo capturar una o dos hojas por imagen.

Los pastos casamiento y estrella africana presentaron menor área foliar al medirse con Li-Cor 3000® (Cuadro 6). La diferencia con respecto al AID fue 55.8 % y 47.8 %, respectivamente,

leaves measured with Matlab 2010a® and through estimation with ruled paper. Green *et al.* (2012) reported a close relationship between area values obtained with PhenoPhyte and ImageJ ($r=0.998$); in this research, the coefficients observed between Digim�zer® and Macf-IJ (Table 5) were similarly close.

Buffalo bur nightshade and sow thistle leaves are difficult to measure using a LI-3000®. Buffalo bur leaves have long and sharp thorns. Damage to the LI-3000® belt was prevented by sampling only 15 leaves, and additional time was spent preventing damage. Sow thistle leaves tended to fold as they passed on the transparent belt and required repetition of the measurement which took additional time (23.4 s). Despite careful handling and repetition, area miscalculation is reflected in higher RMSE (Table 5). Either situation did not interfere with DIA, but digitalization time increased due to greater leaf size (Table 6) that allowed only one or two leaves to be captured per image.

Leaf area for Mexican lovegrass and African stargrass measured with LI-3000® tended to be less (Table 6). Compared to DIA, the difference was 55.8 % and 47.8 %, respectively, and it was caused by leaves folding along the length of the central rib. A comparable situation was reported in wheat

Cuadro 6. Área foliar promedio y tiempo requerido para su registro con Li-Cor 3000® y mediante AID (300 ppp) de hojas recolectadas de 13 especies de plantas.**Table 6. Average leaf area and measurement duration with a LI-3000® and with DIA (300 dpi) of leaves from 13 different plants species.**

Nombre común	Li-Cor 3000®		Macf-IJ		Digimizer®		Black Spot Leaf	
	Área (cm ²)	Tiempo (s)	Área (cm ²)	Tiempo (s)	Área (cm ²)	Tiempo (s)	Área (cm ²)	Tiempo (s)
Chichiquelite	8.70	11.78	8.75	5.66	8.87	6.12	8.97	6.76
Borrajá	84.61	23.40	90.88	40.37	94.77	46.30	100.71	42.44
Malva	21.50	10.50	22.07	10.77	22.27	11.43	22.54	12.20
Mala mujer	64.57	11.85	67.33	32.99	73.07	36.42	75.89	36.37
Girasol	77.66	7.97	79.47	16.16	79.74	17.74	78.72	17.55
Maravilla	18.05	8.26	18.12	8.43	17.88	9.06	18.49	9.52
Choal cenizo	7.40	9.49	7.60	9.38	7.40	9.80	7.87	10.17
Setaria	14.23	12.34	15.89	11.58	14.23	12.17	16.03	12.66
Avena loca	9.28	9.04	10.69	11.74	10.51	12.35	10.91	12.97
Zacate casamiento	1.71	9.43	3.88	11.14	3.88	11.56	3.84	12.31
Zac. pata de ganso	11.08	10.49	10.83	13.52	11.66	14.74	12.84	14.88
Estrella africana	1.89	9.86	3.62	16.32	3.64	16.67	4.42	17.91
Avena	21.12	13.10	22.32	20.85	22.68	22.44	23.00	22.65

porque las hojas se doblan a lo largo de la nervadura central. Una situación similar fue reportada en trigo por Saucedo *et al.* (2015), quienes señalan que la medición correcta del área foliar con el AID es difícil cuando las hojas de este cereal se marchitan y pierden turgencia. Tal inconveniente se soluciona mediante la fijación de las láminas foliares con cinta adhesiva transparente, pero el proceso requiere más tiempo. Dicha propuesta también evita la sobre posición de las hojas (Dornbusch y Andrieu, 2010). En gramíneas el enrollamiento de las hojas representa un problema serio para el registro del área foliar con Li-Cor 3000®. Los valores medios de área foliar por especie obtenidos con Black Spot Leaf y Macf-IJ presentan una $R^2=0.994$ ($p \leq 0.001$), aunque el programa Black Spot Leaf sobrestimó el área foliar en la mayoría de los casos (Cuadro 6).

El tiempo promedio utilizado por hoja con el Li-Cor 3000® fue 11.35 ± 3.95 s, mientras que con Macf-IJ fue 16.07 ± 10.03 s, con Digimizer® fue 17.45 ± 11.57 s y con Black Spot Leaf fue 17.57 ± 10.58 s, aunque sin diferencia significativa ($p > 0.134$). Estos resultados no coinciden con O'neal *et al.* (2002), quienes reportan que para registrar el área total y dañada de cinco hojas de soya (*Glycine max* L.) el tiempo fue menor con AID ($3:25 \pm 0:03$, min:s) en comparación con Li-Cor 3000® ($6:10 \pm 0:10$). Macf-IJ

by Saucedo *et al.* (2015) who indicated that correct measurement of leaf area with DIA is difficult when leaves of this cereal wither and lose turgor. Unwanted folding is solved by fixing the leaf with transparent adhesive tape; however, this extra process requires additional time but prevents overlap (Dornbusch and Andrieu, 2010). In grasses, leaf folding is a serious setback that hinders measurement with a LI-3000®. Mean leaf area values per species obtained with Black Spot Leaf and Macf-IJ had an $R^2=0.994$ ($p \leq 0.001$), but the Black Spot Leaf software over-estimated leaf area in most cases (Table 6).

Average measurement duration with the LI-3000® per leaf was 11.35 ± 3.95 s, while Macf-IJ required 16.07 ± 10.03 s, Digimizer® took 17.45 ± 11.57 s, and Black Spot Leaf needed 17.57 ± 10.58 s; there was no significant difference ($p > 0.134$) among methods though. These results do not coincide with O'neal *et al.* (2002). They reported that measurement of total leaf area and damaged leaf area on five soybean leaves (*Glycine max* L.) required less time with DIA ($3:25 \pm 0:03$, min:s) than with a LI-3000® ($6:10 \pm 0:10$). The Macf-IJ routine records area, width, length, perimeter and color (RGB) of the leaf in 41.4 s per image, which includes image digitalization and analysis. Analysis duration is similarly reported by Easlon and Bloom (2014) when the image is

permite registrar área, ancho, largo, perímetro y color (RGB) de la hoja en 41.4 s por imagen (tiempo que incluye la digitalización más el análisis). Esta duración es similar a la señalada por Easlon y Bloom (2014) para la captura de la imagen con cámara digital que ocupó cerca de 35 s y el análisis con Easy Leaf Area requirió 5 s, pero contrasta con la reportada por Davidson (2011) de que para digitalizar con escáner se necesita unos 5 min más 3 min para el análisis con ImageJ. Dicha diferencia en parte se debe a que la metodología propuesta por este autor es seleccionar en la imagen cada hoja a medir, mientras que con Macf-IJ la identificación y las medidas de las hojas son automáticas. Con el uso de fotografías la captura fue en 6.0 s y el análisis con Macf-IJ en 3.87 s, lo cual es menor que el tiempo señalado por Easlon y Bloom (2014).

Las características de tamaño, resolución de la imagen, el programa, equipo de cómputo utilizado, así como la forma de realizar el procesamiento (manual o automatizado), reflejan lo complejo del análisis o cantidad de variables procesadas que determinan el tiempo requerido para el AID. La obtención del color en CieLab necesitó alrededor de 7.5 s; es decir, cerca de 80 % más tiempo que medirlo en el espacio RGB (1.4 s). Según Dornbusch y Andrieu (2010), para registrar la forma de la hoja con base al ancho y la distancia utilizaron cerca de 15 s con el programa MATLAB 7.04® en un equipo con procesador INTEL® Xeon® (2 GHz).

La duración también depende del tamaño de las láminas foliares, debido a que entre más pequeñas sean, mayor es la cantidad de hojas que se pueden digitalizar en una sola imagen. En chichiquelite se registró el tiempo menor (5.59 s) de digitalización por hoja (requirió sólo dos imágenes para capturar 40 hojas), lo cual junto con el procesamiento suman 5.66 s. En choal cenizo se necesitaron en total 9.38 s por hoja, y para maravilla se ocuparon 8.43 s (Cuadro 6). En los casos mencionados se obtuvieron tres imágenes como máximo, por lo que una limitante de la metodología cuando se utilizan imágenes escaneadas es el número de hojas que se pueden digitalizar a la vez, pero con la ventaja de obtener el largo, ancho, perímetro, circularidad y color.

El contenido relativo de clorofila (CRC) obtenido con el sensor SPAD 502® mostró estrecha asociación con el canal verde (G) ($r=-0.946$, $p\leq 0.01$). La relación también es fuerte con el canal rojo (R) y el

capturado con una cámara digital (aprox. 35 s) y analizado con Easy Leaf Area (5 s). Sin embargo, esta duración contrasta con el reporte de Davidson (2011), que la digitalización con un escáner tomó alrededor de cinco minutos más tres minutos para el análisis con ImageJ. El tiempo adicional de análisis podría deberse a la selección manual de las hojas antes de la medición, como se recomienda al autor. Macf-IJ identifica y mide las hojas automáticamente. El análisis de fotografías digitales tomó 6.0 s para la captura y 3.87 s para Macf-IJ; Easlon y Bloom (2014) reportaron una duración más larga del análisis.

La duración de DIA indica la complejidad del análisis, número de variables que necesitan ser procesadas (tamaño de la imagen, resolución, software, hardware), y el tipo de procesamiento (manual o automático). Se necesitaron 7.5 s para adquirir el color en CieLab; 80 % más tiempo que la medición en el espacio RGB (1.4 s). Dornbusch y Andrieu (2010) emplearon un computador con un INTEL® Xeon® (2 GHz) procesador y MATLAB 7.04® para registrar la hoja basándose en el ancho y el largo en casi 15 s.

DIA también depende del tamaño del área de la hoja: más hojas pueden ser digitalizadas en una sola imagen si son más pequeñas. La planta de nochebuena requirió menos tiempo de digitalización (5.59 s) por hoja (dos imágenes incluyeron 40 hojas) y 5.66 s para el procesamiento. La planta común de lino requirió 9.38 s por hoja, mientras que la maravilla de Perú requirió 8.43 s (Tabla 6). En estos casos, un máximo de tres imágenes fueron obtenidas. Este método está limitado por el número de hojas que pueden ser escaneadas a la vez, pero un perfil completo de la hoja puede ser adquirido (largo, ancho, perímetro, circularidad y color).

El contenido relativo de clorofila (RCC) medido con el SPAD 502® mostró una relación con el canal verde (G, $r=-0.946$, $p\leq 0.01$), el canal rojo (R, $r=-0.941$) y el canal azul (B, $r=-0.881$). Los coeficientes de correlación entre los canales RGB cuantificados con Digimizer® y RCC fueron -0.939 , -0.942 y -0.811 para rojo, verde y azul, respectivamente. Estos resultados coinciden con las conclusiones de Wang *et al.* (2014) en arroz (*Oryza sativa* L.) quienes encontraron coeficientes de correlación más bajos cuando el RCC se graficó contra el rojo ($r=-0.68$), el verde ($r=-0.67$) y el azul ($r=-0.48$) color. También indican que el análisis de color es un método simple para evaluar el estado de nitrógeno en la planta. Teoh *et al.* (2012) también reportó una fuerte relación entre el RCC

canal azul (B), con valores de correlación de -0.941 y -0.881 , respectivamente. Los coeficientes de correlación entre los canales del espacio de color RGB obtenido con Digimizer® y el CRC fueron -0.939 , -0.942 y -0.811 en ese orden, para el rojo, verde y azul. La pendiente negativa coincide con lo reportado en arroz (*Oryza sativa* L.) por Wang *et al.* (2014), quienes encontraron coeficientes de correlación más bajos al comparar el CRC con el color rojo ($r=-0.68$), el verde ($r=-0.67$) y el azul ($r=-0.48$); también indican que el análisis de color es un método sencillo para evaluar estado del nitrógeno en plantas de arroz. Además, Teoh *et al.* (2012) reportan alta asociación entre el CRC con el color rojo ($r=-0.97$) y con respecto al verde ($r=-0.82$) en hojas de arroz. La misma tendencia se presentó cuando Riccardi *et al.* (2014) compararon el color (RGB) de imágenes fotográficas y el CRC, con la concentración de clorofila foliar, obtenida por extracción de pigmentos de hojas de amaranto (*Amaranthus sp.*) y quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), y la mayor correlación fue entre los valores RGB y la concentración de clorofila foliar ($r=-0.96$) que la mostrada entre ésta y el CRC obtenido con el SPAD 502® ($r=0.92$).

El análisis de las dimensiones y la coloración de las hojas con Macf-IJ necesitó menor tiempo (4.43 s) con respecto a la obtención del CRC ($p\leq 0.001$), incluso cuando con este último se realizó una sola lectura por foliolo. Así, en hojas de frijolillo con tamaño promedio de 10.35 cm^2 se usó 24.2 s por cada una, en hojas de 4.72 cm^2 aumentó a 30.15 s, y al realizar con el SPAD 502® tres lecturas por foliolo, en estas mismas hojas, el tiempo incrementó a 49.52 y 59.22 s, de manera respectiva (DMS=7.53, $p\leq 0.05$), pero con tres mediciones por foliolo la precisión mejoró entre el CRC y el verde, pues el coeficiente de determinación, con una sola lectura fue 0.893 y pasó a 0.927, el rojo aumentó de 0.881 a 0.917, y el azul de 0.774 a 0.867. Lo anterior denota la importancia del tamaño de las hojas en la medición del CRC y la relevancia del número de observaciones necesarias con SPAD 502®, para lograr una mayor confianza en las lecturas; es decir, que sean representativas de la condición real de cada hoja. Chang y Robison (2003) mencionan que para obtener un valor del CRC confiable, en hojas de maíz, se requieren múltiples mediciones con el SPAD 502®, pero que éstas implican mayor tiempo.

El sensor SPAD 502® no midió hojas o parte de éstas de color amarillo por completo, lo cual ocurrió

with red ($r=-0.97$) and green ($r=-0.82$) colors in rice leaves. Riccardi *et al.* (2014) found the same tendency when the RGB color of photographic images and the corresponding RCC was plotted against leaf chlorophyll concentration from amaranth (*Amaranthus sp.*) and quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.) leaves. A higher correlation occurred among RGB values and chlorophyll concentration in the leaf ($r=-0.96$) than between RCC measured with the SPAD 502® and chlorophyll concentration ($r=0.92$).

Dimensional and color analysis of the leaves with the Macf-IJ routine required less time (4.43 s) than RCC ($p\leq 0.001$) measurement, even if only one lecture per leaf was taken. For example, snoutbean leaves with an average size of 10.35 cm^2 took 24.2 s per leaf, but 30.15 s for leaves of 4.72 cm^2 average area. Recording three readings per leaflet on the same leaves required additional time, from 49.52 to 59.22 s respectively (DMS=7.53, $p\leq 0.05$). However, accuracy between RCC and the green color improved with three measurements per leaf, as the coefficient of determination increased from 0.893 to 0.927, while the coefficient of determination for the red color increased from 0.881 a 0.917, and for the blue color from 0.774 to 0.867. These results highlight the effect of leaf size on RCC measurement and the number of SPAD 502® observations needed for greater confidence to represent actual leaf conditions. Chang and Robison (2003) mention reliable RCC values in maize leaves need multiple SPAD 502®, at the expense of more time.

The SPAD 502® sensor did not measure the yellow color, which happened when the green color component (G), acquired with DIA, showed a value higher than 150. This limitation is evident when leaves contain areas with chlorosis, like *Rhynchosia minima* (L.) DC., that trigger failed readings (the SPAD 502® sensor marks an error) and increases the time required to obtain the RCC. Additionally, intense color variation on the leaf affects the relationship between color components (RGB) and SPAD 502® readings, because the sensor samples 6.0 mm^2 on the leaf and is limited to 12 mm reach. According to Ali *et al.* (2012), the thickness of the leaves, biotic stresses, and health are affect these readings. Riccardi *et al.* (2014) mention that RGB values captured through digital photographs directly on the field is a faster, more effective, and less expensive method than SPAD 502® readings to estimate chlorophyll content in amaranth and quinoa leaves.

cuando el componente de color verde (G), obtenido con AID, presentó un valor superior a 150, lo cual es un inconveniente cuando la hoja presenta áreas cloróticas como en *Rhynchosia minima* (L.) DC., ya que provocan lecturas fallidas (el sensor SPAD 502° marca error) que aumentan el tiempo requerido para obtener el CRC. También la intensa variación de color en la lámina foliar afecta la relación entre los componentes del color (RGB) y las lecturas del SPAD 502°, porque este sensor mide una pequeña área de la hoja (6.0 mm²) y la posición del sensor en las pinzas (12 mm) limita su alcance de medición en las hojas. De acuerdo con Ali *et al.* (2012), el grosor de las hojas, estrés biótico y enfermedades afectan estas lecturas. Según Riccardi *et al.* (2014), los valores RGB obtenidos a través de fotografías digitales directamente en campo, representa un método rápido, más efectivo y de menor costo que el uso del SPAD 502° para estimar el contenido de clorofila en hojas de amaranto y quinoa.

CONCLUSIONES

Macf-IJ es un método fácil y rápido para medir con precisión el color y el área de las hojas mediante imágenes escaneadas y fotografía digital, con la ventaja de que el procesamiento y análisis es automatizado, proporciona las dimensiones de las hojas y permite registrar el color de toda la lámina foliar. La hipótesis de que Macf-IJ mide con exactitud y en un solo paso, las variables morfológicas y de color foliar fue confirmada.

Macf-IJ mide más rápido el color en hojas pequeñas, como las de *Rhynchosia minima* (L.) DC., que la obtención del contenido relativo de clorofila con SPAD 502°. Además, medir la coloración con Digimizer® y Macf-IJ presenta ventaja especialmente cuando existen áreas cloróticas o variación del color en la lámina foliar.

LITERATURA CITADA

- Ali, M. M., A. Al-Ani, D. Eamus, and D. K. Y. Tan. 2012. A New image-processing-based technique for measuring leaf dimensions. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 12: 1588-1594.
- Backhaus, A., A. Kuwabara, M. Bauch, N. Monk, G. Sanguinetti, and A. Fleming. 2010. LEAFPROCESSOR: A new leaf phenotyping tool using contour bending energy and shape cluster analysis. *New Phytol.* 187: 251-261.
- Bartlett, M. 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Math. Phys. Eng. Sci.* 160: 268-282.
- Bradshaw, J. D., M. E. Rice, and J. H. Hill. 2007. Digital analysis of leaf surface area: Effects of shape, resolution, and size. *J. Kansas Entomol. Soc.* 80: 339-347.
- Bylesjö, M., V. Segura, R. Y. Soolanayakanahally, A. M. Rae, J. Trygg, P. Gustafsson, S. Jansson, and N. R. Street. 2008. LAMINA: A tool for rapid quantification of leaf size and shape parameters. *BMC Plant Biol.* 8: 82.
- Chang, S. X., and D. S. Robison. 2003. Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status using the SPAD-502 chlorophyll meter. *For. Ecol. Manage.* 181: 331-338.
- Chaudhary, P., S. Godara, A. N. Cheeran, and A. K. Chaudhari. 2012. Fast and accurate method for leaf area measurement. *Int. J. Comput. Appl.* 49: 22-25.
- Chen, B., Z. Fu, Y. Pan, J. Wang, and Z. Zeng. 2011. Single leaf area measurement using digital camera image. *In: Li, D., Y. Liu, Y. Chen (eds.). Computer and Computing Technologies in Agriculture IV. 4th IFIP TC 12 Conference, CCTA 2010, Nanchang, China, October 22-25, 2010, Selected Papers, Part II. Springer Berlin Heidelberg.* 345: 525-530.
- Cogliatti, D. H., M. F. Cataldi, y F. Iglesias. 2010. Estimación del área de las hojas en plantas de trigo bajo diferentes tipos de estrés abiótico. *Agriscientia* 27: 43-53.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2009. ¿Cómo identifico una planta? <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/0claves/0claves-inicio.htm> (Consulta: febrero, 2015).
- Corney, D. P. A., H. L. Tang, J. Y. Clark, Y. Hu, and J. Jin. 2012. Automating digital leaf measurement: The tooth, the whole tooth, and nothing but the tooth. *PLoS ONE* 7: doi:10.1371/journal.pone.0042112.

CONCLUSIONS

Macf-IJ is an easy, fast and accurate method to measure color and area of leaves through scanned images and digital photography. Image processing and analysis is thus automated, and the software provides leaf dimensions and color of the complete leaf blade. The hypothesis that Macf-IJ measures, exactly and in one step, leaf color and morphological variables, was supported.

Macf-IJ measures color in smaller leaves, like *Rhynchosia minima* (L.) DC., quicker than obtaining chlorophyll relative content with the SPAD 502°. Additionally, color acquisition with Digimizer® and Macf-IJ is advantageous, especially when there are chlorotic areas or color variations in the leaf blade.

—End of the English version—

---*---

- Davidson, A. 2011. Measuring leaf perimeter and leaf area. Prometheus wiki. <http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tikiindex.php?page=Measuring+leaf+perimeter+and+leaf+area> (Consulta: octubre, 2015).
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, G. Balzarini, L. González, M. Tablada, y W. Robledo. 2014. InfoStat, versión 2014, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dornbusch, T., and B. Andrieu. 2010. Lamina2Shape—An image processing tool for an explicit description of lamina shape tested on winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Comput. Electron. Agr. 70: 217-224.
- Easlon, H. M., and A. J. Bloom. 2014. Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. Appl. Plant. Sci. 2: 1400033. doi:10.3732/apps.1400033.
- Graeff, S., J. Pfenning, W. Claupein, and H. P. Liebig. 2008. Evaluation of image analysis to determine the N-fertilizer demand of broccoli plants (*Brassica oleracea* convar. *botrytis* var. *italica*). Adv. Opt. Technol. 2008: doi:10.1155/2008/359760.
- Green, J. H., H. Appel, E. Rehrig, J. Harnsomburana, J. Chang, P. BalintKurti, and C. Shyu. 2012. PhenoPhyte: A flexible affordable method to quantify 2D phenotypes from imagery. Plant Method 8: 45.
- Maloof, J. N., K. Nozue, M. R. Mumbach, and C. M. Palmer. 2013. LeafJ: An ImageJ plugin for semi-automated leaf shape measurement. J. Vis. Exp. 71: e50028. doi:10.3791/50028.
- Misle, E., B. Kahlaoui, M. Hachicha, and P. Alvarado. 2013. Leaf area estimation in muskmelon by allometry. Photosynthetica 51: 613-620.
- O'neal, M. E., D. A. Landis, and R. Isaacs. 2002. An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. J. Econ. Entomol. 95: 1190-1194.
- Pandey, S. K., and H. Singh. 2011. A Simple, cost-effective method for leaf area estimation. J. Botany. Article ID 658240. doi:10.1155/2011/658240.
- Price, C. A., O. Symonova, Y. Mileyko, T. Hilley, and J. S. Weitz. 2011. Leaf extraction and analysis framework graphical user interface: Segmenting and analyzing the structure of leaf veins and areoles. Plant Physiol. 155: 236-245.
- Riccardi, M., G. Mele, C. Pulvento, A. Lavini, R. d'Andria, and S.-E. Jacobsen. 2014. Non-destructive evaluation of chlorophyll content in quinoa and amaranth leaves by simple and multiple regression analysis of RGB image components. Photosynth. Res. 120: 263-272.
- Rodríguez P, F. J., L. Gómez, M. Melgosa, B. Gordillo, M. L. González, and F. J. Heredia. 2012. Ripeness estimation of grape berries and seeds by image analysis. Comput. Electron. Agr. 82: 128-133.
- Sauceda A., C. P., G. A. Lugo G., H. E. Villaseñor M., L. Partida R., y A. Reyes O. 2015. Un método preciso para medir severidad de roya de la hoja (*Puccinia triticina* Eriksson) en trigo. Rev. Fitotec. Mex. 38: 427-434.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Method. 9: 671-675.
- Shapiro, S. S., and M. B. Wilk. 1965. Analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.
- Teoh, C. C., D. A. Hassan, M. M. Radzali, and J. J. Jafni. 2012. Prediction of SPAD chlorophyll meter readings using remote sensing technique. J. Trop. Agric. Food Sci. 40: 127-136.
- Varma, V., and A. M. Osuri. 2013. Black Spot: A platform for automated and rapid estimation of leaf area from scanned images. Plant Ecol. 214: 1529-1534.
- Wang, Y., D. Wang, P. Shi, and K. Omasa. 2014. Estimating rice chlorophyll content and leaf nitrogen concentration with a digital still color camera under natural light. Plant Method. 10: 36.
- Warman, L., A. T. Moles, and W. Edwards. 2011. Not so simple after all: Searching for ecological advantages of compound leaves. Oikos 120: 813-821.
- Whan, A. P., A. B. Smith, C. R. Cavanagh, J.-P. F. Ral, L. M. Shaw, C. A. Howitt, and L. Bischof. 2014. GrainScan: A low cost, fast method for grain size and colour measurements. Plant Method. 10: 23.