

# Caracterización morfológica del grano de triticale (*x Triticosecale Wittmack*) mediante procesamiento y análisis de imágenes digitales

Recibido 18 de septiembre de 2019 //  
Aceptado 18 de septiembre de 2020 //  
Publicado online 13 de octubre de 2021

Ferrari, E.<sup>1</sup>; Quiriban, A.<sup>2</sup>; Gili, A.<sup>3</sup>; Picca, A.<sup>1</sup>; Repollo, R.<sup>4</sup>

## RESUMEN

La morfología del grano es de interés en el mejoramiento de cultivos por su relación con el rendimiento y la calidad. Con la necesidad de contar con una metodología de análisis que permita la selección por caracteres morfológicos del grano de manera sencilla y eficiente, se utilizó el procesamiento y análisis de imágenes digitales (PAID) con el programa ImageJ, y se analizaron muestras de granos de cuatro genotipos de triticale bajo dos niveles de fertilización. Los resultados de PAID se evaluaron para determinar la exactitud de conteo y dimensiones de longitud y anchura del grano; y estimar el volumen del grano con el uso de aproximación geométrica y empleo de constantes de proporcionalidad ( $k$ ) respecto de métodos tradicionales. El conteo obtenido con PAID fue en promedio una de 0.3 granos inferior al conteo manual, cuando la imagen digitalizada no presentaba contacto entre los granos. Las dimensiones del grano logradas con PAID posibilitaron caracterizar genotipos muy similares y mostraron alta correlación con las mediciones realizadas con micrómetro (longitud:  $r = 0.79$ ,  $p < 0.01$ ; anchura:  $r = 0.91$ ,  $p < 0.01$ ). El volumen estimado por PAID y con el uso de  $k$  logró una diferencia relativa porcentual, respecto del volumen medido por desplazamiento de tolueno, entre 2.82 a 3.43%. El uso de PAID como metodología para registrar el número, dimensiones y volumen del grano en triticale resultó factible, simple y confiable. La aplicación de esta herramienta es una opción para la caracterización morfológica del grano de triticale.

**Palabras clave:** ImageJ, conteo, dimensiones de grano, volumen de grano, triticale.

## ABSTRACT

*Grain morphology is of interest in crop improvement because of its relationship to yield and quality. With the need for a methodology analysis that allows selection by grain morphological characters in a simple and efficient way, digital image processing and analysis (PAID) was used with the ImageJ program, and grain samples of four triticale genotypes were analyzed under two levels of fertilization. PAID results were evaluated to determine counting accuracy and grain length and width dimensions; and estimate the volume of the grain with the use of geometric approximation and use of constants of proportionality ( $k$ ); respect of traditional methods. The count obtained with PAID was on average 0.3 grains lower than the manual count, when the digitized image did not show contact between the grains. The grain dimensions achieved with PAID made it possible to characterize very similar genotypes and showed a high correlation with measurements made with a micrometer (length:  $r = 0.79$ ,  $p < 0.01$ ; width:  $r = 0.91$ ,  $p < 0.01$ ). The volume estimated by PAID and with the use of  $k$  achieved a relative percentage difference, with respect to the volume measured by toluene displacement, between 2.82 to 3.43%. The use of PAID as a methodology to record the number, dimensions and volume of the grain in triticale was feasible, simple and reliable, possible to consider the application of this tool in the morphological characterization of triticale grains.*

**Keywords:** ImageJ, count, grain dimensions, grain volume, triticale.

<sup>1</sup>Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), Facultad de Agronomía, Genética y Mejoramiento, Ruta 35, km 334, (330) Santa Rosa, La Pampa, Argentina. Correo electrónico: ferrarienzo@agro.unlpam.edu.ar; apicca@gmail.com

<sup>2</sup>Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), Facultad de Agronomía, Química Biológica, Ruta 35, km 334, Santa Rosa, (330) La Pampa, Argentina. Correo electrónico: aquiriban@agro.unlpam.edu.ar

<sup>3</sup>Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), Facultad de Agronomía, Estadística y diseño experimental, Ruta 35, km 334, (330) Santa Rosa, La Pampa, Argentina. Correo electrónico: agili@agro.unlpam.edu.ar

<sup>4</sup>Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), Facultad de Agronomía, Agrotecnia, Ruta 35, km 334, (330) Santa Rosa, La Pampa, Argentina. Correo electrónico: rodolfoorepollo@agro.unlpam.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

En el mejoramiento de triticale (*x Triticosecale wittmack*) uno de los objetivos es obtener variedades con altos rendimientos, y propiedades del grano que permitan lograr mejores procesos de molienda y horneado (Zecevic *et al.*, 2005; Pattison y Trethowan, 2013; Warechowska *et al.*, 2013). En Argentina, los triticales graníferos presentan buen potencial de rendimiento en ambientes propensos a déficit hídrico, con rendimientos iguales o superiores al trigo, pero aún no se disponen de líneas de buena calidad industrial, debiéndose mejorar la textura del endosperma, el arrugamiento de los granos, el peso hectolítrico y el contenido de gluten (Paccapelo *et al.*, 2017).

La mejora del volumen del grano o peso hectolítrico es un objetivo importante en muchos programas de mejoramiento de triticale, debido a su relación directa con el rendimiento de la harina y el contenido de energía. La variación genética para el peso volumétrico parece ser bastante abundante y la selección puede ser efectiva (Eudes, 2015). El peso hectolítrico se define como el peso de granos expresados en kilogramos que contiene un recipiente de 100 litros; en los programas de mejoramiento por no disponer de suficientes granos para la evaluación, se suele utilizar su valor proporcional, por ejemplo, peso de los granos contenidos en una probeta de 100 mililitros (Castro *et al.*, 2011; Paccapelo *et al.*, 2017; Ferrari *et al.*, 2018); pero la reducción del número de granos y el uso de una probeta genera espacios vacíos que afectan la medida del volumen sin

aportar masa y provocan valores de densidad erróneo (Hevia, 2003; Cleva *et al.*, 2017), no se logra obtener medidas de variación dentro de la muestra (Whan *et al.*, 2014) y proporciona información limitada porque interfieren factores relacionados con la densidad, como la forma y el tamaño de los granos, propiedades de la superficie, el arrugamiento, las dimensiones del salvado y el grado de empaquetamiento (Babić *et al.*, 2011).

El volumen del grano se obtiene con mayor precisión por desplazamiento de un líquido mediante el uso de un picnómetro, pero resulta complejo utilizarlo de manera rutinaria, o con un gran número de muestras para analizar y en la mayoría de los casos implica la pérdida del material. El uso de tolueno es recomendado como líquido desplazado porque permite que los granos no sean afectados, pero por su alta toxicidad requiere de un laboratorio adecuado de procesamiento (Mohsenin, 1986). La estimación del volumen es una alternativa, porque las medidas de longitud (L), anchura (A) y espesor (E) del grano facilitan su obtención con base en modelos geométricos (Cleva *et al.*, 2013).

El recuento y las dimensiones de los granos son variables que se obtienen la mayoría de las veces de forma manual o mecánica; sin embargo, estos métodos requieren de mucho tiempo, provocan cansancio, incremento del error y solo pueden analizar una cantidad limitada de muestras, en especial con granos de tamaño pequeño (Severini *et al.*, 2011; Whan *et al.*, 2014; Mussadiq *et al.*, 2015; Saucedo *et al.*, 2017); limi-



Figura 1. Distribución de los granos sobre el escáner para la digitalización: (a) disposición ordenada ( $PAID_{ORD}$ ); (b) distribución azarosa o desordenada ( $PAID_{DES}$ ).

tantes que se logran minimizar de manera confiable, rápida, económica y eficiente con el uso del análisis de imágenes digitales (Mussadiq *et al.*, 2015). El procesamiento y análisis de imágenes digitales (PAID) es una herramienta que permite obtener de manera efectiva y automática el registro del número, tamaño y forma de los granos en un mayor número de muestras aun con granos de tamaño muy pequeño (Tanabata *et al.*, 2012; Cleva *et al.*, 2017).

La evaluación cuantitativa de las características del grano es necesaria en los programas de mejoramiento genético, pero se requieren métodos eficientes, confiables y de alto rendimiento para contribuir a un mayor progreso en la selección de genotipos (Tanabata *et al.*, 2012; Makanza *et al.*, 2018); en este estudio se propone evaluar la exactitud del PAID para registrar el número, las dimensiones y el volumen del grano en genotipos de triticale con diferente aptitud de uso y bajo dos niveles de fertilización.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material experimental

El estudio se realizó durante el año 2017, en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de La Pampa, ubicado en 36° 46' S y 64° 17' O, con 210 m s. n. m., Santa Rosa, La Pampa, Argentina. Los genotipos de triticale utilizados fueron las variedades comerciales de aptitud forrajera: Don Santiago INTA y Antonio UNLPam y las líneas experimentales para producción de grano: CIMMYT 820 y CIMMYT 830, los cuales provienen del programa de mejoramiento de tritíceas, que se realiza en La Facultad de Agronomía de La Pampa.

El diseño experimental fue en bloques completos al azar con cinco repeticiones, la parcela constó de siete surcos de cinco metros de largo y separados a 20 cm, la siembra se realizó el 20 de julio de 2017, con una densidad de 250 semillas m<sup>-2</sup>. La fertilización nitrogenada se aplicó en dos niveles, al momento de la siembra, con un nivel considerado como bajo, de 60 kg ha<sup>-1</sup> de fosfato diamónico (18-46-0) y otro nivel clasificado como alto, el cual consistió en adicionar de manera manual, 100 kg ha<sup>-1</sup> de urea (46-0-0) en la etapa de elongación del tallo, más 40 kg ha<sup>-1</sup> de urea (46-0-0) en la etapa de llenado de grano. El manejo agronómico antes y durante el ciclo fue similar al adoptado por los productores regionales. En madurez fisiológica se cosechó cada unidad experimental (n = 40) y se tomó una muestra de granos que va-

rió entre 236 y 380 granos. Las muestras de granos se acondicionaron de forma manual, se eliminó la suciedad y el material inerte, y se procedió a la digitalización de imagen.

### Obtención de las imágenes digitales

La digitalización del grano se realizó con escáner de escritorio (HP, Deskjet Ink Advantage 2135), la disposición de los granos sobre el cristal fue con los granos colocados de manera ordenada, sin contacto entre ellos (PAID<sub>ORD</sub>; figura 1a); y también dispuestos al azar, sin orden, ni separación (PAID<sub>DES</sub>; figura 1b).

La resolución de imágenes fue de 300 píxeles por pulgada (ppp), con dimensiones de 2550 x 3507 píxeles y 24 bits por píxel, con fondo negro para mejorar el contraste y se almacenaron en formato JPG. En el fondo de cada imagen se colocó una figura rectangular, de longitud conocida para corroborar las dimensiones en mm con el recuento de píxeles por pulgada del escáner.

El programa ImageJ se utilizó para el análisis de las imágenes, es de uso gratuito y está disponible en <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>. La secuencia de análisis consistió en convertir las imágenes de color y en formato JPG a imagen de 8-bit, y obtener una imagen binaria con la función "Threshold: default dark" para mejorar la identificación y conteo de los granos. Se utilizó la función "default dark" por presentar el mayor grado de precisión en el conteo comparado con el resto de las funciones de umbralización (resultados no presentados).

### Conteo del número de granos

La función de análisis de partículas del programa ImageJ requiere fijar límites de partículas por tamaño máximo y mínimo, y circularidad para reconocer de forma correcta los objetos identificados para el conteo, y de esta manera evitar sub- o sobreestimaciones (Sauceda *et al.*, 2017). Para definir el tamaño y forma de los granos de triticale e identificar la mínima diferencia porcentual de conteo (número real de granos - número de granos identificados) se analizaron las muestras digitalizadas PAID<sub>ORD</sub> con diferentes límites de tamaños (máximos y mínimos) y circularidad de partícula. Los límites óptimos resultaron en el rango de tamaño de 4 a 40 mm<sup>2</sup> y circularidad de 0.15 a 1.0 mm<sup>2</sup> (figura 2); y se utilizaron como criterio para contabilizar el número de granos de las imágenes PAID<sub>ORD</sub> y PAID<sub>DES</sub>. El procesamiento de las imágenes se automatizó mediante una rutina o macro para facilitar el análisis, dicho pro-

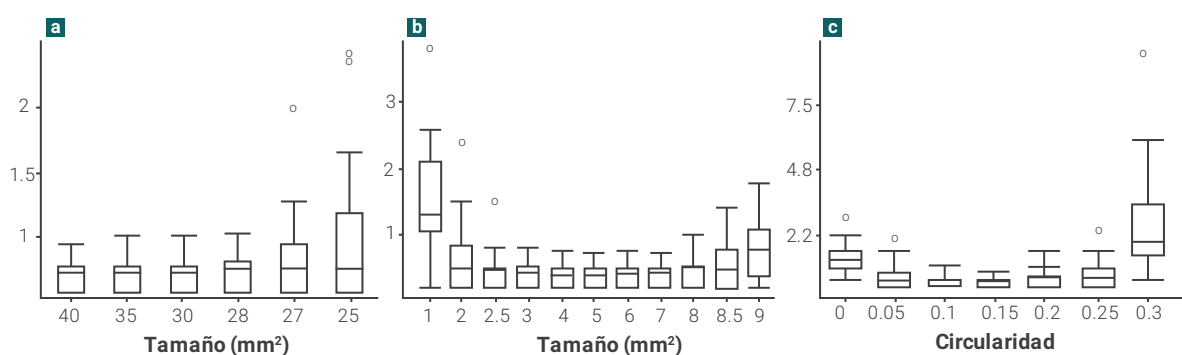


Figura 2. Diferencias porcentuales entre el número real de granos y el estimado por PAID<sub>ORD</sub> a diferente tamaño de partícula y circularidad: a) rango de tamaño máximo de partícula (40 a 25 mm<sup>2</sup>) con mínimo fijo de 4mm<sup>2</sup>; b) rango de tamaño mínimo de partícula (1 a 9 mm<sup>2</sup>) con máximo fijo de 60 mm<sup>2</sup>; c) rango de circularidad (0 a 0.3) con máximo fijo de 1.0.

cedimiento fue similar a lo realizado por Severini *et al.* (2011) y Mussadiq *et al.* (2015). El número de granos de las muestras también se registró por conteo visual realizado por tres individuos (método manual).

### Dimensiones del grano

La longitud (L) y anchura (A) de cada grano se obtuvo de las imágenes PAID<sub>ORD</sub> mediante la función de análisis de partículas del programa ImageJ. La medición de las dimensiones lineales L, A y espesor (E) también se realizaron con un micrómetro ( $\Delta = \pm 0.01$  mm) en 15 granos obtenidos al azar de las mismas muestras digitalizadas.

### Volumen del grano

El volumen experimental del grano ( $V_{EXP}$ ) se obtuvo por desplazamiento de tolueno con el uso de un picnómetro de 25 mL, el cual se considera el método de referencia por su precisión y exactitud. El peso del grano de las muestras digitalizadas se registró con una balanza analítica marca Ohaus, modelo PA1502 (0.01 g).

La estimación del volumen del grano se realizó con el uso de las dimensiones obtenidas con el PAID ( $V_{PAID}$ ) por aproximación a un esferoide prolado, o elipsoide con dos ejes de igual longitud (Weisstein, 2013).

$$V_{PAID} = \frac{4}{3} \pi * \frac{L}{2} * \frac{A}{2} * \frac{A}{2}$$

El volumen del grano también se estimó con las dimensiones obtenidas con el micrómetro ( $V_{MICRO}$ ) utilizadas en la fórmula propuesta para un elipsoide (Kaliniewicz, 2013).

$$V_{MICRO} = \frac{(\pi * A * E * L)}{6}$$

donde:  $\pi = 3.1416$ ; A= ancho; E = espesor, L = largo.

La metodología propuesta por Cleva *et al.* (2013, 2017) se utilizó para obtener la constante de proporcionalidad k, por igualación entre el volumen experimental ( $V_{EXP}$ ) con el volumen estimado con las dimensiones del PAID<sub>ORD</sub> ( $V_{PAID}$ ), según la expresión del volumen de un elipsoide.

$$k = \frac{V_{exp}}{\sum_{n=1}^N L_n * A_n^2}$$

Y la estimación de volumen con el uso de k ( $V_k$ ), para una muestra n de granos resulta:

$$V_k = k * \sum_{n=1}^N L * A^2$$

### Análisis estadístico

Las metodologías de conteo (Manual, PAID<sub>ORD</sub> y PAID<sub>DES</sub>) se compararon con ANAVA y comparación de medias mediante la prueba Tukey al 5%; como entre las muestras no presentaban el mismo número real de granos, cada muestra se consideró como bloque para un diseño en bloques completos al azar. Las dimensiones y el volumen de grano fueron analizados mediante ANAVA doble, los niveles de fertilización nitrogenada,

genotipos y su interacción se consideraron como efectos fijos; y se compararon las medias a través de la prueba de Tukey al 5%. La asociación entre las dimensiones de L y A, obtenidas mediante PAID y Micrómetro, se realizó mediante la prueba T de Student ( $p \leq 0.05$ ) y correlación de Pearson (r). Los datos fueron analizados con paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2017).

La exactitud en la estimación del volumen del grano se evaluó mediante la desviación relativa porcentual (DRP), al contrastar el  $V_{EXP}$  o de referencia con el resto de los métodos de estimación del volumen, según la siguiente expresión:

$$DRP (\%) = \frac{V_{exp} - V}{V_{exp}} * 100$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Conteo del número de granos

El número de granos mostró diferencias entre métodos (DMS = 2.68;  $p < 0.001$ ; CV: 1.76%). El promedio de granos con el método de conteo Manual fue de 291.83, y no se diferenció significativamente de los 292.13 que presentó el método PAID<sub>ORD</sub> (tabla 1). Entre ambos métodos existió una sobreestimación promedio de 0.10% número de granos en el 30% de las muestras, con valores máximos de cuatro granos y mínimos de un grano; en nueve muestras (22.5%) se subestimó el número, pero solo en un grano y en las restantes 19 muestras (47.5%) existió concordancia (tabla 2). Resultados similares fueron reportados en trigo por Saucedo *et al.* (2017), que atribuyen la sub- y sobreestimaciones porque el algoritmo del programa puede excluir granos que no cumplan con la restricción de tamaño o circularidad, o suelen dividir en dos o más partes un mismo grano.

El método PAID<sub>DES</sub> se diferenció del método Manual y PAID<sub>ORD</sub> ( $p \leq 0.05$ ), con un valor promedio de 276.3 granos; y presentó una clara subestimación en el conteo de granos, de 15.52 en promedio. La subestimación del PAID<sub>DES</sub> se produjo en el 100% de las muestras porque los granos que estaban en contacto fueron detectados como uno solo y no contabilizados por exceder los rangos de restricción de tamaño y circularidad (figura 3c y d). En caso de partículas en contacto se recomienda utilizar el algoritmo de transformación divisoria "Watershed", que permite realizar división de partículas en contacto (Severini *et al.*, 2011); pero en este estudio con la umbralización utilizada no se pudo aplicar de manera satisfactoria la función Watershed porque generaba múltiples segmentaciones dentro de cada grano (figura 3a y b). La inexacta segmentación del algoritmo Watershed también fue reportada por Mussadiq *et al.* (2015).

En este estudio el uso de PAID<sub>ORD</sub> permitió lograr una elevada exactitud, tal como lo señala Saucedo *et al.* (2017); sin embargo, con PAID<sub>DES</sub> se produjo una significativa subestimación del conteo. Si bien, el PAID<sub>DES</sub> es rápido y requiere poco esfuerzo al procesar las muestras, la elevada diferencia en el número de granos imposibilitó su posterior uso para la determinación de las dimensiones y el volumen de grano por aproximación geométrica.

### Dimensiones del grano

Los valores de A, E y L obtenidos en este estudio (tabla 3) concuerdan con los reportados en triticale por otros autores



Figura 3. Ejemplo del procesamiento de conteo con granos dispuestos al azar (PAID<sub>DES</sub>): (a) imagen original, (b) imagen segmentada por el algoritmo *Watershed*, (c) conteo de granos (el círculo rojo contiene los granos excluidos en el conteo), (d) elipse equivalente de los granos detectados.

Método	Promedio $\pm$ desvío estándar	Máximo	Mínimo
Manual	291.83 $\pm$ 30.15 a	380	236
PAID <sub>ORD</sub>	292.13 $\pm$ 30.28 a	379	236
PAID <sub>DES</sub>	276.30 $\pm$ 26.75 b	339	229

Tabla 1. Conteo promedio y desvío estándar de número de granos de triticale con metodología manual y análisis de imágenes con granos ordenados (PAID<sub>ORD</sub>) y granos desordenados (PAID<sub>DES</sub>). Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

	Manual vs. PAID <sub>ORD</sub>				Manual vs. PAID <sub>DES</sub>			
	N.º de muestras	Promedio	Máx.	Mín.	N.º de muestras	Promedio	Máx.	Mín.
Sobreestimación	12	1.75	4	1	0	0	0	0
Subestimación	9	1	1	1	40	15.52	41	2

Tabla 2. Diferencia entre el número de granos de triticale registrados de manera manual y mediante el análisis de imágenes con granos ordenados (PAID<sub>ORD</sub>) y granos desordenados (PAID<sub>DES</sub>).

	Micrómetro			PAID <sub>ORD</sub>			
	L	A	E	L	A		
Genotipos	CIMMYT 830	7.57 $\pm$ 0.30 a	3.05 $\pm$ 0.09 a	2.87 $\pm$ 0.09 a	8.08 $\pm$ 0.08 a	2.88 $\pm$ 0.06 b	
	CIMMYT 820	7.26 $\pm$ 0.20 b	3.19 $\pm$ 0.11a	2.97 $\pm$ 0.11 a	7.69 $\pm$ 0.10 b	3.02 $\pm$ 0.05 a	
	Don Santiago INTA	6.90 $\pm$ 0.18 c	2.68 $\pm$ 0.10 b	2.52 $\pm$ 0.09 b	7.55 $\pm$ 0.15 c	2.47 $\pm$ 0.05 d	
	Antonio UNLPam	6.80 $\pm$ 0.23 c	2.66 $\pm$ 0.15 b	2.49 $\pm$ 0.10 b	7.55 $\pm$ 0.10 c	2.60 $\pm$ 0.04 c	
	Tukey	0.23	0.14	0.12	0.11	0.06	
Nivel	Alto	7.20 $\pm$ 0.40 a	2.91 $\pm$ 0.25	2.73 $\pm$ 0.23	7.77 $\pm$ 0.24 a	2.73 $\pm$ 0.22	
	Bajo	7.07 $\pm$ 0.35 b	2.88 $\pm$ 0.27	2.69 $\pm$ 0.24	7.66 $\pm$ 0.24 b	2.74 $\pm$ 0.23	
		Tukey	0.12	-	-	0.06	-
	CV	2.69	3.76	4.01	1.24	1.87	

Tabla 3. Dimensiones del grano promedio  $\pm$  desvío estándar obtenidas con micrómetro y PAID en genotipos de triticale bajos dos niveles de fertilización nitrogenada.

L, A y E representan dimensiones de largo, ancho y espesor respectivamente.

CV: coeficiente de variación.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0.5$ ).

(Malicki y Kotlinski, 1998; Royo *et al.*, 2000; Kusińska, 2005; Kutlu y Kinaci, 2010; Kaliniewicz, 2013; Warechowska *et al.*, 2013; Kaliniewicz *et al.*, 2015; Osokina y Kostetska, 2015; Su-leiman *et al.*, 2019; Kostetska, 2016; Aprodu y Banu, 2017; Kaliniewicz *et al.*, 2018); por lo que se puede considerar que las dimensiones del grano están dentro del rango de variaciones intraespecíficas para el triticale.

La longitud de grano (L) presentó diferencias entre los métodos de medición ( $T = -19.1$ ;  $p < 0.0001$ ). Las mediciones de L generadas por el PAID resultaron en promedio 0.59 mm superior a las obtenidas por micrómetro ( $7.72 \pm 0.24$  vs.  $7.13 \pm 0.30$  mm), la diferencia puede resultar porque con micrómetro se midieron 15 granos, mientras que con PAID se evaluaron todos los granos por muestra; pese a la diferencia entre los métodos existió una alta correlación ( $r = 0.79$ ,  $p < 0.001$ ). La anchura de grano no mostró diferencia significativa entre métodos y existió alto valor de correlación ( $r = 0.91$ ,  $p < 0.001$ ), las mediciones con micrómetro fueron en promedio  $2.89 \pm 0.26$  mm y con PAID resultaron en promedio  $2.74 \pm 0.23$  mm.

La anchura del grano, obtenida con micrómetro y PAID, mostró diferencias entre genotipos, pero sin diferencias significativas entre los niveles de fertilización (tabla 3). Ambos métodos constatan las diferencias entre los genotipos graníferos de los forrajeros, pero el PAID<sub>ORD</sub> logró mayor nivel de diferenciación entre los genotipos (DMS: 0.06 vs. 0.14). El espesor de grano (E) presentó diferencias entre genotipos ( $p < 0.01$ ) y se diferenciaron CIMMYT 820 y CIMMYT 830 de Don Santiago INTA y Antonio UNLPam; solo se evaluó de forma manual con micrómetro, debido a que en la única orientación que se digitalizaron las imágenes no es posible obtener dimensiones en profundidad; Williams *et al.* (2013) plantean una forma de lograr dimensiones de E con PAID en trigo, pero resulta destructiva del material para evaluar y de laboriosa aplicación. La longitud (L) del grano permitió, con ambos métodos de medición, identificar de igual manera los grupos de comparación de medias entre genotipos ( $p < 0.01$ ) y niveles de fertilización ( $p < 0.01$ ); la mayor L entre los genotipos la mostró CIMMYT 830; mientras que entre las dosis de fertilización nitrogenada el nivel alto tuvo un aumento significativo de L. El aumento de L por efecto de la fertilización también fue reportado por Warechowska *et al.* (2013). La respuesta de A, E y L obtenida con ambas metodologías fue similar entre los genotipos en ambos

niveles de fertilización; es decir, no hubo efecto de interacción entre estos factores.

La obtención de las dimensiones con micrómetro permitió obtener el espesor de los granos, pero representa una tarea tediosa en granos de tamaño pequeño como es el caso del triticale. El mayor número de granos evaluados por PAID permitió obtener un valor más confiable de la media y el desvío estándar en las dimensiones de L y A (tabla 3), y permitió diferenciar, caracterizar y clasificar genotipos muy similares de triticale según las dimensiones del grano.

**Volumen de grano**

El análisis de k presentó diferencias significativas entre genotipos (DMS = 0.016;  $p < 0.001$ ), nivel de fertilización (DMS = 0.008;  $p < 0.001$ ) y no evidenció interacción genotipo por nivel de fertilización. El valor de k en todas las muestras resultó en promedio  $0.468 \pm 0.02$ ; la k en el grano del genotipo CIMMYT 820 se diferenció estadísticamente del promedio del resto de los genotipos en 5.2% (tabla 4). Los genotipos restantes no se diferenciaron entre ellos y promediaron un valor de 0.461. El valor de k con el nivel de fertilización alto se diferenció en 3.56% respecto del nivel bajo. Las diferencias entre los valores de k se pueden atribuir en gran parte a las diferencias de espesor de los granos entre los diferentes genotipos (tabla 3), y porque la rugosidad y profundidad del surco de los granos pudo verse afectada por la dosis de fertilizante. Las variedades mejoradas de triticale aún presentan el problema de arrugamiento del grano (Ramírez *et al.*, 2003; Cardozo *et al.*, 2005; Paccapelo *et al.*, 2017) y existe asociación negativa entre la profundidad de surco y la rugosidad del grano con variables asociadas al volumen como la densidad y el peso hectolítrico (Hevia, 2003; Butrón *et al.*, 2015).

En función a la diferencia que presentaron los valores de k entre genotipos y niveles de fertilización, se utilizaron tres valores de k para estimar el volumen del grano: promedio,  $0.468 (V_{k_{prom}})$ ; diferenciado entre genotipos, 0.487 para CIMMYT 820 y 0.461 para CIMMYT 830, Antonio UNLPam y Don Santiago INTA ( $V_{k_{geno}}$ ); y diferenciado en los niveles de fertilización nitrogenada, 0.477 para el nivel alto y 0.46 para el nivel bajo ( $V_{k_{nivel}}$ ).

La comparación entre los métodos para obtener el volumen del grano ( $V_{EXP}$ ,  $V_{MICRO}$ ,  $V_{PAID}$ ,  $V_{k_{prom}}$ ,  $V_{k_{geno}}$  y  $V_{k_{nivel}}$ ) evidenció dife-

		Promedio ± desvío estándar	Máximo	Mínimo
Genotipo	CIMMYT 820	0.487 ± 0.02 a	0.522	0.468
	CIMMYT 830	0.467 ± 0.02 b	0.504	0.441
	Antonio UNLPam	0.460 ± 0.01 b	0.476	0.439
	Don Santiago INTA	0.458 ± 0.01 b	0.479	0.438
	Tukey	0.016		
Nivel	Alto	0.477 ± 0.02 a	0.522	0.438
	Bajo	0.460 ± 0.02 b	0.504	0.438
	Tukey	0.008		
	CV	2.87		

**Tabla 4.** Valores promedio ± desvío estándar de constante de proporcionalidad en genotipos de triticale bajo dos niveles de fertilización. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). CV: coeficiente de variación.

		Método*					
		V <sub>EXP</sub>	V <sub>MICRO</sub>	V <sub>PAID</sub>	Vk <sub>nivel</sub>	Vk <sub>prom</sub>	Vk <sub>geno</sub>
Genotipo*	820	33.99 ± 1.26 a	36.00 ± 3.24 a	36.63 ± 1.45 a	32.88 ± 1.54 a	32.74 ± 1.29 a	34.07 ± 1.35 a
	830	31.22 ± 1.95 b	34.80 ± 3.21 a	34.98 ± 1.39 a	31.40 ± 1.38 a	31.27 ± 1.24 a	30.8 ± 1.22 b
	Ant	23.33 ± 1.19 c	23.71 ± 2.95 c	26.62 ± 1.08 b	23.89 ± 1.05 b	23.79 ± 0.97 b	23.44 ± 0.95 c
	DS	20.98 ± 1.30 d	24.39 ± 2.00 b	24.08 ± 1.32 c	21.62 ± 1.47 c	21.52 ± 1.18 c	21.2 ± 1.16 d
Tukey		1.75	3.41	1.68	1.52	1.50	1.51
Nivel	Alto	27.92 ± 5.67 a	30.35 ± 6.40	30.68 ± 5.50	28.12 ± 5.04 a	27.42 ± 4.91	27.46 ± 5.41
	Bajo	26.84 ± 5.67 b	29.1 ± 6.51	30.48 ± 5.75	26.78 ± 5.05 b	27.24 ± 5.14	27.29 ± 5.60
Tukey		0.92	-	-	0.80	-	-
CV		5.23	9.41	4.51	4.53	4.51	4.52

Tabla 5. Volumen de grano promedio ± desvío estándar de cuatro genotipos de triticale bajo dos niveles de fertilización nitrogenada, obtenido de forma experimental y por aproximación geométrica.

\*Método de estimación de volumen del grano: experimental, V<sub>EXP</sub>; por aproximación geométrica con dimensiones obtenidas con micrómetro, V<sub>MICRO</sub>; software ImageJ, V<sub>PAID</sub>; y constante de proporcionalidad diferenciada en nivel de fertilización, Vk<sub>nivel</sub>; promedio, Vk<sub>prom</sub> y en genotipos, Vk<sub>geno</sub>.

\*Genotipo, 820: CIMMYT 820; 830: CIMMYT 830; Ant: Antonio UNLPam; DS: Don Santiago INTA.

CV: Coeficiente de variación.

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (p≤0.05).

rencias (DMS = 2.12; p<0.001; CV = 11.7). El V<sub>EXP</sub> método de referencia, presentó un valor promedio de 27.38 ± 5.62 mm<sup>3</sup> y se diferenció estadísticamente del método V<sub>PAID</sub> (30.58 ± 5.5 mm<sup>3</sup>) con una subestimación del 11.6%; y del V<sub>MICRO</sub> (29.73 ± 6.41 mm<sup>3</sup>) en 7.9%. Las estimaciones de volumen con el uso de k no evidenciaron diferencias significativas respecto al V<sub>EXP</sub> y permitió lograr resultados muy similares, con valores de 27.33 ± 4.96 (Vk<sub>prom</sub>), 27.36 ± 5.00 (Vk<sub>nivel</sub>), y 27.38 ± 5.43 (Vk<sub>geno</sub>). El volumen del grano en triticale fue reportado por diferentes autores con diversas metodologías, por aproximación geométrica a un elipsoide (Royo *et al.*, 2000; Kaliniewicz, 2013; Aprodu y Banu, 2017); aproximación geométrica a un cono esférico (Suleiman *et al.*, 2019); aproximación geométrica con el uso de constante de proporcionalidad, k = 0.52, utilizada en trigo; con picnómetro con desplazamiento de agua (Ramírez *et al.*, 2003; Taner *et al.*, 2018).

La desviación relativa porcentual (DRP) por estimación geométrica fue de 11.51 ± 8.14% para V<sub>MICRO</sub> y 12.27 ± 4.50% para V<sub>PAID</sub>; resultados similares fueron reportados por (Gastón *et al.*, 2002), quienes obtuvieron un 11.00% de DRP entre el volumen del grano de trigo estimado por enfoque elipsoidal y el V<sub>EXP</sub>. La aplicación de k en la ecuación geométrica permitió obtener mayor exactitud en la estimación del volumen; la menor DRP respecto al V<sub>EXP</sub> se logró con Vk<sub>nivel</sub> 2.82 ± 2.34%, seguido de Vk<sub>prom</sub> 3.23 ± 2.38% y Vk<sub>geno</sub> 3.43 ± 3.31%. Resultados similares de DRP, con el uso de k en la estimación de volumen del grano, fueron reportados por Cleva *et al.* (2013, 2017) en granos de arroz y alubia.

Los seis métodos de análisis presentaron diferencias significativas entre los genotipos (p<0.0001) y ninguno resultó estadísticamente significativo para la interacción genotipo x nivel de fertilización. El método V<sub>EXP</sub> presentó diferencias entre los

niveles de fertilización (DMS = 0.93; p ≤ 0.02), de igual manera que Vk<sub>nivel</sub> (DMS = 0.80; p<0.01). El nivel de fertilización afectó significativamente el volumen del grano, con un aumento de 1.08 mm<sup>3</sup> en promedio a favor de la mayor dosis de fertilizante (tabla 5); resultado similar fue reportado por Warechowska *et al.* (2013), quienes indican que la fertilización con la mayor dosis de nitrógeno contribuyó a incrementar el peso hectolítrico, carácter asociado con el volumen del grano; Royo *et al.* (2000) también comunicaron diferencias en volumen del grano por efectos ambientales, tales como irrigación, defoliación o ciclo del cultivo. En este estudio, la causa de la disminución del volumen por efecto de menor nivel de fertilización nitrogenada puede ser explicado por la disminución de la longitud del grano (tabla 3); y también podría ser por mayor arrugamiento de los granos debido al déficit de crecimiento por limitación nitrogenada tal como lo señala Aguirre *et al.* (2002).

El valor medio de V<sub>EXP</sub> para los genotipos de aptitud granífera fue de 32.6 mm<sup>3</sup>, y se destacó CIMMYT 820; los genotipos de aptitud forrajera promediaron 22.1 mm<sup>3</sup>. Todos los métodos de estimación de volumen presentaron diferencias de medias entre los genotipos tanto graníferos como forrajeros (tabla 5), respuesta esperada y debida al proceso de selección para obtener cada genotipo; sin embargo, el análisis de Vk<sub>geno</sub> fue el único que coincidió en la identificación de los grupos de comparación de medias entre genotipos como el V<sub>EXP</sub> pero no diferenció los niveles de fertilización nitrogenada.

## CONCLUSIONES

El procesamiento y análisis de imágenes digitales permite registrar con exactitud el número de granos de triticale mediante

la digitalización de los granos sin estar en contacto. El PAID presenta exactitud para la medición de longitud, anchura y volumen del grano de manera simple, ágil y confiable; sin embargo, para una mayor exactitud en la estimación de volumen del grano se sugiere determinar la constante de proporcionalidad según las características y el ambiente del material para evaluar. Puede considerarse que los resultados obtenidos en este estudio posicionan al PAID como una herramienta fiable capaz de analizar cuantitativamente el grano, y establecer un punto de partida para aplicarse como alternativa al uso de métodos clásicos, en especial cuando el material para evaluar es limitante.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRRE, A.; BADIALI, O.; CANTARERO, M.; LEÓN, A.; RIBOTTA, P.; RUBIOLO, O. 2002. Relationship of test weight and kernel properties to milling and baking quality in argentine triticales. *Cereal Res. Communications* 30(1/2), 203-208.
- APRODU, I.; BANU, I. 2017. Milling, functional and thermo-mechanical properties of wheat, rye, triticale, barley and oat. *Journal of cereal science* 77, 42-48.
- BABIĆ, L.; BABIĆ, M.; TURAN, J.; MATIĆ KEKIĆ, S.; RADOJČIN, M.; MEHANDŽIĆ STANIŠIĆ, S.; PAVKOV, I.; ZORANOVIĆ, M. 2011. Physical and stress-strain properties of wheat (*Triticum aestivum*) kernel. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(7), 1236-1243.
- BUTRÓN, R.; MICHMA, R.; SILVA, E.; SIÑANI, O.; QUISPE, F.; MARZA, F. 2015. Características de grano relacionados con rendimiento de trigo. *Revista Científica de Investigación INFO-INIAF* 1(6), 68-76.
- CARDOZO, M.; GRASSI, E.; SZPINIĄK, B.; FERREIRA, V. 2005. Selección de introducciones de triticale para doble propósito. *Rev. Univ. Río Cuarto* 25(2), 109-123.
- CASTRO, N.; DOMÍNGUEZ, R.; PACCAPELO, H. 2011. Análisis del rendimiento de grano y sus componentes en cereales sintéticos (tríceps y triticales). *Rev. Facultad de Agronomía, Univ. Nac. La Pampa* 22(1), 13-21.
- CLEVA, M.S.; SAMPALLO, G.M.; THOMAS, G.; OSIRIS, A.; ACOSTA, C.A. 2013. Método para la determinación del volumen de una muestra de granos de arroz mediante el procesamiento digital de imágenes. *RIA* 39(2), 185-190.
- CLEVA, M.S.; SAMPALLO, G.M.; RODRIGUES DA FONSECA, C.; AQUINO, D.C.; LISKA, D.O.; VENTRE, F.R. 2017. Método para la determinación de la densidad de una muestra de granos enteros de alubia por procesamiento digital de imágenes. *RIA* 43(2), 144-148.
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. 2017. *InfoStat*. Córdoba, Argentina. Grupo InfoStat.
- EUDES, F. 2015. *Triticale*. Cham: Springer International Publishing. 258 p.
- FERRARI, E.D.; FERREIRA, V.A.; GRASSI, E.M.; PICCA, A.M. T.; PACCAPELO, H.A. 2018. Genetic parameters estimation in quantitative traits of a cross of triticale (*x Triticosecale W.*). *Open Agriculture*, 3(1), 25-31.
- GASTÓN, A.L.; ABALONE, R.M.; GINER, S.A. 2002. Wheat drying kinetics. Diffusivities for sphere and ellipsoid by finite elements. *Journal of Food Engineering* 52(4), 313-322.
- HEVIA, F. 2003. Componentes químicos y algunas propiedades físicas del grano de trigo y su relación con la funcionalidad de las harinas. En: JOVET, C. (ed.). *Avances y perspectivas en calidad industrial del trigo*. Centro Regional de Investigación Carillanca. Serie Acta 21. 23-40 pp.
- KALINIEWICZ, Z. 2013. Analysis of frictional properties of cereal seeds. *African Journal of Agricultural Research*, 8(45), 5611-5621.
- KALINIEWICZ, Z.; BIEDULSKA, J.; JADWISIEŃCZAK, B. 2015. Assessment of cereal seed shape with the use of sphericity factors. *Technical Sciences/University of Warmia and Mazury in Olsztyn Technical Sciences* 18(4), 237-246.
- KALINIEWICZ, Z.; ŻUK, Z.; KRZYŚIAK, Z. 2018. Influence of Steel Plate Roughness on the Frictional Properties of Cereal Kernels. *Sustainability* 10(4), 1-11.
- KOSTETSKA, K.V. 2016. Physical and mechanical properties and quality indicator of triticale grain. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Агронія і біологія*, (2), 151-154.
- KUSIŃSKA, E. 2005. Impact of storage conditions on geometrical parameters of triticale grain. *TEKA Kom. Mot. Energ. Roln.* 5, 116-124.
- KUTLU, I.; KINACI, G. 2010. Evaluation of Drought Resistance Indicates for Yield and Its Components in Three Triticale Cultivars. *J. Tekirdag Agric. Faculty* 7(2), 95-103.
- MAKANZA, R.; ZAMAN-ALLAH, M.; CAIRNS, J.E.; EYRE, J.; BURGUEÑO, J.; PACHECO, Á.; DIEPENBROCK, C.; MAGOTOKOSHO, C.; OLSEN, M.; PRASANNA, B.M. 2018. High-throughput method for ear phenotyping and kernel weight estimation in maize using ear digital imaging. *Plant methods* 14(1), 1-13.
- MALICKI, M.A.; KOTLINSKI, J. 1998. Dielectric determination of moisture of cereals grain using time domain reflectometry. *International agrophysics* 12, 209-216.
- MOHSENIN, N.N. 1986. *Physical Properties of Plant and Animal Materials*. 2.ª edición. Gordon and Breach Science Publishers (Eds.), Nueva York. 94-104 pp.
- MUSSADIQ, Z.; LASZLO, B.; HELYES, L.; GYURICZA, C. 2015. Evaluation and comparison of open source program solutions for automatic seed counting on digital images. *Computers and Electronics in Agriculture* 117, 194-199.
- OSOKINA, N.M.; KOSTETSKA, K.V. 2015. Technology estimation grain wheat and triticale is for groats production. *Bulletin Uman UNUH* 2(1), 28-33.
- PACCAPELO, H.; FERREIRA, V.; PICCA, A.; FERRARI, E.; DOMÍNGUEZ, R.; GRASSI, E.; FERREIRA, A.; DI SANTO, H.; CASTILLO, E. 2017. Triticale (*x Triticosecale Wittmack*): rendimiento y sus componentes en un ambiente semiárido de la Argentina. *Chilean journal of agricultural & animal sciences* 33(1), 45-58.
- PATTISON, A.L.; TRETOWAN, R.M. 2013. Characteristics of modern triticale quality: commercially significant flour traits and cookie quality. *Crop and Pasture Science* 64(9), 874-880.
- RAMÍREZ, J.J.; CERVANTES, T.; VILLASEÑOR, H.E.; López, C. 2003. Selección para componentes del rendimiento de grano en triticale irradiado. *Agrociencia* 37(6), 595-603.
- SAUCEDA, C.P.; VILLASEÑOR, H.E.; LUGO, G.A.; PARTIDA, L.; GONZÁLEZ, V.A.; REYES, Á. 2017. Tamaño y número de granos de trigo analizados mediante procesamiento de imagen digital. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 8(3), 517-529.
- ROYO, C.; ABAZA, M.; BLANCLO, R.; DEL MORAL, L.F.G. 2000. Triticale grain growth and morphometry as affected by drought stress, late sowing and simulated drought stress. *Functional Plant Biology* 27(11), 1051-1059.
- SEVERINI, A.D.; BORRÁS, L.; CIRILO, A.G. 2011. Counting maize kernels through digital image analysis. *Crop science* 51(6), 2796-2800.
- SULEIMAN, R.A.; XIE, K.; ROSENTRATER, K.A. 2019. Physical and thermal properties of chia, kañiwa, triticale and farro as a function of moisture content. *Applied Engineering in Agriculture*. 35(3): 417-429.
- TANABATA, T.; SHIBAYA, T.; HORI, K.; EBANA, K.; YANO, M. 2012. Smart-Grain: high-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. *Plant physiology* 160(4), 1871-1880.
- TANER, A.; ÖZTEKIN, Y.; TEKGÜLER, A.; SAUK, H.; Duran, H. 2018. Classification of Varieties of Grain Species by Artificial Neural Networks. *Agro-nomy* 8 (7), 123.
- WARECHOWSKA, M.; WARECHOWSKI, J.; WOJTKOWIAK, K.; STĘPIEŃ, A. 2013. Milling quality of spring triticale grain under different nitrogen fertilization. *Pol. J. Natur. Sc.* 28(4), 423-435.
- WEISSTEIN, E.W. 2013. Prolate Spheroid. *MathWorld--A Wolfram Web Resource*. (Disponible: <http://mathworld.wolfram.com/ProlateSpheroid.html> verificado: 31 de agosto de 2020).
- WHAN, A.P.; SMITH, A.B.; CAVANAGH, C.R.; RAL, J.P.F.; SHAW, L.M.; HOWITT, C.A.; BISCHOF, L. 2014. GrainScan: a low cost, fast method for grain size and colour measurements. *Plant methods* 10(1), 1-10.
- WILLIAMS, K.; MUNKVOLD, J.; SORRELLS, M.E. 2013. Comparison of digital image analysis using elliptic Fourier descriptors and major dimensions to phenotype seed shape in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 190: 99-116.
- ZHANG, G.; JAYAS, D.S.; WHITE, N.D. 2005. Separation of touching grain kernels in an image by ellipse fitting algorithm. *Biosystems engineering* 92(2), 135-142.
- ZECEVIC, V.; KNEZEVIC, D.; MICANOVIC, D. 2005. Technological quality of wheat-triticale flour blends. *Tractors and Power Machines* 10, 448-453.