

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS**

**Elaboración de un sistema para la toma y análisis automático de imágenes para evaluar el proceso de germinación en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)**

Trabajo Final de Graduación para optar por el grado de  
Licenciatura en Ingeniería Agrícola y de Biosistemas

**Iván Gómez Bolaños**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio**

**San José, Costa Rica**

**2018**



**Elaboración de un sistema para la toma y análisis automático de imágenes para evaluar el proceso de germinación en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*)**

Sometido a la Escuela de Ingeniería de Biosistemas como requisito para optar por el grado de

LICENCIADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y DE BIOSISTEMAS

---

Iván Gómez Bolaños

Candidato

---

Dr.rer.nat Luis O. Barboza Barquero

Director, Comité Asesor.

---

Ing. Mauricio Bustamante Román, Ph.D.  
Miembro, Comité Asesor.

---

Ing. Giovanni Carmona Villalobos, Lic.  
Miembro, Comité Asesor.

---

Ing. Marta Montero Calderón, Ph.D.  
Presidente, Tribunal Examinador

---

Ing. Juan Roberto Mora Chaves, Lic.  
Miembro, Tribunal Examinador

## RESUMEN

---

La cinética de absorción de agua durante la germinación de una semilla brinda información asociada a la calidad de un lote, sin embargo, estos estudios demandan mano de obra y tiempo. El uso de mediciones indirectas a partir de procesamiento de imágenes digitales es una alternativa que permite aumentar la cantidad de evaluaciones realizadas en un periodo de tiempo. En esta investigación se presenta el diseño, construcción y evaluación de un prototipo de bajo costo compuesto por una cámara digital y un sistema de movimiento capaz de adquirir imágenes de manera independiente. Se utilizó software de acceso libre para el procesamiento de imágenes y de esta manera obtener información asociada al tamaño y forma de los elementos observados sin necesidad de realizar mediciones directas. Se determinó que las mediciones realizadas con procesamiento de imágenes presentan un porcentaje de error menor al 2%, al compararlas con figuras de calibración, mediciones con vernier y el uso de material biológico. Se demostró que es una herramienta capaz de cuantificar variables de interés al uniformizar la fuente de error y con menores tiempos de trabajo. Con el uso del prototipo se cuantificó la expansión en el área de las semillas durante la imbibición de tres genotipos de frijol de importancia nacional a partir del procesamiento de imágenes durante un periodo de 24 horas con mediciones en intervalos de 15 minutos. Se utilizaron los modelos matemáticos de Peleg y Sigmoide para describir la cinética de expansión a partir de las curvas de crecimiento del área, con esto se obtuvieron altos coeficientes de determinación ( $>0,96$ ). Se determinó que los genotipos Nambí y Brunca presentaron una velocidad de crecimiento mayor que el genotipo Cabécar, mientras que la expansión máxima de los genotipos Nambí y Cabécar fueron mayores que el de Brunca. Se hizo una prueba de germinación convencional por medio de la norma ISTA donde se determinó el porcentaje de germinación máxima de cada uno de los genotipos. Se obtuvo un porcentaje de 94% para Cabécar, un 93% para Nambí y un 89% para Brunca. Se encontró que los genotipos que absorbieron mayor cantidad de agua tuvieron, a su vez, porcentajes de germinación mayores. Se recomendó aumentar el número de genotipos de frijol a evaluar, y las condiciones de las semillas para fortalecer el hallazgo encontrado en esta investigación.

## Dedicatoria

---

*A mis padres Wilberth Gómez y Marianela Bolaños y mi hermano José Andrés Gómez, quienes me enseñaron que el motor más importante en la vida de una persona es el apoyo y compañía de la familia. A ellos les debo todo lo que soy hoy y lo que vendrá en el futuro, este es el producto de su esfuerzo, dedicación y compañía.*

## Agradecimientos

---

Al director de este Trabajo Final de Graduación, Luis Orlando Barboza Barquero, por ser un excelente guía durante este proceso, demostrando siempre ingenio, liderazgo, optimismo y motivación por hacer las cosas bien.

A mis asesores los ingenieros Geovanni Carmona Villalobos y Mauricio Bustamante Román, por sus observaciones y consejos, los cuales permitieron perfeccionar las ideas planteadas en este trabajo.

Al personal del CIGRAS, quienes siempre estuvieron dispuestos a brindarme una mano en este proyecto e hicieron que el ambiente de trabajo en el centro fuera mejor cada día.

A la Escuela de Ingeniería de Biosistemas y su equipo de profesores, por la formación académica que me brindaron en mis años por la universidad.

A mis colegas, los ingenieros Guillermo Vargas Elías y Ovidio Valerio Cubillo por sus ideas brindadas a este proyecto.

Al personal del Laboratorio Técnico Mecánico de la Escuela de Física y el Laboratorio de Soldadura de la Oficina de Servicios Generales de la Universidad de Costa Rica, por su trabajo en la construcción del prototipo de este proyecto.

Al Ing. Néstor Chávez Barrantes, del Programa de Leguminosas de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, por su aporte al proyecto, brindando el material biológico utilizado.

A todos mis familiares, profesores, amigos y compañeros que estuvieron a mi lado durante estos años de mi vida y que ayudaron a enriquecer la experiencia para formar la persona que soy hoy.

## INDICE GENERAL

---

RESUMEN.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
INDICE GENERAL.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	x
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1    OBJETIVOS.....	3
1.1.1    OBJETIVO GENERAL.....	3
1.1.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1    Principios sobre germinación de semillas.....	4
2.2    Conceptos básicos, adquisición y procesamiento de imágenes digitales.....	8
2.2.1    Conceptos básicos.....	8
2.2.2    Adquisición de imágenes.....	9
2.2.3    Corrección de imágenes.....	10
2.2.4    Procesamiento de imágenes.....	12
2.2.5    Aplicación de procesamiento de imágenes en germinación de semillas.....	13
2.2.6    Uso de microcontroladores y actuadores para desarrollo de prototipos.....	15
CAPITULO 3. METODOLOGÍA.....	18
3.1    Diseño y construcción del prototipo.....	19
3.1.1    Planteamiento inicial del diseño.....	19
3.1.2    Selección de equipos.....	19

3.1.3	Construcción mecánica y estructural .....	20
3.1.4	Sistema de control y programación .....	21
3.1.5	Calibración de movimiento .....	21
3.2	Procesamiento de imágenes .....	23
3.2.1	Pre procesamiento de imágenes: Calibración de cámara.....	23
3.2.2	Comprobación de corrección con elementos de calibración .....	24
3.2.3	Determinación de funciones requeridas para medición de áreas con procesamiento de imágenes y la elaboración del procedimiento automático.....	25
3.2.4	Comprobación de corrección contra método de referencia (vernier).....	26
3.3	Desarrollo de curvas de germinación.....	26
3.3.1	Metodología de reposición de agua .....	26
3.3.2	Ajustes a ensayos para cuantificar curvas de imbibición .....	27
3.3.3	Ensayos del prototipo en tres genotipos de frijol .....	27
3.4	Comparación de las curvas de crecimiento con la prueba de germinación convencional.....	28
3.4.1	Ensayos de germinación convencional.....	28
3.5	Análisis estadístico de resultados .....	29
4.	<b>CAPITULO 4. RESULTADOS</b> .....	30
4.1	Diseño y construcción del prototipo .....	30
4.1.1	Selección de equipos .....	30
4.1.2	Construcción mecánica y estructural .....	34
4.1.3	Sistema de control y programación .....	39
4.1.4	Calibración de movimiento .....	41
4.2	Procesamiento de imágenes .....	43
4.2.1	Preprocesamiento de imágenes: calibración de cámara .....	43
4.2.2	Comprobación de la corrección con elementos de calibración .....	45

4.2.3	Determinación de funciones requeridas para medición de áreas con procesamiento de imágenes y elaboración de procedimiento en ImageJ .....	51
4.2.4	Comprobación de la corrección contra método de referencia (vernier) .....	55
4.3	Desarrollo de curvas de crecimiento .....	59
4.3.1	Metodología para reposición de agua .....	59
4.3.2	Ajustes para ensayos de imbibición .....	59
4.3.3	Ensayos del prototipo en tres genotipos de frijol .....	63
4.4	Comparación de curvas con germinación convencional .....	69
4.4.1	Ensayos de germinación convencional .....	69
CONCLUSIONES .....		73
RECOMENDACIONES .....		74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		75
ANEXOS .....		81
Anexo A. Costo de componentes principales del prototipo. ....		81
Anexo B: Código grabado en Arduino con funciones para control de cámara y motor. .		82
Anexo C: Código en Python para control de cámara y motor por medio de comunicación serial con computadora. ....		93
Anexo D: Código de Matlab utilizado para corrección de imágenes. ....		97
Anexo E: Macro generado para procesamiento de imágenes en ImageJ. ....		99

## INDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Diagrama de la metodología ejecutada en el proyecto.....	18
Figura 2. Comprobación de movimiento por fotografías.....	22
Figura 3. Matriz de calibración geométrica de imágenes.....	23
Figura 4. Secuencia de pasos implementado en el procesamiento de imágenes.....	26
Figura 5. Categorías de prueba de germinación convencional.....	29
Figura 6. Sistema de movimiento del prototipo .....	34
Figura 7. Prototipo desarrollado .....	36
Figura 8. Definición de filas y columnas para el marco experimental.....	37
Figura 9. Esquema del circuito eléctrico del prototipo.....	40
Figura 10. Curva de operación del motor y tornillo de avance.....	42
Figura 11. Errores de reproyección obtenidos de la calibración de cámara en Matlab con el uso de 18 imágenes del cuadro de calibración .....	44
Figura 12. Corrección geométrica de imágenes obtenidas con el prototipo.....	45
Figura 13. Segmentación de las pruebas realizadas con las semillas, obtenida con el software ImageJ para frijol rojo.....	53
Figura 14. Segmentación de las pruebas realizadas con las semillas, obtenida con el software ImageJ para frijol negro.....	53
Figura 15. Relación entre las mediciones con vernier y con imágenes digitales para frijol Cabécar.....	57
Figura 16. Relación entre las mediciones con vernier y con procesamiento de imágenes digitales para el frijol Brunca.....	58
Figura 17. Aumento del área proyectada de la semilla durante la imbibición en un periodo de 24 horas con intervalos de 6 horas.....	61
Figura 18. Crecimiento del área de la semilla a través del tiempo para los tres genotipos de frijol .....	61
Figura 19. Razón de Crecimiento de Área las semillas a través del tiempo para los tres genotipos de frijol sobre papel con déficit de humedad.....	62
Figura 20. Razón de Crecimiento de Área las semillas a través del tiempo para los tres genotipos de frijol con una lámina de agua de 300 mL.....	64

Figura 21. Ajuste del modelo de Peleg en la cinética de la razón de crecimiento del área de la semilla con respecto al área inicial de los tres genotipos de semilla. ....	66
Figura 22. Ajuste del modelo Sigmoide en la cinética de la razón de crecimiento del área de la semilla con respecto al área inicial de los tres genotipos de semilla. ....	67
Figura 23. Ensayo de germinación convencional en tres genotipos de frijol. ....	71

## INDICE DE CUADROS

---

Cuadro 1. Especificaciones de elementos bidimensionales utilizados en la calibración.....	24
Cuadro 2. Especificaciones de la cámara ARDUCAM mini modelo OV5642.....	31
Cuadro 3. Datos utilizados para el cálculo de fuerza requerida para desplazar el sistema móvil.....	32
Cuadro 4. Datos utilizados para el cálculo del par torsional requerido.....	33
Cuadro 5. Especificaciones del motor de pasos modelo SM-42BYG011-25. ....	33
Cuadro 6. Valores-p en la variabilidad de la cuantificación de variables en la repetitividad del movimiento de la cámara para elementos de 100 mm <sup>2</sup> . ....	43
Cuadro 7. Comprobación de la medición con procesamiento de imágenes con elementos de calibración. ....	46
Cuadro 8. Valores-p en la variación de dimensiones en función a columnas y filas en elementos cuadrados con áreas de 400 mm <sup>2</sup> , 100 mm <sup>2</sup> y 25 mm <sup>2</sup> . ....	47
Cuadro 9. Valores-p en la variación de dimensiones en función a las columnas y filas en elementos circulares con áreas de 200 mm <sup>2</sup> , 100 mm <sup>2</sup> y 25 mm <sup>2</sup> . ....	48
Cuadro 10. Resumen de comparación entre medias mínimas y máximas para elementos cuadrados.....	49
Cuadro 11. Resumen de comparación entre medias máximas y mínimas para elementos circulares.....	50
Cuadro 12. Variabilidad de medición del prototipo al utilizar 10 semillas en diferentes posiciones del prototipo.....	51
Cuadro 13. Valores de probabilidad en prueba de 100 semillas medidas con vernier y con el prototipo. ....	56
Cuadro 14. Constantes del modelo de regresión lineal y valor de significancia de la correlación de Pearson para medición con vernier y procesamiento de imágenes.....	58
Cuadro 15. Caracterización de genotipos de frijol utilizados.....	60
Cuadro 16. Parámetros cinéticos del modelo de Peleg para tres genotipos de frijol.....	68
Cuadro 17. Parámetros cinéticos del modelo Sigmoide para tres genotipos de frijol.....	69
Cuadro 18. Determinación de tolerancia máxima entre repeticiones para pruebas de germinación convencional de ISTA.....	70

Cuadro 19. Determinación de tolerancia máxima entre ensayos para pruebas de germinación convencional de ISTA. ....	70
--	----

## **CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN**

---

La curva de crecimiento y germinación de un lote de semillas brinda información importante sobre la calidad de esta, y esto comprende desde el momento en que inicia la imbibición hasta alcanzar la emergencia de la radícula; proceso conocido como germinación [1]. Al conocer no solo el porcentaje máximo de germinación si no el comportamiento de la curva de expansión con respecto al tiempo, se pueden identificar características que podrían estar relacionadas con la capacidad de un lote para germinar; e inclusive hasta para estudiar y seleccionar individuos más resistentes a condiciones adversas, como por ejemplo estrés hídrico. Por otra parte, la imbibición es el proceso de absorción de agua por parte de la semilla seca, está relacionado con el vigor, por lo que es de gran importancia estudiar el efecto de lo que ocurre durante este fenómeno en la capacidad de una semilla de germinar y desarrollarse [2]. Estudios previos han logrado cuantificar la tasa de crecimiento y el porcentaje de germinación, por medio de adquisición y procesamiento de imágenes [2,3].

La metodología convencional para determinar el porcentaje de germinación máximo de un lote de semillas utilizada en el CIGRAS requiere una supervisión constante por parte de los técnicos encargados de llevar a cabo los ensayos, con esto se busca determinar el porcentaje de semillas de un lote que tengan la capacidad de germinar y producir plantas normales durante un periodo de 2-35 días después de iniciado el ensayo, dependiendo de la especie [4]. Estos ensayos no permiten cuantificar la tasa de crecimiento de germinación de una semilla debido a que se hacen dos conteos generalmente al final del proceso de germinación. Hacer conteos cada día no es viable ya que no se cuenta con suficiente personal para cubrir las evaluaciones. De utilizarse imágenes digitales se podría incrementar la eficiencia de las evaluaciones y obtener información adicional para tener un mejor conocimiento de la calidad de un lote de semillas.

La Universidad de Costa Rica, por medio del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), trabaja en un proyecto donde se estudia el uso de imágenes para cuantificar la germinación y propiedades de semillas (Proyecto VI- proyecto 734-B4-229).

De esta forma se ha logrado evaluar la germinación con dicha metodología en especies como pitahaya y arroz. También se han estudiado propiedades derivadas del análisis de imágenes en frijol, papaya y soya. La gran limitante ha sido la toma de imágenes, ya que se depende de personal para que realice esta labor de forma manual, por esta razón se requiere un sistema que tenga la capacidad de adquirir imágenes de manera automática.

Cabe mencionar que los dos métodos reportados anteriormente para evaluar la germinación no hacen toma automática de imágenes como es el caso de Joosen et al [3] y si lo hacen, el costo de instalación es muy alto como el prototipo elaborado por Wagner et al [2]. En la actualidad no existe un dispositivo automático disponible en Costa Rica que utilice imágenes digitales para cuantificar imbibición y germinación, por tal razón en este trabajo se desarrolló un dispositivo, a partir de tecnología de bajo costo como una solución alternativa que permite obtener resultados confiables en comparación con la tecnología de alto costo implementada en otros países.

La semilla es un producto de alto valor económico, por lo que se deben implementar métodos novedosos y eficientes para evaluar la calidad de un lote de semillas. La predicción de la tasa de germinación en conjunto con la germinación máxima promovería mejoras en la producción al aplicar dichas metodologías en estudios fisiológicos y genéticos para el mejoramiento de genotipos que permita obtener semillas resistentes a condiciones adversas, con mayores rendimientos y calidad en la producción [5].

Como modelo de estudio se utilizó la semilla de frijol, ya que es un cultivo de relevancia para la seguridad alimentaria de la región. El estudio está enfocado en la evaluación de la expansión de la semilla durante la absorción de agua y hasta alcanzar el proceso de germinación, y se utilizaron tres genotipos de frijol de color contrastante. Se determinó la relación de los resultados obtenidos con el prototipo con los de las pruebas realizadas en el CIGRAS de forma convencional.

## **1.1 OBJETIVOS**

---

### **1.1.1 OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un sistema automatizado para analizar la cinética de crecimiento en el área durante la imbibición de semillas por medio de la adquisición y procesamiento de imágenes digitales.

### **1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Diseñar y construir un prototipo a partir de componentes de bajo costo que permita la adquisición automatizada de imágenes fotográficas durante el proceso de imbibición de semillas.
- Elaborar un procedimiento de análisis de imágenes automático en ImageJ para cuantificar el tamaño y forma de las semillas.
- Evaluar el sistema propuesto a través de pruebas de repetitividad y variabilidad de mediciones y el uso elementos y métodos de referencia para validar los resultados obtenidos.
- Demostrar la funcionalidad del prototipo por medio de la elaboración de cinéticas de crecimiento para comparar tres genotipos de frijol contrastante y relacionar el crecimiento de la semilla con el porcentaje de germinación máxima de la prueba de germinación convencional.

## CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1 Principios sobre germinación de semillas

La etapa más vulnerable del ciclo de la vida de las plantas es la germinación de la semilla y ocurre en diferentes fases. Este proceso involucra el crecimiento del embrión, el desarrollo de las plántulas y su emergencia del suelo. El proceso de germinación se lleva a cabo en tres fases [6]: la fase I corresponde a la imbibición o fase de absorción rápida de agua, generalmente conocida como una fase pasiva. Inicialmente se da el ingreso de agua a la semilla, que se distribuye por las grietas e imperfecciones de la cubierta que inicialmente está seca, seguidamente el agua es absorbida por los coloides para reiniciar el proceso metabólico [1]. Una vez concluida la imbibición ocurre la fase II, en la cual se da la activación del metabolismo y proceso de respiración, en este proceso se lleva a cabo la síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva [7]. Por último, se da la fase III o de crecimiento del embrión lo que lleva a la ruptura de las envolturas de la semilla conocidas como testa a través de la cual se observa la emergencia de la radícula, con este proceso se marca el final de la germinación e inicia el proceso de desarrollo de la plántula [8].

La imbibición es una etapa determinante en el desarrollo futuro de un lote de semillas, debido a que los procesos metabólicos para la formación de nuevos tejidos son dependientes de la absorción de agua. En esta fase se pueden brindar condiciones ambientales adecuadas para alcanzar el éxito o puede representar un riesgo importante donde se generen daños irreparables en las estructuras internas [9]. En esta etapa la semilla es vulnerable a las bajas temperaturas, lo que puede provocar daño por frío, también puede sufrir daño por imbibición si la absorción de agua es muy rápida y si se generan condiciones anaeróbicas las semillas pueden acumular sustancias químicas tóxicas en su interior, como por ejemplo el etanol [9]. Sin embargo, el proceso de imbibición presenta una oportunidad para el mejoramiento del vigor por medio de la aplicación de diversos tratamientos relacionados a la absorción de agua, dentro de los cuales se puede mencionar el “*Priming*”.

El “Priming” es un proceso de prehidratación en el que se avanza el proceso metabólico de las semillas durante las dos primeras etapas de la germinación, este proceso se interrumpe con un secado antes de la siembra de la semilla. Este tratamiento garantiza una mayor homogeneidad en la humedad de la semilla y garantiza una mayor rapidez en la emergencia radicular y el establecimiento de la planta en campo [10]. De igual manera se han desarrollado investigaciones que utilizan la cuantificación de la imbibición como variable de respuesta de ensayos de semillas sometidas a absorción de metales [11], efecto de la temperatura [12] y tratamientos en la cubierta de la semilla [13].

La cinética del fenómeno de hidratación de productos agrícolas ha sido ampliamente estudiada (principalmente en productos secos como granos y semillas), ya que este proceso brinda información importante del comportamiento del producto que puede ser utilizada en diversas operaciones de procesamiento y calidad del material como la cocción, extracción, fermentación y germinación [14].

El modelo más utilizado para describir esta cinética es el modelo de Peleg (Ecuación 1), el cual es un modelo empírico dependiente de dos constantes ( $c_1$  y  $c_2$ ), que permite estimar el equilibrio en la hidratación cuando el tiempo es muy grande (Ecuación 2) [15]. Se ha determinado que el modelo de Peleg no describe la fase de retraso o fase lag en la absorción de agua al inicio de la hidratación, por lo que se han empleado otros modelos que identifican satisfactoriamente esta etapa, uno de los más utilizados es el modelo Sigmoide (Ecuación 3) el cual permite estimar el equilibrio en la hidratación, la velocidad y además define un factor relacionado con el tiempo de retraso en la fase lag. Este modelo ha sido aplicado en investigaciones recientes para describir la cinética de hidratación de genotipos que presentaron un crecimiento lento al inicio de la hidratación [14, 16, 17].

$$RCA(t) = RCA_0 + \frac{t}{c_1 + c_2 \cdot t} \quad (1)$$

Donde

$RCA(t)$  es la razón de crecimiento de área en función al tiempo. [-]

$RCA_0$  es la razón de crecimiento del área inicial de las semillas antes de la imbibición equivalente a 1. [-]

$C_1$  [min] y  $C_2$  [-] son las constantes matemáticas del modelo de Peleg.

Este modelo permite estimar la masa o contenido de humedad de equilibrio, por medio de un ajuste en el que el tiempo tiende a infinito (Ecuación 2).

$$RCA(eq) = RCA_0 + \frac{1}{c_2} \quad (2)$$

El modelo sigmoide utiliza la siguiente expresión

$$RCA(t) = \frac{RCA_{eq}}{1 + \exp[-k \cdot (t - \tau)]} \quad (3)$$

Donde

$RCA_{eq}$  es la razón de crecimiento de área de equilibrio. [-]

$\tau$  es una constante que describe el punto de inflexión relacionado a la fase lag. [min]

$k$  es una constante de la cinética de absorción de agua. [ $\text{min}^{-1}$ ]

El éxito del proceso de germinación se puede ver afectado por diversos factores externos, como lo son la cantidad de agua, la temperatura del medio en el que se encuentra, la posibilidad de absorber oxígeno y dióxido de carbono y la exposición a la luz [7]. Existen además los factores endógenos dentro de los cuales se encuentra la viabilidad del embrión, la cantidad de tejido de reserva y la dormancia, esta última se define como el bloqueo que tiene una semilla viable que le impide completar el proceso de germinación bajo condiciones favorables [18]. Además, la duración de cada una de las fases del proceso de germinación se

ve afectada por las propiedades de la semilla, tales como el tamaño, la cantidad de sustratos hidratables en el interior y la permeabilidad de la cubierta o testa [10].

Las pruebas de germinación son de gran importancia ya que cumplen el objetivo de cuantificar la fracción de semillas de una muestra capaces de producir plántulas denominadas con categoría “normal” que cuenten con todas sus estructuras esenciales para desarrollarse y sobrevivir las condiciones específicas del suelo o sustrato, lo que permite comparar el potencial de diferentes lotes de semillas [19].

La Asociación Internacional de Pruebas en Semillas (ISTA por sus siglas en inglés) menciona que las pruebas aplicadas a la germinación deben realizarse en condiciones estándar y controladas que permitan su fácil replicación y que no genere sesgos entre diferentes muestras; además, las pruebas de germinación permiten estimar un rendimiento máximo bajo condiciones óptimas, donde se controla la temperatura, humedad relativa, cantidad de luz, tipo de sustrato y cantidad de agua en el mismo por lo que no se puede esperar un rendimiento mayor del material en campo [4].

La norma ISTA también indica los días en los que se tiene que llevar a cabo el primer y el último conteo a partir del inicio de la prueba, para estandarizar la duración de esta. Para semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), estos conteos se hacen comúnmente en los días cinco y nueve desde que se inicia el ensayo [4]. Los resultados desde el primer conteo hasta el último se pueden categorizar en diferentes clases: la primera de ellas corresponde a las semillas germinadas “normales” donde se incluye el número acumulado de semillas que se han convertido en plantas con aspecto normal que cuentan con las estructuras esenciales de la planta (tallo, hojas y raíces). La segunda clase corresponde a las germinadas que producen plántulas “anormales”, donde se incluyen las semillas que han superado la etapa de germinación, pero son deficientes en el desarrollo de las estructuras esenciales, también se incluyen las plántulas descoloridas y las que presentan enfermedades por patógenos. La tercera categoría corresponde a las semillas “no germinadas”, las cuales no alcanzaron el proceso de germinación durante los días de prueba, estas se caracterizan por ser duras.

Finalmente se consideran las semillas que no alcanzaron la germinación y murieron durante la prueba, estas se caracterizan por tener una cobertura y consistencia suave [4].

Las pruebas de germinación desarrolladas en el CIGRAS responden a las especificaciones recomendadas por ISTA. Con respecto al medio de crecimiento de la semilla se utilizan comúnmente dos tipos, los cuales corresponden a papel toalla y sustrato, el tipo recomendado para *Phaseolus vulgaris* corresponde a la prueba sobre papel (TOP por sus siglas en inglés) en el que el material biológico se coloca sobre un papel de germinación con suficiente porosidad y capacidad de retención de agua [4]. El ensayo ISTA está basado en un total de cuatro repeticiones de 100 semillas por ensayo; sin embargo, la muestra se puede ajustar a la disponibilidad de la semilla. La semilla se debe colocar en el papel previamente humedecido con agua destilada, de manera uniformemente espaciada. La norma específica que la humedad relativa del ambiente debe ser suficiente para evitar que el papel de germinación pierda su contenido de humedad. Esta metodología se realiza comúnmente por pequeños productores de frijol, donde se coloca la semilla entre papeles toalla humedecidos sujetado por medio de mecates tipo piola [20]. Otro método implementado para determinar el porcentaje de germinación es el de cajas con sustrato, donde de manera similar al método de papel toalla, se coloca la muestra en cajas de vidrio, plástico o acero inoxidable (dimensiones aproximadas a 30 cm × 40 cm, con una profundidad de 15 cm). Este método requiere que el sustrato sea calentado mediante radiación solar para garantizar la desinfección del medio en el cual las plantas van a germinar [20].

## **2.2 Conceptos básicos, adquisición y procesamiento de imágenes digitales**

### **2.2.1 Conceptos básicos**

Una imagen se define como una función bidimensional  $f(x,y)$ , que cuenta con dos coordenadas espaciales, definidas por los ejes “x” y “y”. El valor de la función en cada uno de los puntos se conoce como amplitud la cual es una función que depende del brillo [21]. La imagen digital se caracteriza por convertir las variables espaciales y de amplitud a variables discretas. Donde cada par de coordenadas en la imagen corresponde a un pixel, el cual es la unidad más pequeña dentro de una imagen, mientras que el valor de la amplitud se

conoce como nivel de grises [21]. La intensidad es una función proporcional a la energía irradiada por la fuente física, como consecuencia debe ser un valor distinto de cero [22]. La función puede caracterizarse por dos componentes, la cantidad de iluminación de la fuente incidente (Iluminación) y la cantidad de iluminación reflejada por los elementos de la escena (Reflectancia) [22].

Una imagen digital posee una resolución espacial específica que se puede representar cuantitativamente a través de dos variables, una de ellas se conoce como tamaño de imagen (resolución de píxeles), la cual es una medida de la cantidad de píxeles que constituyen una imagen, normalmente se reconoce en megapíxeles (MP) o una expresión en función al ancho de la imagen o número de columnas en el eje “x” y el alto o número de filas en el eje “y”. Sin embargo, esta unidad por sí sola no representa las dimensiones espaciales abarcadas por la imagen, por lo que una de las variables utilizadas corresponde a la cantidad de píxeles por unidad de distancia (resolución espacial), normalmente definida en PPP o píxeles por pulgada [23].

Cada elemento o píxel de la imagen contiene información utilizada en la representación de la imagen, esto puede depender del número de canales correspondientes a diferente información y la profundidad de bit de la imagen donde cada píxel tiene un valor  $k$ , por lo que cada píxel puede presentar un valor de  $2^k$  diferente, comúnmente existen diferentes tipos de imagen en función a la cantidad de canales y profundidad de bits que dan como resultado diversos tipos de imagen: binario, escala de grises e imagen a color (RGB) [23].

### **2.2.2 Adquisición de imágenes**

El principio de la adquisición de imágenes digitales se basa en el sensor fotosensible, los cuales son componentes con la capacidad de recibir una entrada de luz del entorno y dar un voltaje proporcional como respuesta. En el caso de las cámaras digitales se utilizan comúnmente los sensores CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) y CCD (Charged Coupled Device), ambos corresponden a una matriz bidimensional de celdas independientes con capacidad de absorber la intensidad energética de la luz emitida y

reflejada por un elemento observado como una señal analógica y transformarla a una señal digital tanto en posición e intensidad [24]. La digitalización con respecto a la posición se conoce como *sampling* o muestreo, este proceso presenta un menor ruido cuando la resolución de píxeles es mayor, en el caso de la digitalización de la intensidad se conoce como “*quantization*” o cuantificación, este proceso puede presentar mayor ruido cuando se reduce la profundidad de bits. Los sensores CMOS son más sensibles a la cantidad de luz si se comparan con los CCD puesto que la digitalización se realiza de manera individual en cada una de las celdas; sin embargo, estos sensores se caracterizan por ser mucho más económicos de construir lo que permite utilizarse en cámaras fotográficas de bajo costo [25].

### 2.2.3 Corrección de imágenes

El uso de lentes fotográficos u objetivos con longitudes focales pequeñas provoca que los lentes tengan un mayor ángulo de visión, esto puede traer consecuencias debido a que el campo de visión del lente es más grande que el tamaño del sensor, por lo que se debe ajustar la imagen observada por el lente a las dimensiones del sensor. Esto provoca una distorsión geométrica conocida como distorsión de barril o distorsión negativa lo que genera curvas conforme los píxeles se alejan del centro óptico [26].

El principio de proyección geométrica de una cámara permite proyectar elementos presentes en el espacio proyectivo 3D a elementos del espacio proyectivo 2D conocidos como planos a partir de la proyección central, esto se logra al trazar una línea recta entre un punto en el espacio real 3D y un punto fijo en el espacio conocido como centro de la proyección [27]. El mismo principio es conocido como cámara oscura o cámara “*pinhole*” y es mencionado por Heikkilä y Silvén [28] el cual supone un elemento cerrado, donde la única fuente de luz corresponde a un orificio en una de las paredes. Producto del movimiento rectilíneo de los rayos de luz reflejados o emitidos por cualquier objeto en el espacio, cualquier rayo de luz reflejado de un punto del elemento real pasa a través del orificio conocido como centro óptico y se proyecta de manera invertida en un espacio conocido como plano de la imagen, por tanto, se puede afirmar que una imagen es el producto de infinitos rayos de luz emitidos y reflejados por un elemento real.

Los parámetros físicos de las cámaras se dividen comúnmente en extrínsecos e intrínsecos, según lo presenta Zhang [29]. Los parámetros extrínsecos representan la posición de la cámara en la escena real, por lo que permiten transformar los puntos reales en coordenadas de cámara. Además, las coordenadas de cámara son proyectadas en un plano a partir de los parámetros intrínsecos. Dentro de los métodos de calibración de cámara, se puede mencionar el propuesto por Zhang [29], en el cual se pueden estimar los parámetros intrínsecos y extrínsecos a partir de la observación de un patrón plano colocado en al menos dos orientaciones diferentes, las cuales se pueden obtener a partir de fotografías en diferentes posiciones al efectuar el movimiento de forma manual [30].

Cuando los puntos de un elemento real pertenecen a un mismo plano, si se trazan rayos que pasen por el centro óptico de la cámara se puede afirmar que hay una transformación proyectiva u homografía 2D entre el plano real y el plano de la imagen, esto se puede observar en la ecuación 4 [27]. El principio algebraico de la homografía 2D consiste en un mapeo de puntos en el cual existe una matriz singular H con dimensiones 3×3 en el que para cualquier punto representado por el vector x, su punto proyectado corresponde a  $x' = Hx$ .

$$s \cdot \begin{bmatrix} u \\ v \\ 1 \end{bmatrix} = A \cdot [R, t] \cdot \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \\ 1 \end{bmatrix} \quad (4)$$

En la ecuación 4, “s” corresponde a un factor de escala,  $[u, v, 1]^T$  son las coordenadas de la imagen proyectada,  $[R, t]$  son los parámetros extrínsecos (Matriz de Rotación y vector de traslación),  $[X, Y, Z, 1]^T$  son las coordenadas reales y A corresponde a la matriz intrínseca (Ecuación 5).

$$A = \begin{bmatrix} \alpha & \gamma & u_0 \\ 0 & \beta & v_0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (5)$$

Donde  $(u_0, v_0)$  son las coordenadas del punto principal,  $\alpha$  y  $\beta$  son los factores de escala en cada uno de los ejes de la imagen y el factor  $\gamma$  corresponde a la ortogonalidad entre los dos ejes de la imagen.

#### **2.2.4 Procesamiento de imágenes**

Normalmente se utiliza la escala de color RGB en imágenes a color para transmisión, representación y almacenamiento en computadoras, cámaras digitales y escáneres. La escala RGB está compuesta por tres ejes de coordenadas rectangulares correspondientes a cada uno de los colores primarios: rojo, verde y azul. Las imágenes a color real (RGB) cuentan con una profundidad de color de 24 bits, donde cada una de las bandas tiene una profundidad de 8 bits, por esta razón los píxeles presentan valores que van desde el rango de 0 a 255 en la escala de intensidad [23]. Esta escala se puede visualizar como un cubo, donde cada eje corresponde a una banda de color, el origen del plano corresponde al color negro donde los tres componentes de color presentan coordenadas iguales a cero, mientras que el color blanco se representa cuando las tres coordenadas tienen un valor de 255. Cuando existe una equivalencia de las tres coordenadas en los tres componentes de color, se forma una diagonal entre negro y blanco conocida como sombras de grises y cualquier desviación de esa diagonal corresponde a una tonalidad de color diferente [23]. El uso de la escala RGB en segmentación de colores puede ser difícil y poco intuitiva, ya que al modificar cualquier valor en la escala RGB, automáticamente se modifican características como el brillo, saturación y tono, todas al mismo tiempo. Existen escalas que son más adecuadas en aplicaciones de segmentación para procesamiento de imágenes, una de ellas es la escala HSB en la cual los colores se forman a partir de la combinación de tres diferentes componentes: Tono (Hue), Brillo (Brightness) y Saturación (Saturation). La representación geométrica de la escala de color corresponde a un cono invertido, donde el ángulo desde el centro geométrico de la base del cono corresponde al tono, la distancia vertical corresponde al brillo y la distancia horizontal desde el eje corresponde a la saturación [23].

### **2.2.5 Aplicación de procesamiento de imágenes en germinación de semillas**

El procesamiento de imágenes por computadora es una técnica desarrollada a partir de la necesidad de simplificar el análisis de extensas cantidades de imágenes, principalmente en el área de ciencias médicas. Posteriormente ésta técnica fue adoptada por distintas disciplinas las cuales aplicaron los principios en la solución de problemas específicos y en conjunto se implementaron mejoras hasta crear una herramienta potencial en el manejo de grandes bases de datos [31].

El uso de imágenes como método no destructivo para cuantificar diversas propiedades de semillas ha sido ampliamente utilizado en varios estudios. Dentro de las técnicas más conocidas se encuentra la visión de máquina, esta permite adquirir diversas variables externas de las semillas como lo son tamaño, forma, color y textura [32]. Otra técnica de estudio a partir de imágenes corresponde a la espectroscopia, la cual se enfoca en la emisión y detección de luz con el fin de estudiar propiedades como lo son la composición química y posible daño por insectos. Existen múltiples técnicas como lo es el análisis de imágenes hiperespectrales y térmicas, además del uso de rayos X [32].

Estudios elaborados por investigadores de la Universidad Politécnica de California establecen una metodología en el año 2004 que permite diferenciar las semillas germinadas de las no germinadas a partir del análisis de imágenes, donde se observaron diferentes cambios en la longitud y el área proyectada de las muestras en imágenes fotográficas [33]. Se instaló una cámara fotográfica sobre la bandeja de germinación donde se colocaron 3 hileras de 10 semillas y se efectuó la captura de imágenes en intervalos de una hora durante 120 horas. El procesamiento de imágenes se llevó a cabo con programas de procesamiento de imágenes desarrollado por los autores [33].

Investigaciones han logrado diferenciar las 3 fases de imbibición a partir del procesamiento de imágenes, en conjunto con el análisis estadístico. En un estudio específico elaborado en semillas de brócoli, rábano, lentejas y zanahoria; se estudió el efecto de la variación de condiciones ambientales (temperatura y humedad). Los autores definieron el final de la

primera fase cuando el crecimiento del área de la semilla deja de ser significativo ( $p < 0,05$ ) lo que da inicio a la segunda fase, que una vez que el cambio en el crecimiento en el área proyectada vuelve a ser considerable se llega a la fase III de germinación. Los autores definieron el final de la tercera fase hasta que la longitud de la radícula alcanzara una elongación de 1,5-2 mm [34].

La aplicación del procesamiento de imágenes para evaluar la germinación es un campo que ha tenido muchos avances en los últimos años. En el año 2004, la agencia francesa de evaluación de la germinación (“French Seed Testing Station”) diseñó un prototipo de pruebas de germinación [2]. Dicho equipo consiste en una cámara de germinación con ambiente controlado que cuenta con un sistema automatizado para apertura de la compuerta y así permitir la toma de imágenes, que posteriormente son analizadas con el software ImageJ [2]. El análisis de imágenes consistió en la segmentación de las semillas del fondo de la imagen, con el fin de medir el área bidimensional. Luego, por medio de cambios en la inercia, específicamente al cuantificar la protusión de la radícula, se logró definir un umbral bajo el cual la semilla se define como germinada. El prototipo fue elaborado con el objetivo de brindar información automatizada para su uso en pruebas de germinación y vigor, además de estudios genéticos [2].

En el 2010, un grupo de investigadores en Holanda desarrolló un método denominado GERMINATOR, el cual utiliza dos métodos de segmentación por medio de imágenes para identificar el área efectiva de la semilla y de esta manera cuantificar el crecimiento en la germinación. El estudio presenta diferentes paquetes el cual incluye el procesamiento automático de datos y el análisis de los mismos en *Arabidopsis thaliana*. El estudio fue aplicado en semillas bajo diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) como tratamiento, y además se realizó un ajuste de la curva de crecimiento con modelos matemáticos para comparar los resultados obtenidos [3]. Con dicho procedimiento se han ejecutado análisis a gran escala para entender la genética y genómica que controla la germinación en distintos tratamientos [5].

Comúnmente el procesamiento de imágenes implementado en el estudio de la germinación de semillas se compone de diversos pasos, dentro de los cuales se pueden mencionar cuatro importantes. El primero de ellos consiste en una mejora de imagen y contraste, en la cual se ajusta la luminosidad de la imagen y se hace un relleno de pixeles para hacer más suaves los cambios en la imagen [35]. En el segundo paso se debe realizar un proceso de segmentación, donde a partir de los valores de los pixeles en función al color capturado por la cámara fotográfica se pueden segmentar espacios deseados correspondientes a cada una de las semillas estudiadas. El tercer paso aplicado corresponde a la binarización de las imágenes, en este proceso la imagen RGB es convertida a escala de grises, luego para separar el fondo de la semilla se convierte la imagen a binario, en donde los pixeles toman valores de 1 y 0 [3]. En el cuarto y último paso se debe hacer un análisis de partículas, donde el programa cuantifica y extrae los valores de pixeles de la imagen, se introducen valores de calibración de longitud y área para cada pixel, lo que permite determinar variables como lo son el área, forma, longitud [35], esto se logra al estudiar los cambios en la inercia en los ejes “x” y “y” [2].

#### **2.2.6 Uso de microcontroladores y actuadores para desarrollo de prototipos**

Existen componentes electrónicos denominados microcontroladores, estos tienen un gran potencial de uso en el prototipado de equipos con diferentes funcionalidades. Los microcontroladores se pueden caracterizar por ser de bajo costo como lo es Arduino, este se define como una pequeña computadora que tiene la capacidad de ser programada para procesar entradas y salidas entre el microcontrolador y otros dispositivos [36]. Arduino es conocida por ser una plataforma física e integrada de computación que permite la interacción con el entorno por medio del uso de hardware (microcontrolador) a partir de la aplicación de software de acceso libre desarrollado a partir del lenguaje C (Arduino Integrated Development Environment) para reducir el uso de cables y componentes en circuitos eléctricos en la creación de prototipos, sustituyéndolos por líneas de código [37]. La placa de Arduino cuenta con un Microprocesador ATmega328P, un puerto USB de comunicación serial, un regulador de voltaje de 5V y conexiones de poder (5V, 3.3V y GND), además cuenta con 14

pines Entrada/Salida (I/O por sus siglas en inglés) y 6 entradas analógicas [38]. Dentro de las placas de Arduino más utilizadas en la actualidad, se puede mencionar el Arduino UNO, Leonardo y Mega 2560 los cuales presentan diferencias en función a las aplicaciones que se desea llevar a cabo [38].

Los microcontroladores tienen la capacidad de recibir señales provenientes de diversos sensores y con base en estas, tomar decisiones con respecto a diversas funciones dentro de las cuales se puede mencionar el accionamiento de actuadores, estos son componentes capaces de transformar la energía recibida para realizar un trabajo a partir de funciones mecánicas, ya sea de cambios en la posición y velocidad. Se clasifican en función al tipo de energía que reciben, la cual puede ser de origen mecánico, neumático o eléctrico y por el tipo de movimiento que generan el cual puede ser lineal o rotatorio. Comúnmente los más utilizados son los actuadores eléctricos debido a que la alimentación de la red de distribución eléctrica es la más accesible [39]. Los actuadores eléctricos se clasifican en función al tipo de energía con la que se alimentan, ya sea corriente directa, corriente alterna y por el tipo de movimiento que generan ya sea continuo o por pulsos. Los motores paso a paso funcionan con el principio físico fundamental de los actuadores de corriente directa, con la diferencia de que cuentan con un conjunto de bobinas llamadas fases, donde a partir de una serie de impulsos eléctricos se generan desplazamientos angulares discretos, lo que permite precisión en el posicionamiento y velocidad del eje, por esta razón son comúnmente utilizados en aplicaciones donde se requiere una alta precisión del movimiento [39].

Se han elaborado equipos que tienen una aplicación potencial en el estudio de crecimiento de semillas y plántulas por medio de procesamiento de imágenes controlados por microcontroladores de bajo costo que permiten emitir respuestas de diversos actuadores eléctricos, dentro de los cuales se encuentran Arduino y motores de paso [40]. Se ha creado un equipo rotativo que con la capacidad de mostrar en 4 diferentes fases camaras de semillas a una cámara fotográfica, la toma de imágenes brinda la oportunidad de registrar y analizar la dinámica de desarrollo de plántulas [40]. Este tipo de prototipos presenta múltiples ventajas

ya que la compra de equipo para la toma de imágenes por tiempos prolongados puede ser muy costosos y, en consecuencia, volver poco rentables los estudios académicos.

### CAPITULO 3. METODOLOGÍA

El proyecto se ejecutó en cinco fases ligadas a cada uno de los objetivos específicos y el análisis de los resultados. Las fases corresponden a: diseño y construcción del prototipo, análisis de imágenes, desarrollo de curvas de crecimiento, comparación de curvas con germinación convencional y análisis estadístico de resultados (Figura 1).

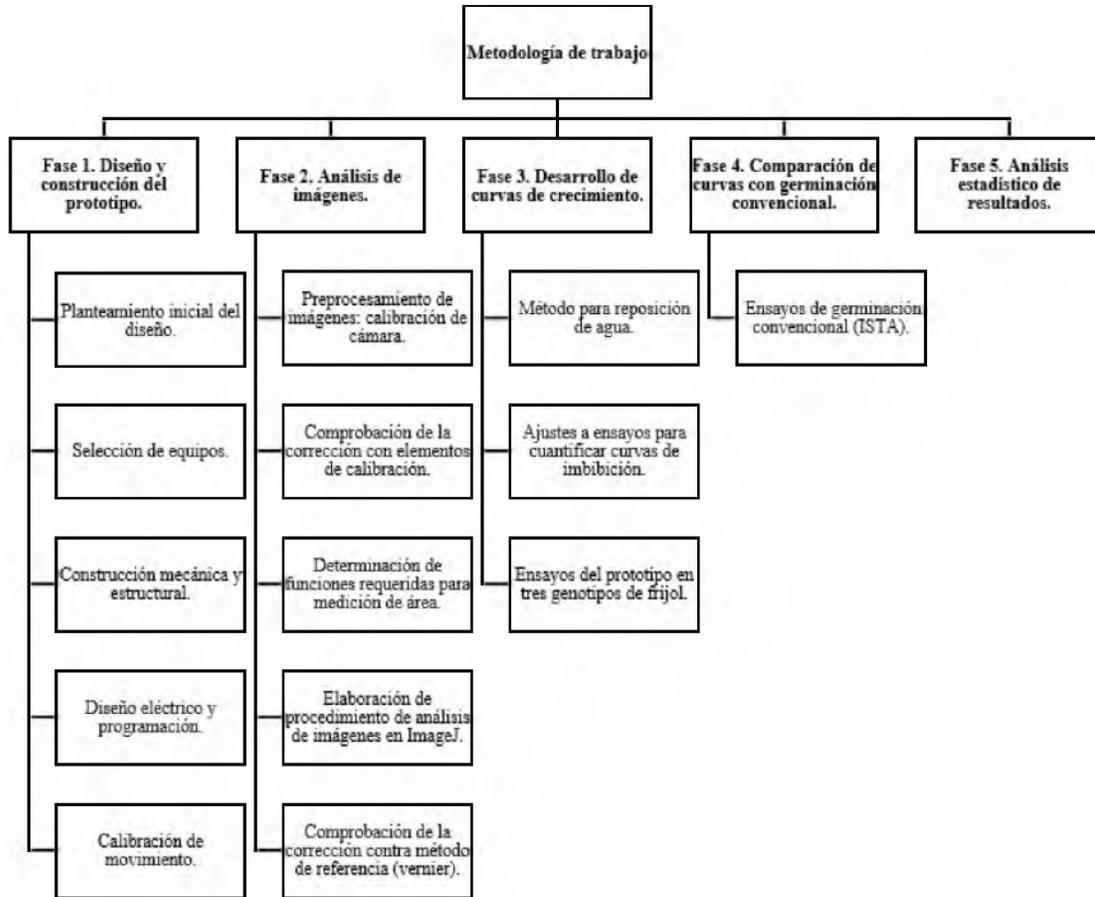


Figura 1. Diagrama de la metodología ejecutada en el proyecto.

### 3.1 Diseño y construcción del prototipo

#### 3.1.1 Planteamiento inicial del diseño

Se planteó el diseño de un prototipo con la capacidad de desplazar una cámara fotográfica a través de diferentes posiciones, por medio de un sistema de transmisión de movimiento, para tener la capacidad de estudiar una mayor cantidad de semillas si se compara con tener la misma cámara en una posición fija.

#### 3.1.2 Selección de equipos

Para cumplir con el planteamiento inicial del diseño, la cámara fotográfica se seleccionó en función de la resolución de pixeles y la amplitud de visión del lente ya que a partir de estas variables en conjunto con la altura a la que se posiciona la cámara con respecto al plano de observación permiten definir el nivel de detalles de los elementos a estudiar.

Para el mecanismo de transmisión de movimiento, se seleccionó el sistema de tornillo de avance y rosca, el cual es comúnmente utilizado en impresoras 3D para movimiento lineal debido a su alta precisión y resolución en el movimiento. Para garantizar la rotación del tornillo de avance se requirió un motor, seleccionado en función al par torsional máximo requerido para desplazar una masa específica, al considerar el diseño planteado, esta fuerza debe ser suficiente para vencer la fricción estática para iniciar un movimiento rectilíneo uniforme (aceleración=0) (Ecuación 6).

$$F - m \cdot g \cdot \mu = 0 \quad (1)$$

Donde,

F es la fuerza requerida para iniciar el movimiento [N].

m es la masa del soporte móvil y la cámara [kg].

g es la aceleración de la gravedad [m/s<sup>2</sup>].

μ es el coeficiente de fricción entre las ruedas y el riel [-].

El par torsional mínimo requerido para desplazar la carga se determinó a partir de la metodología de tornillos de potencia del libro Diseño de Ingeniería Mecánica de Shigley (2008) [41] donde se requiere conocer las especificaciones del tornillo de avance y el factor de fricción entre el tornillo de avance y la rosca (Ecuación 7).

$$T_R = \frac{F \cdot d_m}{2} \left( \frac{l + \pi \cdot f \cdot d_m \cdot \sec \alpha}{\pi \cdot d_m - f \cdot l \cdot \sec \alpha} \right) \quad (2)$$

Donde,

$T_R$  es el par torsional requerido para desplazar la carga [N m].

$d_m$  es el diámetro medio de la rosca [m].

$l$  es el avance del tornillo [m].

$f$  es el factor de fricción entre el tornillo y la rosca [-].

$\alpha$  es la mitad del ángulo de la rosca ACME ( $^{\circ}$ ).

Para la elaboración del prototipo se requirió también del desarrollo de una estructura que permita la fijación del mecanismo de movimiento y la cámara a una altura adecuada con respecto al área donde se desea colocar los elementos a los que se quiere tomar registrar fotografías. También se consideró la necesidad de contar con una base para darle estabilidad y nivelación al prototipo.

### **3.1.3 Construcción mecánica y estructural**

El ensamble del sistema de movimiento y la estructura del prototipo se realizó en el Laboratorio Técnico Mecánico de la Escuela de Física, el Taller de Soldadura de la Oficina de Servicios Generales (OSG) y el CIGRAS en la Universidad de Costa Rica.

### **3.1.4 Sistema de control y programación**

Se utilizó la plataforma electrónica prototípica Arduino para el control del sistema de movimiento ya que sus microcontroladores son de bajo costo, presentan gran disponibilidad en el mercado local y permiten su programación simple por medio del entorno de desarrollo Arduino IDE y librerías de acceso libre.

### **3.1.5 Calibración de movimiento**

Se llevaron a cabo pruebas de medición de distancia recorrida por el soporte móvil producto de la rotación del motor, se hicieron pruebas a cuatro diferentes ángulos de rotación del tornillo de avance:  $360^\circ$ ,  $720^\circ$ ,  $1440^\circ$ ,  $2880^\circ$  en ambas direcciones del movimiento. Se realizaron 25 repeticiones por cada ángulo con el fin de verificar la precisión de las revoluciones programadas al motor y la exactitud del tornillo de avance.

El método de medición corresponde a la comprobación por medio de fotografías, para esto se colocó un escalímetro como elemento de medición de referencia en la base del prototipo y se tomaron fotografías cada vez que el soporte recorría la distancia indicada por las revoluciones del motor, posteriormente se ingresaron las imágenes a ImageJ y se trazó una línea horizontal a partir de la coordenada central de la imagen hasta la lectura del escalímetro, tal y como se muestra en la Figura 2, donde en (a) se muestra la posición 1 del motor con una medición de 8,1 mm mientras que (b) presenta la lectura una vez que el motor se desplazó  $360^\circ$  con un valor de 8,9 mm. La medición realizada por medio de fotografías se verificó con el uso de una plomada de acero y papel blanco, donde se marcó un punto en el papel donde se ubicó la punta de la plomada en cada una de las posiciones de la cámara y se midió la distancia entre puntos con el escalímetro.

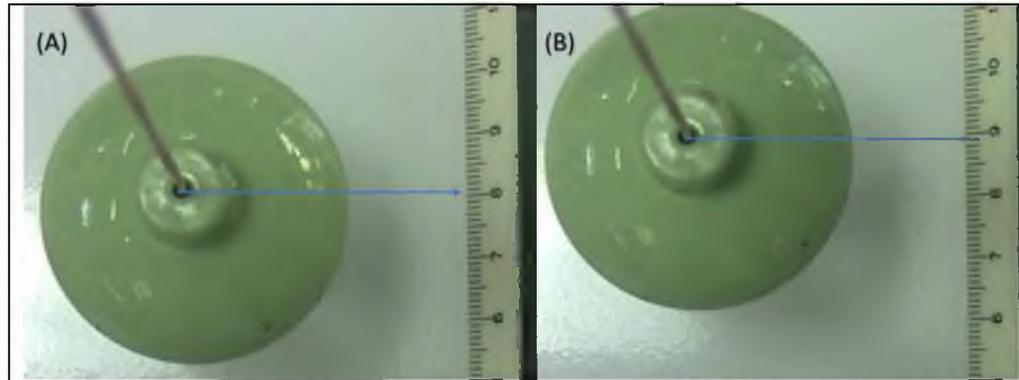


Figura 2. Comprobación de movimiento por fotografías. (a) posición 1 del motor. (b) posición 2 luego de un desplazamiento de  $360^\circ$ .

Finalmente, se realizó una prueba para determinar la vulnerabilidad de las mediciones realizadas con la cámara por la repetitividad del movimiento del soporte móvil. Para esto se tomaron fotografías a cuadrados de  $100 \text{ mm}^2$  de área, colocados en posiciones fijas en ocho columnas en diferentes posiciones a lo largo del tornillo de avance, cada una con un total de 10 filas. Se tomó una fotografía a cada columna por separado cuando la cámara estuviera en posición ortogonal a esta. Una vez finalizada la captura para todas las columnas, la cámara regresó a su posición inicial para llevar a cabo el recorrido nuevamente. Esta prueba se efectuó para un total de 10 repeticiones de fotografías por columna. Por medio de ImageJ se cuantificó la posición con el eje x, el área, el ancho y largo de cada elemento en todas las columnas. Se realizó un análisis de varianza con la prueba Tukey a un 5% de significancia para cada una de las columnas para determinar la variación de las mediciones mencionadas anteriormente, en las 10 repeticiones. Esto se realizó, puesto que se quería conocer si el movimiento del cabezal o soporte móvil a través del tornillo de avance provocaba perturbaciones en la posición que afectarían la posición de la cámara y, por tanto, el tamaño y forma de los elementos observados.

## 3.2 Procesamiento de imágenes

### 3.2.1 Pre procesamiento de imágenes: Calibración de cámara

A partir de las imágenes adquiridas con la cámara fotográfica se observó un efecto de distorsión del lente que afecta las fotografías conforme los pixeles se alejan del centro geométrico de la imagen, esto puede generar un efecto significativo en la medición de elementos observados en la fotografía a partir de procesamiento de imágenes. Por esta razón se aplicó una corrección geométrica a las imágenes obtenidas, para remover el efecto de distorsión de “barril” de la proyección. Para este proceso se utilizó la herramienta Image Processing Toolbox de Matlab R2017a la cual permite adquirir los factores intrínsecos, extrínsecos y coeficientes de distorsión que son utilizados para corregir la distorsión de las imágenes. Esto se logra a partir del procesamiento de varias fotografías de una matriz de calibración como la que se muestra en la Figura 3. Al conocer las dimensiones de cada uno de los cuadrados, el programa detecta los puntos que unen los cuadrados y obtiene el error entre la posición observada en la imagen y la posición con respecto a la escena real.

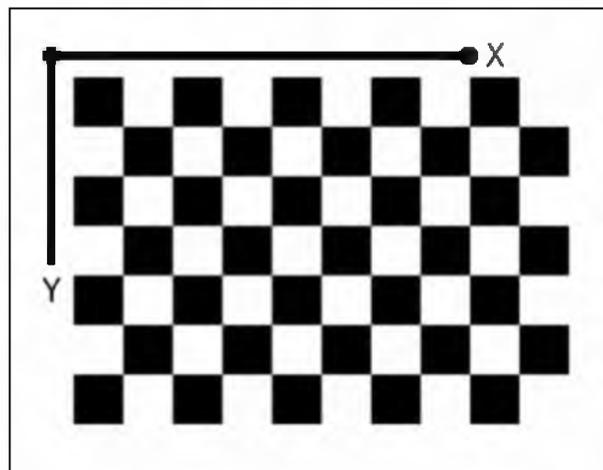


Figura 3. Matriz de calibración geométrica de imágenes.

### 3.2.2 Comprobación de corrección con elementos de calibración

Al determinar la amplitud de visión del prototipo con las especificaciones de la cámara y la altura a la que esta se colocó con respecto al plano de observación, se definió el espaciamiento de 10 columnas con un total de 10 semillas por columna. Estos espaciamientos se definieron para evitar la posible interferencia cuando las semillas germinen. Se realizó una prueba de calibración con elementos de forma y área conocida los cuales corresponden a elementos bidimensionales impresos en papel, con el fin de definir una escala general de medición (píxeles/mm). Las especificaciones de las figuras utilizadas se muestran en el Cuadro 1.

Adicionalmente, se determinó la variabilidad en la medición con la cámara, con respecto a la posición, tanto para las columnas (movimiento del motor) y las filas (posición del elemento con respecto a la cámara fotográfica). Se colocaron matrices de 100 elementos impresos en papel, con figuras mencionadas en el Cuadro 1 en la base del prototipo y se tomaron fotografías a cada una de cada una de las 10 columnas. Posteriormente se cuantificó área, ancho y largo de cada uno de los 10 elementos de la columna. Se realizó un análisis de varianza con la prueba de Tukey a un 5% de significancia para determinar si las variables cuantificadas presentaron diferencias significativas en ambas direcciones.

Cuadro 1. Especificaciones de elementos bidimensionales utilizados en la calibración.

<b>Figura</b>	<b>Área [mm<sup>2</sup>]</b>
Cuadrado	400
	100
	25
Círculo	200
	100
	25

De igual manera, se hizo una prueba con material biológico para observar el mismo efecto. Se colocó una muestra de 10 semillas de frijol en la primera posición del tornillo de avance y se tomó una fotografía de estas. Seguidamente se movieron las mismas semillas a las siguientes posiciones hasta alcanzar las 10 posiciones de la cámara. De esta manera se determinó la precisión del prototipo al medir el mismo material biológico en diferentes posiciones a lo largo del movimiento de la cámara.

### **3.2.3 Determinación de funciones requeridas para medición de áreas con procesamiento de imágenes y la elaboración del procedimiento automático**

Para el procesamiento de imágenes se implementó la secuencia de pasos enumerados en la Figura 4. A partir de las imágenes adquiridas con la cámara se hizo una selección de imágenes y se ordenaron de manera alfanumérica para mantener la secuencia correcta en el procesamiento de imágenes. Seguidamente se llevó a cabo la corrección geométrica descrita anteriormente para disminuir el error en las mediciones. Las imágenes presentan muchos espacios que no tienen relevancia para la segmentación y en consecuencia pueden afectar la precisión de esta, por tal razón se seleccionó un área de interés. Se realizó una segmentación por medio de color para poder cuantificar los pixeles correspondientes al área de los elementos en estudio contrastados con el fondo. Se demostró que la segmentación por color no es suficiente para mantener una cuantificación precisa, por lo que se utilizó una binarización de la imagen y se aplicaron algoritmos de morfología binaria para reducir el ruido en la medición. La unidad de escala y medida en las imágenes digitales corresponde a pixeles, por tal razón se determinó la resolución espacial para conocer cuántos pixeles puede contener un milímetro. El último paso consistió en realizar un análisis de partículas que permita contar y cuantificar las características de los elementos estudiados y almacenar los resultados. Se elaboró un macro en el paquete de procesamiento de imágenes FIJI, el cual es una distribución mejorada del programa ImageJ. Se utilizaron las funciones predeterminadas del programa para cada uno de los pasos de la Figura 4.

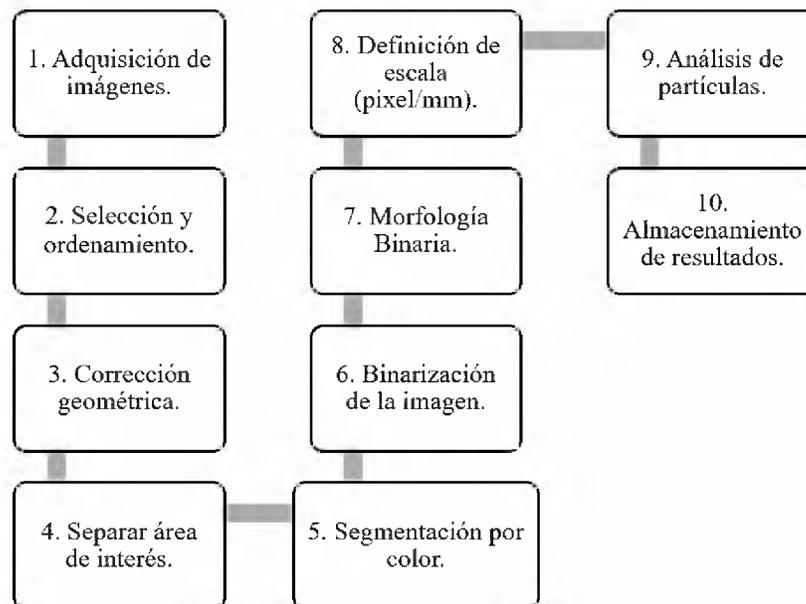


Figura 4. Secuencia de pasos implementado en el procesamiento de imágenes.

### 3.2.4 Comprobación de corrección contra método de referencia (vernier)

Para finalizar la comprobación de la precisión de la cámara seleccionada y la corrección geométrica, se efectuó una prueba para comparar la medición de la imagen contra la medición manual donde se utilizaron muestras de 100 semillas por genotipo a las cuales se les midió previamente el largo y el ancho con un vernier digital Truper (Código 14388, Clave: Calid-6MP) con capacidad máxima de 150 mm, capacidad mínima de 0,01 y una precisión de  $\pm 0,05$  mm. Las semillas fueron colocadas en el mismo orden que se midieron manualmente y se realizó la misma medición de las dimensiones de manera automática con procesamiento de imágenes. A partir de estos resultados se determinó la relación entre ambas mediciones y esta se validó por medio del análisis de correlación de Pearson.

## 3.3 Desarrollo de curvas de germinación

### 3.3.1 Metodología de reposición de agua

A diferencia de la metodología de germinación convencional, la cual se coloca dentro de cajas y se cubre con plásticos para evitar la pérdida de agua, la prueba de germinación con el prototipo requiere una constante reposición de agua, ya que existe pérdida tanto por absorción

de las semillas como por difusión al ambiente de la cámara. Por esta razón, se llevaron a cabo ensayos para medir la pérdida de agua producto de la evaporación generada dentro de la cámara de germinación. Se utilizaron bandejas de plástico con dos papeles de germinación azul (Anchor paper Co. Minnesota, USA, 15,4 × 46 cm) y se agregó un total de 200 ml de agua, se colocó la bandeja dentro de la cámara de germinación y se efectuaron mediciones de masa cada 15 minutos para estimar el peso de agua evaporado al ambiente a una temperatura de 30°C con luz constante a una intensidad de 770 Lux en el rango visible, a una distancia de 55 cm. Se utilizó una balanza BOECO modelo BPS 51 plus con una precisión de  $\pm 0,5$  g.

### **3.3.2 Ajustes a ensayos para cuantificar curvas de imbibición**

Para realizar los ensayos de germinación en el laboratorio con el prototipo, se colocaron muestras de 30 semillas por genotipo sobre una doble capa del papel de germinación azul utilizado en la sección 3.3.1 previamente humedecido con 200 mL de agua destilada dentro de un recipiente de plástico. Cada ensayo se llevó a cabo por periodos de 24 horas, con captura de imágenes cada 15 minutos. Estas pruebas se hicieron por triplicado (experimentos independientes espacialmente) y se reportaron los valores promedio. Todas estas pruebas se efectuaron dentro de una cámara de incubación de semillas Percival (AR-41L) programada a una temperatura de 30°C en luz continua. Se colocó un HOBO Onset MX2301 para monitorear la temperatura y humedad relativa dentro de la cámara y un sensor para monitorear la intensidad lumínica modelo LS-BTA, este cuantifica el nivel de iluminación (Lux) entre las longitudes de onda de 400 – 800 nm y cual cuenta con una precisión de  $\pm 2$  Lux.

### **3.3.3 Ensayos del prototipo en tres genotipos de frijol**

Se utilizaron semillas proporcionadas por el Programa de Leguminosas de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno. Se trabajó con los genotipos Brunca, Cabécar y Nambí, las cuales fueron obtenidas en el mismo lote bajo las mismas condiciones. A cada genotipo se le determinó el contenido de humedad inicial, la temperatura y la densidad aparente con el equipo Grain Analysis Computer de la marca Dickey John modelo GAC

2500-UGMA. Se ejecutaron tres ensayos de 50 semillas por genotipo por un periodo de 24 horas para cuantificar el proceso de imbibición. Se utilizaron los modelos matemáticos de Peleg (Ecuación 1) y Sigmoide (Ecuación 3) para describir la cinética de crecimiento del área observada por procesamiento de imágenes.

### **3.4 Comparación de las curvas de crecimiento con la prueba de germinación convencional**

#### **3.4.1 Ensayos de germinación convencional**

Los ensayos se realizaron de acuerdo con las especificaciones de ISTA [4] donde se colocaron cuatro repeticiones de 100 semillas por repetición sobre papel de germinación azul utilizado en la sección 3.3.1 y 3.3.2, espaciadas uniformemente y se introdujeron en cajas plásticas herméticas con un total de 150 mL de agua destilada por caja, las mismas se cubrieron con una bolsa de plástico transparente y se almacenaron en la misma cámara de incubación mencionada en el punto 3.3.2 para preservar la humedad relativa dentro de la caja. Esto disminuye la pérdida de agua ya que es necesario garantizar que la humedad del papel de germinación sea constante durante todo el intervalo de tiempo en que la semilla está absorbiendo agua. Para cada experimento se monitoreó la temperatura y humedad relativa dentro de las cajas por medio de un HOBO Onset MX2301. Adicionalmente, se efectuaron inspecciones visuales a diario para observar el estado general de la muestra, reponer agua manualmente al sistema y asperjar uniformemente solución antifúngica Amistar 50 WG (Metoxiacrilato Azoxystrobin con una concentración de 5%) en caso de notar presencia de hongos. Se hicieron conteos manuales a los días 5 y 9 de iniciada la prueba y a partir de observaciones se determinó y reportó el porcentaje de plántulas normales (Figura 5a), anormales (Figura 5b), semillas no germinadas y muertas (Figura 5c) de la prueba. Cada prueba se realizó por duplicado (experimentos independientes espacial y temporalmente) y se reportaron los valores promedio y desviaciones de ambos experimentos.

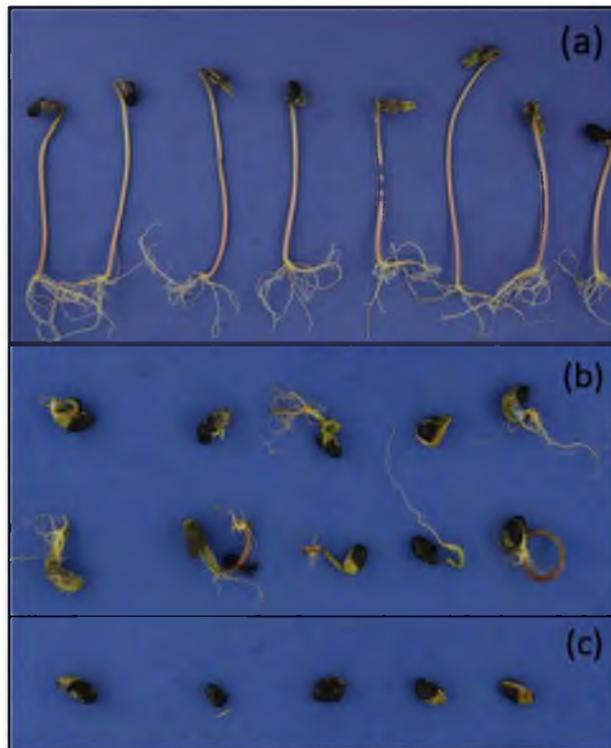


Figura 5. Categorías de prueba de germinación convencional. (a) plántulas normales, (b) plántulas anormales, (c) semillas no germinadas y muertas.

### 3.5 Análisis estadístico de resultados

Los resultados de las pruebas se almacenaron en hojas de cálculo y se procesaron en el programa Infostat 2018 y por medio de análisis estadísticos se identificaron las diferencias significativas entre los elementos observados con un análisis de varianza, al cual se le realizó un análisis post hoc de Tukey a un nivel de significancia del 5%, de igual manera para los ensayos de germinación convencional se hizo una prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis. Los gráficos se elaboraron en el programa Sigmaplot 12 donde se efectuaron los análisis de regresión y las relaciones entre variables.

## **CAPITULO 4. RESULTADOS**

---

### **4.1 Diseño y construcción del prototipo**

#### **4.1.1 Selección de equipos**

Se seleccionó una cámara ARDUCAM mini modelo OV5642, la cual es compatible con el microprocesador de Arduino Uno Rev3. Esta cámara presenta una resolución máxima de 5MP, utiliza un lente con ángulo de 90° y una distancia focal de 4 mm, sin embargo, el sensor de la cámara tiene un tamaño de 1/4" por lo que este limita la amplitud de visión del lente y en consecuencia reduce el ángulo de observación, esto da como resultado un ángulo efectivo de 56° en el eje horizontal y 42° en el eje vertical. Estas son características importantes para definir la amplitud de observación y el nivel de detalle de los elementos observados. El voltaje de operación de la cámara puede variar de 3,3 a 5,0 V por lo que se puede alimentar directamente con el Arduino sin necesidad de una fuente voltaje independiente. Las dimensiones de la cámara hacen que sea un componente con bajo requerimiento de espacio si se compara con otros dispositivos para adquisición de imágenes, además su peso hace que el mecanismo de transmisión de movimiento requiera un menor torque de operación. El rango de temperaturas utilizadas en esta investigación se encuentra dentro de las especificaciones recomendadas por el fabricante (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especificaciones de la cámara ARDUCAM mini modelo OV5642.

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Resolución de pixeles máxima	2596 × 1944
Longitud focal [mm]	4
Tamaño del sensor	1/4"
Ángulo efectivo del lente [°]	Horizontal 56 – Vertical 42
Voltaje [V]	3,3 – 5,0
Dimensiones [mm]	34 × 24
Masa [g]	20
Temperatura de operación [°C]	-10 a 55

Para aplicaciones de visión de computadora, la calidad de las imágenes es un factor determinante para obtener resultados precisos que se aproximen a los fenómenos que ocurren en la realidad. Por tal razón, la selección de la cámara y sus propiedades es de gran importancia. Al tener una mayor resolución de pixeles en una imagen un elemento se puede ver representado por una mayor cantidad de pixeles, lo que hace más precisa la cuantificación de propiedades de tamaño y forma bidimensional [42]. Negativamente, una resolución de pixeles mayor implica mayor requerimiento de almacenamiento y tiempos mayores de procesamiento, principalmente si las bases de datos son grandes [42], por esto no siempre es deseable o posible trabajar con una alta resolución.

La aplicación de cuantificar los cambios en área y forma durante el proceso de imbibición y germinación de semillas por medio de procesamiento de imágenes se ha desarrollado de manera precisa con cámaras con resoluciones que van desde 1288 × 1032 (1.3 MP) [43] hasta 3872 × 2592 (10 MP) [5]. En el caso del presente trabajo se utilizó una cámara de 5 MP con una resolución de 2596 × 1944 pixeles, lo que puede considerarse como una resolución baja si se compara con la capacidad de las cámaras de gama semiprofesional y profesional, pero que los resultados muestran precisión y exactitud aceptables en los parámetros cuantificados, así como se mostrará más adelante.

Se cuantificó que la fuerza requerida por el motor para iniciar el desplazamiento del soporte de la cámara a una velocidad constante corresponde a 0,735 N (Cuadro 3). Esta se obtuvo a partir de la masa de la cámara y el soporte móvil, dando como resultado aproximadamente 300 g, correspondiente a 20 g de la cámara y 280 g para el conjunto de base, ruedas y tornillos del soporte móvil (Cuadro 3). Para realizar la sumatoria de fuerzas en el eje vertical, se consideró que las únicas fuerzas que actuaron sobre el sistema fueron el peso del soporte (2,943 N) y su correspondiente reacción normal, tratándose de un sistema estático (no existe movimiento en el eje vertical), se puede afirmar que fuerza la normal es igual al peso del elemento. Para determinar la fuerza de fricción se utilizó un coeficiente de fricción estático de 0,25 correspondiente a la resistencia de la rodadura de las ruedas plásticas sobre el acero [44].

Cuadro 3. Datos utilizados para el cálculo de fuerza requerida para desplazar el sistema móvil.

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Masa [kg]	0,300
Aceleración [m/s <sup>2</sup> ]	9,810
Peso [N]	2,943
$\mu$ [-]	0,250
Fuerza de fricción [N] (Ecuación 6)	0,735

El par torsional requerido para que el motor pueda desplazar el soporte móvil venciendo la fuerza de fricción corresponde a  $2 \times 10^{-3}$  N·m (Cuadro 4). Para este cálculo se utilizaron las especificaciones del tornillo de avance. Este consiste en un tornillo de acero con un diámetro externo de 8 mm, un paso diametral de 2 mm y un avance de 8 mm/revolución (Cuadro 4). Al tratarse de un tipo de rosca ACME, a diferencia de una rosca cuadrada, esta presenta una forma trapezoidal con un ángulo de rosca “ $2\alpha$ ” de 29°. Este ángulo se requiere en el cálculo para poder determinar la inclinación de la carga normal hacia el eje del tornillo, puesto que esta variable incrementa la fuerza de fricción. El coeficiente de fricción entre el tornillo de

avance y rosca ACME se seleccionó en función de los materiales de ambas partes, se consideró acero seco como material del tornillo y bronce como material de la rosca, por lo que el valor corresponde a 0,23 [41] (Cuadro 4).

Cuadro 4. Datos utilizados para el cálculo del par torsional requerido.

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Diámetro medio [mm]	7,00
Paso diametral [mm]	2,00
Avance [mm]	8,00
Ángulo de rosca [°]	14,50
Fricción del tornillo [-]	0,23
Par torsional requerido [Nm] (Ecuación 7)	$2 \times 10^{-3}$

Se seleccionó un motor de pasos modelo SM-42BYG011-25 el cual permite un torque nominal de 0,23 N·m (Cuadro 5), el cual es mayor al requerido para desplazar el soporte móvil. La resolución del motor corresponde a 1,8° por paso. Este motor requirió una fuente de voltaje independiente de 12 V con una corriente eléctrica de 0,33 A.

Cuadro 5. Especificaciones del motor de pasos modelo SM-42BYG011-25.

<b>Característica</b>	<b>Valor</b>
Ángulo de paso [grados]	1,80
Fases	2
Voltaje [V]	12,00
Corriente eléctrica [A]	0,33
Par torsional máximo del motor [N·m]	0,23
Diámetro del eje [mm]	5,00

#### 4.1.2 Construcción mecánica y estructural

El mecanismo de movimiento compuesto por el tornillo de avance y rosca permite aumentar el área de trabajo al desplazar la cámara por distintas posiciones en lugar de estar en una posición fija. El tornillo de avance se colocó sobre dos rodamientos de balines para eje lineal en los extremos, estos tienen un diámetro de 8 mm. El eje del motor tiene un diámetro de 5 mm (Cuadro 5); este se unió al tornillo de avance por medio de un acople elástico de eje helicoidal de 5 mm × 8 mm. La rosca ACME se unió por medio de tornillos al soporte móvil con ruedas, al restringir la rotación de la rosca se obtiene un movimiento lineal. El soporte móvil cuenta con ruedas colocadas sobre un riel de acero. Sobre el soporte móvil se colocó la cámara fotográfica por medio de una base de acero unida con tornillos (Figura 6).

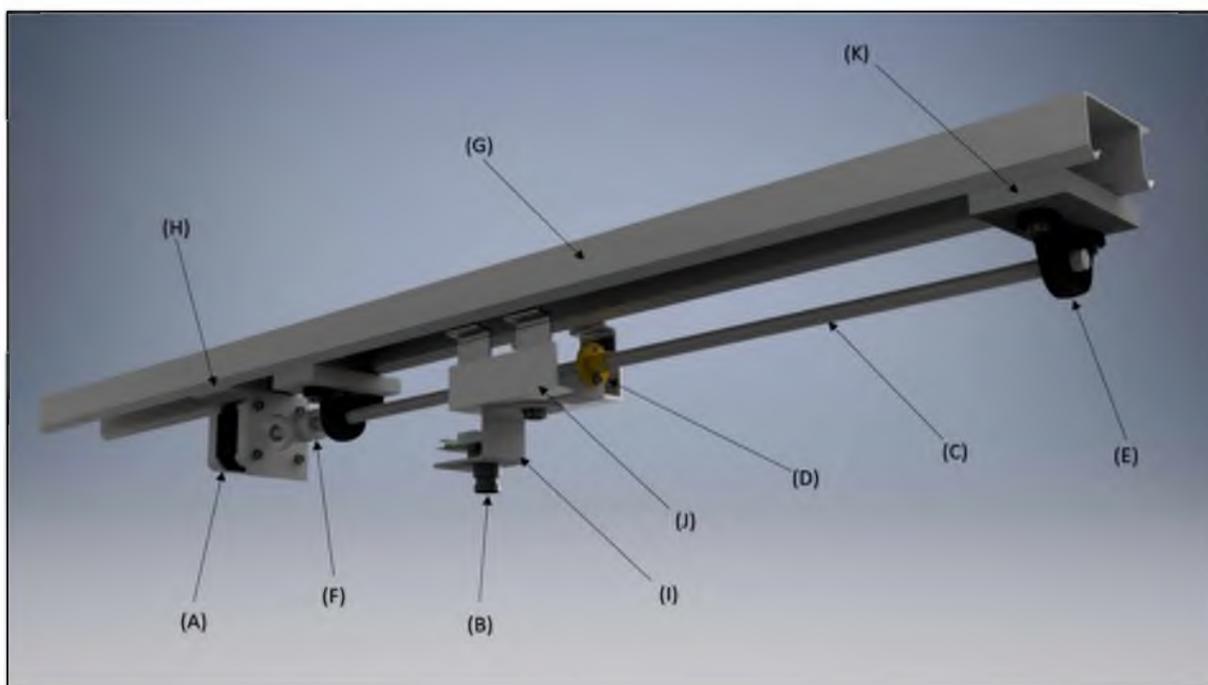


Figura 6. Sistema de movimiento del prototipo. (A) Motor de pasos, (B) Arducam, (C) Tornillo de avance, (D) Rosca ACME, (E) Rodamientos 8 mm, (F) Acople 8 mm – 5 mm, (G) Riel de acero, (H) Base para motor, (I) Base para Arducam, (J) Soporte móvil para cámara fotográfica, (K) Base para rodamiento.

Se construyó una estructura (Figura 7) que permitió colocar la cámara fotográfica a una altura de 28 cm con respecto al plano de observación y una base para colocar la bandeja con las semillas. La estructura se elaboró con perfil rectangular de aluminio con sección de 50,8 mm × 25,4 mm y 2 mm de espesor. Las uniones en los extremos se hicieron con cortes a 45° y angulares de aluminio unidos por medio de remaches. La altura del prototipo es de 50 cm, un ancho de 50 cm y largo de 54 cm. Estas dimensiones se seleccionaron en función al espacio disponible dentro de las cámaras de germinación del CIGRAS y la disponibilidad de longitud del tornillo de avance. La estructura se unió por medio de angulares de aluminio soldados en cada una de las extremidades, las cuales se fijaron a una base de lámina de PVC con espesor de 10 mm y un tablero de madera comprimida con espesor de 20 mm. Además, se colocaron niveladores en cada uno de los extremos de la base (Figura 7). A una altura de 28 cm se obtuvo una amplitud de visión efectiva de 30 cm en el eje vertical, por esta razón se definió un espaciamiento de 25 mm entre los elementos ubicados en cada una de las filas. Para separación entre columnas de elementos en la dirección del movimiento de la cámara se definió una distancia de 36 mm.

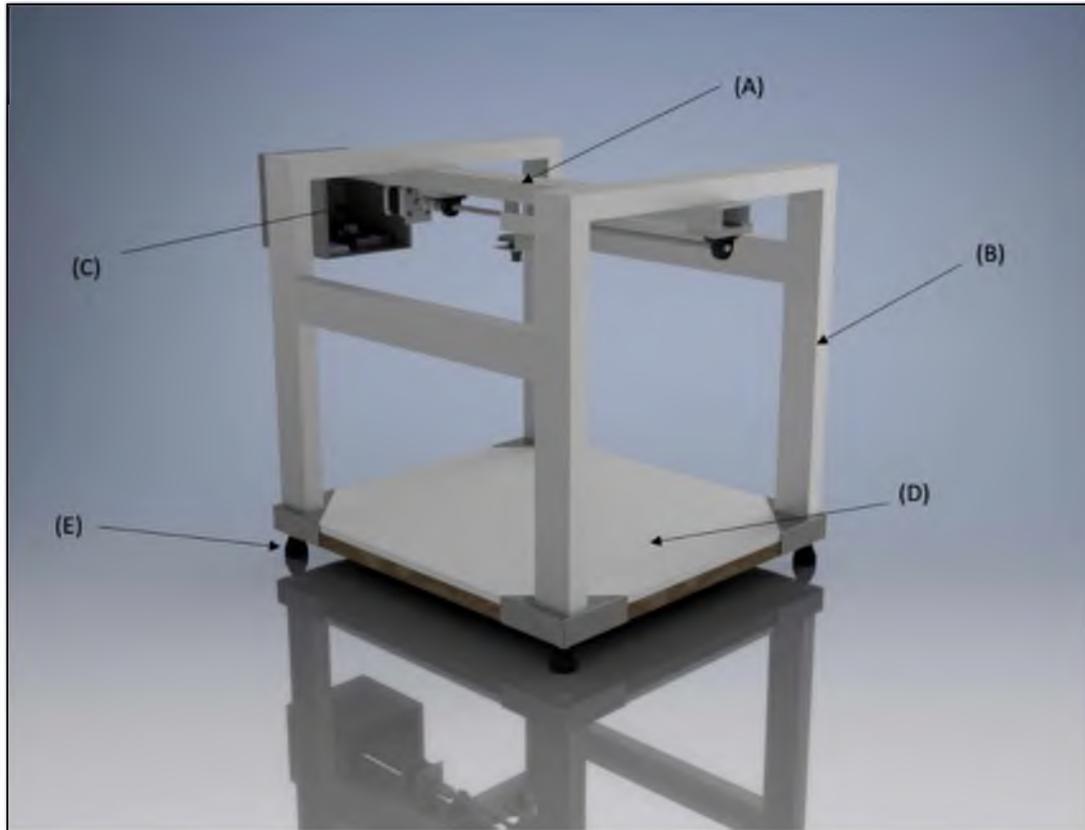


Figura 7. Prototipo desarrollado. (A) Sistema de movimiento, (B) Estructura de aluminio, (C) Sistema de control, (D) Base para semillas, (E) Niveladores.

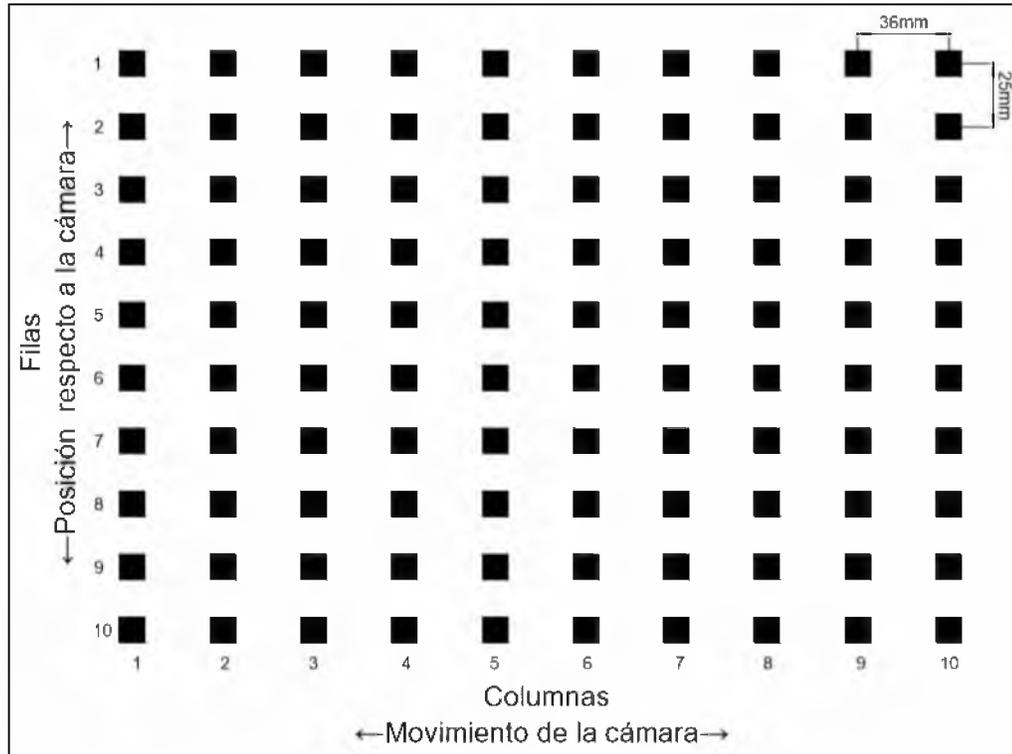


Figura 8. Definición de filas y columnas para el marco experimental.

La metodología de adquisición de imágenes para el estudio de procesos biológicos como la germinación de semillas puede ser limitada, producto de la ausencia de automatización en el proceso, por lo que se requiere una constante intervención manual y se puede dificultar la continuidad en los intervalos de medición. Por ejemplo, los sistemas en los que se ha automatizado la toma de imágenes son estáticos (cámara en una posición fija). También, algunos están diseñados para un bajo número de semillas, como es el caso de Dell' Aquila [34] quien obtuvo imágenes de manera automática de una placa de Petri, con 12 semillas de brócoli y coliflor por repetición, para un total de cuatro repeticiones por ensayo. El intervalo de captura de imágenes para este sistema correspondió a 15 minutos. Para solucionar este problema, se han creado dispositivos con un mayor grado de complejidad y costo de materiales, que permiten aumentar la capacidad de toma de imágenes y análisis simultáneo de muestras. En 2011 Wagner et al [2] diseñaron un dispositivo compuesto por tres módulos

cilíndricos, con capacidad de control de apertura y cierre de compuerta hermética, control de iluminación, captura y procesamiento de imágenes. Cada módulo requiere de cuatro cámaras fotográficas de 1,3 Megapíxeles, colocadas a una altura suficiente para estudiar hasta 400 semillas de *Brassica napus* por cámara. Si se compara con el desarrollado en este trabajo final de graduación, se pudo aumentar la cantidad de semillas analizadas simultáneamente con el uso de una única cámara que se desplaza a través de diferentes columnas, sin embargo, esta cantidad puede aumentar en mayor medida si las semillas son de un tamaño menor. Al trabajar con frijol, el cual es de mayor tamaño, se requirió utilizar espaciamientos mayores (Figura 8), esto para evitar que el constante movimiento del frijol durante la imbibición y germinación generara que las semillas se interpusieran unas con otras. En este caso se desarrolló un dispositivo donde el costo de los materiales se estima alrededor de USD \$170 (Anexo A).

Barbez et al [40] crearon un prototipo con capacidad de estudiar el comportamiento de la germinación y crecimiento de la plántula a través del tiempo por medio de un sistema rotatorio constituido por un motor de pasos que permite la rotación precisa de cuatro planos verticales, separados en un ángulo de 90°. La cámara fotográfica DLSR se colocó en una posición fija con el lente en posición ortogonal a uno de los cuatro planos. El mecanismo se programó con un movimiento de 90° del eje del motor para cambiar el plano observado y de esta manera aumentar cuatro veces el área de observación de la cámara ubicada a una misma distancia [40]. Al igual que en el presente trabajo se utilizó un microcontrolador Arduino Uno para llevar un conteo de los intervalos de tiempo de rotación del plano, específicamente 15 minutos para cada medición de los cuatro planos. Los componentes utilizados para realizar el ensamble fueron de bajo costo (inferior a €200), lo que facilita su reproducibilidad. Aun así, el estudio de Barbez et al [40] requiere un control independiente la cámara fotográfica y la rotación del motor, por lo que se debe sincronizar de manera adecuada ambas funciones para evitar capturar una imagen mientras se lleva a cabo el movimiento, la ventaja del presente estudio es que se logró controlar ambos componentes con el uso de un único programa esto garantiza que el motor está detenido durante la captura de la imagen.

### **4.1.3 Sistema de control y programación**

Se construyó un sistema con capacidad de controlar la cámara fotográfica y el motor de pasos con el uso del microcontrolador Arduino Uno. La conexión eléctrica que controla el prototipo permite accionar las funciones tanto de la cámara fotográfica como del motor de pasos con el uso de un único Arduino UNO Rev 3. La cámara fotográfica se alimenta por medio de una conexión a la fuente de 5V y el pin GND de la placa Arduino. Para transferir datos por medio del bus Inter-Integrated Circuit (I<sup>2</sup>C), se estableció una conexión a los pines de datos serial (SDA) y el reloj serial (SCL) de la placa Arduino. Por último, se requirió conexión de los pines digitales 13-10 para permitir el protocolo de comunicación serial (SPI) (Figura 9).

Para el control del motor se seleccionó la tarjeta Sparkfun Easy Driver V 4.4 la cual cuenta con un circuito integrado A3957 que cumple con el requerimiento de corriente y voltaje del motor. Este driver permitió simplificar el control del motor por medio de dos pines digitales para controlar la dirección y la cantidad de pasos del motor. La alimentación del motor requirió una fuente externa de voltaje de 12 V a 2 A conectada directamente al circuito integrado (Figura 9). Para disminuir el consumo eléctrico de los componentes electrónicos del prototipo cuando no estén en uso, se utilizó una función de la cámara que permite apagar el sensor después de capturar las imágenes requeridas. En el caso del motor, se desactivó el voltaje de parada debido a que este genera calentamiento del circuito integrado y del motor cuando se energiza por periodos superiores a una hora.

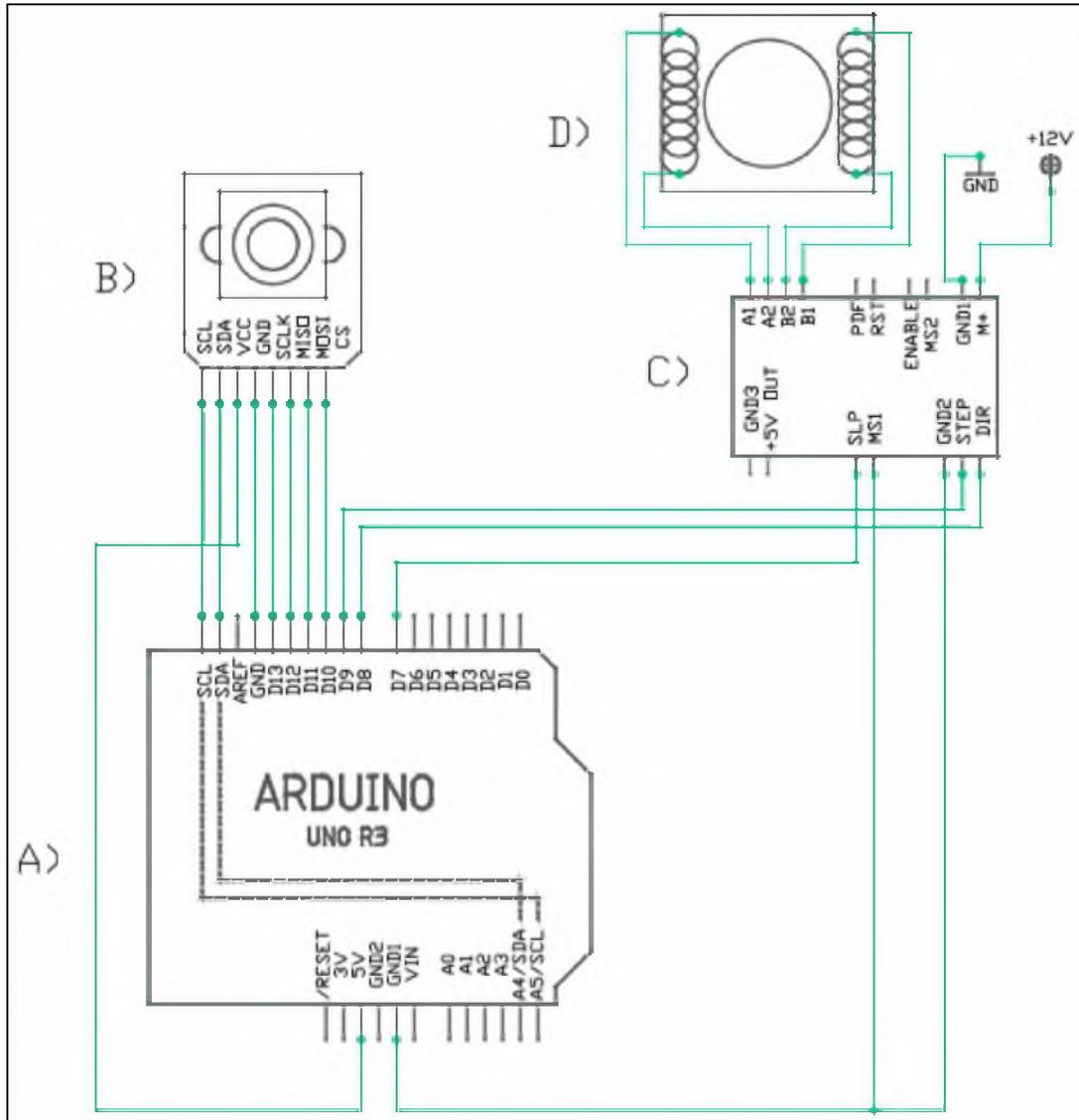


Figura 9. Esquema del circuito eléctrico del prototipo. (A) Arduino Uno Rev3. (B) Arducam OV5642. (C) Easy Driver V 4.4. (D) Motor de pasos.

Los bloques de programación que incluyen las funciones de la cámara y el motor se agregaron en un único sketch en el IDE de Arduino (Anexo B). La plataforma de Arduino cuenta con una librería para el control de la cámara Arducam que consiste en una serie de métodos declarados previamente en una estructura de control “Switch” con diferentes casos donde cada uno contiene diferentes funciones de la cámara. Dentro de las funciones más

importantes se puede mencionar el cambio de la resolución de la imagen, ajuste de las propiedades de la imagen (brillo, exposición, contraste, saturación) captura de imágenes y toma de video. La selección de los casos se emite por comunicación con el puerto serial. Para la programación del motor por medio del driver, se utilizó un método que recibe una variable numérica correspondiente al ángulo de giro del eje del motor, por tanto, si se desea que el motor gire una revolución completa en el sentido de las manecillas del reloj, se debe ingresar la variable con un valor de  $360^\circ$ , por el contrario, si se desea que el motor gire en contrarreloj se debe agregar un signo negativo antes del ángulo de giro deseado. Se efectuaron modificaciones a la programación del sketch base de la Arducam mencionado anteriormente y se agregó el nuevo método en un caso de la estructura de control predeterminada que permita el movimiento de motor.

Por medio de la comunicación serial con una computadora (Intel Core i5, 4 Mb de RAM) se hizo un llamado de los métodos declarados previamente en el sketch de la Arducam con un código en Python 2.7 (Anexo C). El control permitió secuencialmente iniciar la comunicación serial del Arduino, seguidamente se ajustaron las propiedades de la cámara que corresponden a la resolución máxima permitida ( $2596 \times 1944$ ) y se modificó la exposición del lente para el contraste de la imagen. Posteriormente el programa capturó una imagen en la posición inicial y la almacenó en un directorio previamente definido en el código, se accionó el motor para desplazar la cámara a la segunda posición hasta capturar 10 fotografías en diferentes posiciones y almacenarlas respectivamente en directorios diferentes para cada posición. Finalmente, se dieron indicaciones al motor para girar en el sentido contrario y regresar la cámara a su posición inicial. Los componentes se programaron para apagarse durante un intervalo de 15 minutos donde el programa se reinicia para repetir el proceso.

#### **4.1.4 Calibración de movimiento**

Existe una relación lineal entre el ángulo de rotación del motor y el desplazamiento del tornillo de avance del prototipo, esto dio como resultado un  $R^2$  de 0,99 para un modelo lineal. Se tomó el promedio de desplazamiento en un intervalo de medición entre una revolución y

ocho revoluciones, el desplazamiento del soporte móvil es de 8 mm por cada revolución que gire el motor, tal y como se indica en las especificaciones de diseño del tornillo de avance (Figura 10).

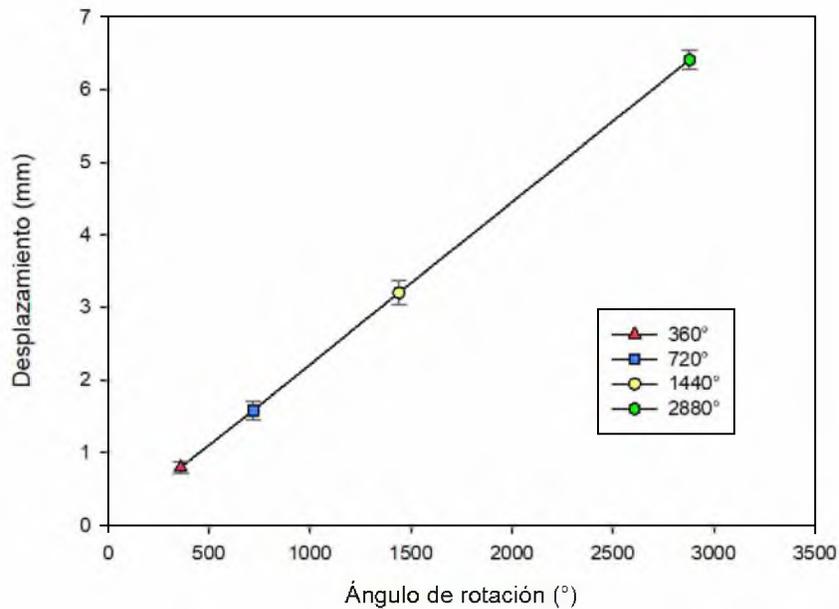


Figura 10. Curva de operación del motor y tornillo de avance. Se muestran los promedios para cada ángulo y su respectiva desviación estándar.

Al utilizar la cámara fotográfica para evaluar la repetitividad del movimiento, después de 10 repeticiones se demostró que no existe variación significativa entre las posiciones de los cuadrados observados en ocho columnas a lo largo del tornillo de avance (Cuadro 6). En todas las columnas se determinaron altos valores-p ( $p > 0,99$ ) lo que refleja la precisión del movimiento del tornillo y el motor al desplazar el soporte móvil en ambas direcciones. Esta precisión se debe a la alta resolución y exactitud en el motor de pasos, el cual permite obtener una revolución completa en un total de 200 pasos de  $1,8^\circ \pm 5\%$ . Además, el tornillo de avance está diseñado bajo los estándares de la norma ISO: 2904 y DIN: 103 Metric Trapezoidal Threads.

Al calcular variables características como área, ancho y largo de figuras geométricas, se obtuvieron valores de probabilidad mayores a un nivel de significancia de 0,05, esto demuestra que el tamaño y forma de los elementos observados con la cámara no se ven afectados significativamente a través de las repeticiones por movimientos que perturben la posición de la cámara. Únicamente en el caso de la variable “largo” se observó un valor-p significativo (0,0139). Cabe mencionar que posibles correcciones por pruebas múltiples (por ejemplo, Bonferroni), cambiarían el valor-p haciendo el anterior resultado no significativo.

Cuadro 6. Valores-p en la variabilidad de la cuantificación de variables en la repetitividad del movimiento de la cámara para elementos de 100 mm<sup>2</sup>.

Variable	Columna (valor-p)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Área	0,95	0,99	0,99	0,78	0,95	0,84	0,99	0,99
Posición en el eje x	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
Ancho	0,91	0,97	0,83	0,87	0,95	0,94	0,99	0,97
Largo	0,48	0,15	0,43	0,01	0,36	0,84	0,99	0,88

*Se presentan los valores-p para la prueba de ANOVA entre las 10 mediciones realizadas para cada columna. Valor-p > 0,05 significa que las medias no son significativamente diferentes.*

## 4.2 Procesamiento de imágenes

### 4.2.1 Preprocesamiento de imágenes: calibración de cámara

Se corrigió el efecto de distorsión de la cámara con la herramienta de calibración (Anexo D), por lo que se eliminaron las curvaturas indeseadas en los extremos de la imagen. Se determinó un error de reproyección promedio de 0,48 píxeles, para un total de 18 imágenes de la Figura 3 distribuidas por toda el área focal de la cámara. El error de reproyección es una unidad que representa la distancia en píxeles, entre las coordenadas del punto detectado y el punto real por lo que se considera un error absoluto, el programa da como resultado un gráfico de barras con el error individual para cada imagen (Figura 11).

La calibración de la cámara se puede evaluar de dos maneras, una de ellas es examinar error de reproyección mencionado anteriormente, donde se recomienda que una calibración de cámara aceptable debe efectuarse en al menos 10 imágenes y obtener un error de reproyección promedio menor a un píxel [29]. Para mejorar la calibración se omitieron imágenes que tuvieran errores de reproyección atípicos ( $>1$ ) con respecto al promedio de las imágenes [29]. Otra forma de evaluar el resultado de la calibración es observar las fotografías del patrón de calibración antes y después de la corrección geométrica, al corregir la imagen las líneas curvas en los extremos de la imagen del patrón de calibración deben ser rectas (Figura 12). Se ha reportado que el método de calibración propuesto por Zhengyou Zhang [29] no es el más preciso de todos los diversos métodos de calibración existentes; sin embargo, presenta una alta facilidad para aplicarse en el ámbito industrial, por la facilidad de adquisición del patrón de calibración y la rapidez y flexibilidad de los resultados [26].

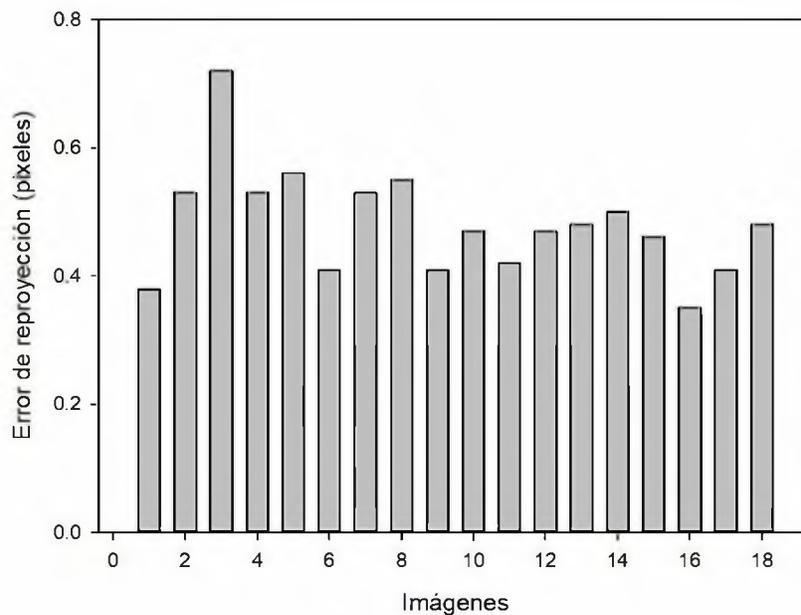


Figura 11. Errores de reproyección obtenidos de la calibración de cámara en Matlab con el uso de 18 imágenes del cuadro de calibración. Cada columna representa el error de reproyección promedio para una de las imágenes.

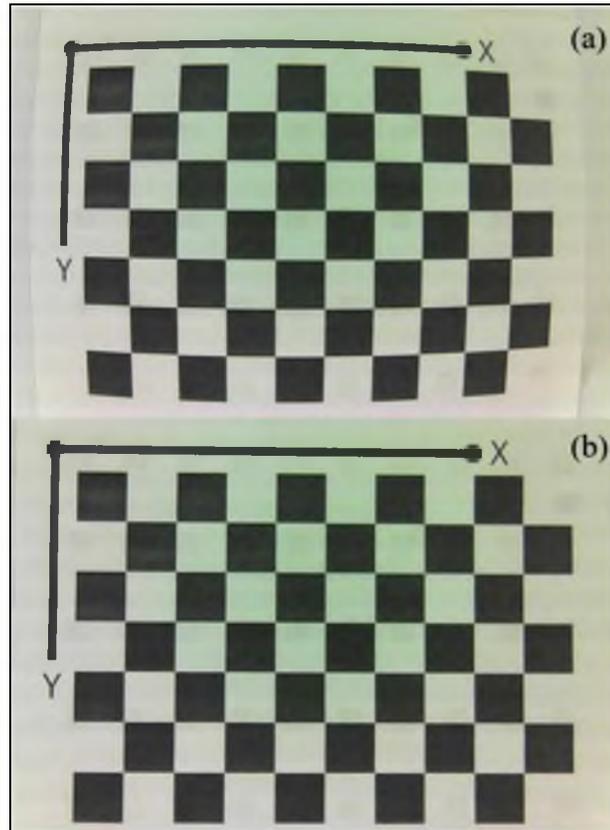


Figura 12. Corrección geométrica de imágenes obtenidas con el prototipo. (A) imagen con distorsión radial. (B) imagen después de aplicar el proceso de corrección con la homografía 2D.

#### 4.2.2 Comprobación de la corrección con elementos de calibración

Al utilizar figuras cuadradas y circulares en la configuración presentada en la Figura 8, se encontró que la cuantificación a partir de las imágenes obtenidas con el prototipo presenta un porcentaje de error menor al 2%. Para evaluar lo anterior, se tomaron fotografías a matrices de figuras de formas y áreas conocidas impresos en papel a través de distintas posiciones del movimiento, y se cuantificó el área, ancho y largo correspondiente a cada uno de los elementos. Los valores medidos tuvieron en promedio un porcentaje de error del  $0,83 \pm 0,57\%$  con respecto al valor real escalado en la impresión de las figuras. El porcentaje de

error máximo se presentó en el área de las figuras cuadradas de 100 mm<sup>2</sup> con un porcentaje de error de 1,79% (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comprobación de la medición con procesamiento de imágenes con elementos de calibración.

<b>Forma</b>	<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Variable</b>	<b>Valor real</b>	<b>Valor medido</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Error (%)</b>
Circulo	25	Área	25,00	24,86	0,39	0,55
		Ancho	5,64	5,63	0,08	0,26
		Alto	5,64	5,60	0,06	0,75
	100	Área	100,00	98,70	1,35	1,30
		Ancho	11,28	11,24	0,12	0,42
		Alto	11,28	11,19	0,07	0,81
	200	Área	200,00	196,67	2,65	1,67
		Ancho	15,96	15,85	0,16	0,68
		Alto	15,96	15,81	0,09	0,91
Cuadrado	25	Área	25,00	25,17	0,44	0,67
		Ancho	5,00	5,08	0,08	1,58
		Alto	5,00	5,08	0,06	1,61
	100	Área	100,00	98,21	1,41	1,79
		Ancho	10,00	10,00	0,13	0,01
		Alto	10,00	10,00	0,07	0,02
	400	Área	400,00	394,84	5,12	1,29
		Ancho	20,00	20,06	0,27	0,31
		Alto	20,00	20,07	0,11	0,36

El desplazamiento de la cámara tiene un efecto en el largo de los objetos observados al comparar las distintas columnas del experimento. El movimiento de la cámara (columna)

para las variables área y ancho de elementos cuadrados y circulares del mismo tamaño impresos en papel no tuvo un efecto significativo ( $p > 0,05$ ). Esto parte del supuesto de que la hipótesis nula es que no hay diferencias entre las mediciones al variar la posición de la cámara. Sin embargo, para la variable largo, sin importar el tamaño del elemento estudiado existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) conforme la cámara se desplaza sobre las diferentes columnas (Cuadro 8 y 9). En el caso de la variación respecto a las filas, el análisis estadístico refleja diferencias significativas en la todas las variables sin importar el tamaño y forma de los elementos estudiados, con excepción del largo en cuadrados de  $25 \text{ mm}^2$  donde  $p = 0,2451$ . Al observar las comparaciones entre las medias de los grupos se observa que a pesar de que existen diferencias significativas estas son muy pequeñas y no generan impacto en los resultados, lo que refleja la sensibilidad del método a diferentes factores como una desalineación mínima de la cámara, el efecto de la uniformidad de la luz a través de las filas que afecte la cantidad de píxeles segmentados, imperfecciones en la calidad de la impresión de los elementos en papel, desalineación de las plantillas de papel con respecto a la posición de la cámara.

Cuadro 8. Valores-p en la variación de dimensiones en función a columnas y filas en elementos cuadrados con áreas de  $400 \text{ mm}^2$ ,  $100 \text{ mm}^2$  y  $25 \text{ mm}^2$ .

Variable	Valor-p					
	400 mm <sup>2</sup>		100 mm <sup>2</sup>		25 mm <sup>2</sup>	
	Columna	Fila	Columna	Fila	Columna	Fila
Área	0,0789	<0,0001	0,2355	<0,0001	0,1371	<0,0001
Ancho	0,9109	<0,0001	0,0314	<0,0001	0,8399	<0,0001
Largo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0121	0,0017	0,2451

*Se observan los valores-p para la comparación entre elementos cuadrados de diferentes tamaños, respecto a las columnas y filas. Valor-p > 0,05 significa que las medias no son significativamente diferentes.*

Cuadro 9. Valores-p en la variación de dimensiones en función a las columnas y filas en elementos circulares con áreas de 200 mm<sup>2</sup>, 100 mm<sup>2</sup> y 25 mm<sup>2</sup>.

Variable	Valor-p					
	200 mm <sup>2</sup>		100 mm <sup>2</sup>		25 mm <sup>2</sup>	
	Columna	Fila	Columna	Fila	Columna	Fila
Área	0,2601	<0,0001	0,4650	<0,0001	0,5895	<0,0001
Ancho	0,8381	<0,0001	0,6292	<0,0001	0,8174	<0,0001
Alto	0,0010	<0,0001	0,1251	<0,0001	0,1297	<0,0001

*Se observan los valores-p para la comparación entre elementos circulares de diferentes tamaños, respecto a las columnas y filas. Valor-p > 0,05 significa que las medias no son significativamente diferentes.*

A pesar de que existen diferencias significativas entre las mediciones del prototipo en diferentes posiciones a lo largo del área del experimento, se realizó una comparación entre los dos extremos de las medias para determinar el error de la prueba (Cuadro 10 y 11). Se observó que para el caso del área en elementos cuadrados de 100 mm<sup>2</sup>, el valor de probabilidad es muy bajo ( $p < 0,0001$ ), esto hace que se rechace la hipótesis nula. Sin embargo, en el Cuadro 10 se presenta la comparación entre la media mayor y menor del experimento, donde hay una diferencia de 3 mm<sup>2</sup> al promediar los valores de las medias con el valor real de la medición, el cual debe ser 100 mm<sup>2</sup>. Con lo anterior se obtiene un porcentaje de error de la medición corresponde a 1,91%.

Cuadro 10. Resumen de comparación entre medias mínimas y máximas para elementos cuadrados.

Área [mm <sup>2</sup> ]	Variable	Clasificación	Menor [mm]	Mayor [mm]	Diferencia [mm]	Error [%]
400	Largo	Columna	19,95	20,19	0,24	0,35
400	Área	Fila	389,26	400,89	11,63	1,23
400	Ancho	Fila	19,79	20,38	0,59	0,42
400	Largo	Fila	19,95	20,18	0,23	0,32
100	Largo	Columna	9,94	10,08	0,14	0,10
100	Área	Fila	96,59	99,59	3,00	1,91
100	Ancho	Fila	9,86	10,11	0,25	0,15
25	Largo	Columna	5,04	5,13	0,09	1,70
25	Área	Fila	24,65	25,54	0,89	0,38
25	Ancho	Fila	4,97	5,15	0,18	1,20

*Se presentan únicamente para los casos en los que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).*

Al igual que con los cuadrados, la variación de medición en círculos muestra que el efecto con respecto al movimiento entre las columnas no presenta diferencias significativas para la mayoría de las variables, excepto para la variable largo en círculos con área de 200 mm<sup>2</sup> ( $p=0,001$ ), caso contrario con la variación a través de las filas, donde sin importar el tamaño del elemento las diferencias son altamente significativas ( $p < 0,0001$ ). Al comparar los extremos de las medias para el caso del área de círculos de 200 mm<sup>2</sup> la diferencia corresponde a 6,27 mm<sup>2</sup>, lo que da como resultado el mayor porcentaje de error de 1,95%. Esta diferencia se considera aceptable en el experimento, puesto que el estudio pretende estudiar semillas que no van a cambiar su posición a través del tiempo en cada uno de los ensayos y se estudió

la razón de crecimiento con respecto a su tamaño inicial (variable adimensional) en lugar de analizar el tamaño real de los elementos.

Cuadro 11. Resumen de comparación entre medias máximas y mínimas para elementos circulares.

Área [mm <sup>2</sup> ]	Variable	Menor [mm]	Mayor [mm]	Diferencia [mm]	Error [%]
200	Área	192,95	199,22	6,27	1,95
200	Ancho	15,64	16,00	0,36	0,86
200	Largo	15,72	15,88	0,16	0,98
100	Área	97,28	100,33	3,05	1,19
100	Ancho	11,11	11,38	0,27	0,34
100	Largo	11,13	11,24	0,11	0,87
25	Área	24,46	25,22	0,76	0,64
25	Ancho	5,54	5,69	0,15	0,47
25	Largo	5,54	5,64	0,10	0,91

*Se presentan únicamente para los casos en los que se existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).*

Al utilizar material biológico en lugar de elementos impresos en papel, colocado en las mismas posiciones el efecto de las diferencias observadas anteriormente en elementos impresos en papel se reduce al punto de obtener valores de probabilidad mayores, en algunos casos cercanos a 1 (Cuadro 12). Esto refleja que, sumado a lo explicado en los párrafos anteriores, el análisis de materiales biológicos como lo son las semillas es heterogéneo, lo que implica la importancia de trabajar con crecimientos relativos, donde no solo se elimina el efecto de la alta variabilidad en los tamaños de las semillas si no que se elimina el efecto de las pequeñas diferencias que existen en la cuantificación del tamaño con respecto a la posición del elemento respecto al centro óptico de la imagen.

Cuadro 12. Variabilidad de medición del prototipo al utilizar 10 semillas en diferentes posiciones del prototipo.

Variable	Cabécar	Brunca
Área	0,7794	0,9999
Ancho	0,4101	0,5989
Largo	0,9973	0,9772

*Se presentan los valores-p para la comparación de las mismas 10 semillas de dos genotipos en las 10 columnas del experimento. Valor-p > 0,05 significa que las medias no son significativamente diferentes.*

#### **4.2.3 Determinación de funciones requeridas para medición de áreas con procesamiento de imágenes y elaboración de procedimiento en ImageJ**

Se desarrolló un macro que permite procesar automáticamente una carpeta que incluye secuencia de imágenes, a las que se le aplican funciones predeterminadas de ImageJ para cuantificar las características de tamaño y forma de las semillas (Anexo E). Para delimitar el área de interés, se utilizó la herramienta “Crop” en un rectángulo en el centro de la fotografía correspondiente al espacio donde se ubicó la columna de las semillas de interés en la posición a través del tornillo de avance (Figura 13a y Figura 14a).

Se obtuvo una segmentación precisa de la semilla, del fondo de papel de germinación, por medio de la herramienta “Color Threshold”. Esta segmentó los píxeles deseados (área de la semilla), de los no deseados en la imagen (papel de germinación azul). Se utilizó la escala de color HSB, debido a que presentó mejores resultados visuales con respecto a otras escalas. La segmentación se realizó a partir de a una escala de tono, brillo y saturación, en la que los píxeles tienen valores entre 0 y 255. Para las imágenes obtenidas de frijol negro se utilizó un intervalo de (100-255) para el tono o color, (0-255) para la saturación y (85-255) para el brillo, mientras que para frijol rojo se utilizó (95-195) para el tono o color, (0-255) para la saturación y (75-255) para el brillo. Estos intervalos garantizan que la semilla se segmente del fondo del papel de germinación azul de manera precisa (Figura 13b y Figura 14b).

Se ha determinado que la precisión de la segmentación por color en imágenes en escala de grises y RGB se ve afectada por el intervalo seleccionado en cada uno de los histogramas de intensidad de los canales que componen la imagen [45]. Si el intervalo es muy amplio, se pueden incluir píxeles no deseados en los bordes de los elementos observados o si el intervalo es muy pequeño, estos se pueden omitir [42]. Esta imprecisión se debe al error de muestreo y cuantización, que dependen de la capacidad del sensor de convertir una señal analógica proveniente de la luz emitida y reflejada por el elemento a una señal digital en posición y con respecto a la intensidad [45].

La binarización de la imagen en el cual los píxeles segmentados toman valores de “1”, mientras que los píxeles descartados toman un valor de “0” se aplicaron las funciones predeterminadas “Make Binary” y “Convert to Mask”. Para mejorar la segmentación obtenida por medio de color se utilizaron funciones de morfología binaria y se comprobaron los resultados visualmente. Fue común observar píxeles no identificados u omitidos dentro de un elemento, los cuales se representan como espacios vacíos y no son considerados en la cuantificación de píxeles que conforman un elemento, para corregir esto se utilizó la herramienta “Fill Holes” la cual permite rellenar píxeles omitidos (Valor “0”) cuando sus ocho píxeles vecinos son de interés en la segmentación (Valor “1”). Ehsan (46) detectó agujeros en la segmentación de partículas de agregados de construcción y atribuyó el fenómeno a la uniformidad de la luz, y la posibilidad de tener sombras o excesos de brillo producto de la naturaleza del material. La segmentación por color de las semillas presentó pequeñas deficiencias cuando hay presencia de sombras y brillo producto del movimiento que tienen a través del tiempo, por lo que es común que la segmentación incluya píxeles no deseados en los contornos de las semillas que genera errores en la segmentación, por tal razón se utilizó la herramienta “Open” la cual suaviza y define el contorno de un objeto, elimina posibles protuberancias e istmos estrechos (Figura 13c y Figura 14c).



Figura 13. Segmentación de las pruebas realizadas con las semillas, obtenida con el software ImageJ para frijol rojo. (a) Imágenes obtenidas de la cámara, (b) Segmentación por color, (c) Binarización y aplicación de morfología binaria.

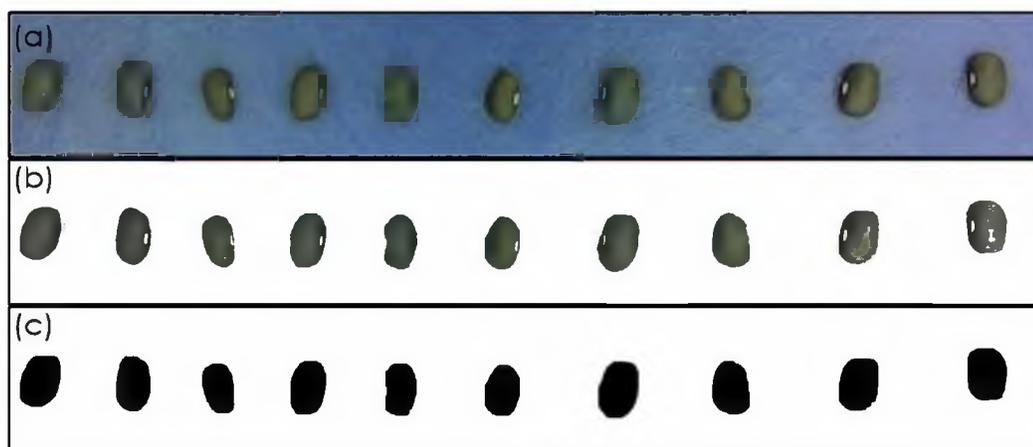


Figura 14. Segmentación de las pruebas realizadas con las semillas, obtenida con el software ImageJ para frijol negro. (a) Imágenes obtenidas de la cámara, (b) Segmentación por color, (c) Binarización y aplicación de morfología binaria.

La resolución de megapíxeles de la cámara en combinación con la altura a la que esta se coloca con respecto al plano de observación de elementos impresos en papel permitió obtener una escala de 9,26 píxeles/mm lo que es igual a resolución espacial de 246 ppp. Este valor se ingresó al macro por medio de la función “Set scale”. Esto significa que una figura de 100

mm<sup>2</sup> de área se representó con un promedio de 8400 pixeles. En el caso de las semillas, se representó con un promedio de  $5000 \pm 712$  pixeles para Brunca y  $5200 \pm 768$  pixeles para Cabécar. Duris et al [42] determinaron que a menor resolución espacial existe una sobreestimación del área de los elementos observados. Esto se debe a que los elementos se ven conformados por una menor cantidad de pixeles, lo que implica que un pixel representa un área mayor del elemento real observado, en consecuencia, se incluye información que excede los bordes de los elementos. Por esta razón, emplean una variable denominada factor de escala el cual corresponde al tamaño de la partícula observada entre el tamaño del pixel, ambas en  $\mu\text{m}$  y lograron una cuantificación precisa de partículas con factores de escala entre 20 y 60  $\mu\text{m}$  para un diámetro medio de partícula entre 1-3 mm. Almeida et al [47] cuantificaron resultados precisos al utilizar un factor de escala de 20  $\mu\text{m}$  obtenido a partir de un tamaño de partícula de 0,3 mm con un tamaño de pixel de 12,56  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, Podczec et al [48] recomiendan un tamaño máximo de pixel de 30  $\mu\text{m}$  para un tamaño de partícula de 1 mm. Estos resultados coinciden con los de esta investigación ya que la semilla de frijol presenta un diámetro menor aproximado a 6 mm (Figura 15 y 16) y a partir de la escala mencionada anteriormente el tamaño de pixel promedio es 0,108 mm, por lo que el factor de escala corresponde a 55  $\mu\text{m}$ . Por lo que se puede afirmar que la magnificación empleada se ajusta a los valores recomendados en otras investigaciones. Bajo este principio, el tamaño mínimo de partícula que se puede estudiar para obtener un factor de escala que cumpla con las recomendaciones mencionadas anteriormente corresponde a 2,5 mm y el crecimiento más pequeño que puede ser detectado corresponde a un pixel de tamaño 0,1 mm.

Al utilizar la función “Particle Analysis”, se realizó un conteo de la cantidad de pixeles que se encuentran dentro de la forma del elemento de interés. A través de esto se obtuvieron características de la forma como el largo, ancho, área y centro de masa. Es importante garantizar la uniformidad de luz y cantidad de humedad del papel durante los ensayos, ya que las variaciones en las fotografías pueden perjudicar la identificación y cuantificación de objetos, lo que en consecuencia podría afectar los experimentos al identificar elementos no deseados. Para disminuir este efecto se utilizó un filtro en función a tamaños mínimos de

partículas y circularidad de los objetos. Finalmente se reportaron los resultados a una hoja de cálculo, para su posterior análisis en la generación de curvas de crecimiento a través del tiempo.

La secuencia de pasos requeridos dentro del procesamiento de imágenes depende propiamente de la aplicación y del tipo de imágenes que se obtengan. Para identificar y cuantificar características de forma y tamaño de elementos se encontraron metodologías similares a la implementada en este documento. Lursthut y Pornpanomchai [35] desarrollaron un sistema de visión de máquina especializado en medir la germinación de semillas de arroz por medio de segmentación de color y lo combinaron con la aplicación de redes neurales, lo que permite que el programa tome la decisión de clasificar una semilla como germinada. Esto es una ventaja con respecto al prototipo de este trabajo final de graduación, ya que este depende mínimamente de la supervisión humana para determinar el tiempo en el que la semilla alcanza la germinación, por lo que sería de gran potencial mejorar el análisis desarrollado a partir del uso de herramientas computacionales más robustas.

#### **4.2.4 Comprobación de la corrección contra método de referencia (vernier)**

Los genotipos de semilla de frijol utilizados presentaron una alta variabilidad, a diferencia de las pruebas realizadas con figuras geométricas, no se encontraron diferencias significativas en las mediciones realizadas entre las muestras al compararlas entre las filas y las columnas. Al medir el ancho, largo y área de 100 semillas de cada genotipo, de manera manual y por medio de procesamiento de imágenes adquiridas con el prototipo se encontró que no existen diferencias significativas entre ellas al colocarlas en 10 filas y 10 columnas (Cuadro 13). Esto debido a que se determinaron altos valores de significancia ( $p > 0,05$ ). Esto se puede justificar debido a que, al tratarse de un material biológico, existe una alta variabilidad entre las diferentes semillas que es mucho mayor a las diferencias que se mencionan anteriormente, obtenidas al cuantificar variables en elementos impresos en papel.

Cuadro 13. Valores de probabilidad en prueba de 100 semillas medidas con vernier y con el prototipo.

Variable	Cabécar				Brunca			
	Prototipo		Vernier		Prototipo		Vernier	
	Columna	Fila	Columna	Fila	Columna	Fila	Columna	Fila
Área	0,1442	0,0947	-	-	0,3980	0,7922	-	-
Ancho	0,072	0,0852	0,6129	0,0993	0,2616	0,2457	0,7682	0,3694
Largo	0,2888	0,0533	0,2892	0,0995	0,2647	0,6094	0,4705	0,9718

*Se presentan los valores-p para la comparación de 100 semillas de dos genotipos con respecto a filas y columnas medidos con procesamiento de imágenes y con vernier. Valor-p > 0,05 significa que las medias no son significativamente diferentes.*

Se observó una relación alta entre las mediciones manuales y las obtenidas por medio de análisis de imágenes. Se determinaron ajustes lineales con pendientes con valores cercanos a 1, e intersecciones con el eje “y” cercanas a 0, lo cual refleja que ambas variables tienden a crecer juntas (Figura 15 y 16). La prueba de correlación de Pearson da como resultados valores-p muy pequeños ( $p \ll 0,001$ ), lo que demuestra que la correlación entre las variables es fuerte y significativa (Cuadro 14). Esto implica que no hay diferencia significativa entre las mediciones con el vernier y con procesamiento de imágenes para cada una de las columnas, tanto para la medición con procesamiento de imágenes como para la medición con vernier (Figura 15 y 16). Los valores de la regresión lineal que compara los resultados del procesamiento de imágenes con los del vernier (Cuadro 14) valida el prototipo desarrollado, como un método que permite hacer uso de imágenes digitales adquiridas con el prototipo y su debido procesamiento para obtener aproximaciones de dimensiones de partículas de diferentes formas y tamaños observadas en el plano de la imagen. Esto representa una gran ventaja cuando las mediciones se deban realizar a una gran cantidad de partículas o si los periodos de medición son largos con intervalos de medición pequeños.

A pesar de que existe una correlación significativa entre las mediciones con ambos métodos, se observan valores dispersos alrededor de la línea de ajuste, lo que deja en evidencia de que existe imprecisión en mediciones específicas en ambos métodos. La fuente de error se puede atribuir al factor humano en las mediciones que se hacen con el vernier, principalmente en la medición del ancho, donde se encuentra el hilum de la semilla que presenta una curvatura pequeña en la que complica acomodar el vernier de manera correcta. Otro posible efecto del factor humano se puede provocar cuando se mide cada elemento individualmente, donde se puede inclinar inadecuadamente la semilla con respecto a las mandíbulas del vernier y medir incorrectamente. Las mediciones por medio de procesamiento de imágenes pueden incurrir en errores producto de sombras o excesos de brillo, sin embargo, es un método que permite estandarizar el error a partir de mediciones objetivas.

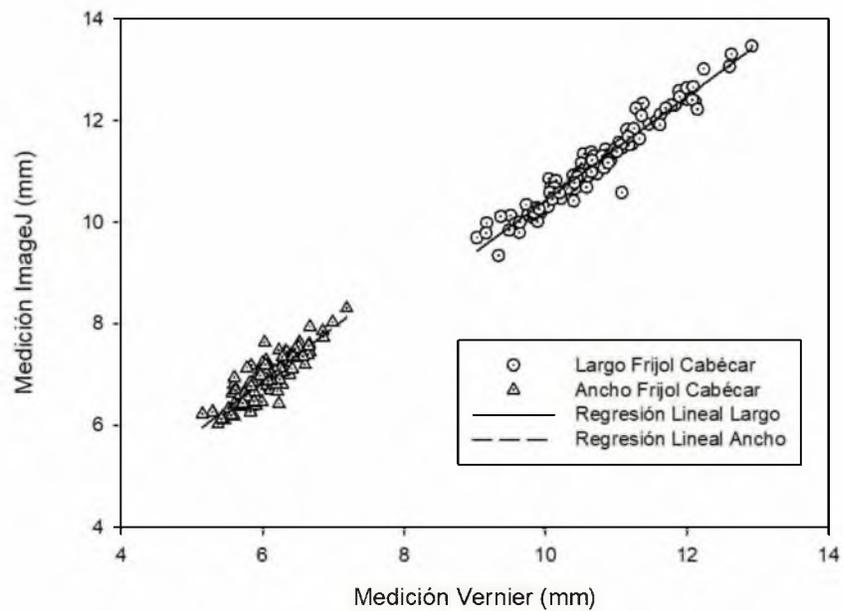


Figura 15. Relación entre las mediciones con vernier y con imágenes digitales para frijol Cabécar.

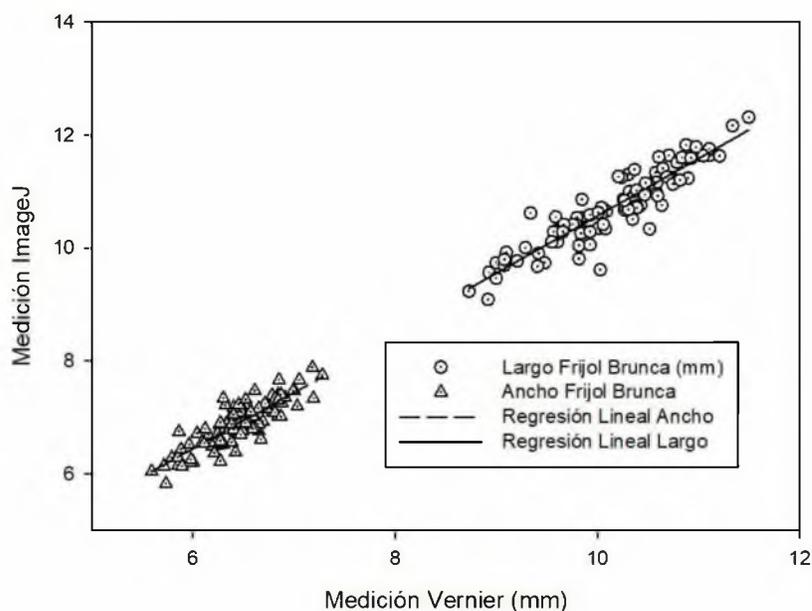


Figura 16. Relación entre las mediciones con vernier y con procesamiento de imágenes digitales para el frijol Brunca.

Cuadro 14. Constantes del modelo de regresión lineal y valor de significancia de la correlación de Pearson para medición con vernier y procesamiento de imágenes.

Genotipo	Variable	Pendiente	Intersección con eje y	R	R <sup>2</sup>	Valor-p
Cabécar	Largo	1,02	0,19	0,97	0,94	$9,7 \times 10^{-64}$
Cabécar	Ancho	1,05	0,51	0,88	0,76	$8,7 \times 10^{-34}$
Brunca	Largo	0,98	0,51	0,84	0,70	$9,20 \times 10^{-43}$
Brunca	Ancho	1,01	0,42	0,92	0,85	$8,40 \times 10^{-29}$

Se han determinado altas relaciones entre mediciones con procesamiento de imágenes y mediciones manuales con vernier para diversos parámetros que describen el tamaño y forma de granos y semillas. Kumar et al [49] obtuvieron ajustes lineales en diversos genotipos de

frijol, con  $R^2$  en los rangos de 0,80-0,96 para el largo y 0,69-0,94 para el ancho. De igual manera, Valerio [50] determinó ajustes con  $R^2$  de 0,67 para alto y 0,72 para ancho de frijol de genotipo Matambú. Los valores adquiridos en esta investigación se encuentran dentro de los intervalos encontrados en las investigaciones mencionadas anteriormente, donde se obtuvo 0,70-0,94 para el largo y 0,76-0,85 para el ancho.

### **4.3 Desarrollo de curvas de crecimiento**

#### **4.3.1 Metodología para reposición de agua**

Se cuantificó una pérdida de agua aproximada de  $0,19 \pm 0,02$  mL/min (a  $30^\circ\text{C}$  con luz continua de 770 Lux). Para la reposición de dicha pérdida y evitar que el papel de germinación se seque, se colocó un tanque con agua destilada unido a un gotero estándar que brinda 20 gotas/mL ( $\sim 0,05$  ml/gota) el cual cuenta con una llave reguladora de flujo que por medio de gravedad permitió brindar de manera precisa el agua absorbida por la semilla y la evaporada al ambiente en función a la cantidad de gotas por un minuto.

#### **4.3.2 Ajustes para ensayos de imbibición**

El contenido de humedad de los diferentes genotipos utilizados fue similar (cerca a 14% de humedad) (Cuadro 15). La densidad aparente fluctuó de 75,33 kg/hl para el genotipo Brunca hasta 81,4 kg/hl para el genotipo Nambí. Se garantizaron condiciones de almacenamiento similares para evitar la variación en estas características y, por tanto, evitar variaciones en el proceso de imbibición y germinación durante los ensayos. Adicionalmente por medio de procesamiento de imágenes se obtuvo un área promedio por semilla, que dio como resultado un área de  $56,11 \pm 2,65$  mm<sup>2</sup> para el genotipo Brunca,  $58,24 \pm 3,17$  mm<sup>2</sup> para Cabécar y  $65,25 \pm 2,44$  mm<sup>2</sup> para el genotipo Nambí (Figura 18).

Cuadro 15. Caracterización de genotipos de frijol utilizados.

<b>Genotipo</b>	<b>% Humedad</b>	<b>Densidad aparente [kg/hl]</b>
Brunca	14,1	75,3
Cabécar	14,9	79,8
Nambí	14,3	81,4

La semilla presentó cambios importantes en su tamaño durante los ensayos de imbibición, esto se puede observar fácilmente si se hace una comparación del tamaño de la semilla en periodos de 6 horas (Figura 17). Sin embargo, existen cambios que no pueden ser detectados de manera visual que sí pueden ser observados por procesamiento de imágenes, por lo que se pudo desarrollar una curva de crecimiento del área de los tres genotipos de semilla durante la imbibición, al efectuar mediciones cada 15 minutos durante un periodo de 24 horas (Figura 19). Al tratarse de materiales biológicos diferentes los genotipos de semillas presentan diferentes tamaños iniciales, por lo que, al promediar y graficar este promedio del área de las columnas de semillas observadas, puede dificultar el estudio (Figura 18). Al considerar la Razón de Crecimiento de Área (RCA) la cual expresa el crecimiento de la semilla como una fracción adimensional respecto a su tamaño inicial ( $A_{(t)}/A_0$ ) se pudo observar las diferentes curvas de crecimiento desde un mismo punto de inicio, esto permitió apreciar de mejor manera las diferencias entre los diferentes genotipos utilizados (Figura 19).

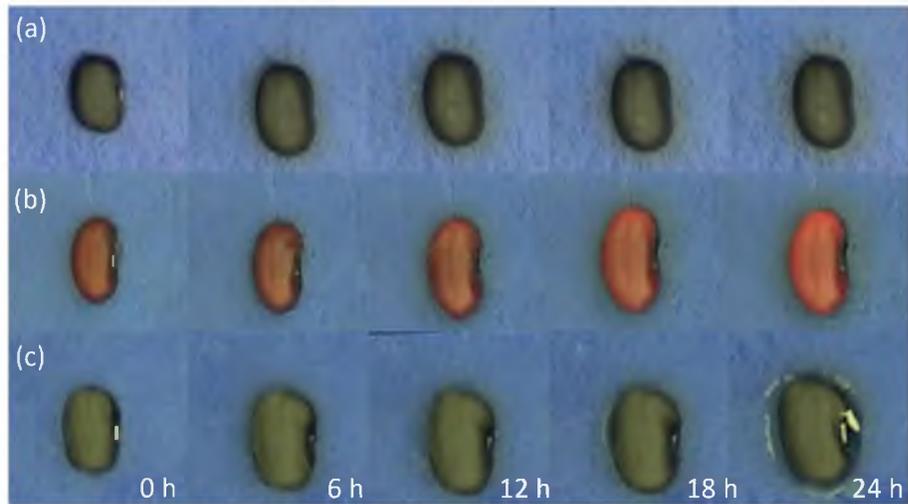


Figura 17. Aumento del área proyectada de la semilla durante la imbibición en un periodo de 24 horas con intervalos de 6 horas. (a) Brunca, (b) Cabécar, (c) Nambí.

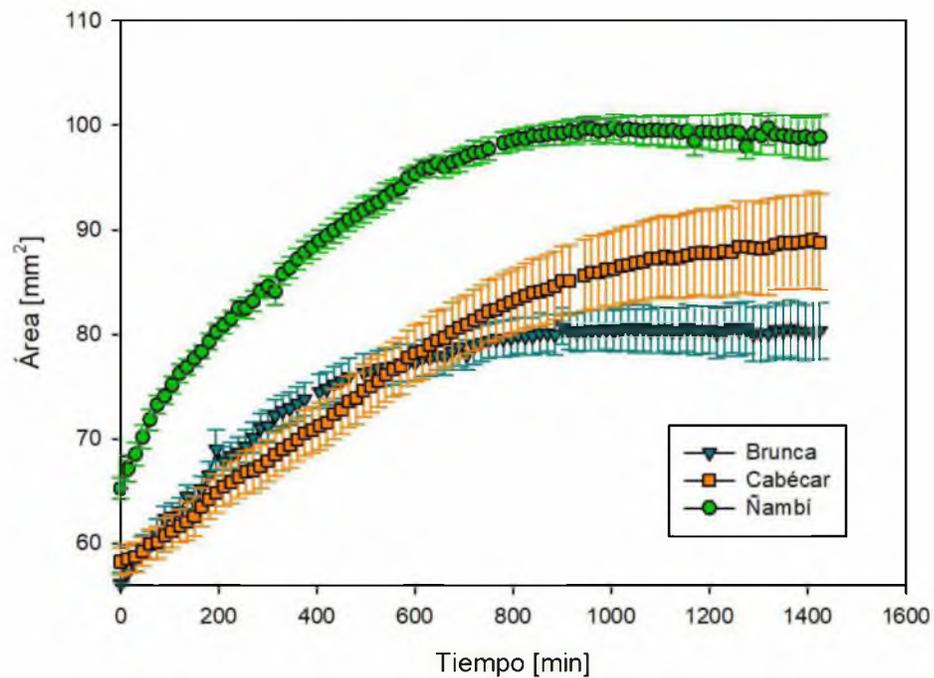


Figura 18. Crecimiento del área de la semilla a través del tiempo para los tres genotipos de frijol. Se muestran los valores promedio junto con el error estándar para tres ensayos.

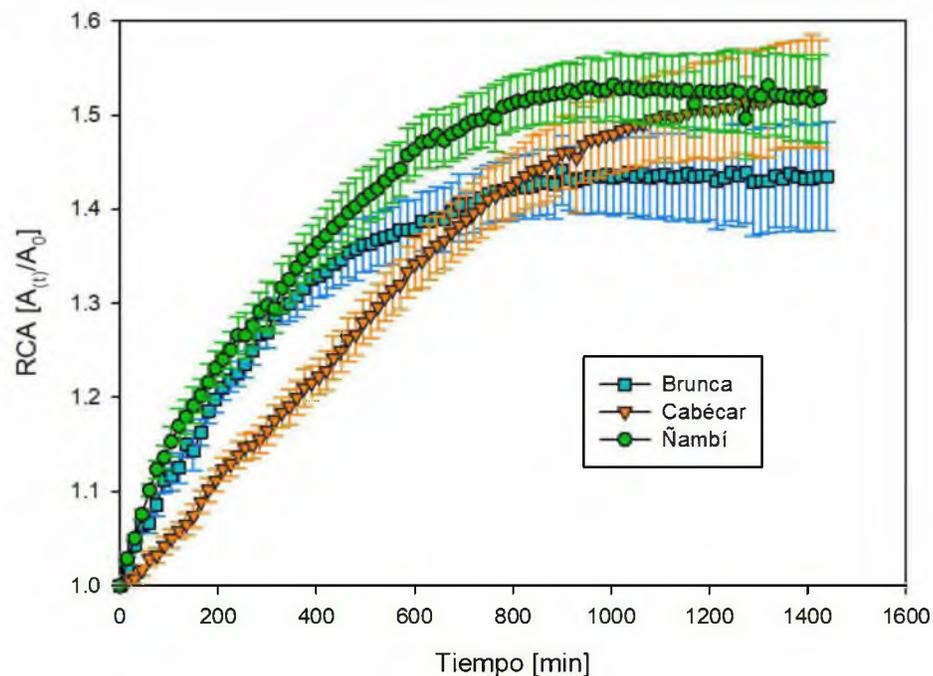


Figura 19. Razón de Crecimiento de Área las semillas a través del tiempo para los tres genotipos de frijol sobre papel con déficit de humedad. Se muestran los valores promedio junto con el error estándar para tres ensayos.

La prueba de imbibición con el papel humedecido con 100 mL de agua (Figura 18) presentó una deficiencia en cuanto a la variabilidad en el comportamiento del crecimiento de la semilla. Al estar el gotero ubicado en una posición fija el agua no se distribuyó de manera uniforme en todo el papel de germinación por lo que se observó un crecimiento acelerado en las semillas más cercanas a la fuente de agua. Esto se puede evidenciar con el comportamiento de los errores estándar de las curvas de área y RCA respecto al tiempo, los cuales crecen conforme pasa el tiempo y alcanzan valores de hasta 0,05 (Figura 18 y 19). Las semillas que presentaron un mayor crecimiento lograron alcanzar la emergencia radicular, a diferencia de las que se encontraban más alejadas del gotero las cuales no alcanzaron la emergencia radicular en un periodo de tres días.

### **4.3.3 Ensayos del prototipo en tres genotipos de frijol**

Se redujo la alta variabilidad en el crecimiento de diferentes ensayos de imbibición y germinación de semillas al aplicar dos modificaciones en los ensayos. Primero, se aumentó la cantidad de agua colocada inicialmente en la bandeja de germinación, pasando de 100 mL a 300 mL esto garantizó que el papel estuviera uniformemente humedecido por medio de una lámina de agua suficiente para no sobrepasar el nivel del papel de germinación. El segundo cambio consistió en utilizar tiras de papel de germinación con agujeros donde se colocaron las semillas, esto permitió que el área de contacto de la semilla con el papel humedecido y la lámina de agua fuera mayor sin afectar la segmentación en el procesamiento de imágenes producto de reflejos, sombras o excesos de brillo. Los errores estándar de cada punto de las curvas se redujeron en comparación con la prueba con 100 mL de agua ( $<0,01$ ) y se mantuvieron constantes a través de toda la curva contrario a lo que se muestra en la Figura 19 donde los errores crecen conforme la semilla alcanza el equilibrio.

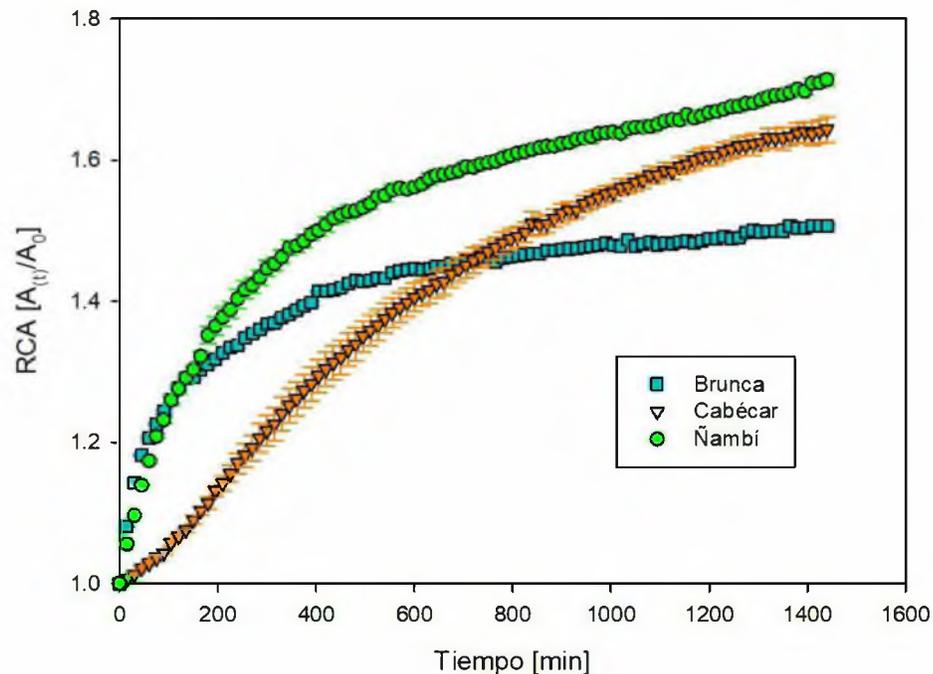


Figura 20. Razón de Crecimiento de Área las semillas a través del tiempo para los tres genotipos de frijol con una lámina de agua de 300 mL. Se muestran los valores promedio junto con el error estándar para tres ensayos.

Al aumentar la cantidad inicial de agua a las semillas y aumentar el área de contacto entre semilla y el papel de germinación, se observó un cambio importante en el comportamiento del crecimiento en el área y RCA, manteniendo las tendencias de crecimiento entre los genotipos (Figura 20). Se observa que en el ensayo donde se utilizó papel con poca cantidad de agua (100 mL) se alcanzó un equilibrio menor en la curva de crecimiento del área durante la imbibición en los tres los genotipos, esto puede significar que hubo una interrupción del proceso de imbibición ya que el agua disponible en el papel no fue suficiente para ingresar a la semilla y promover la actividad metabólica de la misma, por esta razón no se logró alcanzar la emergencia radicular. Al tener una mayor disponibilidad de agua (300 mL), la fase de crecimiento de las semillas redujo su velocidad en un tiempo determinado respecto al inicio de la prueba, pero no se detuvo, esto puede ser producto de la alta variabilidad de tamaño de

la semilla que provocó un crecimiento no uniforme del lote ya que no todas las semillas absorben agua a la misma velocidad y al utilizar repeticiones de 10 semillas, algunas pueden iniciar antes o después su proceso de crecimiento. Se observa que a pesar de ser ensayos con diferentes condiciones de humedad del papel se conserva la tendencia en el comportamiento de los genotipos en el que Brunca y Nambí presentan un crecimiento inicial más acelerado que el genotipo Cabécar, mientras que el equilibrio en la imbibición de Brunca es más bajo que el genotipo Cabécar y Nambí (Figura 19 y 20).

Los modelos matemáticos comúnmente empleados para describir la cinética de la masa y contenido de humedad en base seca se ajustaron a la cinética de expansión del área bidimensional observada por medio del estudio de imágenes fotográficas con altos coeficientes de determinación. El modelo de Peleg (Figura 21), presentó mejores ajustes para los genotipos que tuvieron un crecimiento acelerado desde el tiempo cero, como es el caso de Brunca ( $R^2=0,989$ ) y Nambí ( $R^2=0,997$ ), en comparación con los ajustes del modelo Sigmoide (Cuadro 16). Al utilizar el modelo de Peleg para predecir el punto de equilibrio de la razón de crecimiento del área con respecto a su valor inicial se determinó que el genotipo Brunca alcanzó un equilibrio en la expansión del 54% con respecto al área inicial de la semilla, el genotipo Cabécar se equilibró en un 133% y el genotipo Nambí alcanzó el equilibrio en un 80%. Estos resultados presentan una sobreestimación con respecto a los valores observados por medio de procesamiento de imágenes, principalmente en el genotipo Cabécar donde el punto de equilibrio observado es de un 67%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ulloa et al (17) quienes encontraron sobreestimaciones del modelo de Peleg en diferentes genotipos de frijol. Por esta razón el modelo de Peleg es una herramienta matemática que permite describir de manera correcta la cinética de expansión del área durante el periodo en que se realizan las mediciones, sin embargo, no debe ser utilizado predecir el equilibrio en la expansión del área en intervalos de tiempo muy largos.

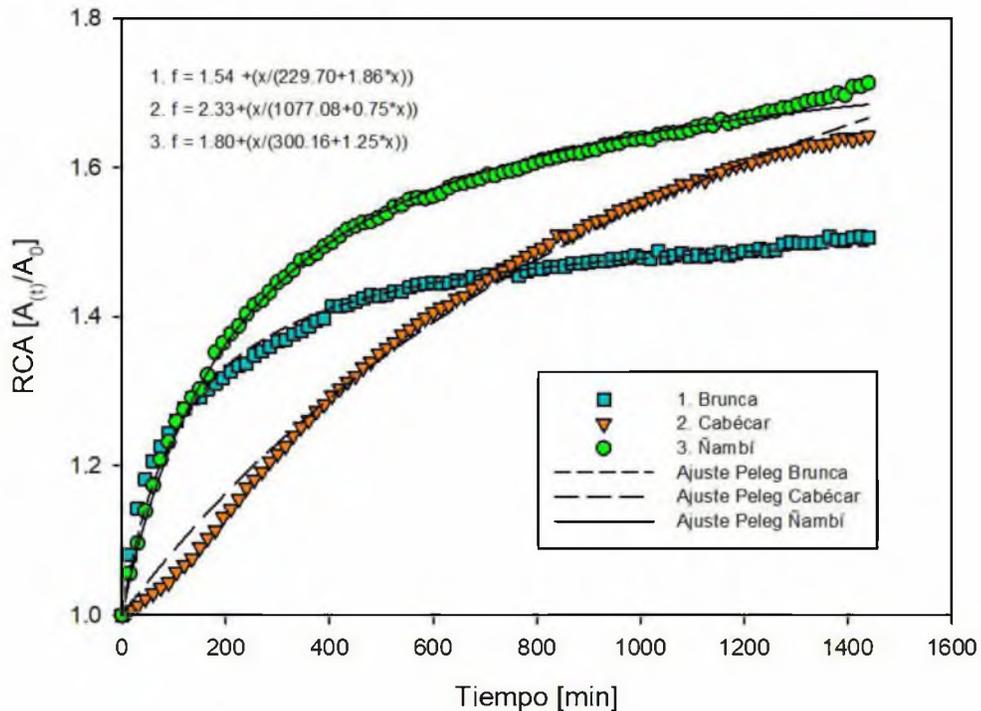


Figura 21. Ajuste del modelo de Peleg en la cinética de la razón de crecimiento del área de la semilla con respecto al área inicial de los tres genotipos de semilla.

El modelo Sigmoide (Figura 22) permitió obtener mayores ajustes para el genotipo Cabécar ( $R^2=0,999$ ) con respecto al modelo de Peleg, ya que este presentó un crecimiento lento del área durante el proceso de imbibición con respecto a otros genotipos, este comportamiento coincide con los resultados encontrados por Oliveira et al [16] quienes evaluaron ambos modelos en frijol Adzuki para describir la cinética de hidratación de semillas y observaron que ciertos genotipos de semillas presentan un crecimiento desacelerado al inicio del experimento que puede ser ajustado por el modelo Sigmoide. La fase de crecimiento lento se describe con una de las constantes del modelo Sigmoide la cual representa el tiempo asociado punto de inflexión en relación con la fase lag [16].

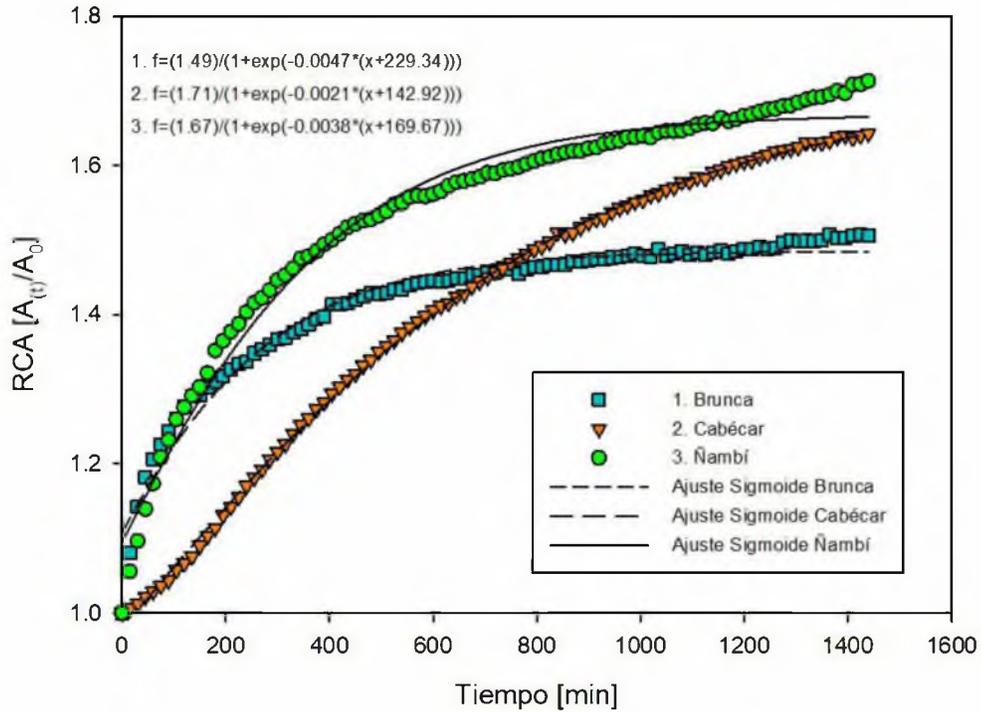


Figura 22. Ajuste del modelo Sigmoide en la cinética de la razón de crecimiento del área de la semilla con respecto al área inicial de los tres genotipos de semilla.

El modelo Sigmoide presenta dos constantes que pueden asociarse con variables físicas, las cuales son el equilibrio en la Razón de Crecimiento del Área ( $RCA_{eq}$ ) y la constante de velocidad de crecimiento ( $k$ ). Con respecto al genotipo Brunca, la estimación del equilibrio en la razón de crecimiento del área corresponde a un 49% lo que implica un error de 1,32% con respecto al valor observado, el genotipo Cabécar dio como resultado una expansión del 71% durante la imbibición lo que implica un error del 3,63% y el genotipo Nambí alcanzó el equilibrio en un 67% para un error de 1,62% (Cuadro 17). Estos errores son menores comparados con los obtenidos por medio del modelo de Peleg (Cuadro 16) lo que demuestra que el modelo Sigmoide puede ser utilizado como una herramienta predictiva del equilibrio en la imbibición de semillas por medio del estudio del crecimiento del área.

Con respecto a la velocidad del crecimiento de las semillas Brunca y Nambí, presentó valores de  $k = 0,0047 \text{ min}^{-1}$  y  $k = 0,0038 \text{ min}^{-1}$  respectivamente, esto demuestra que estos genotipos muestran un crecimiento más acelerado que el genotipo Cabécar el cual tiene una constante de velocidad  $k = 0,0021^{-1}$  (Cuadro 17). Kaptso et al [14] atribuye el fenómeno de absorción lenta de agua al endurecimiento de la semilla y el efecto de la cubierta de la semilla, donde en función al espesor y a la constitución de la misma puede mostrar mayor o menor permeabilidad. Se ha demostrado en genotipos costarricenses de frijol que la cobertura tiene un efecto importante en la absorción de agua, principalmente cuando la semilla es de color negro brillante o de color rojo. Oreamuno [51] efectuó una prueba comparativa entre semillas con cobertura intacta y semillas con una incisión en la cubierta, los genotipos de frijol negro opaco no presentaron diferencias significativas, mientras que la semilla de color rojo o negro brillante aumentó significativamente su velocidad de absorción de agua.

Cuadro 16. Parámetros cinéticos del modelo de Peleg para tres genotipos de frijol.

Parámetros cinéticos	Genotipo de semilla		
	Brunca	Cabécar	Nambí
RCA eq [dec]	1,54	2,33	1,80
% Error	8,76	31,31	6,04
C <sub>1</sub> [min]	229,70	1077,08	300,16
C <sub>2</sub> [dec]	1,86	0,75	1,25
SEE	0,01	0,02	0,01
R <sup>2</sup>	0,989	0,994	0,997

*RCA es la Razón de Crecimiento del Área observada con procesamiento de imágenes.*

*SEE es el error estándar de la estimación.*

Cuadro 17. Parámetros cinéticos del modelo Sigmoide para tres genotipos de frijol.

Parámetros cinéticos	Genotipo de semilla		
	Brunca	Cabécar	Nambí
RCA eq [dec]	1,49	1,71	1,67
% Error	1,32	3,63	1,62
k [min <sup>-1</sup> ]	0,0047	0,0021	0,0038
$\tau$ [min]	-229,34	-142,92	-169,77
SEE	0,02	0,01	0,02
R <sup>2</sup>	0,969	0,999	0,980

*RCA es la Razón de Crecimiento del Área observada con procesamiento de imágenes.*

*SEE es el error estándar de la estimación.*

#### 4.4 Comparación de curvas con germinación convencional

##### 4.4.1 Ensayos de germinación convencional

La norma ISTA establece tolerancias máximas permitidas para las diferencias entre las repeticiones de un ensayo de germinación y entre diferentes ensayos para un mismo genotipo ejecutados bajo las mismas condiciones de laboratorio (Aplicadas a la categoría con mayor porcentaje del ensayo). Se determinó que para ambos ensayos independientes se cumplen las tolerancias máximas entre las cuatro repeticiones realizadas, esto se logró al adquirir el porcentaje máximo y mínimo de germinación de las cuatro repeticiones de cada ensayo [4]. Al encontrar la diferencia de estas variables se consultó el cuadro de tolerancias de la norma, donde se reportan las diferencias máximas permitidas, si la diferencia obtenida en laboratorio es menor a la tolerancia máxima se aceptan los resultados y pueden reportarse, de lo contrario se debe repetir la prueba (Cuadro 18).

Con respecto a la diferencia entre las repeticiones, el genotipo que presentó mayores variaciones fue el Nambí, en el que ambos ensayos dieron una diferencia de 7% entre el porcentaje más bajo y el más alto, sin embargo la diferencia máxima permitida es de 10% por lo que no fue necesario repetir los ensayos (Cuadro 18). En el caso de la diferencia entre

ensayos, los genotipos Cabécar y Nambí dieron como resultado el mismo porcentaje de plántulas normales en ambos ensayos, por tanto, no se requirió determinar la tolerancia. Por otra parte, el genotipo Brunca sí presentó una diferencia del 4% cuando la tolerancia máxima es un 5% lo que valida los resultados obtenidos (Cuadro 19).

Cuadro 18. Determinación de tolerancia máxima entre repeticiones para pruebas de germinación convencional de ISTA.

<b>Ensayo</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Germinación (%)</b>	<b>Máximo</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Tolerancia</b>
1	Brunca	87	90	85	±5	±13
1	Cabécar	94	97	92	±5	±10
1	Nambí	93	97	90	±7	±10
2	Brunca	91	93	89	±4	±13
2	Cabécar	94	98	92	±6	±10
2	Nambí	93	97	90	±7	±10

Cuadro 19. Determinación de tolerancia máxima entre ensayos para pruebas de germinación convencional de ISTA.

<b>Genotipo</b>	<b>Germinación (%)</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Tolerancia</b>
Brunca	89	±4	±5
Cabécar	94	±0	±4
Nambí	93	±0	±4

Se determinaron los porcentajes de germinación promedio de los tres genotipos de semillas utilizados en el experimento para un periodo de nueve días en dos ensayos independientes. El genotipo Cabécar presentó un mayor porcentaje de germinación (expresado en términos de porcentaje de plántulas normales, siguiendo los procedimientos de ISTA) con un promedio del 94%, seguido del frijol Nambí que tuvo un 93% de plántulas normales (Figura 23a). A partir de la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que no existen diferencias

significativas entre los genotipos Cabécar y Nambí, pero ambos genotipos sí presentaron diferencias significativas con el genotipo Brunca. Este último genotipo obtuvo un menor porcentaje de germinación, con mayor diferencia entre los dos ensayos con un 87% para el primer ensayo y un 91% para el segundo ensayo (Figura 23a). No se observaron diferencias entre los genotipos para porcentaje de plántulas anormales y porcentaje de semillas no germinadas (Figura 23b y c). En el caso de porcentaje de semillas muertas, el genotipo Cabécar no mostró semillas de este tipo, el material Brunca presentó un porcentaje mayor que Nambí (Figura 23d).

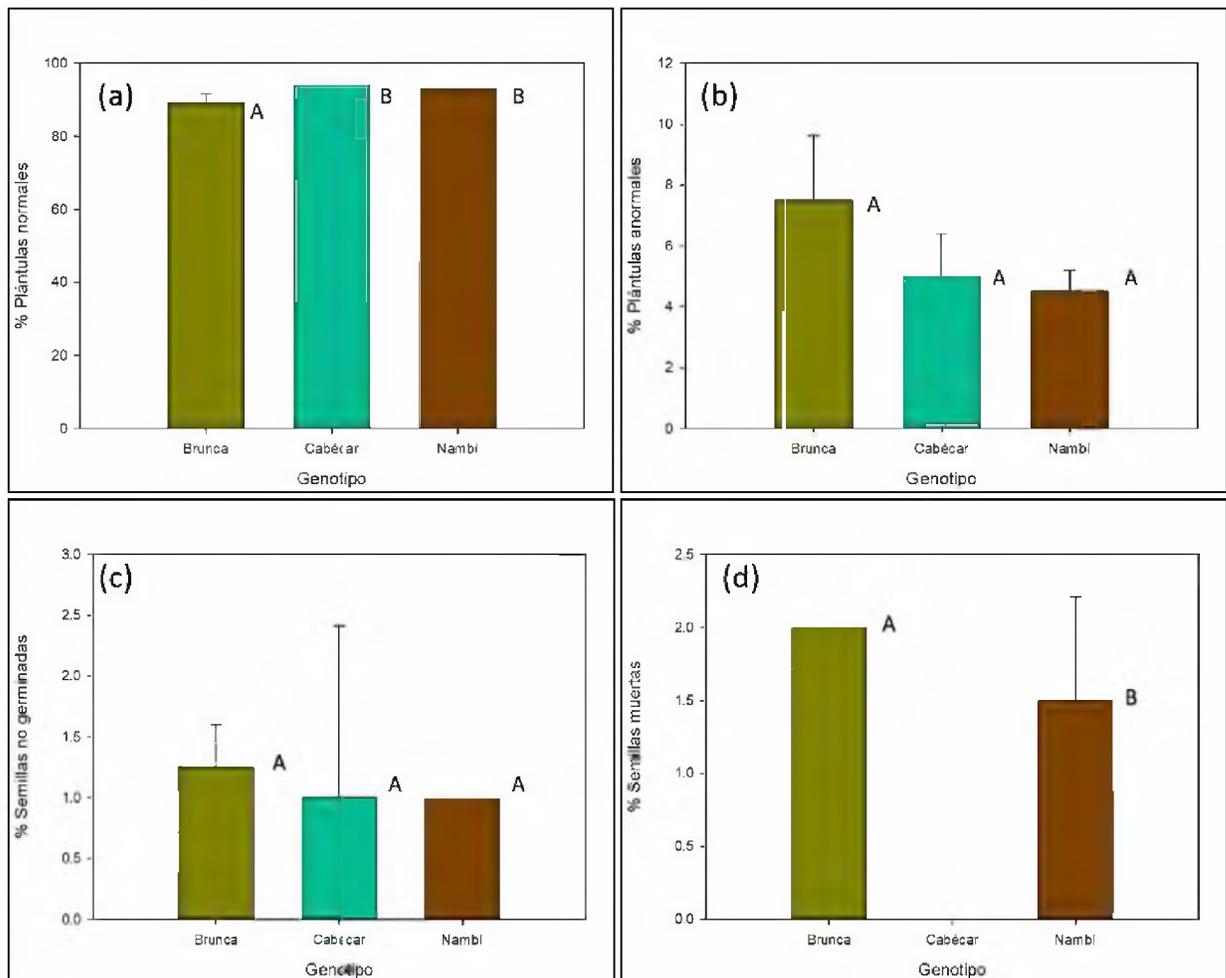


Figura 23. Ensayo de germinación convencional en tres genotipos de frijol. (a) Porcentaje de plántulas normales, (b) plántulas anormales, (c) semillas no germinadas, (d) semillas

muertas. Se muestra el promedio y la desviación estándar de dos experimentos independientes. Barras con letras en común implican que no hay diferencias significativas a un valor- $p > 0,05$ .

Se observó una relación lineal entre el punto de equilibrio de la expansión del área de los tres genotipos de frijol estudiados estimados con el modelo Sigmoide (sección 4.3.3) y el porcentaje de germinación máxima obtenida de la prueba de germinación de ISTA (sección 4.4.1). Los genotipos Cabécar y Nambí embebieron una mayor cantidad de agua con expansiones del 71% y 67% (Cuadro 17) con respecto a su área inicial a su vez presentaron porcentajes de germinación mayor con valores de 94% y 93% (Figura 23) respectivamente, mientras que el genotipo que embebió una menor cantidad de agua fue Brunca con una expansión del 49% mostró un porcentaje de germinación del 89%. A pesar de que el ajuste de estas dos variables es lineal con un  $R^2 = 0,99$  el número de genotipos utilizado en esta investigación no es suficiente para afirmar que existe una correlación entre ambas variables, por lo que se debe proyectar el enfoque de esta investigación a un panel con un mayor número de genotipos con variaciones importantes en los porcentajes de germinación. Otra aplicación potencial relacionada a esta investigación es utilizar los mismos genotipos con diferentes niveles de envejecimiento que reduzcan los porcentajes de germinación de la semilla y determinar si existe un efecto en la disminución de la expansión del área observada lo que implica una reducción en la absorción de agua de la semilla.

## CONCLUSIONES

---

Se desarrolló un prototipo para la adquisición de imágenes de manera independiente y automática en periodos e intervalos de tiempo deseados por el usuario, lo que facilita su aplicación en estudios de imbibición y germinación de semillas.

La herramienta de procesamiento de imágenes en ImageJ con funciones predeterminadas permitió analizar imágenes y adquirir información descriptora del tamaño y forma de los elementos observados por la cámara fotográfica.

Se demostró la funcionalidad de los componentes de bajo costo y software de acceso libre para el desarrollo de una herramienta de cuantificación de variables a partir de procesamiento de imágenes.

El uso de una cámara de 5 megapíxeles a una altura de 28 cm respecto al espacio de observación permitió obtener un nivel de detalle de los elementos observados, para realizar mediciones con un 2% de error, respecto a figuras geométricas impresas en papel.

El uso del sistema permitió cuantificar los cambios en el tamaño de la semilla durante la imbibición y germinación en periodos de 24 horas e intervalos de 15 minutos, evidenciando las diferencias entre los diferentes genotipos.

El modelo sigmoide fue el más adecuado para describir la cinética de crecimiento de semillas de frijol durante la imbibición, con expansiones máximas de 71%, 67% y 49% para los genotipos Cabécar, Nambí y Brunca.

La cantidad de agua brindada a la semilla y la humedad relativa del aire tienen un efecto importante en la velocidad de crecimiento de las semillas, por lo que estas variables deben ser monitoreadas para no generar variaciones en los resultados de diferentes ensayos.

Se encontró que los genotipos que absorbieron mayor cantidad de agua tuvieron porcentajes de germinación mayores, por lo que puede existir una relación entre ambas variables, que requiere ser verificada con un mayor número de genotipos.

## RECOMENDACIONES

---

Se recomienda utilizar cámaras fotográficas novedosas que no se encontraban disponibles en el momento que se adquirieron los materiales de este proyecto. Actualmente se recomienda la cámara Kayeton UVC OTG Plug Play Driverless USB Camera 5.0 MP, ya que esta cuenta con el mismo sensor utilizado en este proyecto con mejoras como carcasa protectora, conexión USB, además permite una programación más sencilla y estable. Información disponible en: <https://www.kayetoncctv.com/5mp-uvc-otg-plug-play-driverless-usb-camera-5-megapixel-omnivision-ov5640-webcam-with-mini-case/>

Al utilizar un tornillo de avance de mayor longitud permitiría aumentar en mayor medida el área de observación de una cámara fotográfica, en comparación con tener una o varias cámaras en posiciones fijas.

Para la calibración de la cámara en este proyecto se utilizó una versión gratuita de la herramienta de Matlab: Image Processing Toolbox, sin embargo, estas aplicaciones se pueden realizar con herramientas de acceso libre como OpenCV, la cual es compatible con Windows.

Colocar el sistema en un ambiente con una humedad relativa mayor al 95% para reducir la tasa de evaporación de agua al ambiente, esto permitiría homogenizar la velocidad de germinación de un lote de semillas.

Ampliar el número de genotipos de frijol evaluados con el prototipo y con la prueba de germinación convencional, para comprobar la relación obtenida en este proyecto.

Evaluar el efecto las condiciones ambientales como temperatura, luz, cantidad inicial de agua y el efecto de diferentes tratamientos a las semillas como envejecimiento acelerado y estrés hídrico en la velocidad de crecimiento de la semilla.

Reforzar la validación del prototipo, por medio de ensayos de imbibición y germinación con semillas de diversas formas y tamaños.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Benech-Arnold RL, Sánchez RA. Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture. Food Products Press; 2004. 506 p.
2. Wagner M-H, Demily D, Ducournau S, Dürr C, Léchappé J. Computer Vision for Monitoring Seed Germination from Dry State to Young Seedlings. *Seed Sci.* 2011; 142:49-51.
3. Joosen RVL, Kodde J, Willems LAJ, Ligterink W, van der Plas LHW, Hilhorst HWM. GERMINATOR: A Software Package for High-throughput Scoring and Curve Fitting of Arabidopsis Seed Germination. *Plant J Cell Mol Biol.* 2010; 62(1):148-59.
4. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, Switzerland; 2017.
5. Joosen RVL, Arends D, Willems LAJ, Ligterink W, Jansen RC, Hilhorst HWM. Visualizing the genetic landscape of Arabidopsis seed performance. *Plant Physiol.* 2012; 158(2):570-89.
6. He D, Yang P. Proteomics of rice seed germination. *Front Plant Sci.* 2013; 4(246):1-9.
7. Herrera J, Alizaga R, Guevara E, Jiménez V. Germinación Y Crecimiento de la Planta. 1 edición. San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 128 p.
8. Suárez D, Melgarejo LM. Biología y Germinación de Semillas. En: *Experiments in plant Physiology*. 1 edition. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2010. p. 13-24.
9. Woodstock LW. Seed Imbibition: A critical period for successful germination. *J Seed Technol.* 1988; 12(1):1-15.

10. Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H, Nonogaki H. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. *Plant Cell*. 2013; 9:1055-66.
11. Guzmán GI. Efecto del plomo sobre la imbibición, germinación y crecimiento de *Phaseolus vulgaris L.* y *Zea mays L.* *Biotechnol Veg*. 2013; 13(3):161-7.
12. Jennings P, Saltveit ME. Temperature Effects on Imbibition and Germination of Cucumber (*Cucumis sativus*) Seeds. *J Am Soc Hortic Sci*. 1994; 119(3):464-7.
13. Karaguzel AU, Cakmakci S, Ortacesme V, Aydinoglu B. Influence of seed coat treatments on germination and early seedling growth of *Lupinus varius L.* *Pak J Bot Pak*. 2004; 36(4):65-74.
14. Kaptso KG, Njintang YN, Komnek AE, Hounhouigan J, Scher J, Mbofung CMF. Physical properties and rehydration kinetics of two varieties of cowpea (*Vigna unguiculata*) and bambara groundnuts (*Voandzeia subterranea*) seeds. *J Food Eng*. 2008; 86(1):91-9.
15. Peleg M. An Empirical Model for the Description of Moisture Sorption Curves. *J Food Sci*. 1988;53(4):1216-7.
16. Oliveira AL, Colnaghi BG, Silva EZ da, Gouvêa IR, Vieira RL, Augusto PED. Modelling the effect of temperature on the hydration kinetic of adzuki beans (*Vigna angularis*). *J Food Eng*. 2013; 118(4):417-20.
17. Ulloa JA, Rosas-Ulloa P, Ramírez-Ramírez JC, Ulloa-Rangel BE, Ulloa JA, Rosas-Ulloa P, et al. Modelación matemática de las cinéticas de hidratación a diferentes temperaturas de cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) producidas en México. *Cienc UAT*. 2016; 10(2):52-62.
18. Azcón-Bieto J. Fundamentos de fisiología vegetal. 2 edición. Barcelona: McGraw-Hill Interamericana; 2008. 651 p.

19. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. 1 edición. Brasília; 1992. 365 p.
20. Araya R, Martínez K, López A, Murillo A. Protocolo para el manejo poscosecha de la semilla de frijol. 1 edición. San José, Costa Rica: FAO; 2013. 39 p.
21. Petrou M, Petrou C. Image Processing: The Fundamentals. 2 edición. India: John Wiley & Sons; 2010. 820 p.
22. Gonzalez RC, Woods RE. Digital Image Processing. 3 edición. New Jersey: Prentice Hall; 2008. 977 p.
23. Burger W, James Burge M. Principles of Digital Image Processing: Fundamental Techniques. 2008.
24. Rastislav L. Single-Sensor Imaging: Methods and Applications for Digital Cameras. CRC Press; 2008. 626 p.
25. Young IT, Gerbrands JJ, Vliet LJ van. Fundamentals of image processing. Delft TU Delft, Faculty of Applied Physics, Pattern Recognition Group; 1995.
26. D'Emilia G, Gasbarro DD. Review of techniques for 2D camera calibration suitable for industrial vision systems. J Phys Conf Ser. 2017; 841(1):1-6.
27. Chavarría JFC. Diseño, implementación y prueba de un algoritmo de estimación de los 8 parámetros de la transformación proyectiva (homografía) entre dos imágenes a partir del rastreo de esquinas [Bachillerato]. [San José, Costa Rica]: Universidad de Costa Rica; 2013.
28. Heikkilä J, Silvén O. A Four Step Camera Calibration Procedure with Implicit Image Correction. En: Proceedings of the IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. 1997. p. 1106.

29. Zhang Z. A Flexible New Technique for Camera Calibration. *Pattern Anal Mach Intell.* 2000; 22:1330-4.
30. Ramírez JM, Medina R, Garreau M. Calibración Geométrica de un Equipo de Angiografía Digital. En: *IV Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering Solutions for Latin America Health.* Springer, Berlin, Heidelberg; 2007. p. 381-5.
31. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7):671-5.
32. Rahman A, Cho B-K. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. *Seed Sci Res.* 2016;26(4):285-305.
33. Li C, Raheja A, Still DW. Application of Computer Vision for Lettuce Seeds Germination Detection. *Seed Sci Technol.* 2011; 35:337-50.
34. Dell 'Aquila A. Application of a Computer-Aided Image Analysis System to Evaluate Seed Germination under Different Environmental Conditions. *Int J Appl.* 2004; 8:51-62.
35. Lurstwut, B, Pornpanomchai, C. Application of Image Processing and Computer Vision on Rice Seed Germination Analysis. *Int J Appl Eng Res.* 2016; 11(9):6800-7.
36. McRoberts M. *Beginning Arduino. Segunda Edición.* Estados Unidos: Apress; 2010. 433 p.
37. Pedrera AC. *Arduino para Principiantes. 2 edición.* IT Campus Academy; 2017. 94 p.
38. Blum J. *Exploring Arduino: Tools and Techniques for Engineering Wizardry.* Indiana: John Wiley & Sons; 2013. 461 p.

39. Cortés FR, Monjaraz JC. Arduino: aplicaciones en robótica, mecatrónica e ingenierías. 1 edición. México: Marcombo, S.A.; 2015. 468 p.
40. Barbez F, Kleine-Vehn J, Barbez E. Low-Cost Microprocessor-Controlled Rotating Stage for Medium-Throughput Time-Lapse Plant Phenotyping. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017; 1497:37-45.
41. Budynas R, Keith N J. Diseño en ingeniería mecánica de Shigley. 9 edición. McGraw-Hill; 2012. 1069 p.
42. Đuriš M, Arsenijević Z, Jaćimovski D, Kaluđerović Radoičić T. Optimal pixel resolution for sand particles size and shape analysis. *Powder Technol*. 2016; 302:177-86.
43. Dell'Aquila A. Computerised seed imaging: a new tool to evaluate germination quality. *Commun Biometry Crop Sci*. 2006; 1(1):20-31.
44. Beer FP, Johnston ER, Eisenberg ER, Mazurek DF. Mecánica vectorial para ingenieros: Estática. 9 edición. McGraw-Hill; 2007. 652 p.
45. Brown L. Imaging Particle Analysis | Resolution and Sampling Considerations [Internet]. [citado 4 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://info.fluidimaging.com/resolution-and-sampling-wp>
46. Ehsan KM, Hossain MR, Manzur T, Shohag A, Tabassum N. Particle Size Analysis by Image Processing Technique. En: *BANGLADESH CIVIL ENGINEERING*. 2017.
47. Almeida-Prieto S, Blanco-Méndez J, Otero-Espinar FJ. Image Analysis of the Shape of Granulated Powder Grains. *J Pharm Sci*. 2004; 93(3):621-34.
48. Podczeczek F. A shape factor to assess the shape of particles using image analysis. *Powder Technology*. 1997; 93(1):47-53.

49. Kumar M, Bora G, Lin D. Image processing technique to estimate geometric parameters and volume of selected dry beans. *J Food Meas Charact.* 2013; 7(2):81-9.
50. Valerio O. Cinética de la masa y expansión volumétrica del frijol en hidratación [Licenciatura]. [San José, Costa Rica]: Universidad de Costa Rica; 2016.
51. Oreamuno P. Efecto de las altas temperaturas en el campo, el momento de la cosecha y almacenamiento tradicional sobre el tiempo de cocción y la imbibición de los granos de variedades de frijol común [Maestría]. [San José, Costa Rica]: Universidad de Costa Rica; 2016.

## ANEXOS

---

### Anexo A. Costo de componentes principales del prototipo.

---

Componente	Costo (USD)
Microcontrolador Arduino Uno R3	\$ 27.95
Motor de pasos bipolar	\$ 19.95
Riel de acero	\$ 19.05
Tarjeta Sparkfun Easy Driver V 4.4	\$ 14.95
Perfil de aluminio	\$ 39.70
Sistema de movimiento (Tornillo, Rosca, Rodamientos y Acople)	\$ 15.99
Base de PVC	\$ 15.88
Otros accesorios	\$ 15.00
Total	\$168.77

---

**Anexo B: Código grabado en Arduino con funciones para control de cámara y motor.**

```
//Definición de librerías para comunicación serial y Arducam
#include <Wire.h>
#include <ArduCAM.h>
#include <SPI.h>
#include "memorysaver.h"

//Definición de pines para control de motor
#define Direccion 8
#define Pasos 9
#define Sleep 7

String temp;
String temp2;
int b;

//Definición de pin 10 para comunicación con Arducam
const int SPI_CS = 10;
int mode =0;

//El programa reconoce que la cámara con la cual se trabaja es la OV5642
ArduCAM myCAM( OV5642, SPI_CS );

void setup() {

//Define pines que controlan el motor como salidas de señal
```

```

pinMode(Direccion, OUTPUT);
pinMode(Pasos, OUTPUT);
pinMode(Sleep, OUTPUT);

//Inicio de la comunicación serial
uint8_t vid, pid;
uint8_t temp;
#if defined(__SAM3X8E__)
  Wire1.begin();
  Serial.begin(115200);
#else
  Wire.begin();
  Serial.begin(921600);
#endif
Serial.println(F("Arducam Inicializada"));
// set the SPI_CS as an output:
pinMode(SPI_CS, OUTPUT);
// initialize SPI:
SPI.begin();
while(1){

//Verifica que el bus de datos SPI funciona.
myCAM.write_reg(ARDUCHIP_TEST1, 0x55);
temp = myCAM.read_reg(ARDUCHIP_TEST1);
if (temp != 0x55){
  Serial.println(F("Error en la interfaz SPI"));
  delay(1000);continue;
}
}

```

```

}else{
  Serial.println(F("Interfaz SPI correcta"));break;
}
}
while(1){

//Comprobación de que la cámara conectada es la OV5642
  myCAM.wrSensorReg16_8(0xff, 0x01);
  myCAM.rdSensorReg16_8(OV5642_CHIPID_HIGH, &vid);
  myCAM.rdSensorReg16_8(OV5642_CHIPID_LOW, &pid);
  if((vid != 0x56) || (pid != 0x42)){
    Serial.println(F("No se puede encontrar Módulo OV5642"));
    delay(1000);continue;
  }
  else{
    Serial.println(F("Módulo OV5642 detectado"));break;
  }
}

//Define el formato de imagen como JPEG e inicializa la cámara con una resolución por defecto de 320x240.

myCAM.set_format(JPEG);
myCAM.InitCAM();
myCAM.write_reg(ARDUCHIP_TIM, VSYNC_LEVEL_MASK); //VSYNC is active HIGH
myCAM.OV5642_set_JPEG_size(OV5642_320x240);
delay(1000);

```

```

myCAM.clear_fifo_flag();
myCAM.write_reg(ARDUCHIP_FRAMES,0x00);
myCAM.set_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);

//La cámara cuenta con opciones de ajuste para diferentes funciones de la imagen.

//Balance de Blancos: Advanced_AWB, Simple_AWB, Manual_day, Manual_A,
Manual_cwf Manual_cloudy
    myCAM.OV5642_set_Light_Mode(Advanced_AWB);
    Serial.println(F("ACK CMD Set to Advanced_AWB"));

//Saturación: Saturation(4, 3, 2, 1, 0, _1, _2, _3, _4)
    myCAM.OV5642_set_Color_Saturation(Saturation4);
    Serial.println(F("ACK CMD Set to Saturation+4"));

//Brillo: Brightness (4, 3, 2, 1, 0, _1, _2, _3, _4)
    myCAM.OV5642_set_Brightness(Brightness4);
    Serial.println(F("ACK CMD Set to Brightness+4"));

//Contraste: Contrast(4, 3, 2, 1, 0, _1, _2, _3, _4)
    myCAM.OV5642_set_Contrast(Contrast4);
    Serial.println(F("ACK CMD Set to Contrast+4"));

//HUE: degree ( _180, _150, _120, _90, _60, _30, _0, 30, 60, 90, 120, 150, 180)
    myCAM.OV5642_set_hue(degree_180);
    Serial.println(F("ACK CMD Set to -180 degree"));

```

```

//Efectos especiales: Normal, BW, Bluish, Sepia, Reddish, Greenish, Negative
myCAM.OV5642_set_Special_effects(Normal);
Serial.println(F("ACK CMD Set to Normal"));

//Exposición: Exposure( _17_EV, _13_EV, _10_EV, _07_EV, _13_EV, _Default, 07_EV,
10_EV, 13_EV, 17_EV)
myCAM.OV5642_set_Exposure_level(Exposure_17_EV);
Serial.println(F("ACK CMD Set to -1.7EV"));

//Nitidez: Auto_Sharppness_default, Auto_Sharppness1, Auto_Sharppness2,
Manual_Sharppnessoff, Manual_Sharppness1, Manual_Sharppness2, Manual_Sharppness3,
Manual_Sharppness4, Manual_Sharppness5

myCAM.OV5642_set_Sharppness(Auto_Sharppness_default);
Serial.println(F("ACK CMD Set to Auto Sharppness default"));

//Espejo y rotación: MIRROR, FLIP, MIRROR_FLIP, Normal

myCAM.OV5642_set_Mirror_Flip(MIRROR);
Serial.println(F("ACK CMD Set to MIRROR"));

//Calidad de compresión: high_quality, default_quality, low_quality

myCAM.OV5642_set_Compress_quality(high_quality);
Serial.println(F("ACK CMD Set to high quality"));
}

```

*//Estructura de control switch case que permite controlar las diferentes funciones de la cámara y motor. Al inicio de cada caso la cámara se inicia y define su ajuste, cuando la función finaliza, el sensor de la cámara se apaga para disminuir el consumo de energía y por ende disminuir la disipación de calor, alargando la vida útil de la cámara.*

```
void loop() {
uint8_t temp = 0xff, temp_last = 0;
uint8_t start_capture = 0;
temp = Serial.read();
switch (temp)
{
//Define resolución de cámara a 320x240 pixeles.
case 0:
temp = 0xff;
myCAM.clear_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
myCAM.OV5642_set_JPEG_size(OV5642_320x240);delay(1000);
Serial.println(F("ACK CMD switch to OV5642_320x240"));
myCAM.set_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
break;

//Define resolución de cámara a 640x480 pixeles.
case 1:
temp = 0xff;
myCAM.clear_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
myCAM.OV5642_set_JPEG_size(OV5642_640x480);delay(1000);
Serial.println(F("ACK CMD switch to OV5642_640x480"));
```

```

    myCAM.set_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
break;

//Define resolución de cámara a 1024x768 pixeles.

case 2:
    temp = 0xff;
    myCAM.clear_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
    myCAM.OV5642_set_JPEG_size(OV5642_1024x768);delay(1000);
    Serial.println(F("ACK CMD switch to OV5642_1024x768"));
    myCAM.set_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
break;

//Define resolución de cámara a 1280x960 pixeles.

case 3:
    temp = 0xff;
    myCAM.clear_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
    myCAM.OV5642_set_JPEG_size(OV5642_1280x960);delay(1000);
    Serial.println(F("ACK CMD switch to OV5642_1280x960"));
    myCAM.set_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
break;

//Define resolución de cámara a 1600x1200 pixeles.

case 4:
    temp = 0xff;
    myCAM.clear_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
    myCAM.OV5642_set_JPEG_size(OV5642_1600x1200);delay(1000);
    Serial.println(F("ACK CMD switch to OV5642_1600x1200"));

```

```

myCAM.set_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
break;
//Define resolución de cámara a 2048x1536 pixeles.
case 5:
temp = 0xff;
myCAM.clear_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
myCAM.OV5642_set_JPEG_size(OV5642_2048x1536);delay(1000);
Serial.println(F("ACK CMD switch to OV5642_2048x1536"));
myCAM.set_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
break;
//Define resolución de cámara a 2592x1944 pixeles.
case 6:
temp = 0xff;
myCAM.clear_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
myCAM.OV5642_set_JPEG_size(OV5642_2592x1944);delay(1000);
Serial.println(F("ACK CMD switch to OV5642_2592x1944"));
myCAM.set_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
break;

//Llamado a la función que permite tomar una fotografía, envía mensaje en consola de que
la fotografía se tomó.
case 0x10:
mode = 1;
temp = 0xff;
start_capture = 1;
Serial.println(F("ACK CMD CAM start single shoot."));

```

```

myCAM.clear_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
delay(800);
break;

//Llamado a la función mover motor, recibe una variable String correspondiente al ángulo
de giro deseado y la convierte en una variable entera.

case 0x32:
temp2= Serial.readString();
b= atoi(temp2.c_str());
rotateDeg(b, 0.7);
break;
default:
break;
}

//Función para captura de imagen
if(start_capture == 1)
{
myCAM.flush_fifo();
myCAM.clear_fifo_flag();
//Start capture
myCAM.start_capture();
start_capture = 0;
}
if(myCAM.get_bit(ARDUCHIP_TRIG, CAP_DONE_MASK))
{

```

```

myCAM.set_bit(ARDUCHIP_GPIO,GPIO_PWDN_MASK);
Serial.println(F("ACK CMD CAM Capture Done. "));
temp = 0;
Serial.println(F("ACK IMG"));
while( (temp != 0xD9) | (temp_last != 0xFF) )
{
temp_last = temp;
temp = myCAM.read_fifo();
Serial.write(temp);
delayMicroseconds(10);
}
//Clear the capture done flag
myCAM.clear_fifo_flag();
}
}

```

*//Función para control del giro del motor. Permite que el motor gire un número de grados en sentido horario (positivo) y antihorario (negativo) por medio de la variable deg.*

*La velocidad con la cual el motor gira depende de la variable speed la cual puede presentar valores entre 0 y 1. Donde 1 es la velocidad más alta y la fuerza más baja, mientras que a menor número la velocidad se reduce y la fuerza del movimiento aumenta.*

```

void rotateDeg(float deg, float speed){
int dir = (deg > 0)? HIGH:LOW;
digitalWrite(Direccion,dir);
digitalWrite(Sleep,HIGH);

int steps = abs(deg)*(1/0.225);
float usDelay = (1/speed) * 70;

```

```
for(int i=0; i < steps; i++){  
    digitalWrite(Pasos, HIGH);  
    delayMicroseconds(usDelay);  
  
    digitalWrite(Pasos, LOW);  
    delayMicroseconds(usDelay);  
}  
digitalWrite(Sleep, LOW);
```

### **Anexo C: Código en Python para control de cámara y motor por medio de comunicación serial con computadora.**

```
#Se importan las librerías y dependencias del programa.
from PIL import Image
from PIL import ImageDraw
import serial
import cv2
import time
import binascii
import StringIO
import numpy as np

#Esta función escribe indicaciones al Arduino para cambiar la resolución, utilizando el método declarado en el case del sketch.
def resolution(res,ser):
    ser.write(chr(res))
    while True:
        result= ser.readline()
        print (result)
        if result=="":
            break

#Esta función escribe indicaciones al Arduino para tomar una fotografía.
def takepicture(ser):
    ser.write(chr(0x10))
    data=ser.readline()
    print data
    data=""
    storedata=False
```

```
#Este bucle comienza a almacenar los datos de la imagen una vez que detecta el código 0xd8 y se detiene cuando lee 0xd9
```

```
while True:  
    result= ser.readline()  
    result=binascii.hexlify(result)  
    if result.startswith("ffd8")==True:  
        storedata=True  
    if storedata==True:  
        data=data+result  
    if result.endswith("ffd9")==True:  
        break
```

```
#Este método almacena la matriz de datos y la convierte en una imagen.
```

```
buf = StringIO.StringIO()  
bytes = binascii.unhexlify(data)  
buf.write(bytes)  
img = Image.open(buf)  
return img
```

```
#Este método escribe instrucciones al Arduino para mover el motor, en función al ángulo ingresado.
```

```
def movimiento (angulo,ser):  
    ser.write(chr(0x32))  
    ser.write(angulo)
```

```
#La lógica del programa inicia aquí
```

```
for a in range (1,n): #n corresponde al número de repeticiones deseadas.
```

```

ser = serial.Serial('COM3', baudrate = 921600, timeout = 1) #se inicia la comunicación serial.

time.sleep(3)
resolution(0x06,ser) #se escribe a la cámara instrucciones para resolución máxima.
time.sleep(1)

repeticion=str(a)
img=takepicture(ser)
print "Repetición: "+repeticion
opencvImage = cv2.cvtColor(np.array(img), cv2.COLOR_RGB2BGR)
cv2.imwrite("C:/Users/Usuario/Desktop/PruebaGerminacion/Hilera1/"+repeticion+"-1"+" .jpg",opencvImage)

for i in range (2,11):

    fotografia=str(i)
    print "Imagen: "+fotografia

    #Positivo es hacia la ubicación del motor
    print "Moviendo motor"
    movimiento("-1620",ser)
    time.sleep(5)

    #Imagen es tomada.
    img=takepicture(ser)
    time.sleep(2)
    opencvImage = cv2.cvtColor(np.array(img), cv2.COLOR_RGB2BGR)

```

```
cv2.imwrite("C:/Users/Usuario/Desktop/PruebaGerminacion/Hilera  
"+fotografía+"/"+"repeticion+"-"+fotografía+".jpg",opencvImage)
```

```
#Se regresa el motor a su posición original.
```

```
movimiento("4860",ser)
```

```
time.sleep(10)
```

```
movimiento("4860",ser)
```

```
time.sleep(10)
```

```
movimiento("4860",ser)
```

```
time.sleep(10)
```

```
# Se cierra el monitor serial para almacenar memoria
```

```
ser.close()
```

```
# El programa descansa por 15 minutos.
```

```
time.sleep(720)
```

#### **Anexo D: Código de Matlab utilizado para corrección de imágenes.**

```
%Crear un set de imágenes de para calibrar la cámara.

machote_calibracion = imageDatastore(fullfile('C:', 'Users', 'Ivan', 'Desktop', 'calibracion'));

%Detectar el patrón de calibración.

[imagePoints, boardSize] = detectCheckerboardPoints(machote_calibracion.Files);

% Genera coordenadas reales de las esquinas de los cuadros. Se ingresa el tamaño del cuadro en mm.

squareSize = 24;
worldPoints = generateCheckerboardPoints(boardSize, squareSize);

% Calibración de cámara: analiza la primera imagen de la carpeta para determinar el tamaño de la imagen y estima los parámetros intrínsecos y extrínsecos. Muestra una figura con los errores de reproyección.

I = machote_calibracion.readimage(1);
imageSize = [size(I, 1), size(I, 2)];
cameraParams = estimateCameraParameters(imagePoints, worldPoints, ...
    'ImageSize', imageSize);

figure; showReprojectionErrors(cameraParams);
title('Reprojection Errors');

% Remoción de la distorsión y almacenamiento de imágenes.

for x=1:1:n %siendo n el número de imágenes en la carpeta.

carpeta = '1'; %se corrigen las imágenes de las columnas desde 1 hasta 10.

imagenes_corregir = imageDatastore(fullfile('C:', 'Users', 'Ivan', 'Desktop', 'Ensayo_1', 'carpeta'));

I = imagenes_corregir.readimage(x);
J1 = undistortImage(I, cameraParams);

%Almacenamiento de imágenes, en función al número de imagen agrega "00" ó "0" antes del número de imagen para respetar el orden numérico.
```

```
if x<10
s = strcat('C:/Users/Ivan/Desktop/ Ensayo_1/',carpeta,'/corregida/',carpeta,'-00',chr,'.jpg');
imwrite(J1,s);
else
    if 10<=x<100
        s = strcat('C:/Users/Ivan/Desktop/ Ensayo_1/',carpeta,'/corregida/',carpeta,'-0',chr,'.jpg');
        imwrite(J1,s);
    else
        s = strcat('C:/Users/Ivan/Desktop/ Ensayo_1/',carpeta,'/corregida/',carpeta,'-',chr,'.jpg');
        imwrite(J1,s);
    end
end
end
end
```

## Anexo E: Macro generado para procesamiento de imágenes en ImageJ.

```
//Cuadro de dialogo que permite al usuario ingresar la ubicación de la carpeta donde se obtienen las imágenes a procesar.

#@ File (label = "Input directory", style = "directory") input

// Cuadro de dialogo que permite al usuario ingresar la ubicación de la carpeta donde se almacenan las imágenes procesadas.

#@ File (label = "Output directory", style = "directory") output

// Cuadro de dialogo que permite al usuario ingresar el formato de las imágenes a procesar.

#@ String (label = "File suffix", value = ".tif") suffix

// Función que permite escanear una carpeta, reconocer y ordenar los archivos contenidos en la misma.

processFolder(input);

function processFolder(input) {
    list = getFileList(input);
    list = Array.sort(list);
    for (x = 0; x < list.length-1; x++) {
        if(File.isDirectory(input + File.separator + list[x]))
            processFolder(input + File.separator + list[x]);
        if(endsWith(list[x], suffix))
            processFile(input, output, list[x]);
    }
}

// Función que permite procesar las imágenes en el orden que fueron escaneadas, aplicando los métodos incluidos dentro de la función.

function processFile(input, output, file) {

//Abrir la imagen

open(input + File.separator + list[x]);
```

```

//Realizar un recorte del área de interés.

makeRectangle(280, 924, 2076, 228);
run("Crop");

//Definición de escala.

run("Set Scale...", "distance=9.267162909 known=1 unit=mm");

//Segmentación por color. Código autogenerated por ImageJ.

min=newArray(3);
max=newArray(3);
filter=newArray(3);
a=getTitle();

//Definición de tres escalas: Tono (Hue), Saturación (Saturation) y Brillo (Brightness)

run("HSB Stack");
run("Convert Stack to Images");
selectWindow("Hue");
rename("0");
selectWindow("Saturation");
rename("1");
selectWindow("Brightness");
rename("2");

//Definición de intervalos en la escala de color.

min[0]=100;//Frijol Rojo 95/195
max[0]=180;//Frijol Negro 100/255
filter[0]="pass";
min[1]=0;//Frijol Rojo 0/255
max[1]=255;//Frijol Negro 0/255
filter[1]="pass";
min[2]=75;//Frijol Negro 95/255
max[2]=255;//Frijol Rojo 75/255
filter[2]="pass";
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  setThreshold(min[i], max[i]);
}

```

```

//Binarización de la imagen

run("Convert to Mask");
if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0", "1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0", "2");
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----
//setThreshold(255, 255);
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
run("Convert to Mask");

//Función para rellenar espacios vacíos

run("Fill Holes");

//Función para Analizar partículas, filtro que excluye partículas que tengan un área
inferior a 40 mm2.

run("Analyze Particles...", "size=40-Infinity display");

//Almacenamiento de resultados en formato de texto

saveAs("Results", "C:/Users/Ivan/Desktop/Hilera_x.txt");

    outputPath = output +File.separator+ list[x];
    saveAs("Jpeg",outputPath);
    run("Close All");
}

```