



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

PROPUESTA Y CALIBRACION DE UN METODO
ALTERNATIVO PARA LA DETERMINACION DE AREA
FOLIAR MEDIANTE ANALISIS DE IMAGENES
DIGITALIZADAS.

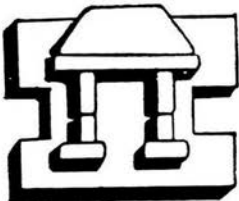
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

PATRICIA GARCILAZO PEÑA



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. GERARDO ORTIZ MONTIEL

TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO

ABRIL 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



U.N.A.M. CAMPUS

IZT

DEDICO ESTE TRABAJO A TODAS LAS PERSONAS QUE HAN ESTADO CERCA DE MI DURANTE TODO ESTE TIEMPO Y QUE DE ALGUNA MANERA HAN CONTRIBUIDO EN MI FORMACIÓN PROFESIONAL Y COMO SER HUMANO, MUY EN ESPECIAL:

**A MIS PADRES: JOSÉ Y ESPERANZA,
POR SU AMOR, ESFUERZO Y APOYO.**

Y

A MI FAMILIA: LUIS, XIMENA Y LUIS ARMANDO, POR SU AMOR Y POR SER EL MOTOR QUE IMPULSA MI VIDA.

Expreso mi más sincero agradecimiento a los profesores:

M. en C. Socorro Sánchez Correa

M. en C. Ernesto Aguirre León

Biol. Francisco López Galindo

Biol. Gumercindo H. de la Cruz Guzmán

Por todas sus atenciones, comentarios y sugerencias al presente trabajo.

Mi muy especial agradecimiento al M. en C. Gerardo Ortiz Montiel, jefe del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la U.M.F., por su apoyo incondicional y paciencia durante la realización del presente trabajo, además de su invaluable amistad.

INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ÁREA FOLIAR.....	5
MÉTODOS DE ESTIMACIÓN.....	6
ANTECEDENTES.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
DIAGRAMA DE FLUJO SINTÉTICO.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN

El análisis de crecimiento vegetal se realiza generalmente en función de la estimación de la producción fotosintética. Los valores primarios en que se basa son usualmente, tanto el peso seco de plantas completas y/o de sus partes (tallos, hojas, botones, etc.) como las dimensiones del aparato asimilatorio (área foliar, área del tallo, contenido de clorofila, etc.).

Las hojas son los productores fotosintéticos más importantes, y el hecho de que una planta cuente con más superficie para captar la luz podría traducirse en una mayor capacidad de producir compuestos de carbono y por lo tanto esa planta tendría más posibilidades de crecer mejor, sobre todo si las condiciones del medio no son limitantes.

El área foliar de un cultivo, permite establecer relaciones con la pérdida de agua por transpiración, acumulación de materia seca, el metabolismo vegetal, la capacidad fotosintética potencial, la madurez y calidad del producto cosechado, además se aplica en la determinación de daños causados por patógenos o plagas de distintos tipos en los cultivos. La superficie foliar raramente es plana del todo, y dado que la mayoría de las técnicas para medirla son planimétricas, las hojas tienen que ser aplanadas antes de ser medidas, podemos encontrar infinidad de formas y tamaños, lo cual no permite que se pueda estandarizar una ecuación o método para todas las plantas.

En cultivo de tejidos con frecuencia se requiere analizar el crecimiento vegetal en base a la medición del área foliar en las plántulas producidas, que frecuentemente son de tamaños muy variables, desde las muy pequeñas a grandes; determinación que resulta difícil o cara, por los métodos instrumentales.

En este trabajo se propone un modelo matemático y el uso de un sistema analizador de imágenes digitalizadas (PAID), para la medición del área foliar de hojas de violetas africanas (*Saintpaulia ionantha* L), provenientes de cultivo de tejidos, comparándolos con los métodos más comúnmente usados (gravimétrico, matemático e instrumental (integrador de área foliar)).

Se trabajaron 3 grupos de hojas de diferente origen (in vitro, de trasplante y plantas madre), y distintos tamaños (Chicas, medianas y grandes), obteniéndose como resultado que el uso del PAID es el más ventajoso, de los métodos utilizados, por su precisión, rapidez y su bajo costo. Sus coeficientes de determinación para cada muestra resultaron ser los más altos, para las hojas grandes $r^2 = 0.9774$, en la hojas medianas fue $r^2 = 0.9976$ y para las hojas chicas se obtuvo un $r^2 = 0.8523$. Se encontró una diferencia significativa fuerte (0.01), para las hojas pequeñas.

INTRODUCCION

El análisis de crecimiento vegetal se ha realizado durante años, a tal grado que se ha establecido como un método estándar de estimación de la producción fotosintética. No obstante el gran avance en la materia se siguen desarrollando nuevas técnicas, especialmente matemáticas, métodos indirectos, para estimar los valores primarios en que se basa el análisis de crecimiento y de la estructura del dosel, (Bidwell, 1987; Chávez, 1997 y Reséndiz et al., 1987).

Los valores primarios en que se basa el análisis de crecimiento son usualmente tanto el peso seco de plantas completas y/o de sus partes (tallos, hojas, botones, etc.) como las dimensiones del aparato asimilatorio (área foliar, área del tallo, contenido de clorofila, etc., Reséndiz et al., 1987).

Estos índices y su interpretación son el núcleo del análisis de crecimiento, que también se utiliza para investigar fenómenos ecológicos, tales como la sucesión de especies en varios hábitats, la competencia como es el caso de la *Portulaca oleracea* L., que es una planta dañina encontrada en el Brasil infestando prácticamente todos los tipos de cultivo y provocando pérdidas a los agricultores (Pedriho et al., 2000); o por tener un mejor lugar en el dosel para una mayor captación de luz, así como también las diferencias genéticas que se pueden presentar en una misma especie que provocan variaciones en las características fenotípicas como podrían ser el tamaño y la forma de la hoja, esto se ha observado en algunas clonas de *Xanthosoma sagittifolium* (L) O. Schott (Simón y Trujillo, 1990), así como en su capacidad de producción, y efectos de tratamientos con productos agrícolas sobre el crecimiento del cultivo.

Algunos factores internos que también afectan las características del crecimiento están usualmente relacionadas con los procesos fisiológicos básicos como la respiración, la fotosíntesis y el transporte de asimilados, metabolitos de nitrógeno, procesos morfogenéticos, deficiencia de fósforo etc. (Bidwell, 1987; Blanco, 1998; Bunce, 1989; Escalante, 1999 y Reséndiz, 1987).

Entre otros factores también podemos mencionar las diferentes condiciones en que se encuentre el cultivo, por ejemplo en el caso de presentar alguna patología que afecte directamente el desarrollo foliar como es el caso de algunas enfermedades de las que afectan los cultivos de fresa, que son causadas por hongos y provocan serias reducciones en la producción y los daños causados van de la muerte prematura de la hoja, lo cual lleva a una reducción en la calidad del fruto y en algunos casos a la muerte de la planta.

Estas enfermedades se detectan como manchas en las hojas y al igual que en el tizón tardío del tomate la severidad de la infección se determina por el área foliar dañada (Funt, 1997 y Pérez, 2000), otro caso es la infestación por larvas que consumen las hojas de las plantas de soja (Pereyra, 1997). También el establecimiento de cultivos *in vitro* con diversos fines de estudio en los cuales se sabe que sus hojas son mucho más pequeñas que las cultivadas en el campo,

cuya área foliar en algunos casos llega a ser hasta 83 veces menos que las cultivadas en invernadero debido a la reducción en la división celular y el decrecimiento individual de las células que puede llegar al 40 % de su talla normal, la medición del área foliar resulta problemática y esto se complica aún más debido a el rápido deterioro de dichas hojas, (Vinterhalter 2001); aunque resulte difícil de evaluar debido al tamaño de las hojas la evaluación del área foliar es de suma importancia y se requiere de métodos confiables y accesibles que permitan su cálculo.

ÁREA FOLIAR

Las hojas son los productores fotosintéticos más importantes, y el hecho de que una planta cuente con más superficie para captar la luz podría traducirse en una mayor capacidad de producir compuestos de carbono y por lo tanto esa planta tendría más posibilidades de crecer mejor, sobre todo si las condiciones del medio no son limitantes.

El área foliar (AF) de un cultivo permite establecer relaciones con la pérdida de agua por transpiración, acumulación de materia seca, el metabolismo vegetal, la capacidad fotosintética potencial, la madurez y calidad del producto cosechado, además es aplicada en la determinación de daños causados por patógenos o plagas de distintos tipos en los cultivos como se mencionó anteriormente (Escalante, 1999).

El área de las hojas es una medida que ayuda a determinar la inversión de la planta por su relación directa con la fotosíntesis, ya que para una irradiancia ambiental dada, la cantidad de luz interceptada es directamente proporcional al área foliar de la planta, (Custom, 1981; Bunce, 1989).

El área foliar deberá medirse tan pronto como sea posible después del muestreo en caso de que este sea destructivo, debido a la deshidratación y maltrato que las hojas sufren a la hora del manejo para obtener las evaluaciones (Padilla et al.,1997).

La superficie foliar raramente es plana del todo, y dado que la mayoría de las técnicas para medirla son planimétricas, las hojas tienen que ser aplanadas antes de ser medidas, podemos encontrar infinidad de formas y tamaños, lo cual no permite que se pueda estandarizar una ecuación o método para todas las plantas, haciendo necesaria una evaluación específica según las necesidades del estudio a realizar (Reséndiz, 1987).

MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE ÁREA FOLIAR

Diversos principios han sido aplicados para la determinación del área foliar y se han desarrollado una gran variedad de métodos. El escoger un método para una investigación dependerá del propósito principal de la medida, es decir, se deberá considerar, si debe ser destructivo o no, la precisión requerida, el tamaño de la muestra, la morfología de la hoja y el equipo técnico disponible, además de la cantidad de trabajo y el tiempo disponible. A continuación se describen los métodos más utilizados:

1) Delineación sobre papel gráfico: la hoja es delineada sobre papel gráfico y el área se obtiene contando los cuadros dentro del contorno (Goodall 1947; Winter et al., 1956). Para estudios de campo se modifica el método utilizando una pieza de acrílico transparente cuadrículado (cuadros de 1 cm^2), se coloca la hoja sobre el acrílico y se cuentan los cuadros bloqueados. La precisión de este método depende de la forma de la hoja y la experiencia del usuario, pero para hojas muy divididas o compuestas es poco práctico (Chávez, 1997; Reséndiz, 1987).

2) Método gravimétrico: el contorno de la hoja es trazado sobre papel con un peso uniforme con respecto al área o se puede tomar una fotocopia. La forma de la hoja se recorta y se pesa. El área foliar se calcula a partir de la relación del peso del área problema, contra el peso de un área conocida mediante una curva de calibración de área (Rock y Bolas, 1956). Es un método muy tardado y tedioso sobre todo si el tamaño de las muestras es grande, además de la forma y el tamaño de las hojas de las especies que se deseen trabajar, ya que si las hojas son compuestas o multilobuladas la precisión puede verse seriamente afectada por los errores a la hora de recortar, (Chávez, 1997; Reséndiz, 1987).

3) El método sugerido por Mérida (1987), que consiste en representar sobre la lámina foliar una o varias figuras geométricas, luego de calcular el área de cada una de ellas se suman para obtener el área total de la hoja.

4) Intercepción de luz: mide el área foliar directamente. Los instrumentos empleados son llamados "planímetro fotoeléctrico". Se basa en la cantidad de luz que recibe una fotocelda que a su vez produce una corriente constante, si se interfiere el paso de la luz se produce una variación que será proporcional al área que obstruye el paso de la luz, el detector es usualmente una célula fotovoltaica cuya corriente de salida puede ser medida directamente y luego transformada a unidades de área (Chávez, 1997; Reséndiz, 1987), este puede ser un método rápido pero también debe tomarse en cuenta si las hojas son muy delgadas no serían medidas con precisión; es adecuado para medir hojas y arreglos de hojas relativamente grandes, tiene una precisión de 97.4 %, aunque es complicado técnicamente por la conversión que se debe realizar de milivolts a cm^2 , además de no ser adecuado para medir hojas muy pequeñas y/o muy delgadas que permitan el paso de la luz que afecte la lectura. Su costo aproximado es de 431.77 USD y es necesario calibrarlo constantemente (Chávez, 1997).

5) Relación entre las medidas lineales y el área foliar: este método permite medir las hojas sin destruir la planta. Las medidas de las hojas usadas con mayor frecuencia y relacionadas con el área foliar (AF), son el largo de la hoja (L) y el ancho (B), ya sea el ancho máximo o el de una fracción específica de la hoja. La fórmula general de relación es:

$$A=b.L.B$$

Se ha encontrado satisfactoria para algunas especies como brócoli (*Brassica oleracea* L. Var. *Italica* Plenkl.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), donde $a = 0$ y b es el coeficiente de regresión, el cual se obtiene mediante la regresión lineal y tiene que ser revisado continuamente de manera especial cuando hay cambios en la forma de la hoja con respecto a la posición en la planta y la edad de esta, ya que entre más madura es una hoja aumenta la distancia entre ella y el ápice de la rama o tallo donde se localiza además de incrementar su tamaño hasta llegar a su talla adulta. (Astegiano et al., 1999; Stoppani y Francescangeli, 2000; Reséndiz, 1987).

6) Integrador de imagen de área foliar (Delta T): el sistema puede medir el área de todas las formas y tamaños de las hojas además de medir el área enferma de una hoja siempre y cuando se ofrezca un buen contraste con el resto de la hoja, funciona iluminando los objetos en contraste con su fondo, un dispositivo integrador de áreas, suma los períodos durante los cuales línea por línea de una cámara de video explora transversalmente el objeto. Se usan objetos de área conocida para su calibración, tiene una precisión de 98.1% y un costo aproximado de 1,300.00 USD. (Chávez, 1997; Reséndiz, 1987).

7) Integrador de área foliar (LI-COR 3000A): al igual que el anterior este sistema puede medir todas las formas y algunos tamaños que no excedan el área con los sensores. Usa un método electrónico que simula una hoja cuadrículada. La cabeza de escaneo tiene una línea de 128 diodos emisores de luz (LEDs), espaciados 1 mm para examinar metódicamente cada una de las 128 celdas a través del ancho de la hoja, así como detectores de luz para cada una. Una característica superior del escaneo es el uso de un solo LED para cada celda. El bloqueo de la luz por causa de el área de la hoja en cada celda es igual a 1 mm^2 y es acumulada hasta obtener el área foliar total en cm^2 . la hoja pasa a través de estas líneas en unas bandas transparentes que la aplanan, También se utilizan objetos de área conocida para su calibración, su precisión es de 98.0% y su costo aproximado es de 1,315.00 USD (LI-COR, Inc., 1988).

8) Win/Mac FOLIA, es un sofisticado sistema medidor de área foliar por medio de imágenes digitalizadas que utiliza niveles de gris o aplicación de color. Es eficiente y fácil de usar con pocos clicks del ratón, es útil en la medición del área foliar, muestra la morfología de la hoja, análisis de enfermedades y daños causados por insectos, además de ser portátil. El costo va de 750.00 USD el básico y el Pro de

3,000.00 USD, más el costo de los accesorios necesarios como el escáner y la cámara que es compatible con Windows 95, 98 y 2000.

ANTECEDENTES

Se han realizado varios trabajos para determinar el área foliar y la precisión de los métodos antes mencionados comparando unos con otros e implementando algunas nuevas tecnologías que pudieran ser de utilidad en la medición del área foliar.

Chávez (1997), realizó la fabricación de un prototipo de planímetro fotoeléctrico a bajo costo y lo compara con un integrador de área foliar (Delta T), y con el método gravimétrico que presenta una precisión del 97.9 % no encontrando una diferencia estadísticamente significativa entre estos métodos y el prototipo, que presentó una precisión del 97.4% , aunque reporta un aumento en el error en mediciones de hojas muy pequeñas y/o muy delgadas además de ser necesaria la calibración constante y la conversión de las lecturas de milivolts a cm^2 , sin embargo el costo de este sistema si se desea construir ya que no se encuentra en el mercado tiene un costo aproximado de 437 USD.

Chirinos et al., (1996), proponen modelos matemáticos para estimar el área foliar del melón híbrido "Durango", con base en las medidas del largo (L) y el ancho (A) de la hoja, se utilizaron 40 hojas para cada una de las diferentes edades (Jóvenes, maduras y senescentes).

Las medidas fueron correlacionadas y se obtuvieron las ecuaciones de regresión: lineal simple (AF en función del L, de A y del producto de LxA), lineal múltiple (AF en función del L con A), Las cuadráticas (AF en función del A^2 , del A con A^2 , del L^2 y del L con L^2) y las funciones de regresión gama (AF con L y AF con A). Encontrando que todas las ecuaciones permiten el cálculo adecuado del área foliar aunque se obtuvo un coeficiente de determinación más alto $R^2 = 0.98$ y un coeficiente de variación de $CV = 2.02$ con la expresión logarítmica de la función de regresión gamma cuya ecuación es $AF = -0.863 - 0.03 A + 2.349 \ln A$ y los directamente calculados con la ecuación cuadrática $AF = 21.58 + 4.202 A + 0.507 A^2$ cuyo coeficiente de determinación fue de $R^2 = 0.973$ y $CV = 9.26\%$ y $AF = 2.366 + 0.676 A^2$, donde $R^2 = 0.972$ y $CV = 9.5\%$ tomando en ambos casos como base el ancho de la hoja.

De esta forma se demuestra así la posibilidad de estimar el área foliar de manera confiable sin destruir las plantas que aún cuando son métodos muy baratos tienen una precisión cuestionable debido a que requieren ajustes constantes en los coeficientes para las diferentes tamaños de la hoja de la planta y sus condiciones de cultivo, ya que pueden existir variaciones.

Beverly y van Iesrel, (1998), proponen la calibración de un sistema de análisis de imagen de video para la evaluación de área foliar y largo del tallo, como un método no destructivo y accesible económicamente (1,500.00 USD), el sistema comprende una video cámara Sony High 8 mm, un video cassette Sony High 8mm (VCR), un monitor de video y una tarjeta para capturar imágenes en computadora además del programa Mocha, para el análisis de imágenes de video (Jandel Scientific) instalado en una computadora.

En el caso del tallo las mediciones resultaron ser buenas con un coeficiente de correlación de $R = 0.96$ en relación con los obtenidos con la regla, para el área foliar y áreas conocidas, los valores tuvieron un coeficiente de variación del 18 %, aun que la correlación con el integrador de área foliar LI-COR 3100 es de $R = 0.98$, esta variación puede deberse a una sobre estimación debida a un error en el control de brillo o el contraste con el fondo, ya que el programa que analiza las imágenes trabaja con tonos de grises y esto puede causar problemas a la hora de la evaluación además se presenta también el problema de los puntos de calibración que pueden ser 2 horizontales y/o verticales se pueden agregar 3 puntos de calibración diagonal que aumentan la precisión al disminuir la subestimación o sobrestimación del área. También debe considerarse a la hora de grabar las imágenes que las condiciones de luz sean constantes.

No se encontró una diferencia estadísticamente significativa con el integrador de área foliar LI-COR 3100, pero se menciona que los resultados no son claros debido a errores sistemáticos al momento de analizar la imagen obtenida del video y analizada con el programa Mocha, también se reportan problemas de imprecisiones al momento de grabar las imágenes en un fondo negro por el contraste con la muestra. Se sugiere una mejor calibración del método, además de controlar la luz a la hora de grabar las muestras para disminuir el error debido al brillo.

Astegiano et al., (1999), proponen la utilización de una ecuación alométrica entre las dimensiones lineales y de superficie que permitan la estimación rápida del área foliar en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) de cultivares antiguos y modernos, encontrándose que es necesario para tener una mayor precisión considerar los cultivares por separado así como el tamaño de las hojas. La función general que resultó ser aceptable para todos los cultivares fue $AF = 0.34(LxA)$, donde $a = 0$ además de ser necesario ajustar la función lineal adecuada para cada cultivo según las necesidades del estudio a realizar en cuanto a precisión.

Pedriho et al., (2000), proponen la estimación del área foliar de *Portulaca Oleracea* L. para el estudio y control de estas plantas dañinas utilizando las medidas lineales (largo L, ancho A y LxA) y correlaciones para encontrar las ecuaciones que permitan su cálculo en forma precisa. Se encontró que la medida lineal con la cual se obtuvo la ecuación más precisa fue la que utiliza $L \times A$ cuya ecuación es $AF = 0.6831(L \times A)$, considerando el coeficiente $a = 0$.

Escalante (1999), determinó la relación que existe entre el área foliar, senescencia y rendimiento del girasol, cultivado en humedad residual, así como la influencia del nitrógeno en el tamaño y duración de las hojas además producción de biomasa y el rendimiento de la semilla y aceite, encontrándose que fue más alta en las plantas con fertilización nitrogenada desde las primeras etapas de desarrollo, ya que el aumento en el tamaño y duración de la hoja hasta después de la floración tiene por consecuencia aumento en la producción, esto muestra un coeficiente de correlación de $r^2 = 0.98$. La medición del área foliar se realizó con un IAF Licor 3000 (Li-cor, Inc. Lincoln, NE.).

Stoppani y Francescangeli (2000), determinaron un método funcional para estimar el área foliar de brócoli (*Brassica oleracea* L. Var. *Italica* Plenck), mediante la obtención de una ecuación a partir de medidas lineales en el campo de cultivo mediante regresiones. En este trabajo se tomaron las medidas del largo de la hoja (L), el ancho a la mitad del largo (AML) y el ancho máximo (AMAX). Encontrándose que la ecuación $AF = 0.63 (LMAX)$, fue la más precisa al obtener un coeficiente de determinación $R^2 = 98.82\%$, en caso de que se deseara tomar una sola medición la ecuación adecuada sería $AF = 1.345 (AMAX^2)$, cuyo coeficiente de determinación es $R^2 = 96.15\%$.

Padilla et al., (1997), determinaron el área foliar de 5 cultivares de café *Coffea arabica*, mediante modelos de regresión utilizando medidas lineales como el largo (L), el ancho (A) y se compararon con las áreas obtenidas con un planímetro en el cual se utilizaron fotocopias de las hojas, ya que sus bordes obstaculizan su recorrido y pierden turgencia después de cortadas.

Se realizaron análisis de correlación del planímetro con L, con A, con L+A y con L x A, evaluando así 3 modelos de regresión: lineal, cuadrática y cúbica. Los coeficientes de correlación más altos fueron: 0.96, 0.93, 0.90, 0.97 y 0.95, para los cultivares Catuaí, Icatú, T-5296, Lempira e IHCAFE-90 respectivamente, concluyendo así que el modelo lineal fue el que mejor estimó el área y tiene una alta correlación con el planímetro.

Simón y trujillo (1990), realizaron la determinación de área foliar en 5 clones de ocumo (*Xanthosoma sagittifolium* L), utilizando mediciones lineales como son el largo (L), el ancho central (Ac) y el ancho basal (Ab). Se obtuvieron 3 ecuaciones de regresión: 1) L x Ac, 2) L x Ab y 3) L x Ab /2. Se utilizó un integrador de área foliar Licor modelo Li-3000, las hojas se seccionaron ya que son demasiado grandes para el lector del instrumento. Se obtuvo como resultado que la ecuación obtenida mediante el parámetro L x Ac es la más consistente con un valor de $R^2 = 0.94$ y una la ecuación $AF = 1.16 (L x Ac)$.

Korva y Forbes (1996), propusieron un método simple y de bajo costo para medir el área foliar de papa *Solanum tuberosum* L. ssp *andigena*, el cual consiste en la aplicación de un spray de agua sobre una hoja de cartón plastificada de área conocida (SA), donde se coloca la hoja y se obtienen los datos para aplicar la fórmula:

$$LA = \frac{(b - a - c) \times SA}{b - a}$$

Donde a = al peso de la hoja de cartón plastificada con las hojas, b = peso de la hoja plastificada con las hojas más el spray, c = peso de la hoja plastificada con el spray después de remover las hojas. Este método fue comparado con el integrador de área foliar Licor Li-3000. Se encontró un coeficiente de variación de 0.66 %, con los datos transformados a logaritmos se produce una distribución normal y su correlación es de r = 0.976.

Aunque también se encontraron factores que afectan la precisión del método antes descrito, son: 1) Carencia de uniformidad a la hora de la aplicación del spray, 2) La evaporación del agua que ocurre durante la obtención de los pesos, 3) La precisión de la balanza y 4) La precisión a la hora de tomar los datos.

Tsuda (1999), determinó los errores en la medición del área foliar con un medidor automático de clorofila en hojas de cereales, la relación del área determinada usando el espécimen fresco, el cual se fotocopió, fue referido como F/P. Las áreas se determinaron con un medidor de área automático (AAM-8, Hayashi Denko, Co., Japan.). Dichas áreas subestimaron las áreas del espécimen fresco. Se midió también el contenido de clorofila con un SPAD 502 (medidor de clorofila), Minolta Camera Co., Japan, para relacionarla con el área foliar, el coeficiente de determinación de las áreas para F/P y el SPAD van de 0.4 a 0.5, dependiendo del espécimen. Esto puede deberse a que el SPAD muestra valores pequeños en las áreas amarillentas con bajo contenido de clorofila lo cual afecta la lectura y a su vez el cálculo del área.

Vinterhalter et al., (2001), probó el efecto de la irradiancia, azúcares y nitrógeno en el tamaño de la hoja de *Ceratonia siliqua* L., en cultivo *in vitro*, encontrando que la disminución de la irradiancia provoca el desarrollo de brotes etiolados, en cambio un aumento provoca un área foliar mayor.

El efecto de una alta concentración de sacarosa estimula el desarrollo de la lámina foliar y una baja concentración provoca hojas pequeñas, a menudo difíciles de evaluar. En el caso de las sales de nitrógeno (KNO₃ y NH₄NO₃), se observa que un decremento en la concentración resulta en una disminución del área foliar.

La determinación del área se realizó colocando las hojas en un plato de vidrio humedecidas con glicerol y cubiertas con una hoja transparente para ser fotocopiadas (Copiadora Canon NP 3825, Canon, Tokio, Japan.). Las fotocopias fueron escaneadas en un escáner HP 4C (Hewlett-Packard, Palo-Alto, USA.), y analizadas usando el programa UTHSCSA Image Tools (Universidad de Texas, Centro de Ciencias de la Salud, San Antonio, USA.), sin mencionar detalles de calibración o uso.

JUSTIFICACIÓN

Algunos de los métodos mencionados resultan excesivamente laboriosos y poco precisos en los casos de hojas muy pequeñas como las obtenidas de un cultivo *in vitro* o difíciles de utilizar con hojas muy grandes y multilobuladas o compuestas. Por otra parte los aparatos confiables diseñados para este fin son sumamente costosos y por lo tanto difíciles de utilizar en la práctica docente, por este motivo el presente trabajo propuso utilizar imágenes digitalizadas mediante un escaner y procesadas en un programa analizador de imágenes en computadora, "Image Tool" for Windows, versión 2 desarrollado por D.Wilcox, B.Dove, D. Mc David y D. Greer 1996, en la Universidad de Texas, Centro de Ciencias de la Salud, San Antonio Texas. De distribución gratuita, u otro analizador de imágenes disponible gratuitamente en Internet que permita realizar el cálculo del área foliar de manera rápida y confiable para la práctica docente y los centros de investigación con un costo mínimo.

OBJETIVOS

GENERAL:

1) Calibrar un método de medición del área foliar mediante la utilización de un escaner y un programa analizador de imágenes digitalizadas en computadora (P.A.I.D).

PARTICULARES:

2) Comparar la precisión de las mediciones obtenidas con el PAID y el integrador de área foliar (Li- Cor Modelo LI – 3000 A, portable area meter).

3) Generar un modelo matemático a partir de las medidas lineales del largo (L) y ancho (A), para la determinación de área foliar de 3 diferentes tamaños de hojas de violeta africana de diferentes fuentes: Plantas madre, plantas trasplantadas de cultivo *in vitro* y plántulas *in vitro*.

4) Comparar la precisión de las mediciones obtenidas con el Integrador de Área Foliar con el modelo matemático seleccionado para cada tamaño de hojas y el método gravimétrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) SELECCIÓN DE LA ESPECIE

Se seleccionó a la violeta africana (*Saintpaulia ionantha* L), por presentar diferentes tamaños de hojas y bordes que van de lisos a ondulados, de estas se utilizaron hojas de plántulas de obtenidas *in vitro*, plántulas trasladadas a suelo y plantas madre, gentilmente donadas por la Biol. Claudia Medina Quiroz del mismo laboratorio, trabajando por tanto con diferentes tamaños y formas de hojas (chicas, medianas y grandes).

Se manejaron 3 tipos de muestras con 35 repeticiones cada una de ellas. Una primer muestra fue la de hojas grandes obtenidas de plantas madre, otra la de hojas medianas obtenidas de plántulas trasplantadas de cultivo *in vitro* y una tercera, la de hojas chicas obtenidas de plántulas crecidas *in vitro*, se procedió con la metodología señalada en la figura 2, la figura 1 muestra las imágenes de las hojas de los distintos tamaños que se trabajaron.

2) MODELO MATEMÁTICO

Para la selección del modelo matemático se tomaron las medidas lineales de cada una de las repeticiones considerándose el largo (L) y el ancho (A) en cada una de las muestras. Una vez tomadas estas medidas se obtuvo el producto del largo por el ancho ($L \times A$), obteniéndose después una ecuación de regresión lineal con la cual se calculó el área de cada hoja.

También se obtuvieron los cuadrados del largo y del ancho, con los cuales también se realizó una regresión lineal, así como el logaritmo natural de cada uno, realizándose después las regresiones lineales múltiple del largo con el ancho, del largo con el largo al cuadrado, del ancho con el ancho al cuadrado, del largo con el logaritmo natural del largo y del ancho con el logaritmo natural del ancho. Posteriormente se realizaron los cálculos de las áreas con las ecuaciones obtenidas con cada uno de los modelos matemáticos (cuadro 1).

En todas las regresiones realizadas se consideró como variable independiente a las mediciones hechas con el Integrador de Área Foliar (Licor – 3000 Lambda, Lincon, Nebraska, USA), para las mismas repeticiones. Las áreas calculadas con los modelos seleccionados para cada muestra se compararon con las estimadas con el IAF, el cálculo de dichas las áreas se realizó con las ecuaciones de los modelos matemáticos seleccionados que se muestran en el cuadro 2.

TIPO MODELO MATEMATICO	MEDIDA LINEAL	HOJAS GRANDES	HOJAS MEDIANAS	HOJAS CHICAS
R LINEAL SIMPLE	LARGO (L)	0.92062531	0.91740220	0.78791515
	ANCHO (A)	0.95020427	0.96143563	0.89422285
	LxA	0.9852800	0.97313886	0.91862781
R LINEAL MULTIPLE	L con A	0.98634895	0.96340501	0.89588328
R CUADRÁTICA INCOMPLETA	L2	0.92044306	0.94906204	0.81643258
	A2	0.94889344	0.97521516	0.49918880
R CUADRÁTICA COMPLETA	L con L2	0.92135658	0.95975452	0.81833883
	A con A2	0.95039022	0.97560531	0.89657849
R GAMMA LOGARITMICA	L con ln L	0.92143626	0.96649444	0.80695005
	A con ln A	0.95037788	0.97744987	0.92244149

Cuadro 1.- Modelos matemáticos probados para cada una de las muestras, así como los coeficientes de correlación obtenidos de la comparación de las diferentes medidas lineales y las áreas estimadas con el Integrador de Área Foliar (IAF). Los coeficientes de correlación más altos fueron los seleccionados y cada modelo matemático fue posteriormente empleado para el cálculo de las áreas de cada una de las muestras.

TIPO DE MODELO MATEMÁTICO SELECCIONADO	ECUACION	TAMAÑO DE HOJA	COEFICIENTE DE CORRELACION
LINEAL MÚLTIPLE L CON A	$AF=21.3777+3.4244(L)+4.8158(A)$	GRANDE	0.9863
REGRESION GAMMA LOGARITMICA DE A CON ln A	$AF=-4.6553+6.3655(A)+-5.8401(\ln A)$	MEDIANA	0.9774
REGRESION GAMMA LOGARITMICA DE A CON ln A	$AF=-0.3438+1.0423(A)+-.1216(\ln A)$	CHICAS	0.9224

Cuadro 2.- Ecuaciones obtenidas con el modelo seleccionado para cada una de las muestras y sus coeficientes de correlación..

3) INTEGRADOR DE ÁREA FOLIAR (IAF)

Se tomaron las mediciones del área foliar con el IAF de cada una de las hojas de cada una de las muestras, dichas mediciones se utilizaron para compararlas con cada uno de los métodos que se evalúan en este trabajo. Se calibró el integrador con una curva patrón de áreas conocidas elaborada con cartoncillo negro cuyas áreas fueron de 0.25 a 49 cm² ya que por el tamaño no fue posible medir áreas mayores.



4) MÉTODO GRAVIMÉTRICO

Se sacaron copias fotostáticas de las hojas en una fotocopidora Minolta DIALTA Di 125. se recortaron y se pesaron en una balanza analítica Sauter Mod. D-7470. August Sauter Ebingen 1 (west-Germany) con una precisión de 0.0001 g. Una vez obtenidos los pesos de las muestras y de una curva patrón hecha con el mismo papel utilizado para las fotocopias con áreas conocidas, se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación que nos permitió el cálculo de las áreas de cada una de las hojas para posteriormente ser comparadas con las estimadas con el IAF.

5) PROGRAMA ANALIZADOR DE IMÁGENES DIGITALIZADAS (PAID)

Las hojas de violeta (chicas, medianas y grandes), fueron fotocopiadas con un objeto de área o longitud conocida (utilizado para la calibración del programa), posteriormente se escanearon las imágenes fotocopiadas (Hewlett Packard Scan Jet 4200 C, con una resolución óptica de 600 dpi y una interfaz USB de 216 x 297 mm y una plataforma base Windows 95.), en una computadora Hewlett Packard Vectra VE pentium II con 64 mb de memoria RAM y 4 Gigabites de memoria en disco duro en la cual se instaló el programa " Image Tool " para Windows,

versión 2 desarrollado por D. Wilcox, B.Dove, D. Mc David y D. Greer 1996, en la Universidad de Texas, Centro de Ciencias de la Salud, San Antonio Texas de distribución gratuita en internet. <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/> El programa se maneja de la siguiente manera:

a)se selecciona el programa *IT* (*IMAGE TOOLS*).

b)seleccionar File.*

c)seleccionar Acquire.*

d)seleccionar Select source.*

e)seleccionar Select scanner.*

f)seleccionar File.*

g)seleccionar Acquire.*

h)seleccionar TWAIN se procede al escaneo de las imágenes en fotocopia con el objeto de área conocida, se obtiene como fotografía blanco y negro al 50 %.*

g)seleccionar Settings.*

i)seleccionar Calibration. Se traza la línea de calibración sobre el objeto de área conocida, entre más precisa sea esta calibración más precisa será la estimación del área, se deben especificar las unidades que se desean emplear y se sustituye el número de pixeles por el valor del objeto de dimensión conocida.*

j)seleccionar Análisis.*

k)seleccionar Objet análisis.*

l)seleccionar Find Objects.*

m)seleccionar Manual. Se contrastan los objetos para delimitarlos, y así disminuir el número de posibles objetos que pudieran aparecer. Una vez obtenido el mejor contraste se eligen los objetos de interés y se anotan sus números.*

n)seleccionar Análisis.*

o)seleccionar Objects análisis.*

p)seleccionar Analyze.*

q)restaurar los Resultados, Ver que tan precisa es la medición del objeto de dimensión conocida para realizar una nueva calibración de ser necesario. Se eliminan los datos no deseados y se guardan primero las imágenes como archivos de imagen tif y después los resultados.*

NOTA: En caso de que alguno de los objetos requeridos no aparezca numerado, se selecciona Setting. *, selecciona Find objects.*, selecciona Include objects at edge of image.*

* Hacer clic.

Una vez obtenidas las áreas con el PAID se comparó su precisión con las área estimadas con el IAF. El PAID (Programa Analizador de Imágenes Digitalizadas) se calibra con la misma curva patrón empleada en el IAF.

6) COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE LOS DIFERENTES MÉTODOS.

Para la comparación de los datos obtenidos con los diferentes métodos probados se realizaron regresiones lineales, se obtuvieron las gráficas de dispersión y el coeficiente de correlación así como la ecuación de regresión y coeficiente de determinación, para esto se utilizó el programa Sigma Plot (Scientific Graph System) 1986-1993 de Jandel Scientific. También se realizaron análisis de varianza (ANOVAS), para cada muestra con los diferentes métodos para evidenciar las diferencias existentes éstas se realizaron con el programa PROSTAT Ver. 1.02 de Handel Scientific, utilizado también para las regresiones empleadas para la selección del modelo matemático.

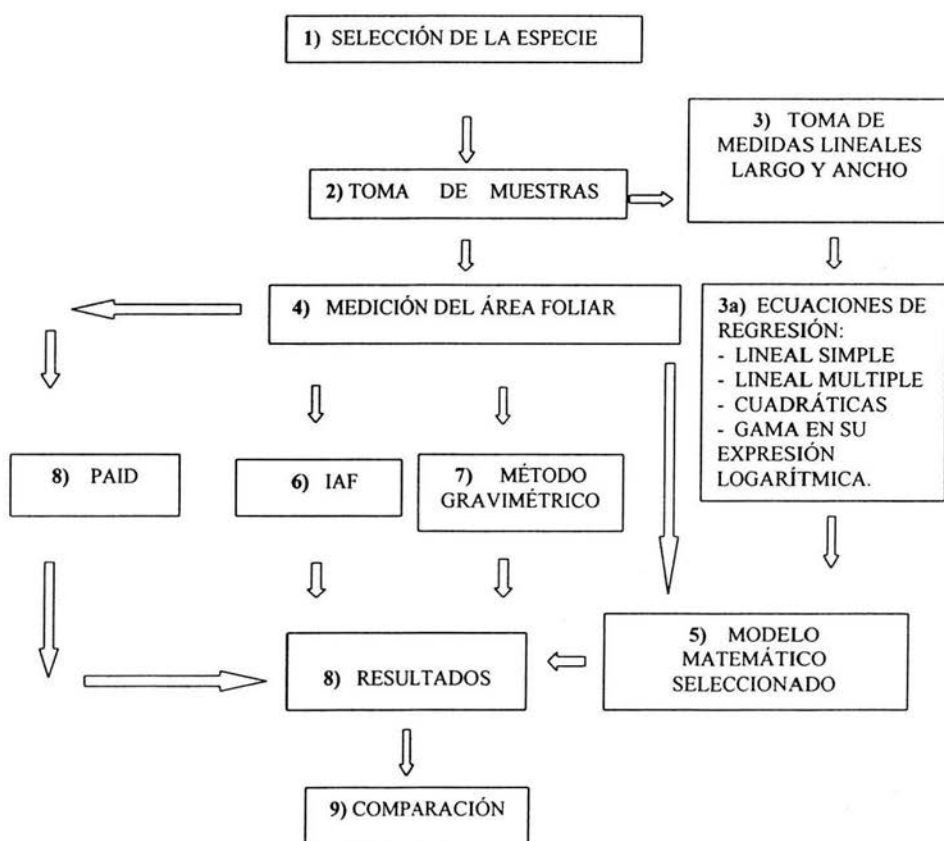


Figura 2.- Diagrama de flujo sintético de los principales pasos de la metodología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la muestra constituida por las hojas grandes obtenidas de plantas madre se encontraron áreas de 12.81 a 36.25 cm² con una longitud (L) de 4.1 a 7.1 cm y un ancho (A) de 3.9 a 6.8 cm. En las hojas medianas las áreas fueron de 1.33 a 12.3 cm², un largo de 1.2 a 4.0 cm y ancho de 1.0 a 3.9 cm. Las hojas chicas presentaron un área de 0.03 a 0.83 cm², un largo de 0.1 a 0.9 cm y ancho de 0.09 a 0.95 cm dichas mediciones fueron obtenidas con una regla (figura 1,2).

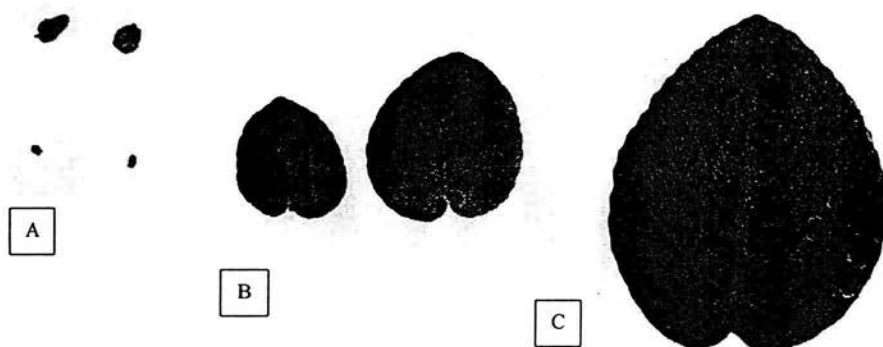


Figura 1.- a) Hojas de plántulas en cultivo *in vitro* (chicas); b) Hojas de plántulas trasplantadas de cultivo *in vitro* (medianas) y c) Hojas de plantas madre (grandes).

Como resultado de la selección del modelo matemático (Cuadros 1 y 2), se obtuvo para las hojas grandes una regresión lineal múltiple de L con A, con un coeficiente de correlación de 0.9863 y cuya fórmula es $AF = -21.3777 + 3.4244 (L) + 4.8158 (A)$, para las hojas medianas se seleccionó el modelo de regresión gamma logarítmica con un coeficiente de correlación de 0.9774, y fórmula $AF = -4.6553 + 6.3655 (A) + -5.8401 (\ln A)$ y para las hojas chicas también fue seleccionado el modelo de regresión gamma logarítmica con un coeficiente de correlación de 0.9224 y una fórmula donde $AF = -0.3483 + 1.0423 (A) + -0.1216 (\ln A)$. Se realizaron los cálculos de las áreas para cada una de las repeticiones de las 3 diferentes muestras.

Cada uno de los métodos probados en el presente trabajo fueron comparados con las mediciones obtenidas con el IAF que se consideró como área estimada en cm², obteniéndose una gráfica de dispersión y una ecuación de la regresión.

Los diagramas de dispersión de los datos obtenidos para la curva patrón con el PAID (cuadros negros) y con el IAF (círculos blancos), observaron un coeficiente

de determinación muy alto 0.99977 para el SAI y 0.99978 para el IAF, lo cual nos indica que son muy semejantes en cuanto a su precisión al evaluar las mismas áreas conocidas de dicha curva (figura 3).

En relación a las mediciones calculadas con el modelo matemático para las hojas grandes y medianas comparadas con las estimadas con el IAF, se obtuvo una alta correlación entre ellas, ya que los diferentes modelos se realizaron comparando las medidas lineales de las repeticiones con las mediciones obtenidas con el IAF, para la obtención del modelo seleccionado y de esta manera obtener las áreas que fueron comparadas con las obtenidas con el IAF, aún así podemos ver que los coeficientes de determinación fueron de 0.9728 para las hojas grandes en las cuales se utilizó un modelo lineal múltiple de longitud con anchura, resultando menor para las hojas medianas 0.9549 utilizándose un modelo de regresión gamma ln, esto se puede atribuir a que la medición del largo y el ancho no fue exacta, debido a errores humanos o a la pérdida de turgencia de las hojas durante las evaluaciones (figura 4 y 5).

IZT

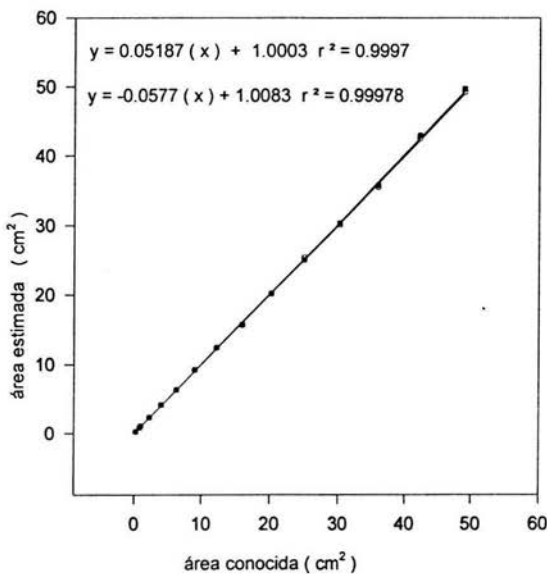


Figura 3.- Dispersograma de los datos obtenidos con el IAF (círculos blancos) y las áreas conocidas de la curva patrón, además de la línea de regresión, la ecuación y el coeficiente de determinación. En cuadros negros la dispersión de los datos obtenidos con el PAID, para las áreas conocidas de la curva patrón, la línea y ecuación de regresión y el coeficiente de determinación.

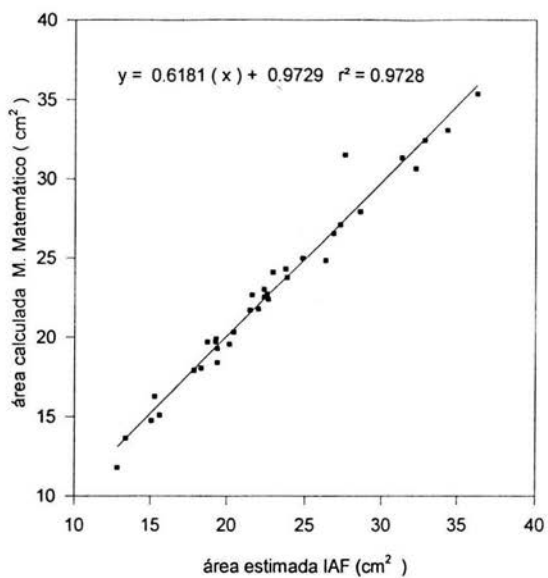


Figura 4.- Dispersión de los datos calculados con el modelo lineal múltiple y los estimados con el IAF, además de la línea y ecuación de regresión y el coeficiente de determinación, para las hojas grandes.

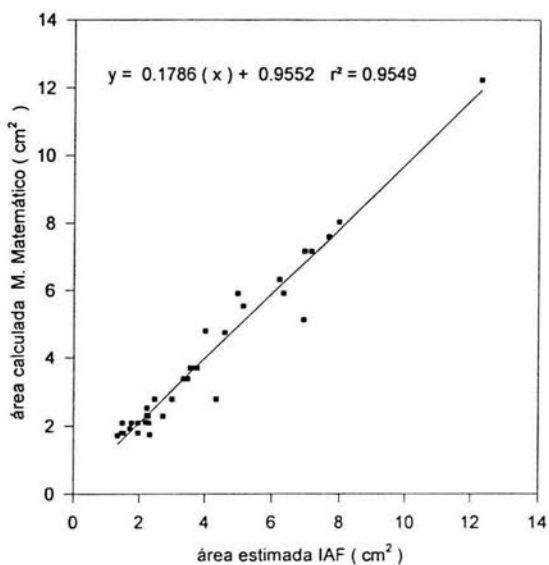


Figura 5.- Dispersograma de los datos calculados con el modelo matemático de regresión gamma logarítmica y los estimados con el IAF, coeficiente de determinación, línea y ecuación de regresión para las hojas medianas.

La dispersión de los datos de las áreas calculadas con un modelo de regresión gamma ln, para las hojas chicas, presentados en la figura 6, muestran un coeficiente de determinación de 0.5638 que resulta ser muy bajo a pesar de que en este caso también se utilizó una comparación con el integrador de área foliar, esto lo podemos atribuir a la dificultad a la hora de medir las hojas de plantas cultivadas *in vitro*, ya que son muy pequeñas, sus áreas van de 0.03 a 0.83 cm², de difícil manejo y rápido deterioro en el momento de realizar las mediciones, como menciona Vinterhalter (2000).

La comparación de los datos de las áreas calculados mediante el método gravimétrico en las hojas grandes produjo un coeficiente de determinación de 0.9672 y para las hojas medianas de 0.9886 con las áreas estimadas con el IAF, podemos decir que este método tiene una precisión satisfactoria, debido a que sin tener ninguna relación, los cálculos obtenidos con este método y las estimaciones realizadas con el IAF son muy parecidos llegando inclusive a tener un mayor coeficiente de correlación en el caso de las hojas medianas que el obtenido con el modelo matemático. Esto nos lleva a pensar nuevamente en la imprecisión a la hora de tomar las mediciones y al deterioro de la muestra (figuras 7 y 8).

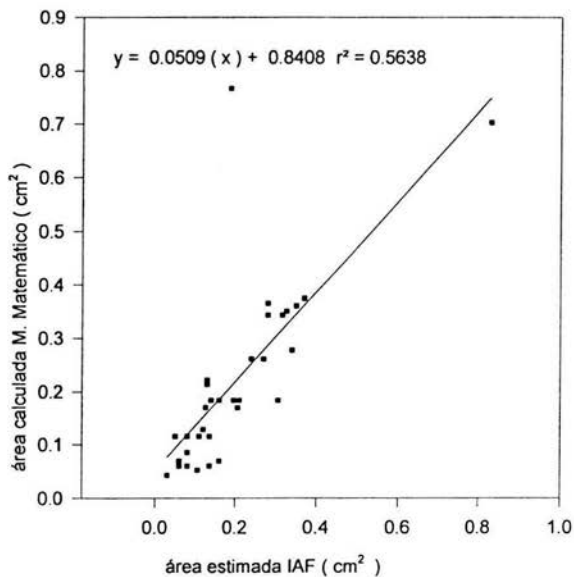


figura 6.- Dispersión de los datos calculados mediante el modelo matemático de regresión gamma logarítmica y el IAF, coeficiente de determinación, línea y ecuación de regresión, para las hojas chicas.

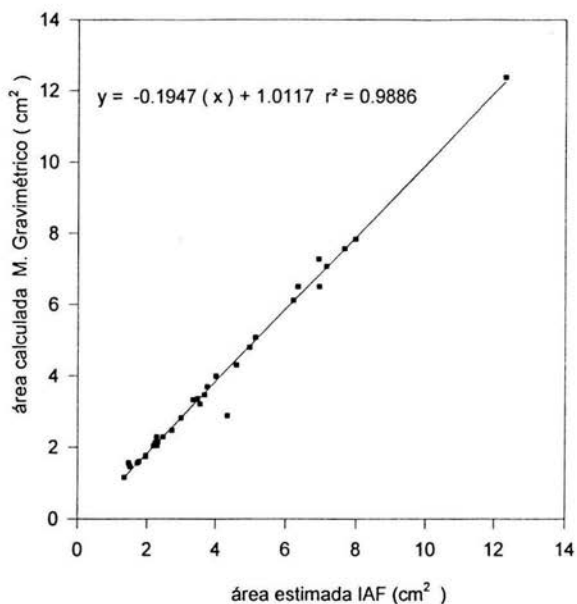


Figura 7.- Dispersograma de los datos calculados con el método gravimétrico y el IAF, coeficiente de determinación, línea y ecuación de regresión para las hojas medianas.

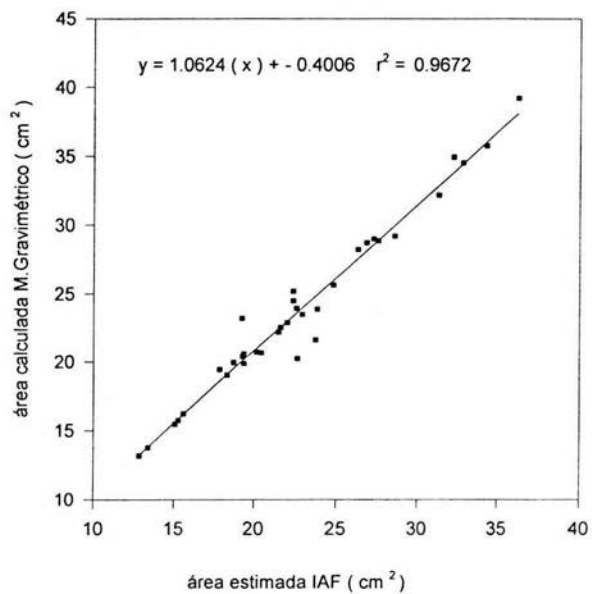


Figura 8.- Dispersión de los datos calculados con el método gravimétrico y los estimados con el IAF, coeficiente de determinación, línea y ecuación de regresión, para las hojas grandes.

El diagrama de dispersión obtenido de la comparación de los datos calculados para las hojas chicas con el método gravimétrico y los estimados con el IAF (figura 9), observaron una correlación casi nula cuyo coeficiente de determinación fue 0.1709, esto puede deberse a la dificultad para obtener el peso de las hojas tan pequeñas, aún con una balanza analítica que tiene una precisión de 0.0001 g y el cálculo de las áreas con la ecuación obtenida de la regresión (con la curva patrón realizada para este método), además del deterioro antes mencionado. Lo anterior hace evidente la falta de precisión de los métodos a la hora de evaluar áreas tan pequeñas como las que se presentan en plantas cultivadas *in vitro*.

Los dispersogramas y los coeficientes de determinación para las hojas grandes 0.9774 y para las hojas medianas 0.9976 obtenidos de la comparación del PAID con las estimadas con el IAF, siendo estos los más altos en comparación con los otros métodos, lo cual nos indica la eficiencia del método propuesto en este trabajo (figuras 10 y 11). El hecho de que el valor del coeficiente para las hojas grandes sea menor puede deberse a los bordes y superficie ligeramente ondulada que presentan algunas de las hojas.

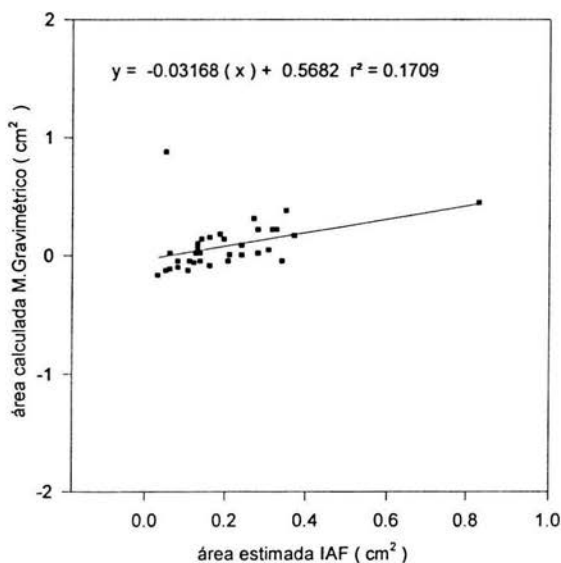


figura 9.- Dispersograma de los datos calculados con el método gravimétrico y el IAF, coeficiente de determinación, línea y ecuación de regresión, para las hojas chicas.

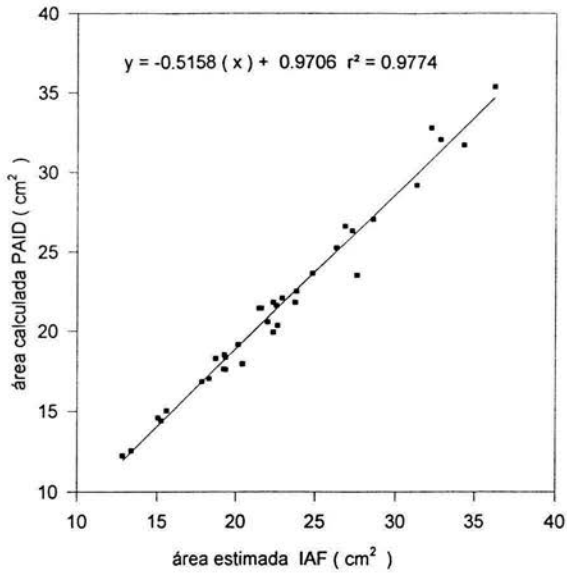


Figura 10.- Dispersión de los datos calculados con el PAID y el IAF, coeficiente de determinación, línea y ecuación de regresión, para las hojas grandes.

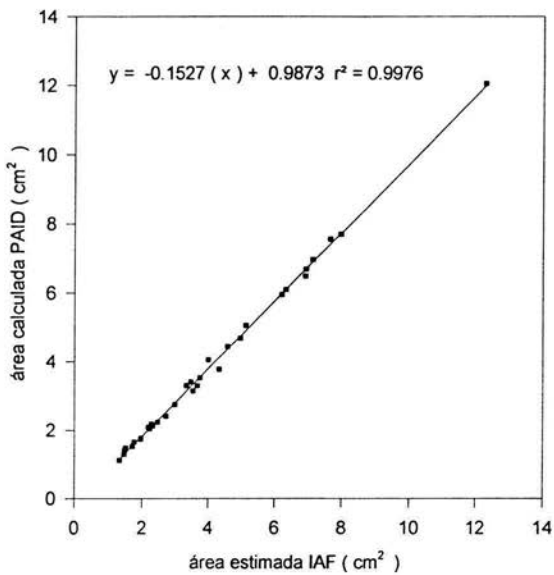


Figura 11.- Dispersograma de los datos calculados con el PAID y los estimados con el IAF, coeficiente de determinación, línea y ecuación de regresión, para las hojas medianas.

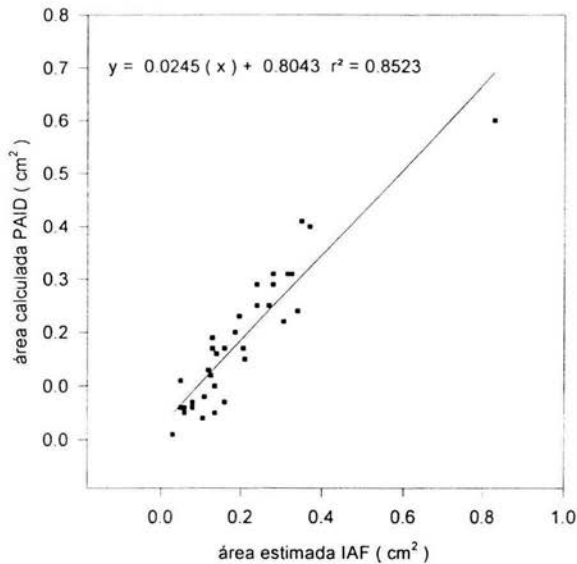


Figura 12.- Dispersión de los datos calculados con el PAID y estimados con el IAF, coeficiente de determinación, línea y ecuación de regresión para las hojas chicas.

El coeficiente de determinación 0.8523, aunque no es el esperado, si apreciamos que es el más alto obtenido para la medición de hojas pequeñas, lo anterior puede explicarse debido a que las muestras fueron fotocopiadas antes de ser evaluadas en el IAF; la deshidratación además del maltrato sufrido a la hora de realizar dicha lectura en el IAF pudo alterar los datos de área estimados, ya que para realizar dicha mediciones las hojas se colocan en las bandas de plástico transparente que las lleva al lector de área, y en el recorrido pueden ser enrolladas o dobladas debido a su tamaño y grosor tan pequeños, no así con el PAID, ya que las fotocopias no se deterioran y presentan una imagen fiel al momento de tomarlas figura 12.

En cuanto a los resultados obtenidos en los Análisis de Varianza (ANOVA), se encontraron valores de $F = 0.00167$ y $P = 0.99833$ lo cual nos indican que no existen diferencias estadísticamente significativas en los grupos de datos que relacionan los resultados de la curva patrón para los datos de área conocida con el IAF y el PAID. Con base en un 99 % de confianza. Para los datos de las hojas grandes con los diferentes métodos evaluados encontramos que no existe una diferencia significativa con un valor para $F = 0.81664$ y $P = 0.48678$, con un 99 % de confianza. En las hojas medianas también encontramos que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de datos de los distintos métodos probados, ya que el valor de $F = 0.06623$ y $P = 0.97771$, con un 99 % de confianza. Los valores de $F = 4.86926$ y $P = 0.00301$, encontrados para los datos de las hojas chicas, con un 99 % de confianza, nos muestran que sí existe una diferencia estadísticamente significativa entre los métodos evaluados, lo anterior coincide con los valores de los coeficientes de determinación obtenidos en las

regresiones presentados en las figuras 6, 9 y 12, que resultaron ser muy diferentes entre sí.

Cabe mencionar que el programa Image Tool utilizado en el PAID, es un paquete de fácil operación y no requiere del manejo de un experto para hacer evaluaciones precisas, además de ofrecer la posibilidad de seleccionar y medir áreas dañadas por enfermedades de diferentes tipos, como las causadas por hongos y/o herbívora (Pérez, 2000), existen paquetes como el Area Measure (Area Meas) versión 1.01 Rev. 4 1995-1999 MYKA, Lab. Universidad de Hongu, Akinori Japón, el cual se distribuye también en forma gratuita en internet para la medición de áreas de imágenes en mapas de bits, dicho programa resulta simple y afuncional ya que evalúa áreas en tonos de grises complicando así la evaluación de un área que contenga diferentes tonalidades como es el caso de algunas hojas de plantas.

Este problema en cuanto a los tonos presentes en las imágenes se presenta en el trabajo de Beverly y van Iersel (1998), quienes mencionan la importancia de controlar la luz a la hora de videograbar las imágenes que serán analizadas con el programa Mocha que tiene un costo elevado, además de requerir varios puntos de calibración para que las evaluaciones sean precisas.

CONCLUSIONES.

1. Se obtuvieron los modelos matemáticos para las diferentes muestras, resultando los empleados en las hojas grandes y medianas, precisos y con coeficientes de determinación muy altos.
2. El PAID resultó ser el método con los más altos valores en coeficiente de determinación comparado con el IAF. Además de resultar más ventajoso por su bajo costo y versatilidad por el hecho de poder utilizar fotocopias de las muestras que no se deterioran ó las hojas directamente en el escáner, así como utilizar imágenes a color o blanco y negro. Siendo posible reducir el margen de error al realizar una buena calibración sobre el área conocida las veces que sea necesario, hasta obtener la precisión deseada. Con la utilización de el PAID no es problema la forma de la hoja , ya que al escanear la imagen y realizar la calibración el programa procesa la imagen y calcula al área de inmediato.
3. Los métodos utilizados resultan eficaces dependiendo de la precisión que se requiera en los estudios a realizar, aunque en modelo matemático y el método gravimétrico resultan inadecuados para la medición de hojas pequeñas, debido a la dificultad de su manejo y la obtención de sus medidas lineales.
4. El PAID podría ser utilizado como un método no destructivo al existir la posibilidad de obtener las imágenes directamente de la planta en cultivo con un scanner y una computadora portátil.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aas, G., 1994. Win/Mac FOLIA. Regent Instruments Inc. Zurich, Switzerland.
2. Astegiano, E. D., J. C. Favaro y C.A. Bouzo, 1999. Estimación del área foliar en distintos cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), utilizando medidas lineales. Universidad Nacional del Litoral. TE.Argentina.Comunicación personal e-mail: easteg@unl.edu.ar.
3. Beverly, R.B. y M. W. Van Iersel, 1998. "Calibration of a video image analysis system for measurement of stem length, leaf area, and percent ground coverage.", Commun. Soil. Sci. Plant. Anal. 29 (9 & 10), 1071-1081.
4. Bidwell, R.G.S.,1987, Fisiología Vegetal, Primera edición en español, AGT editor, pp 477-479.
5. Blanco, E. G. G.,1998. Eficiencia de uso de fósforo, acumulación de azúcares y fotosíntesis en *Amaranthus dubius* Mart.,después de un periodo de recuperación de una deficiencia de fósforo. Tesis de postgrado. Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía.
6. Bunce, J.A., 1989, Growth rate, photosynthesis and respiration in relation to leaf area index., Annals Botany 63,459-463.
7. Causton, y Venus, (1981), The Biometry of Plant Growth, Edward Arnold England.
8. Chávez, M.M.,1997."Portotipo de planímetro fotoeléctrico". Tesis para obtener el título de Biologo UNAM FES Iztacala.
9. Chirinos, D. T, L. Chirinos, F. Geraud-Pouey, O. Castejón, R.E.,Fernández, J.A., Vergara, L.E. Mármol y D. Chirinos 1996. Modelos para estimar el área foliar de melón híbrido "Durango", Rev. Fac. Agron. (La Universidad de Zulia, Venezuela.) 1997 14: 163-171.
10. Coombs J., Hall D. O., y S. P. Long, 1988. "Técnicas de fotosíntesis y Bioproductividad", Ed. Futura S.A. , Segunda edición, México.
11. Escalante, E. J. A., 1999. Área foliar, senescencia y rendimiento del girasol de humedad residual en función del nitrógeno. Terra 17(2):149 – 157.
12. Funt, C. R., M. A. Ellis y C. Welty, 1997. Midwest Small Fruit Pest Management Handbook. Bulletin 861. Chapter 1 Strawberries. The Ohio State University.

13. Korva, J. T. y G.A. Forbes, 1997. A simple and low-cost method for leaf area measurement of detached leaves. *Expl. Agric.* Vol. 33, pp 65-72.
14. LI-COR, Inc., 1988. 3000 A/SM Service Manual for the LI- 3000 A, Portable Area Meter and 3000 A – 01 Readout Console, LI-COR, Inc., Nebraska, USA.
15. Padilla, M. R., J. A. Pineda y M. Ordóñez, 1997. determinación del área foliar de cinco cultivares de café (*Coffea arabica*), mediante modelos de regresión. *Memorias de Resultados y Avances de Investigación. CICAPE - IHCAFE . Tegucigalpa, Honduras.*
16. Pedrinho, J. A. F., A.F.J. Barbosa, S. Bianco y R.A. Pitelli, 2000. Estimativa da área foliar de plantas daninhas: *Portulaca oleracea* L. Centro Regional Universitario de Espírito Santo do Pinhal (CREUPI).
17. Pereyra, P.C., 1997. Consumo foliar de soja por " la oruga medidora " *Rachiplusia un Gene* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad de Entomología. Argentina (CEPAVE).*
18. Pérez, J. E. y V. Sánchez, 2000. Efecto de los sustratos de celulosa y glucano sobre antagonistas de *Phitophthora infestans* en tomate. *Manejo Integrado de Plagas Núm. 58.* Turrialba, Costa Rica.
19. Reséndiz D, y D. Barnes, 1987. "La educación de posgrado : naturaleza , funciones, requisitos y métodos", *Ciencia y Desarrollo, México*, pp 3-7.
20. Simón, M. y A. Trujillo de Leal, 1990. Determinación de área foliar de ocumo (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) O. Schott.). *Rev. Fac. Agron. (Maracay) 16:147-158.*
21. Stoppani, M. I., N. Francescangeli, R. Wolff y H. R. Martí, 2000. Determinación de un método funcional para estimar área foliar a campo en cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* L. Var. *Italica*). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. República Argentina. Biblioteca Virtual.
22. Tsuda, M., 1999. Erros in leaf area measurement with an Automatic Area Meter due to leaf Chlorophyll in Crop Plants. *Annals of Botany 84:799-801.*
23. Vinterhalter, B., D. Vinterhalter y M. Neskovic, 2001. Effect of irradiance, sugars and nitrogen on leaf size of *in vitro* grown *Ceratonia siliqua* L. *Biologia Plantarum 44 (2): 185-188.*

