

## UN MÉTODO PRECISO PARA MEDIR SEVERIDAD DE ROYA DE LA HOJA (*Puccinia triticina* Eriksson) EN TRIGO

### A PRECISE METHOD TO MEASURE LEAF RUST (*Puccinia triticina* Eriksson) SEVERITY IN WHEAT

Carlos P. Saucedo-Acosta<sup>1</sup>, Gabriel A. Lugo-García<sup>1\*</sup>, Héctor E. Villaseñor-Mir<sup>2</sup>,  
Leopoldo Partida-Ruvalcaba<sup>1</sup> y Álvaro Reyes-Olivas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Ciencias Agropecuarias, Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa. Calle 16 Av. Japaraqui S/N. 81110, Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa. <sup>2</sup>Campo Experimental Valle de México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 13.5 carr. Los Reyes- Texcoco. 56250, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. <sup>3</sup>Universidad Tecnológica de Culiacán. Km 2 carr. Culiacán-Imala. 80014, Col. Los Ángeles, Ciudad Educadora del Saber, Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

\*Autor para correspondencia (gabriel.lugo.garcia@gmail.com)

#### RESUMEN

La estimación visual de la severidad de una enfermedad es subjetiva y no repetible, por lo que se requiere investigar métodos alternos que midan con exactitud la superficie dañada de un órgano vegetal. En este estudio se desarrolló una metodología para medir la severidad de la roya de la hoja (*Puccinia triticina* Eriksson) en trigo (*Triticum aestivum* L.) cvs. INIA F-66, Jupateco-73R, Morocco, Sonora F-64 y WL-711, con base en análisis de imágenes digitales (AID). Con el AID se calculó el porcentaje real de área foliar dañada por la enfermedad (MED, %), y se comparó con la metodología visual (EST, %) para estimar la severidad, realizada por tres evaluadores en dos muestreos con 10 repeticiones. La imagen de las hojas se obtuvo con escáner, AID se realizó y automatizó con el programa ImageJ 1.48r. Se midió el área foliar (AS, mm<sup>2</sup>), área dañada (AD, mm<sup>2</sup>), número (NTL), tamaño (TAM, mm<sup>2</sup>) y forma de las lesiones. Se calculó número de lesiones por cm<sup>2</sup> (LPC) y la MED. Los métodos estuvieron correlacionados entre sí ( $r_s = 0.86$ ,  $P \leq 0.0001$ ); aunque EST carece de exactitud. Las severidades determinadas por los evaluadores y con el AID fueron diferentes ( $K-W \approx X^2 = 21.73$ ,  $P \leq 0.05$ ). Los cultivares mostraron diferencias en MED y EST ( $P \leq 0.001$ ); pero los evaluadores sobrestimaron EST cuando el AD fue menor a 19 % y al rebasar este nivel la subestimaron. Morocco presentó la mayor MED (49.4 %). Jupateco-73R y Sonora F-64 tuvieron las menores NTL, TAM y LPC ( $P \leq 0.001$ ). Las ventajas de usar el AID son: permite discriminar entre AD y área sana, requiere menos de 1 min para determinar variables relacionadas con la severidad de roya. Este método presenta repetitividad, reduce el error experimental y la subjetividad.

**Palabras clave:** *Puccinia triticina*, *Triticum aestivum*, estimación visual, imágenes digitales, severidad de roya.

#### SUMMARY

Visual estimation of disease severity in plant organs is subjective and not repeatable, thus accurate methods to measure damaged surfaces are needed. This study proposes a method for measuring severity of leaf rust (*Puccinia triticina* Eriksson) on wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars INIA F-66, Jupateco-73R, Morocco, Sonora F-64 and WL-711 by using digital image analysis (AID). The actual percentage of leaf area damaged by the disease (MED, %) was estimated using AID and then compared to a visual assessment method of disease severity (EST, %) performed by three volunteers, on two samples with 10 replicates.

Leaf images were scanned, and then AID was performed via automation with software (ImageJ 1.48r). Leaf area (AS, mm<sup>2</sup>), damaged area (AD, mm<sup>2</sup>), number (NTL), size (TAM, mm<sup>2</sup>) and shape of lesions were measured. Number of lesions per cm<sup>2</sup> (LPC) and MED was calculated. The two methods correlated with each other ( $r_s = 0.86$ ,  $P \leq 0.0001$ ); although EST lacks accuracy. Severity was different among volunteers and AID ( $K-W \approx X^2 = 21.73$ ,  $P \leq 0.05$ ). MED and EST were different between cultivars ( $P \leq 0.001$ ). Volunteers overestimated EST when AD was less than 19 %, and they underestimated it when it exceeded this level. Morocco had the largest MED (49.4 %). Sonora F-64 and Jupateco-73R had the lowest NTL, TAM and LPC ( $P \leq 0.001$ ). Usage of AID has many advantages, among which it allows accurate identification of damaged and healthy leaf area; it requires less than 1 min to determine variables related with severity of leaf rust; and this method is repeatable, reduces experimental errors and subjectivity.

**Index words:** *Puccinia triticina*, *Triticum aestivum*, visual estimation, digital images, severity of rust.

#### INTRODUCCIÓN

La roya de la hoja causada por *Puccinia triticina* Eriksson, es la enfermedad de mayor importancia en trigo harinero o hexaploide (*Triticum aestivum* L.), ya que limita su producción mundial (Brevis *et al.*, 2008). La disminución en el rendimiento de grano se relaciona proporcionalmente con la severidad de esta enfermedad en la hoja bandera (Seck *et al.*, 1985), en donde es común hacer una sola observación para estimar la severidad de la enfermedad (Marasas, 2004). Un método para evaluar la severidad de roya es el uso de escalas o claves pictográficas que muestran un aumento progresivo de la enfermedad (James, 1971); estas escalas diagramáticas muestran series de plantas o partes de plantas con diferentes niveles de gravedad de los síntomas.

Para estimar el porcentaje del tejido afectado por la roya se usa la escala de Cobb modificada por Peterson *et al.* (1948), la cual relaciona el porcentaje real ocupado por uredinios de la roya con el grado de severidad (Roelfs *et al.*,

1992). Navarro y Arauz (1999) mencionan que el método de evaluación visual de la severidad se utiliza debido a su sencillez, rapidez y bajo costo, pero el error en el cálculo puede ser alto (Bock *et al.*, 2008a). Según Bade y Carmona (2011), el problema con los métodos visuales es la baja repetitividad, imprecisión y, por tanto, menor confiabilidad.

La cuantificación confiable y exacta de la superficie de un órgano vegetal dañado por una enfermedad es fundamental en la prevención y control oportuno de las enfermedades, así como en la selección de nuevos cultivares tolerantes, en la modelación dinámica de epidemias (Robert *et al.*, 2002), en el análisis de los factores que afectan el desarrollo de una enfermedad, en los estudios de efectividad de fungicidas, y al definir el umbral en el cual se deba ejercer un método para combatir una enfermedad y reducir las pérdidas económicas (Kranz, 1988). La identificación y cuantificación de la superficie de un órgano vegetal dañado por una enfermedad es factible de medir con mayor precisión mediante técnicas ahora disponibles para el procesamiento y análisis de imágenes digitales (Cui *et al.*, 2010; Patil y Kumar, 2011; Chaudhary *et al.*, 2012; Barbedo, 2013; Dhaygude y Kumbhar, 2013; Zhang, 2013), que permite obtener resultados consistentes, precisos y sin necesidad de usar técnicas destructivas (Bock *et al.*, 2008b; Velázquez *et al.*, 2011).

El análisis de imágenes permite conocer el número, tamaño, color y forma de las lesiones (Rathod *et al.*, 2013), indicadores útiles para los fitomejoradores y fitopatólogos que utilizan el tamaño de las lesiones y su posterior crecimiento para evaluar la resistencia a patógenos en algunos cultivares (Berger *et al.*, 1997; Bock *et al.*, 2010); además, se elimina subjetividad y errores inducidos (Patil y Bodhe, 2011), por lo que se ha utilizado para desarrollar escalas diagramáticas de severidad de roya en soya, *Glycine max* L. Merr. (Godoy *et al.*, 2006) y de antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.) (Zavala y Alejo, 2012).

Barbedo (2013) considera que la estimación visual es preferida porque la medición mediante procesamiento de imágenes requiere de cierto grado de intervención del usuario, y porque el precio de los programas especializados es elevado. En ese sentido, Angulo y Serra (2005) consideran que la elección del espacio de color adecuado constituye el problema principal en el proceso y análisis de las imágenes en color, como es el caso de discriminar entre área sana y dañada (Patil y Bodhe, 2011). No obstante, el análisis de

imágenes permite evaluar la severidad de enfermedades en forma objetiva, además de que el proceso puede ser automatizado (Bock *et al.*, 2008a) con programas de dominio público para el análisis de imágenes, como es el programa ImageJ 1.48r (Rasband, 2014) cuyo uso ha aumentado en varias disciplinas (Mateos y Pascua, 2013). El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología para medir la severidad de la roya de la hoja de trigo mediante análisis de imágenes digitales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en Guasave, Sinaloa. El 14 de diciembre de 2013 se hizo la siembra de los genotipos de trigo INIA F-66, Jupateco-73R, Morocco, Sonora F-64 y WL-711, susceptibles a roya de la hoja; los síntomas del patógeno se observaron en las hojas bandera durante la segunda quincena de febrero. Se hicieron dos muestreos de hojas bandera (3 y 22 de marzo), con 10 repeticiones colectadas al azar en cada cultivar. Las muestras se digitalizaron en fresco para evitar marchitamiento y pérdida de turgencia, porque cuando esto ocurre se dificulta la medición correcta del área foliar.

La severidad (EST) de la roya en cada hoja bandera fue estimada por tres evaluadores previamente entrenados mediante la proyección de imágenes con diferentes niveles de daño por roya de hoja; se uniformizaron criterios para la determinación de la severidad con base en la escala de Cobb modificada, la cual relaciona el área ocupada por uredinios de la roya (%) con el grado de severidad (%) de la roya (Cuadro 1). A la par se midió la severidad de la enfermedad (MED), que en este estudio se consideró como la severidad de referencia, mediante el procesamiento de las imágenes digitales (AID), con el programa libre ImageJ 1.48r (Rasband, 2014), proceso que permitió la discriminación entre área dañada por uredinios y el resto de la superficie foliar. El programa se encuentra disponible gratuitamente en la página electrónica (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) del National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.

ImageJ soporta diversos formatos de imagen (tiff, gif, jpeg, png, dicom, bmp, pgm y fits), y otros más con la adición de bibliotecas o complementos; admite establecer y calibrar con precisión la escala de medición en cualquier unidad espacial (mediante una medida de referencia), ofrece la opción de analizar objetos por tamaño y forma para eliminar del

**Cuadro 1. Escala de Cobb modificada. A, porcentaje real ocupado por uredinios de la roya; B, grado de severidad de la roya (%).**

A	0.37	1.85	3.7	7.4	11.1	14.8	18.5	22.2	25.9	29.6	33.3	37
B	1	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

análisis objetos fuera de interés en las imágenes digitales; permite aplicar diversos estadísticos a los resultados (media, mediana, curtosis, asimetría, desviación estándar, mínimo, máximo) (Ferreira y Rasband, 2012). Otra ventaja del programa es que el usuario puede incluir rutinas o complementos para automatizar tareas repetitivas. El programa está escrito en lenguaje de programación Java® y funciona sin modificaciones en Windows®, MacOS® y Linux®.

Las imágenes digitales del haz de las hojas se obtuvieron con un escáner de cama plana, marca Epson Stylus® modelo CX4700. El formato de las imágenes fue jpeg en el espacio de color RGB (Red, Green, Blue) a 24 bits por pixel, con una resolución de 300 ppp (píxeles por pulgada), y un tamaño de 2544 (ancho) x 3508 (alto) píxeles.

El procesamiento de imágenes con ImageJ fue en dos etapas: 1) Cálculo del área total de la hoja (AS). Se estableció la escala (*Analyze/Set Scale*), y se binarizó la imagen (*Process/Binary/Make Binary*). Después se usó el análisis de objetos (*Analyze/Analyze particles*) para medir el área de la hoja en el rango de 800 a 50,000 mm<sup>2</sup> (el mayor tamaño de una hoja fue 4457 mm<sup>2</sup>), y se midió la forma o circularidad de la hoja sin ningún ajuste. Al término de este proceso se des-

hicieron los cambios en la imagen (*Edit/Undo*) para poder usar la imagen original en la siguiente etapa. 2) Cálculo del área dañada por roya en cada hoja. Para esta etapa se usó la segmentación de las imágenes con base en umbrales aplicados a los canales de un espacio de color (*Image/Adjust/Color Threshold*).

Se transformó el espacio de color RGB de la imagen al espacio de color HSB (Hue, Saturation, y Brightness por sus siglas en inglés, que corresponden a tono, saturación, y brillo), el cual mejora la representación del color de los píxeles de la imagen y facilita el análisis de la misma (Gonzalez y Woods, 2007); es decir, la identificación y localización de las pústulas o lesiones causadas por la enfermedad (Figura 1). Para la segmentación del área dañada se usaron los siguientes umbrales mínimo y máximo: para el tono fueron 12 y 20, para la saturación fueron 0 y 255, y para el brillo fueron 0 y 140.

Para medir el área total dañada (AD, mm<sup>2</sup>), tamaño (TAM, mm<sup>2</sup>) y número total de lesiones (NTL) causadas por roya se ejecutó un análisis de partículas (*Analyze/Analyze particles*), en el rango de 0.001 a 30,000 mm<sup>2</sup>, sin hacer ningún ajuste por forma del objeto. El número de lesiones por cm<sup>2</sup>

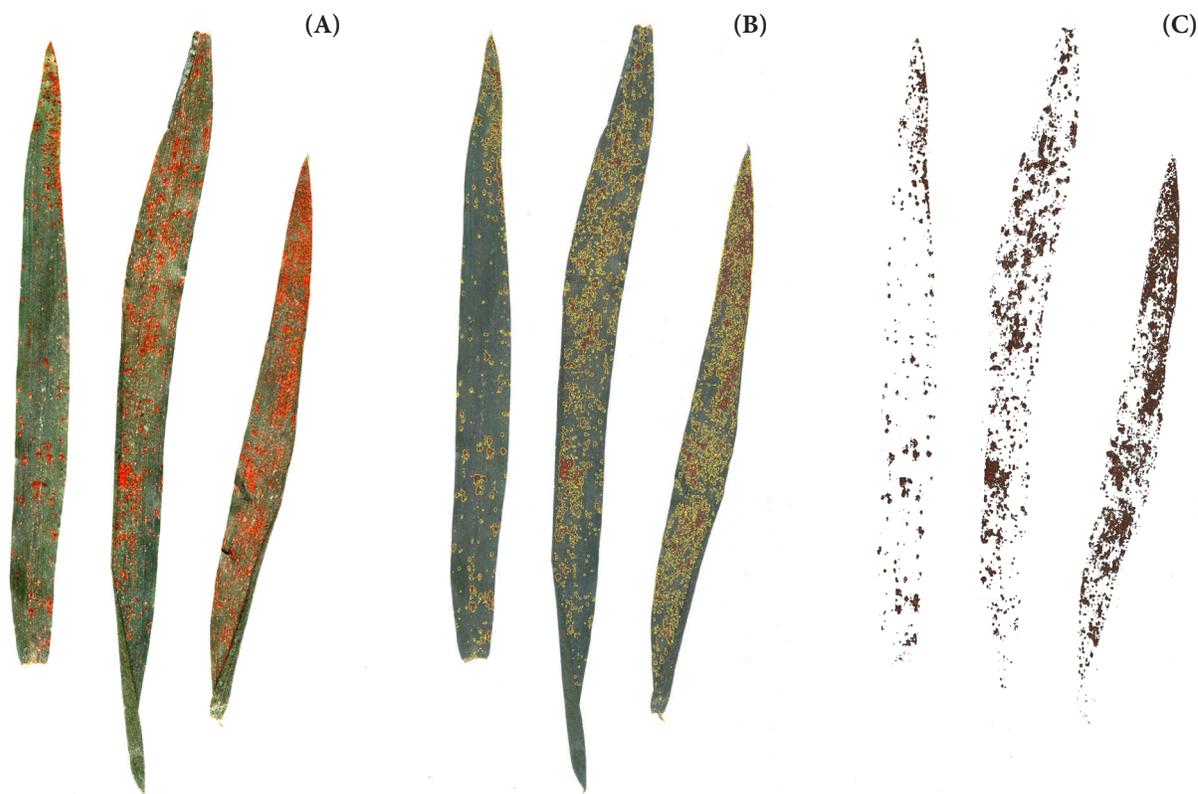


Figura 1. Imagen original de hojas bandera afectadas por roya de la hoja (A), imagen segmentada (B), y presentación del área dañada por la enfermedad (C).

(LPC) se calculó con la siguiente ecuación:  $LPC = \frac{NTL \times 100}{AS}$  y la severidad con la ecuación  $MED (\%) = \frac{AD}{AS} \times 100$ . Para automatizar el proceso de análisis de imágenes se creó una rutina o macro con la opción grabar (*Plugins/Macros/Record*). Esta rutina analiza automáticamente las imágenes de una carpeta, y el resultado lo guarda en un archivo de Excel®, o bien el resultado de cada imagen se guarda en un archivo por separado con el nombre de la imagen para su identificación. Los autores ofrecen esta rutina al público, si se les solicita directamente.

El tiempo promedio requerido para obtener la imagen de las hojas con el escáner fue 45 s, y el procesamiento y análisis por imagen con la ejecución de la macro se realizó en 1.6 s, sin importar el número de hojas que contenía (el máximo de hojas por imagen fue de cinco); la digitalización y análisis de imágenes se hicieron en el sistema operativo Windows 7® de 32 bits, en un equipo con procesador AMD Phenom® X3 B73 a 2.8 GHz y 3 GB de memoria RAM.

Los datos se analizaron mediante la prueba descrita por Shapiro y Wilk (1965) para determinar normalidad, y la prueba de Bartlett (1937) para comprobar la homogeneidad de varianzas (estadística paramétrica) de las variables evaluadas, las cuales no se cumplieron en las variables MED, EST, NTL y TAM ni aun cuando se hicieron transformaciones logarítmicas, matemáticas y trigonométricas. En consecuencia, el análisis fue con un análisis de varianza (ANDEVA) no paramétrico de Kruskal-Wallis; el estadístico de prueba (H) es una aproximación a la  $X^2$  de Pearson a 1.0 % ( $K-W \approx X^2$ ). Se ejecutaron comparaciones apareadas entre genotipos y métodos de estimación de la severidad mediante la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon, con el procedimiento NPARIWAY. Las variables EST, NTL, LPC, TAM y MED correlacionaron con el estadístico no paramétrico de Spearman ( $r_s$ ) y se ajustaron regresiones no paramétricas (regresión local ponderada) con el procedimiento PROC LOESS, con parámetro de suavizado de 0.5. La forma de las lesiones cumplió con los supuestos del ANDEVA y se analizó con estadística paramétrica. Todos estos análisis se hicieron con el programa estadístico SAS 9.2® (SAS Institute Inc., 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La dispersión de los datos de severidad (MED) con respecto al número de lesiones mostró un punto de inflexión a partir de 19 % de área dañada, por lo que se utilizó este porcentaje como umbral de referencia para determinar el impacto del número de lesiones en la apreciación visual de la severidad (EST). De acuerdo con Bock *et al.* (2010), el número de lesiones influye en la precisión y exactitud de las estimaciones visuales del área dañada; además, los autores

señalan que existe una tendencia generalizada de los evaluadores a sobrestimar el porcentaje de área dañada cuando la severidad es menor a 10 %.

Cuando el área dañada fue menor a 19 % hubo una sobrestimación de ésta de 208, 145 y 428 % por los evaluadores 1, 2 y 3, respectivamente, pero las observaciones en que se rebasó el umbral de 19 % hubo una subestimación de 54, 58 y 41 % por los evaluadores 1, 2 y 3, en el mismo orden, la cual en parte corresponde a que 27 % del total de las mediciones estuvieron por encima de 37 %, nivel máximo de la escala de Cobb modificada. Según Bock *et al.* (2009), cuando los niveles de severidad son bajos (< 8 %) la evaluación de lesiones foliares causadas por el cáncer de los cítricos (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) se sobrestima en alrededor de 600 %, sin importar la experiencia del evaluador en la estimación. Por su parte, Kwack *et al.* (2005) mencionan que la evaluación visual sobrestima la severidad cuando los niveles de infección son bajos.

Con ambos métodos de cálculo de la severidad de la roya se detectaron diferencias significativas de severidad entre genotipos ( $P \leq 0.001$ ), según los valores medios de severidad por método para cada cultivar, el valor de  $X^2$  y nivel de probabilidad, los que se muestran en el Cuadro 2. La variedad Morocco mostró mayor severidad por roya (MED = 49.39 %), mientras que Jupateco-73R presentó el menor daño por la enfermedad (MED = 1.65 %). Los evaluadores 1 y 3 sobrestimaron el porcentaje de la roya cuando el área dañada fue baja como ocurrió en los cultivares Jupateco-73R y Sonora F-64. Godoy *et al.* (2006) señalan que el uso de escalas permite mejorar la precisión y exactitud para la estimación de la severidad de roya en soya de evaluadores sin experiencia, pero aun así se mantiene la tendencia a sobrestimar las enfermedades cuando la severidad es baja. Por su parte, Bade y Carmona (2011) indican es difícil de alcanzar precisión y exactitud con escalas diagramáticas para evaluar la severidad de roya en maíz (*Zea mays* L.).

Se observó una estrecha correlación entre las estimaciones realizadas por los tres individuos (EST) y la que se hizo con el método basado en análisis de imágenes ( $r_s = 0.86$ ,  $P \leq 0.0001$ ). El evaluador 1 tuvo mayor precisión en las observaciones, con un coeficiente de correlación de Spearman de 0.94 ( $P \leq 0.001$ ), aunque lo anterior no indica exactitud. Al respecto, Bock *et al.* (2010) mencionan que el término precisión se utiliza ampliamente en estadística para denotar la variabilidad de las observaciones, pero que las estimaciones precisas no necesariamente se acercan al valor real, tal y como es el caso de los tres evaluadores (Figura 2). Hubo diferencias en severidad de la roya entre las estimaciones por los evaluadores y con las mediciones obtenidas con AID ( $K-W \approx X^2 = 21.73$ ,  $P \leq 0.05$ ).

**Cuadro 2. Porcentaje real de área foliar dañada por la enfermedad (MED) o severidad de roya de la hoja medida con análisis de imágenes digitales (AID), y la estimada por tres evaluadores (EST) en cinco cultivares de trigo harinero, en el norte de Sinaloa, ciclo otoño-invierno (2013/2014).**

Genotipo	MED (%)	EST (%), escala de Cobb modificada		
		Evaluador 1	Evaluador 2	Evaluador 3
INIA F-66	33.0 b	15.3 b	15.5 b	18.4 b
Morocco	49.3 c	22.7 b	17.9 b	28.1 c
Jupateco-73R	1.6 a	2.4 a	1.0 a	3.2 a
Sonora F-64	2.3 a	2.2 a	0.6 a	7.6 ab
WL-711	17.2 a	8.4 a	6.9 a	12.7 ab
K-W $\approx$ X <sup>2</sup> (P $\leq$ 0.001)	42.2	42.4	39.1	38.5

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales (Prueba de Kruskal Wallis).

El evaluador 2 estimó la severidad promedio más baja (8.4 %) y difirió con los evaluadores 1 y 3, quienes estimaron en 10.25 y 14.04 % de severidad respectivamente, y también difirió con el AID con el cual se obtuvo el mayor promedio de severidad (20.74 %). De acuerdo con Mirik *et al.* (2006), las evaluaciones visuales de la severidad difieren entre personas debido a que cada individuo tiene una capacidad diferente para percibir las longitudes de onda de la luz visible, y agregan que condiciones como fatiga, falta de concentración y de experiencia incrementan la subjetividad de la estimación visual. En el primer muestreo la MED promedio fue 7.4 %, y para la segunda evaluación se incrementó a 34.0 % (K-W  $\approx$  X<sup>2</sup> = 20.55, P  $\leq$  0.0001).

Se observaron diferencias altamente significativas entre cultivares en el número, tamaño y lesiones por cm<sup>2</sup> (Cuadro 3). El número de lesiones por hoja varió desde 3 hasta 1922, lo cual no significa que un número bajo de lesiones represente igual número de pústulas, ya que éstas últimas eventualmente se unen y forman una sola. Lo anterior explica el que no haya existido una relación directa entre el número y el tamaño de lesiones ( $r_s = 0.64$ , P  $\leq$  0.0001). Al comparar el cálculo del número de lesiones ocasionadas por *Puccinia sorghi* en hojas de maíz con el programa Assess 2.0® (American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA) y los registros visuales, Bade y Carmona (2011) no encontraron relación entre métodos, ya que el programa subestimó el número de pústulas debido a que cuando éstas están agrupadas cuentan como una sola lesión. Al analizar nuestros resultados, se observaron diferencias (P  $\leq$  0.001) en NTL y TAM entre fechas de muestreo; en el primer muestreo el número promedio de lesiones fue 252, que incrementó a 394 en el segundo muestreo (K-W  $\approx$  X<sup>2</sup> = 15.04, P  $\leq$  0.0001); de igual manera, el tamaño de las lesiones aumentó de 0.43 mm<sup>2</sup> a 2.21 mm<sup>2</sup> (K-W  $\approx$  X<sup>2</sup> = 8.69, P  $\leq$  0.003).

Las lesiones presentan forma circular con un valor medio de 0.81 de circularidad; a mayor número de lesiones la

circularidad tiende a disminuir, ya que las pústulas unidas forman áreas irregulares. El número y tamaño de lesiones fue mayor en las variedades Morocco e INIA F-66 (Cuadro 3). El tamaño de las lesiones fue desde 0.042 hasta 9.59 mm<sup>2</sup> (Cuadro 3); este intervalo es más amplio que el reportado por Robert *et al.* (2002) de 0.7 a 4.7 mm<sup>2</sup> para roya de la hoja, o que el reportado por Robert *et al.* (2004) de 0.48 a 3.4 mm<sup>2</sup>. El tamaño de las lesiones presentó asociación positiva con MED ( $r_s = 0.92$ , P  $\leq$  0.0001) y EST ( $r_s = 0.78$ , P  $\leq$  0.0001).

El efecto del tamaño de las lesiones en la estimación visual se ha señalado en diversos estudios (Godoy *et al.*, 2006; Bock *et al.*, 2008a; Bock *et al.*, 2008b). Según Bock *et al.* (2010), la severidad se sobrestima cuando hay numerosas lesiones de tamaño pequeño. Se observaron de 0.13 a 52 lesiones por cm<sup>2</sup>, y se encontró una relación lineal con pendiente positiva entre esta variable y MED cuando ésta fue menor a 19 %, pero a mayor severidad la relación entre estas variables fue lineal con pendiente negativa y con baja correlación (Figura 3), lo cual ocurre porque el número de lesiones se reduce porque éstas se unen y aumentan de tamaño, por lo que resulta que igual número de lesiones puede representar diferente nivel de severidad, lo que provoca mayor dispersión de los datos.

La automatización de la metodología con la rutina aquí generada permite que evaluadores sin conocimiento previo de cómo analizar imágenes, ni de programación en ImageJ, puedan realizar la medición de la superficie dañada por roya de la hoja de trigo en cientos de imágenes con una sola instrucción, a la tasa de 0.625 imágenes por segundo, aunque el tiempo de procesamiento depende del tamaño o resolución de la imagen, del programa y equipo de cómputo utilizado.

Al evaluar las lesiones foliares causadas por el cáncer de los cítricos, Bock *et al.* (2009) reportaron que se requieren

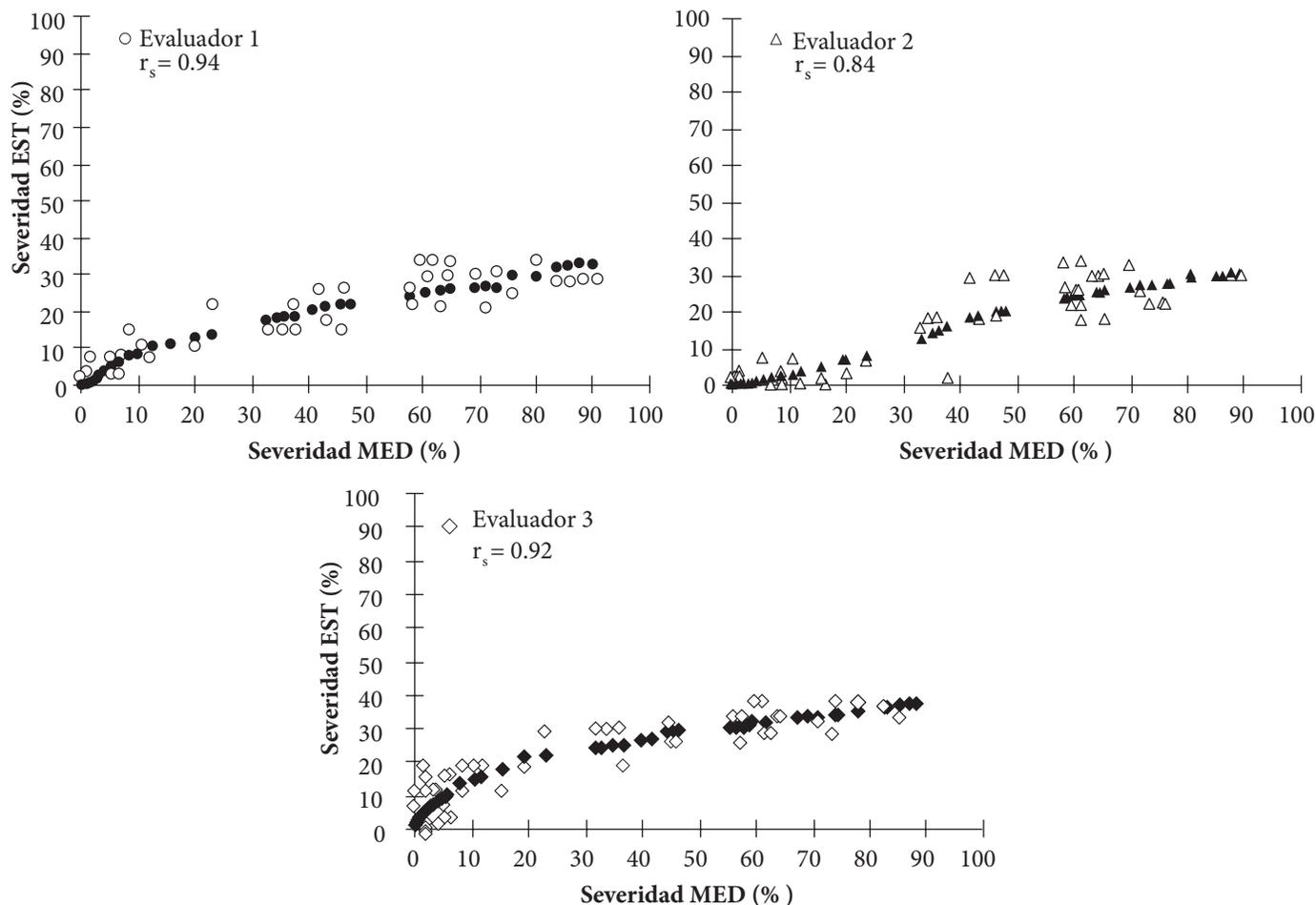
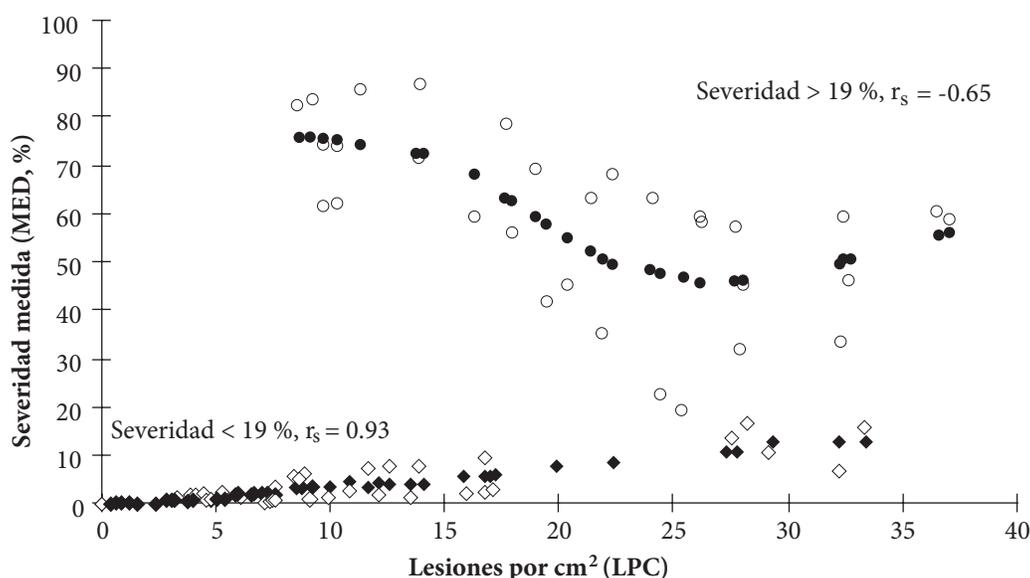


Figura 2. Relación entre la severidad medida (MED) y estimada (EST) por tres evaluadores con base a la escala de Cobb modificada, con coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ), y modelo de esta relación por evaluador (puntos sólidos) con regresión local ponderada (LOESS) con parámetro de suavizado 0.5.

Cuadro 3. Características de las lesiones de roya de la hoja en cinco cultivares de trigo harinero, en el norte de Sinaloa, ciclo otoño-invierno (2013/2014).

Genotipo	NTL	NMín	NMáx	TAM (mm <sup>2</sup> )	TMín	TMáx	Circ	LPC
INIA F-66	376 bc	8	1002	1.7 bc	0.114	7.56	0.817	17.5 bc
Morocco	594 c	247	1922	3.3 c	0.220	9.59	0.794	22.1 c
Jupateco-73R	180 a	28	840	0.2 a	0.042	0.60	0.814	5.7 a
Sonora F-64	217 ab	83	580	0.2 a	0.069	0.49	0.802	9.0 ab
WL-711	245 a	3	815	0.9 ab	0.043	5.18	0.801	10.9 a
K-W $\approx$ X <sup>2</sup> (P ≤ 0.01)	29.7			36.7				30.5

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales (Prueba de Kruskal Wallis). NTL = número de lesiones; NMín = número mínimo de lesiones; NMáx = número máximo de lesiones; TAM = tamaño de lesión; TMín = tamaño mínimo de lesión; TMáx = tamaño máximo de lesión; Circ = circularidad (0 = polígono alargado, 1 = circular); LPC = número de lesiones por cm<sup>2</sup>.



**Figura 3.** Relación entre el número de lesiones por  $\text{cm}^2$  (LPC) y la severidad medida (MED), con nivel de infección mayor (círculo) y menor (rombo) a 19 %, coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ), y modelo de esta relación por nivel de infección (puntos sólidos) con regresión local ponderada (LOESS) con parámetro de suavizado 0.5.

30 s con el programa Assess 1.0® para procesar imágenes obtenidas con una cámara digital (1000 x 600 píxeles a 300 ppp). Por su parte, Xie *et al.* (2012) reportaron más de 60 s por imagen en Assess 2.0® para analizar en forma automática el tizón común bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y *X. fuscans* subsp. *fuscans*) en *Phaseolus vulgaris*. En la evaluación de la severidad del tizón foliar en trigo (*Zymoseptoria tritici*) mediante imágenes fotográficas, Stewart y McDonald (2014) estimaron que el análisis del porcentaje de área dañada con ImageJ requirió 14.4 s por imagen.

La escala de Cobb modificada considera que sólo alrededor de un tercio (37 %) de la hoja puede ser afectada por roya, lo cual no coincidió con el AID ya que 27 % de las mediciones estuvieron entre 40.8 y 86.6 % de superficie dañada por roya. Bade y Carmona (2011) consideran que otro inconveniente de esta escala es la distribución homogénea de las lesiones en el diagrama, lo cual dificulta la estimación porque no corresponde con la distribución heterogénea de las lesiones en las hojas, como tampoco corresponde el tamaño y la forma de las lesiones, en comparación con la variación de tamaños y formas de las lesiones reales.

La escala de Cobb modificada comúnmente utilizada para estimar la severidad de roya en maíz y trigo (Bade y Carmona 2011), fue elaborada manualmente a partir de áreas que se midieron con planímetro, y su uso es incierto cuando la severidad real supera 37 % de superficie dañada (Peterson *et al.*, 1948). De acuerdo con Godoy *et al.* (2006),

un aspecto importante en la elaboración de escalas diagramáticas es que el límite inferior y superior de la escala corresponda a la mínima y máxima severidad observada en campo. Con base en los argumentos mencionados, es necesario considerar la elaboración y validación de una nueva escala con una representación real y cuantitativa de la severidad de roya, la cual se puede obtener mediante el procesamiento y análisis de imágenes digitales, para incrementar la precisión y exactitud de las estimaciones de la severidad de roya de la hoja en trigo.

## CONCLUSIONES

La metodología desarrollada mediante procesamiento y análisis de imágenes digitales (AID) es capaz de diferenciar entre las lesiones causadas por roya de la hoja, el área sana y regiones necróticas causadas por otros factores, por lo que mide con precisión el área foliar dañada por este patógeno, al mismo tiempo que permite caracterizar el avance de la enfermedad mediante el número, tamaño y forma de las lesiones.

El AID es un método más preciso para evaluar severidad de la roya en trigo que el procedimiento visual que utiliza la escala de Cobb modificada, además facilita la repetitividad, reduce el error y la subjetividad de la estimación visual.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Sectorial SAGARPA-

CONACYT, Proyecto No. 146788, por el financiamiento parcial de la presente investigación y su publicación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Angulo J. y J. Serra (2005) Segmentación de imágenes en color utilizando histogramas Bi-variables en espacios color polares luminancia/saturación/matiz. *Computación y Sistemas* 8:303-316.
- Bade C. I. A. and M. A. Carmona (2011) Comparison of methods to assess severity of common rust caused by *Puccinia sorghi* in maize. *Tropical Plant Pathology* 36:264-266.
- Barbedo J. G. A. (2013) Digital image processing techniques for detecting, quantifying and classifying plant diseases. *SpringerPlus* 2:660.
- Bartlett M. (1937) Properties of sufficiency and statistical tests. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* 160:268-282.
- Berger R. D., F. A. Bergamin and L. Amorim (1997) Lesion expansion as an epidemic component. *Phytopathology* 87:1005-1013.
- Bock C. H., P. E. Parker and T. Gottwald (2010) Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29:59-107.
- Bock C. H., P. E. Parker, A. Z. Cook and T. R. Gottwald (2008a) Visual rating and the use of image analysis for assessing different symptoms of citrus canker on grapefruit leaves. *Plant Disease* 92:530-541.
- Bock C. H., P. E. Parker, A. Z. Cook and T. R. Gottwald (2008b) Characteristics of the perception of different severity measures of citrus canker and the relations between the various symptom types. *Plant Disease* 92:927-939.
- Bock C. H., P. E. Parker, A. Z. Cook, T. Riley and T. R. Gottwald (2009) Comparison of assessment of citrus canker foliar symptoms by experienced and inexperienced raters. *Plant Disease* 93:412-424.
- Brevis J. C., O. Chicaiza, I. A. Khan, L. Jackson, C. F. Morris and J. Dubcovsky (2008) Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene Lr47. *Crop Science* 48:1441-1451.
- Chaudhary P., A. K. Chaudhari, A. N. Cheeran and S. Godara (2012) Color transform based approach for disease spot detection on plant leaf. *International Journal of Computer Science and Telecommunications* 3:65-70.
- Cui D., Q. Zhang, M. Li, G. L. Hartman and Y. Zhao (2010) Image processing methods for quantitatively detecting soybean rust from multispectral images. *Biosystems Engineering* 107:186-193.
- Dhaygude S. B. and N. P. Kumbhar (2013) Agricultural plant leaf disease detection using image processing. *International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering* 2:599-602.
- Ferreira T. and W. Rasband (2012) ImageJ User Guide: IJ 1.46 r. Bethesda, MD: National Institutes of Health. 185 p.
- Godoy V. C., L. Koga J. and M. Canteri G. (2006) Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira* 31:63-68.
- Gonzalez R. C. and R. E. Woods (2007) Digital Image Processing. 3rd ed. Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ, USA. 976 p.
- James W. C. (1971) An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. *Canadian Plant Disease Survey* 51:39-65.
- Kranz J. (1988) Measuring plant disease. In: Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology. J. Kranz and J. Rotem (eds.). Springer, Berlin. pp:35-50.
- Kwack M. S., E. N. Kim, H. Lee, J-W. Kim, S-C. Chun and K. D. Kim (2005) Digital image analysis to measure lesion area of cucumber anthracnose by *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of General Plant Pathology* 71:418-421.
- Marasas C. N., M. Smale and R. P. Singh (2004) The Economic Impact in Developing Countries of Leaf Rust Resistance Breeding in CIMMYT-Related Spring Bread Wheat. Economics Program México, Paper 04-01. D.F., CIMMYT. 34 p.
- Mateos P. J. M. and J. Pascua (2013) Image Processing with ImageJ. Packt Publishing Ltd. Birmingham B3 2PB, UK. 126 p.
- Mirik M., G. J. Michels, S. M. Kassymzhanova, N. C. Elliott, V. Catala, D. B. Jones and R. Bowling (2006) Using digital image analysis and spectral reflectance data to quantify damage by greenbug (Hemitera: Aphididae) in winter wheat. *Computers and Electronics in Agriculture* 51:86-98.
- Navarro J. R. y L. F. Arauz (1999) Exactitud y repetitividad de dos métodos para la evaluación de la severidad de enfermedades fungosas en el fruto de la papaya (*Carica papaya*). *Agronomía Costarricense* 23:89-96.
- Patil J. K. and R. Kumar (2011) Advances in image processing for detection of plant diseases. *Journal of Advanced Bioinformatics Applications and Research* 2:135-141.
- Patil S. B. and S. K. Bodhe (2011) Leaf disease severity measurement using image processing. *International Journal of Engineering and Technology* 3:297-301.
- Peterson R. F., A. B. Campbell and A. E. Hannah (1948) A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals. *Canadian Journal of Research* 26:496-500.
- Rasband W. S. (2014) ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/> (Febrero 2014).
- Rathod A. N., B. A. Tanawal and V. H. Shah (2013) Image processing techniques for detection of leaf disease. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering* 3:397-399.
- Robert C., M. O. Bancal and C. Lannou (2004) Wheat leaf rust uredospore production on adult plants: Influence of leaf nitrogen content and *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* 94:712-721.
- Robert C., M. O. Bancal and C. Lannou (2002) Wheat leaf rust uredospore production and carbon and nitrogen export in relation to lesion size and density. *Phytopathology* 92:762-768.
- Roelfs A. P., R. P. Singh y E. E. Saari (1992) Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. México, D.F.: CIMMYT. 81 p.
- SAS Institute (2008) SAS/STAT® 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Seck M., P. S. Teng and A. P. Roelfs (1985) The role of wheat leaves in grain yield and leaf rust losses. *Phytopathology* 75:1299.
- Shapiro S. S. and M. B. Wilk (1965) Analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52:591-611.
- Stewart E. L. and B. A. McDonald (2014) Measuring quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using high-throughput automated image analysis. *Phytopathology* 104:985-992.
- Velázquez L. N., Y. Sasaki, K. Nakano, J. M. Mejía M. y E. Romanchik K. (2011) Detección de cenicilla en rosa usando procesamiento de imágenes por computadora. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17:151-160.
- Xie W., K. Yu, K. P. Pauls and A. Navabi (2012) Application of image analysis in studies of quantitative disease resistance, exemplified using common bacterial blight-common bean pathosystem. *Phytopathology* 102:434-442.
- Zavala L. M. J. y J. C. Alejo (2012) Escala logarítmica diagramática de severidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya (*Carica papaya*). *Fitosanidad* 16:83-86.
- Zhang F. (2013) Feature extraction method for wheat diseases based on multi-fractal spectrum. In: Proceedings of the 2nd International Conference on Computer Science and Electronics Engineering. Paris, France. pp:3061-3064.