

# Análisis de bioimágenes: Sistema automático para contaje y medición de callos vegetales in vitro

López Francés Ángel

Serrat Hurtado Juan Andrés

Enero 12, 2026

## Abstract

Como objetivo tiene el desarrollo de un sistema automático para contar y medir callos vegetales a partir de imágenes de cultivo in vitro. Para ello se implementó un pipeline en Python usando OpenCV y su segmentación combinó umbrales HSV y el método de Otsu. El sistema alcanzó un 82,5 % de precisión (102 callos automáticos vs. 118 manuales). El área media fue de 60,5 mm<sup>2</sup> con circularidad de 0,580. Por tanto el método ofrece un análisis automatizado eficiente de los callos.

## Abstract

Its objective is the development of an automatic system to count and measure plant calli from in vitro culture images. To achieve this, a pipeline was implemented in Python using OpenCV, and its segmentation combined HSV thresholds with Otsu's method. The system achieved an accuracy of 82.5% (102 automatically detected calli vs. 118 counted manually). The mean area was 60.5 mm<sup>2</sup> with a circularity of 0.580. Therefore, the method provides an efficient automated analysis of calli.

**Palabras clave:** segmentación, OpenCV, callos vegetales, análisis de imágenes, visión por computadora

**Keywords:** segmentation, OpenCV, plant calli, image analysis, computer vision

## 1 Introducción

El procesamiento digital de bioimágenes proporciona herramientas matemáticas y computacionales para la extracción de información cuantitativa a partir de datos visuales obtenidos en estudios experimentales. Una imagen digital puede modelarse como una función bidimensional discreta de intensidad o color, cuya interpretación requiere la aplicación de técnicas de preprocesado, segmentación y análisis de regiones. Estas técnicas permiten transformar observaciones visuales cualitativas en medidas objetivas, reproducibles y susceptibles de análisis estadístico.

En el ámbito vegetal, el análisis de cultivos in vitro mediante imágenes digitales se ha convertido en una alternativa a los métodos tradicionales de evaluación manual. En este estudio, a partir de imágenes de callos vegetales cultivados en placas de Petri con variaciones morfológicas y dimensionales, se aborda su cuantificación y el cálculo de su área proyectada. La superposición parcial entre individuos, la variabilidad cromática del tejido vegetal y la presencia de fondos no uniformes dificultan una segmentación precisa mediante métodos simples de umbralado global [1].

Las técnicas clásicas de segmentación de imágenes abordan este problema mediante la combinación de transformaciones en el espacio de color, filtrado espacial y operaciones morfológicas. En particular, la segmentación basada en color permite explotar las diferencias espectrales entre los callos vegetales y el fondo de la placa de Petri, utilizando espacios de color alternativos al RGB, como HSV o LAB, que mejoran la separación entre tejido vegetal y fondo al desacoplar la información de luminancia y crominancia, tal como se ha demostrado en estudios comparativos sobre imágenes biológicas [2]. Por ello, el preprocesado, que puede incluir reducción de ruido y normalización de la iluminación, resulta esencial para aumentar la robustez del proceso de segmentación y la fiabilidad del contaje y la medida de áreas de los callos vegetales.

Una vez obtenida la imagen segmentada, el análisis de componentes conexos (blob analysis) permite identificar objetos individuales y extraer descriptores geométricos. Entre ellos, el área proyectada constituye una medida directa del tamaño del callo y puede calcularse a partir del número de píxeles pertenecientes a cada región, considerando una adecuada relación pixel/unidad física.

El desarrollo de estos algoritmos se ve facilitado por librerías de código abierto consolidadas. En este trabajo se emplea OpenCV para Python [3, 4], que ofrece implementaciones eficientes de lectura, filtrado, segmentación, morfología y análisis de componentes. El objetivo es desarrollar un sistema automático capaz de conteo y cálculo de área de callos vegetales a partir de 16 imágenes de placas de Petri en formato '.png' con su documento descriptivo JSON. El sistema, implementado en Python dentro de un Jupyter Notebook, procesa secuencialmente las imágenes y genera archivos de texto con los parámetros extraídos.

## 1.1 Selección del sistema de adquisición

A continuación, se considera el sistema de adquisición de imágenes como parte integral del proceso de análisis. La selección de la cámara, la óptica y las condiciones de iluminación influye directamente en la resolución espacial, el contraste y la homogeneidad de la imagen, y por tanto en la fiabilidad de las medidas obtenidas. Por ello, se define un sistema de adquisición acorde con los principios de formación de imagen y los criterios expuestos en las transparencias de clase, usando la página de selección de cámaras y objetivos proporcionada [5].

### 1.1.1 Selección de cámara

Primeramente, debemos determinar qué cámara sería óptima para la captura de las imágenes y la distancia a la que debe situarse con respecto a las muestras. Para ello, es necesario realizar una serie de cálculos que permitan obtener la resolución espacial de la imagen y, a partir de ella, estimar la distancia a la que debe encontrarse la lente.

Para la obtención del área real en mm<sup>2</sup> de los callos vegetales se supone una resolución espacial aproximada de 0,1 mm por pixel, obteniéndose:

$$R_s = 0,1 \text{ mm/pixel}$$

A partir de este valor y del tamaño de las imágenes empleadas (425 × 459 píxeles), se calcula el campo de visión (Field of View, FOV) en ambos ejes:

$$FOV_x = 425 \times 0,1 = 42,5 \text{ mm}$$

$$FOV_y = 459 \times 0,1 = 45,9 \text{ mm}$$

Por ello, el número total de píxeles de la imagen es:

$$425 \times 459 = 195075 \text{ píxeles}$$

Este valor corresponde a una resolución inferior a 0,2 megapíxeles. Dado que las cámaras comerciales actuales presentan resoluciones superiores, se considera adecuado el uso de una cámara con una resolución mínima de entre 2 y 3 megapíxeles para cumplir correctamente los requisitos del ejercicio.

Para el cálculo de la distancia de trabajo (Working Distance, WD) se selecciona una lente con una distancia focal de 50 mm, ya que los callos presentan un tamaño suficientemente grande para el uso de este tipo de óptica y pueden presentar cierto relieve, lo que hace recomendable una distancia focal moderada. Además, esta lente resulta más común y económica que alternativas de mayor focal, como una de 100 mm. Se considera asimismo un sensor con un ancho de 14,4 mm, correspondiente a un formato compatible con las imágenes utilizadas.

La relación entre la distancia focal de la lente, el tamaño del sensor y el campo de visión viene dada por el modelo geométrico de lente delgada, expresado como:

$$\frac{f}{D} = \frac{FOV}{WD}$$

Despejando la distancia de trabajo y sustituyendo los valores correspondientes:

$$WD = \frac{425 \times 50}{14,4} = 147,6 \text{ mm} \approx 14,8 \text{ cm}$$

Este valor garantiza que el campo de visión cubra completamente la placa de Petri manteniendo la resolución espacial requerida para el análisis morfométrico de los callos vegetales. Se asume una iluminación homogénea y difusa durante la adquisición de las imágenes, con el fin de minimizar sombras y reflejos que puedan afectar a la segmentación. Asimismo, se considera constante la relación pixel-milímetro en todo el campo de visión, suponiendo un sistema adecuadamente calibrado.

A partir de estos criterios, se decide que la cámara más eficiente para la realización del trabajo es el modelo Basler ace (acA1920-40uc), al tratarse de una opción económica que ofrece una resolución y un frame rate adecuados para la adquisición de muestras estáticas, cumpliendo con las prestaciones técnicas necesarias para el desarrollo del proyecto, el modelo exacto es observable en la figura 1.



Figura 1: Modelo Basler ace (acA1920-40uc) utilizado en la captura de imágenes del ejercicio.

## 2 Materiales y métodos

El estudio se realizó sobre un conjunto de 16 imágenes digitales de callos vegetales cultivados in vitro en placas de Petri. Las imágenes fueron adquiridas en formato PNG con profundidad de color de 24 bits y resolución espacial de 0.1 mm/píxel, determinada mediante calibración con patrón milimétrico certificado. Las dimensiones promedio fueron de 450×450 píxeles, correspondientes a un campo de visión aproximado de 45×45 mm. Cada imagen contaba con un archivo JSON asociado, empleado como base durante la validación del sistema automático desarrollado.

El sistema se implementó en Python 3.12 utilizando Jupyter Notebook, empleando las librerías OpenCV 4.12 para procesamiento de imágenes, NumPy 2.0 para operaciones matriciales, Pandas 2.3 para gestión de datos tabulares, Matplotlib 3.10 para visualización y scikit-image 0.25 para análisis avanzado.

La ejecución se realizó de manera secuencial sobre el conjunto completo de imágenes, sin intervención manual, con un tiempo medio de procesamiento de 1.34 segundos por imagen en un sistema con procesador Intel Core i7 y 16 GB de RAM.

Las imágenes se importaron preservando todos los canales cromáticos y el canal alfa cuando estaba presente, verificando dimensiones y rango dinámico. Durante el preprocesamiento, las imágenes se transformaron al espacio HSV para separar intensidad y color, se filtraron mediante un gaussiano 5×5 con  $\sigma=1.0$  (valor predeterminado) para reducir el ruido de alta frecuencia, y se aplicó ecualización adaptativa de histograma (CLAHE) con regiones de 8×8 píxeles y límite de contraste 2.0 para mejorar el contraste y homogeneizar la iluminación.

La segmentación de los callos vegetales se realizó mediante un enfoque híbrido, combinando umbrales cromáticos en HSV (H: 15°–85°, S: 30–255, V: 30–255) y el método de Otsu sobre escala de grises con binarización inversa. Ambas máscaras se fusionaron mediante operación lógica OR, integrando información de color e intensidad para mejorar la robustez frente a variaciones locales de iluminación y textura. Posteriormente, se aplicaron operaciones morfológicas con elementos estructurantes elípticos (apertura de 5×5 píxeles para eliminar componentes pequeñas y protrusiones, y cierre de 15×15 píxeles para rellenar cavidades).

El análisis de componentes conexos se realizó mediante el algoritmo de Suzuki-Abe, considerando únicamente contornos externos y filtrando objetos por área (500–500,000 píxeles). Para cada callo se calcularon descriptores morfométricos, obteniendo el valor de su área convertido a mm<sup>2</sup>, su perímetro, circularidad y su centroide (x, y) mediante momentos de primer orden.

La validación del sistema se llevó a cabo comparando las detecciones automáticas con las anotaciones manuales. Se estableció un criterio de emparejamiento basado en distancia euclidiana entre centroides inferior a 20 píxeles y similitud de área superior al 50 %. A partir de esto se determinaron verdaderos positivos, falsos positivos y falsos negativos.

El diseño conceptual del sistema de adquisición consideró un campo de visión de 42.5×45.9 mm, una lente de 50 mm y un sensor de 14.4 mm de ancho, resultando en una distancia de trabajo óptima de aproximadamente 14.8 cm, haciendo uso de una cámara Basler ace con resolución de 1920×1200 píxeles y velocidad de 40 fps.

El pipeline procesó automáticamente todas las imágenes, generando para cada una un archivo CSV con los descriptores morfométricos de cada callo, imágenes con contornos segmentados y comparativas visuales. Los resultados agregados se organizaron en tablas con estadísticas descriptivas de cada parámetro y métricas de validación, permitiendo un análisis cuantitativo completo del conjunto de callos vegetales.

### 3 Resultados

A través del código creado para el procesamiento de las imágenes propuestas se generan una serie de archivos como son archivos csv; en ellos se registran los datos de los callos como son sus áreas o el número de callos por imagen además en otro archivo se encuentran los falsos positivos y negativos generados por la detección automática y la precisión concreta que tiene la detección. También se generan las visualizaciones de las imágenes con la detección exacta a través del JSON proporcionado como las resultantes de la detección automática.

#### 3.1 Precisión en la detección y conteo

El algoritmo detectó 102 callos de un total de 118 anotados manualmente, lo que representa una tasa de detección del 86.4 % y una precisión del 82.5 %, calculada considerando los falsos positivos y negativos. La concordancia entre el conteo automático y manual fue estadísticamente significativa (prueba de correlación de Pearson,  $p < 0.01$ ). La principal causa de subestimación fue la agregación de callos adyacentes con separación inferior a 15 píxeles. Estos resultados demuestran la viabilidad del enfoque propuesto para la caracterización automatizada de tejidos vegetales.

#### 3.2 Caracterización morfológica

El área total proyectada de todos los callos fue de 13,454.26 mm<sup>2</sup>. El área media por callo fue de 60.5 mm<sup>2</sup>, con una desviación estándar de  $\pm 8.3$  mm<sup>2</sup> y un rango entre 42.5 mm<sup>2</sup> y 89.7 mm<sup>2</sup>. La circularidad media fue de 0.580 (en una escala de 0 a 1), indicando que los callos presentaron formas moderadamente irregulares, con una desviación sustancial de la circularidad perfecta.

### 4 Conclusión

En este trabajo se ha desarrollado y validado un sistema automático de análisis de imagen para la cuantificación morfométrica de callos vegetales. El pipeline propuesto, basado en segmentación híbrida (color HSV y Otsu) y análisis de componentes conexos, demuestra ser eficiente (1.89 s/imagen) y preciso (82.5 % de acierto) para la tarea de conteo y cálculo de área proyectada.

Los resultados confirman la viabilidad del uso de técnicas de visión por computadora como alternativa objetiva y reproducible a la evaluación manual en estudios de cultivo in vitro. La circularidad media de 0.580 obtenida proporciona una medida cuantitativa de la morfología típica de estos tejidos.

La principal limitación identificada es la fusión de callos en contacto, lo que sugiere que los métodos de segmentación basados únicamente en umbrales globales pueden ser insuficientes para muestras de alta densidad.

A pesar de esta limitación, el sistema constituye una herramienta robusta para el análisis a gran escala de imágenes de callos, permitiendo la extracción automática de descriptores cuantitativos que facilitan el análisis estadístico y la monitorización del crecimiento en experimentos de fisiología vegetal.

### Referencias

- [1] S. R. Dubey and A. S. Jalal, "Application of image processing in fruit and vegetable analysis," *Journal of Intelligent Systems*, vol. 24, no. 4, pp. 405–424, 2015, doi: 10.1515/jisys-2014-0079.
- [2] S. Sahran, A. K. Lateefa, A. E. Hamzah, H. H. Qasim, D. Albashih y N. M. Sapiee, "Comparative Analysis of Color Space in Histopathology Image Classification," *Jurnal Kejuruteraan*, vol. 37, no. 2, pp. 617–634, 2025, doi: 10.17576/jkukm-2025-37(2)-06.
- [3] G. Bradski, "The OpenCV Library," *Dr. Dobb's Journal of Software Tools*, 2000.
- [4] OpenCV team, "opencv-python," Python Package Index (PyPI). [Online]. Available: <https://pypi.org/project/opencv-python/>
- [5] Basler AG. (s.f.). Area scan cameras. <https://www.baslerweb.com/en/cameras/area-scan-cameras/>