



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS**

**EVALUACIÓN DE CARACTERES MORFOLÓGICOS Y
ESTRUCTURALES DEL GRANO DE ARROZ *VARIEDAD
MORELOS A-98* MEDIANTE ANÁLISIS FRACTAL DE
IMÁGENES DIGITALES**

TESIS

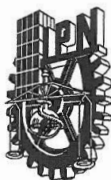
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
EN
DESARROLLO DE PRODUCTOS BIOTICOS
PRESENTA
ROSA ELENA ESPINOSA MENDOZA**

**DIRECTORES
DR. ANTONIO RUPERTO JIMÉNEZ APARICIO
DRA. ALMA ANGÉLICA DEL VILLAR
MARTÍNEZ**



YAUTEPEC, MORELOS.

FEBRERO 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos siendo las 12:30 horas del día 19 del mes de Noviembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CEPROBI para examinar la tesis de titulada:
"Evaluación de caracteres morfológicos y estructurales del grano de arroz variedad Morelos A-98 mediante análisis fractal de imágenes digitales".

Presentada por el alumno:

Espinosa
 Apellido paterno

Mendoza
 Apellido materno

Rosa Elena
 Nombre(s)

Con registro:

B	0	6	1	6	4	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Antonio Jiménez Aparicio

Dra. Alma Angélica Del Villar Martínez

Dr. Javier Solorza Fera

Dra. Gabriela Trejo Tapia

Dr. Luis Arturo Bello Pérez

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López

EL PRESIDENTE DEL
 COLEGIO

Dr. Antonio Jiménez Aparicio

SEP IPN
 CENTRO DE DESARROLLO
 DE PRODUCTOS BIÓTICOS
 YAUTEPEC, MOR.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Yautepec, Mor., el día 23 del mes de enero del año 2012, la que suscribe **C. ROSA ELENA ESPINOSA MENDOZA** alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, con número de registro B061640, adscrita al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio y la Dra. Alma Angélica Del Villar Martínez y cede los derechos del trabajo intitulado **“Evaluación de caracteres morfológicos y estructurales del grano de arroz variedad Morelos A-98 mediante análisis fractal de imágenes digitales”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Carretera Yautepec-Jojutla, KM. 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México, C.P. 62731, Apartado Postal 24, Teléfonos (735) 3942020, (735) 3941896 y (55) 57296000 EXT. 82500 y 82505. E-mail: ceprobi@ipn.mx (<http://www.ceprobi.ipn.mx>). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ATENTAMENTE

C. ROSA ELENA ESPINOSA MENDOZA
ALUMNA

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del Instituto Politécnico Nacional, hacemos constar que el trabajo de tesis **“Evaluación de caracteres morfológicos y estructurales del grano de arroz variedad Morelos A-98 mediante análisis fractal de imágenes digitales”**, es responsabilidad del Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio, Dra. Alma Angélica del Villar Martínez y de la C. Rosa Elena Espinosa Mendoza y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

ATENTAMENTE



Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



Dra. Alma Angélica Del Villar Martínez



C. Rosa Elena Espinosa Mendoza

Yautepec, Mor., a 23 de Enero del 2012.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microscopía e Imagenología del Departamento de Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de los Doctores Antonio Ruperto Jiménez Aparicio y Alma Angélica Del Villar Martínez, en la Central de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la supervisión de la M. en C. Maria Esther Sánchez Espíndola y en el laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión del Biólogo Armando Zepeda.

Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de CONACyT (No. 233857), del Programa Institucional de Formación de Investigadores de la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) del IPN, y de la Coordinación de Cooperación Académica del IPN para la realización de una Estancia de Investigación.

La investigación fue realizada con el financiamiento otorado a los proyectos de la SIP (No. 1258), CONACyT (No 105704) y Produce (Caracterización de variedades de arroz (O. sativa L.) para el reconocimiento de la Denominación de origen).

AGRADECIMIENTOS

Porque el espacio de esta hoja y otras más no sería suficiente para mencionar a cada ente al cual debo agradecer, porque sin el apoyo de tanta gente valiosa y de todas las instituciones implicadas, pero principalmente del creador de todo cuanto existe, este trabajo no hubiera sido posible....

A todos GRACIAS.

Pues, ¿quién hace que tú difieras de otro?

En realidad, ¿qué tienes tú que no hayas recibido?

Entonces, si verdaderamente lo recibiste, ¿por qué te jactas como si no lo hubieras recibido?

(1 Corintios 4:7)

CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE CUADROS	III
INDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO	
1.1 Fisiología del llenado del grano	6
Etapas en el llenado del grano	7
Factores involucrados en el llenado: genéticos, ambientales y otros	8
Almidón: biosíntesis y enzimas involucradas	9
Deposición del gránulo de almidón	13
1.2 Mancha opaca blanca	15
Factores involucrados en la presencia de MOB	16
Propiedades fisicoquímicas y funcionales de arroz con MOB	21
Estructura de la MOB	23
1.3 Morfo estructura y conceptos de dimensión fractal	24
Herramientas de análisis de la morfo estructura	25
Tratamiento digital de imágenes	26
Dimensión fractal	30
Literatura citada	36

CAPÍTULO 2 CARACTERIZACIÓN MORFO ESTRUCTURAL DEL
LLENADO DEL GRANO

Introducción	47
Materiales y metodos	50
Resultados	61
Discusion	79
Conclusiones	86
Literatura citada	89

CAPÍTULO 3 ESTUDIO COMPARATIVO MORFO ESTRUCTURAL Y DE
LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y TÉRMICAS DE LA
VARIEDAD MORELOS A-98 CON OTRAS VARIEDADES.

Introducción	105
Materiales y metodos	107
Resultados	112
Discusion	127
Conclusiones	130
Literatura citada	131

DISCUSION GENERAL 135

CONCLUSIONES GENERALES 139

ANEXO Artículo MORPHO STRUCTURAL CHARACTERIZATION 140
DURING RICE (Oryza sativa L.) GRAIN FILLING OF “MORELOS A98”
VARIETY.

ÍNDICE DE CUADROS

No.	CAPÍTULO 2	Pág.
1	Comparación por DAF de descriptores morfo métricos dimensionales y de forma del grano de arroz Morelos A-98.	65
2	Comparación por intervalo de descriptores morfo métricos dimensionales y de forma del grano de arroz Morelos A-98.	66
3	Comparación de descriptores morfo métricos dimensionales y de forma de gránulos de almidón de la región dorsal (cristalina), variedad Morelos A-98.	70
4	Comparación de descriptores morfo métricos dimensionales y de forma de gránulos de almidón de la región ventral (MOB), variedad Morelos A-98.	71
 CAPÍTULO 3 		
1	Dimensión fractal de textura superficial para las muestras estudiadas.	114
2	Comparación de propiedades fisicoquímicas de harinas: Tg temperatura de gelatinización, Tr temperatura de retrogradación, CA contenido de amilosa, % H porcentaje de humedad, AT almidón total	124

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	CAPÍTULO 1	Pág.
1	Esquema de un grano de arroz	7
2	Micrografía de la estructura del gránulo del almidón de arroz y esquema que representa su conformación.	14
3	Comparación de calidad de granos a diferentes temperaturas.	18
4	Distribución de calidad de granos y peso a diferentes temperaturas	19
5	Morfo estructura del gránulo de almidón.	24
6	Técnicas de segmentación.	28
7	Brocoli romanescu a diferentes escalas de observación	33

CAPÍTULO 2

1	Micrografía (MO) que muestra las secciones de captura de imágenes con MEB del corte transversal del grano de arroz Morelos A-98.	53
2	Imágenes segmentadas y binarizadas.	54
3	Micrografía que muestra el corte transversal del grano de arroz Morelos A-98 (40X).	58
4	Micrografía que muestra el corte transversal del grano de arroz Morelos A-98 (40X, 200X)	59
5	Fotomicrografías obtenidas por MO de cortes transversales de arroz variedad Morelos A-98 durante el llenado	61
6	Fotomicrografías obtenidas por MEB, corte transversal, región dorsal y región ventral	68
7	Imágenes micrográficas de cortes transversales de la región dorsal (endospermo cristalino) y la región ventral (MOB).	69
8	Evolución de la dimensión fractal de perímetro (Dfp) durante el llenado y maduración del grano de arroz Morelos A-98.	73
9	Evolución de la dimensión fractal de área (Dfa) durante el llenado y	74

	maduración del grano de arroz Morelos A-98.	
10	Dimensión fractal de textura para el intervalo 1.	75
11	Dimensión fractal de textura para el intervalo 3.	76
12	Parámetros texturales de las micrografías electrónicas (x2,000), correspondientes al desarrollo de la estructura del endospermo del grano de arroz Morelos A-98.	77
13	Temperatura y humedad relativa registradas durante el llenado del grano de arroz Morelos A-98.	79
14	Modelo descriptivo para el llenado del grano variedad Morelos A98.	85

CAPÍTULO 3

1	Micrografías que ejemplifican las diferencias en la morfo estructura del endospermo de las cinco variedades estudiadas (MorA98, MF, PS, SO, GV).	113
2	Micrografías que ejemplifican las diferencias en la morfo estructura del endospermo de la muestra MorA98.	117
3	Micrografías que ejemplifican las diferencias en la morfo estructura del endospermo de la muestra MF.	118
4	Micrografías que ejemplifican las diferencias en la morfo estructura del endospermo de la muestra GV.	119
5	Micrografías que ejemplifican la morfo estructura de los gránulos de almidón en la región de apariencia <i>escalonada</i> del endospermo	120
6	Reconstrucción topográfica tridimensional de la superficie de cortes transversales del grano para las cinco muestras estudiadas	122

ABREVIATURAS

ADPG-ppasa	ADP Glucosa pirofosforilasa
AT	Almidón total
BE	Enzima ramificante
CEZ	Centro experimental Zacatepec
DAF	Days after floration
DF	Dimensión fractal
Dfa	Dimensión fractal de área
Dfp	Dimensión fractal de perímetro
Dft	Dimensión fractal de textura
E	Entropía de la imagen
Fc	Factor de compacidad
Fe	Factor elíptico
Ff	Factor de forma
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography

HPSEC	High Pressure Size Exclusion chromatography
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MO	Microscopía óptica
MOB	Mancha opaca blanca
SS	Almidón sintasa
TDI	Tratamiento digital de imágenes

RESUMEN

El arroz es uno de los principales cultivos de Morelos, las variedades producidas en el estado han sido reconocidas a nivel mundial debido a su alta cocina y la calidad sensorial. Hoy en día Morelos A-98, variedad generada publicado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias de Investigaciones de México (INIFAP) fue cultivada y comercializada en Morelos. Esta variedad se caracteriza por la presencia de una mancha blanca opaca almidón en la región ventral de más del 20% de la superficie del grano, conocida como "panza blanca" (WB). Dicha característica está influenciada por factores ambientales tales como altas temperaturas que interrumpen el llenado normal de los granos durante su desarrollo. Por lo tanto fue considerado como un rasgo distintivo y deseable en variedades de arroz tales como en Morelos A -98. En este trabajo se utilizó la microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, análisis de imágenes digitales y dimensión fractal para la caracterización morfo estructural del endospermo de arroz MorA98 en cinco etapas de maduración (7, 14, 21, 28 y 35 días después de la antesis, DAF) y cuatro posiciones de la panícula, además se describieron las características morfométricas de grano a través de cuatro descriptores dimensiones, tres descriptores de la forma, dimensión fractal de perímetro (Dfp), área (Dfa) y la textura (Dft) y dos parámetros texturales (entropía y segundo momento angular) todos ellos asociados a la temperatura y la humedad ambiental en la probable formación de la WB en el grano de esta variedad de arroz. Finalmente, se hizo una comparación morfo-estructural, físico-química y térmica de la variedad de arroz Morelos A-98 con la variedad milagro filipino y tres productos comerciales que hacen referencia de ser variedad "Morelos".

ABSTRACT

Rice is one of the main crops of Morelos, the varieties produced in this State have been worldwide recognized because of its high culinary and sensory quality, Currently Morelos A-98 variety generated and released by the National Institute of Forest, Agricultural Investigations and Livestock of Mexico (INIFAP) was cultivated and marketed in Morelos. This variety is characterized by the presence of a starchy white opaque spot in the ventral region in more than 20% of the grain surface, well-known as “White belly” (WB). This feature to be influenced by environmental factors such as high temperatures that interrupt the normal filling of the grain during its development, therefore it was considered as a distinctive and desirable trait in some rice varieties, particularly in Morelos A-98. In this work there were used optical microscopy, scanning electronic microscopy, digital image analysis and fractal dimension were used for the morphostructural characterization of rice MorA98 endosperm in five stages of physiological maturation (7, 14, 21, 28 and 35 days after anthesis DAF) and four panicle positions; also grain morphometric characteristics were described through four dimensional descriptors, three shape descriptors, fractal dimension of perimeter (Dfp), area (Dfa) and texture (Dft) and two textural parameters (entropy and second angular momentum) all of these associated with temperature and environmental humidity in the probable formation of the WB in the grain of this rice variety. Finally, was made a morphostructural, physico-chemical and thermal comparison of the Morelos A-98 variety with the Filipino miracle variety and three commercial products that make reference to the “Morelos” variety .

INTRODUCCIÓN

El arroz constituye la base de la alimentación de la mitad de la población mundial (Quian *et al.*, 2007). En México es el cuarto producto de consumo básico; el 75% de la producción se concentra en cinco estados: Sinaloa, Campeche, Veracruz, Michoacán y Morelos; las variedades de arroz generadas en este último estado - “Morelos”, “Jojutla” y *Mor A-98* - han sido objeto de reconocimiento a nivel mundial gracias a su rendimiento molinero y elevada calidad sensorial y culinaria (Moldenhauer y McKenzie, 2004).

Actualmente, se cultiva la variedad Morelos A-98, generada y liberada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP. La variedad Morelos A-98 se caracteriza por ser de grano largo (> 7 mm), delgado (> 2.4 mm) y opaco (SCFI, 2005). La opacidad de la variedad Morelos A-98 se debe a la presencia de una mancha blanca distintiva en la región ventral en más del 20% del grano, conocida como “panza o mancha opaca blanca” (MOB) (FAO, 1995; SCFI, 2005). Algunos autores sugieren que la MOB puede ser un defecto del grano conocido como yesosidad, que demerita su apariencia general y disminuye su rendimiento molinero (Patindol y Wang, 2003; Funaba *et al.*, 2006; Yoshioka *et al.*, 2007). Los granos que presentan yesosidad tienden a ser menos duros y más susceptibles a quebrarse (Tamaki *et al.* 2006).

Por otra parte, la presencia de la MOB parece estar influenciada por factores ambientales tales como las altas temperaturas que interrumpen el llenado normal del grano,

ya que acelera el desarrollo de los tejidos, por lo que dejan de ser fisiológicamente funcionales aquellos tejidos que desempeñaban el papel de conducción, con lo que se interrumpe de forma abrupta el flujo de nutrimentos al interior del grano; debido a esto se considera entonces que hay una deposición de almidón defectuosa en el endospermo, dando como resultado estados no uniformes de maduración (Cheng *et al.*, 2005); también puede estar influido por enfermedades o por cosechar el grano con un contenido de humedad elevado (Funaba *et al.*, 2006; Ishimaru *et al.*, 2009). Algunos autores sugieren que la MOB es una característica varietal distintiva, que es controlada genéticamente y se asocia a la baja actividad de las enzimas ADP Glucosa Pirofosforilasa (ADPG-PPasa), Almidón Sintasa (SS) y Ramificante (BE) en las etapas intermedias y finales del llenado (Tamaki *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Esta característica se asocia también a la posición que ocupa el grano en la panícula (Cheng *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que las propiedades estructurales, fisicoquímicas, térmicas y de cocción, difieren significativamente en granos con MOB a las de granos traslucidos. Por ejemplo, el contenido de amilosa de granos con MOB es generalmente menor al de granos de endospermo cristalino; en lo que respecta a la arquitectura conformacional de los gránulos de almidón, también se han reportado diferencias (Patindol y Wang, 2003; Singh *et al.*, 2003), ya que los granos con MOB presentan gránulos de almidón de forma esférica, pobremente empacados (con espacios de aire), y una estructura irregular de forma granular; a diferencia de los granos con endospermo traslucido, que presentan gránulos de almidón de forma poliédrica y densamente empacados. Este arreglo estructural, característico de las variedades con MOB confiere ventajas, como una mayor capacidad de absorción de agua;

lo que favorece la hidratación del gránulo, facilita la gelatinización, reduce el tiempo de cocción; y en las variedades empleadas para la elaboración de Sake, induce la invasión del hongo Koji (Patindol y Wang, 2003; Singh *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2005; Tamaki, *et al.*, 2006).

Actualmente, la producción de arroz en el estado de Morelos se ha reducido drásticamente como resultado de una problemática crónica, entre las que sobresalen las prácticas de comercialización inadecuadas e incluso ilegales, ya que es frecuente encontrar en el mercado productos de calidad inferior o mezclas de variedades que llevan la leyenda “*Arroz Morelos*” o “*Arroz tipo Morelos*”.

Con el objeto de buscar la protección legal de variedades con características únicas, como la Morelos A-98, las leyes y normatividades respectivas, señalan la necesidad de contar con una descripción precisa y detallada del grano. Dado que la MOB es un factor inherente a esta variedad y que es un rasgo distintivo reconocido por productores y consumidores, se sugiere que esta particularidad pudiese ser utilizada como un factor complementario para lograr la caracterización del grano. No obstante, en la actualidad se cuenta con información muy limitada para las variedades de arroz generadas y cultivadas en el Estado de Morelos, y particularmente para la variedad Morelos A-98 en lo referente a su caracterización y en lo referente a la MOB, tal información es prácticamente nula.

Actualmente, las técnicas analíticas fisicoquímicas y moleculares permiten obtener información rutinaria de manera rápida, precisa y confiable. Dentro de éstas, la microscopía y el tratamiento digital de imágenes han permitido establecer la morfometría de distintos

granos como el trigo, la cebada y el arroz (Horigane *et al.*, 1999; Majmudar y Jayas, 1999; Ogawa *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2006; Emadzadeh *et al.*, 2010). Mediante técnicas de calorimetría diferencial de barrido, viscoamilografía y microscopía acoplada a tratamiento digital de imágenes (TDI), se han caracterizado distintas variedades de arroz y se ha establecido la presencia de MOB (Kang *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2007). En este sentido, Yoshioka *et al.* (2007) mediante TDI, lograron establecer diferencias entre la yesosidad y la MOB, ubicando con precisión, la posición de ésta en el grano.

Sin embargo, la complejidad estructural y la morfología irregular presente en el grano de arroz, limita el uso de herramientas de análisis derivadas de la geometría euclidiana para su cuantificación e interpretación; en cambio, la geometría fractal puede permitir la descripción de objetos que exhiben alto grado de complejidad (Chakraborti *et al.*, 2003). La magnitud de la dimensión fractal (DF) de los objetos irregulares está relacionada con diversas propiedades como la rugosidad y sinuosidad (Kenkel y Walker, 1996). En general, la DF se puede expresar en términos lineales como dimensión fractal de perímetro (Dfp) o de área (Dfa). En el caso de arroz, son escasos los trabajos sobre análisis fractal de imágenes, además de que las variedades mexicanas, hasta antes del presente trabajo, no habían sido objeto de este tipo de estudios.

Por lo anterior, en este trabajo se utilizaron herramientas analíticas como la microscopía electrónica de barrido, el tratamiento digital de imágenes y el concepto de dimensión fractal, con el objeto de caracterizar la conformación morfo estructural del endospermo, así como la formación de la MOB en el grano de arroz de la variedad Morelos A-98, en diferentes etapas de desarrollo. Los resultados generaron información original y

útil que contribuye al avance en el conocimiento de la morfo estructura del arroz, particularmente la variedad Morelos A-98.

El trabajo se estructuró de la siguiente manera: El capítulo uno contiene una revisión bibliográfica de la literatura que sustenta el presente trabajo de investigación; particularmente el estado del arte en cuanto a los estudios que se tienen hasta el momento, de la caracterización morfo estructural del arroz, relacionada con la fisiología del grano, la biosíntesis del almidón y los factores ambientales que influyen en este proceso.

En el capítulo dos se describe la generación de la estructura del endospermo del grano de arroz variedad Morelos A-98 durante su llenado. Lo anterior para cinco etapas de maduración fisiológica (7, 14, 21, 28 y 35 días después de a) y cuatro posiciones en la panícula. De igual manera, dichos resultados se relacionaron con ciertos estados (empíricos) de maduración descritos en la literatura, así como algunos factores ambientales, tales como la temperatura y la humedad relativa. Así mismo se describen los resultados de los cambios morfo estructurales que ocurren en la MOB durante el llenado del grano; similarmente, en cinco etapas de maduración fisiológica y dos posiciones en la panícula.

Finalmente en el capítulo cuatro se dan a conocer los resultados comparativos entre las características fisicoquímicas y térmicas, así como morfo estructurales, de las variedad Morelos A-98, con la variedad Milagro Filipino y tres marcas comerciales de arroz que, hacen alusión en su empaque a la variedad Morelos.

CAPÍTULO 1 *Marco Teórico*

1.1 FISIOLÓGÍA DEL LLENADO DEL GRANO DE ARROZ

El arroz es un cereal perteneciente a la familia de las Gramíneas; se ha establecido que su cultivo inició en regiones húmedas de Asia tropical y subtropical. El centro de origen de este cereal posiblemente sea la India, lugar donde probablemente también se cultivó por primera vez. Sin embargo, el mayor desarrollo del cultivo tuvo lugar en China. Existen dos especies cultivadas, la variedad asiática (*Oryza sativa*), y la africana (*Oryza glaberrima*) (Franquet y Borrás, 2004).

La inflorescencia de arroz se presenta en forma de racimo en el que las espigas se localizan en ramas laterales sobre un raquis articulado, llamado raquila o panícula y protegida por 4 brácteas estériles. La semilla está rodeada por una testa fusionada al pericarpo formando la cariósida; ésta cubierta envuelve la capa aleurona, el embrión y el endospermo como lo muestra la figura 1 (Champagne *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 2005).

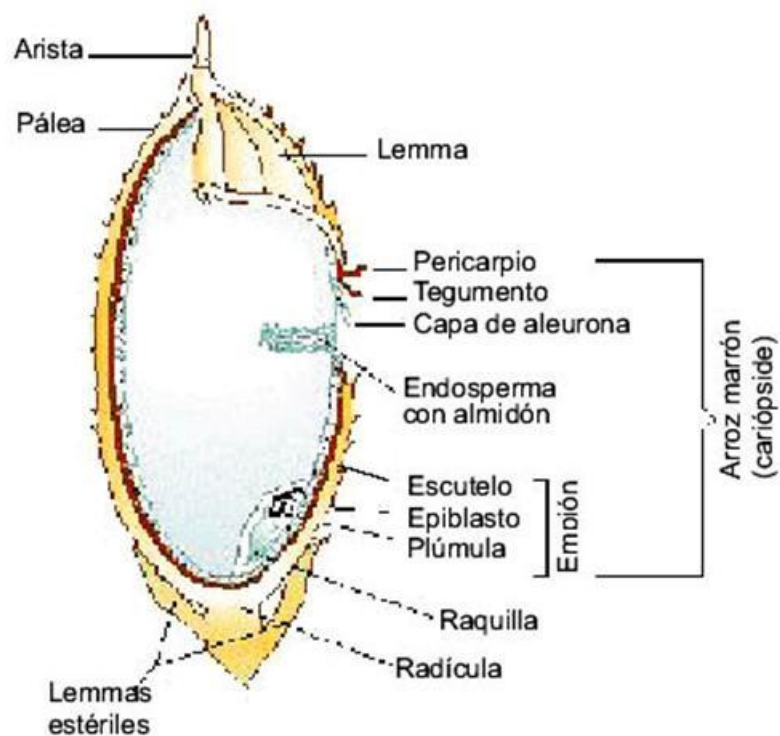


Figura 1. Esquema de un grano de arroz.

1.1.1 Etapas en el llenado del grano de arroz

De forma general se consideran 4 etapas en el desarrollo de la planta de arroz: etapa germinativa, etapa vegetativa, etapa reproductiva y la etapa del llenado del grano (Myers, 2004). Counce *et al.* (2000), consideran tres etapas, que a su vez subdividen en estadios: a) etapa *germinativa*, que abarca desde la semilla seca hasta la emergencia del coleóptilo (S0, S1, S2 y S3); b) etapa *vegetativa* que consiste de tantos estadios como número de hojas formadas en el tallo principal (V1, V2,...VN) y c) etapa *reproductiva* que comprende 10 fases de crecimiento y van desde la iniciación de la panícula (R0), su diferenciación (R1), formación del nudo de la hoja bandera (R2), apertura de la panícula (R3), antesis (R4), expansión de la cariósida e inicio del llenado del grano (R5), expansión final o lechosa, (R6), inicio del

secado del grano o masa suave (R7), madurez fisiológica de los granos individuales, masa solida (R8) y madurez de la panícula completa (R9).

El llenado del grano es la última etapa del crecimiento del arroz y depende principalmente, del suministro de carbono a partir del proceso fotosintético (Kobata *et al.*, 2000). Ésta etapa da inicio una vez que se ha producido la fertilización y ocurre de la parte superior de la panícula hacia abajo, en el mismo patrón que se efectúa la polinización. El saco embrionario comienza a crecer periclinalmente por división celular de las capas periféricas (posteriormente, se diferenciarán a células de aleurona), que a su vez efectúan el transporte de fotoasimilados debido a que no existe tejido de conducción diferenciado. La división celular y la expansión del endospermo concluye 9 o 10 días después de la antesis o floración (DAF) y da inicio la acumulación de almidón (Myers, 2004). El tiempo de llenado del grano depende de la variedad y condiciones ambientales y puede ser de 30 a 50 días. La deposición de almidón ocurre rápidamente al inicio y de forma lenta al final del periodo de llenado, debido a la inhibición de ciertos procesos fisiológicos y a la senescencia de las hojas y tallos (He *et al.*, 1989; Morell *et al.*, 1995; Kobata *et al.*, 2000).

1.1.2 Factores involucrados en el llenado del grano de arroz

Debido a que el llenado del grano depende principalmente del suministro de carbono a partir del proceso fotosintético, la inhibición de la fotosíntesis durante el período de llenado del grano puede afectar de manera irreversible su desarrollo. Esta característica puede ser ocasionada por diversos factores tales como: a) el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados y la regulación hormonal; b) el estrés hídrico, ya que induce la senescencia de

la planta acortando el período de llenado y aumentando la movilización de fotoasimilados (Yang y Zhang, 2006); c) cambios en las condiciones ambientales como períodos excesivos de sombra (Kobata *et al.*, 2000); d) estrés por frío (10-15°C) o retardación térmica provocando un desarrollo anormal de las espigas y reduciendo su fertilidad (Jacobs y Pearson, 1999; Kang *et al.*, 2003; Myers, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Morita *et al.*, 2005; Tabata *et al.*, 2007) y e) temperaturas elevadas (superiores a los 26°C) que afectan la actividad de algunas enzimas involucradas en la síntesis de almidón.

En este sentido se ha demostrado que la panícula es el órgano más sensible a temperaturas elevadas (Yang *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2005; Funaba *et al.*, 2006; Yang y Zhang, 2006; Yamakawa *et al.*, 2007).

1.1.3 Almidón: biosíntesis y enzimas involucradas

El almidón es el principal componente del endospermo de cereales; en el arroz pulido constituye aproximadamente entre el 70 y 90% del peso seco (Zhou *et al.*, 2002; Fitzgerald, 2004). Está formado por dos tipos de polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula esencialmente lineal compuesta de cadenas glucosídicas unidas por enlaces $\alpha - 1,4$. La amilopectina en cambio, es una molécula altamente ramificada formada por unidades de glucosa unidas por enlaces $\alpha - 1,4$ con ramificaciones unidas por enlaces $\alpha - 1,6$. La amilopectina es el polímero más abundante en el almidón; posee un alto grado de organización estructural ya que las regiones ramificadas alternan con regiones lineales, lo cual posibilita arreglos paralelos de dobles hélices (Smith *et al.*, 1997, 2001; James *et al.*, 2003). En este sentido algunos autores

proponen que las secciones lineales de amilopectina constituyen las regiones cristalinas, mientras que los puntos de ramificación entre ésta y la amilosa son los componentes principales de la región amorfa lo que conforma un arreglo en “clusters” o racimos (Smith et al., 1997, 2001; Zhou, 2002).

La síntesis de almidón se lleva a cabo en cloroplastos de diferentes partes de la planta. En tejidos fotosintéticos es almacenado por períodos de tiempo muy cortos; se genera durante períodos de luz, poco después de haber iniciado el proceso de fotosíntesis y se detiene en períodos de oscuridad, cuando la concentración de sacarosa comienza a declinar, entonces el almidón almacenado en cloroplastos es exportado al citoplasma, donde es convertido nuevamente a sacarosa. En el endospermo del arroz, el almidón es acumulado en amiloplastos, el tiempo de almacenamiento es generalmente largo, en este caso una vez que el almidón ha sido sintetizado, permanece sin cambios y puede ser movilizado rápidamente cuando es requerido (Smith, 1999).

La acumulación de almidón se realiza durante el período de llenado del grano y da inicio 10 días después de la antesis o floración (DAF), periodo durante el cual el endospermo adquiere los precursores y nutrientes requeridos para la síntesis y deposición de almidón (Fitzgerald, 2004; Myers, 2004). Esta actividad involucra diferentes enzimas y procesos. Fitzgerald (2004) agrupó estos procesos de la siguiente manera:

- a) Adquisición de precursores (sacarosa, glucosa).
- b) Síntesis de amilosa y amilopectina.

- c) Organización de los polímeros de almidón en las regiones cristalina y amorfa para la conformación del gránulo.
- d) Organización de los gránulos de almidón individuales en gránulos más grandes.

Las enzimas involucradas en la síntesis de almidón son las siguientes:

- a) *ADP glucosa pirofosforilasa (AGP asa)*. Cataliza la reacción para obtener el sustrato ADP glucosa. Se localiza en el plastidio, y en el caso de endospermo de cereales se encuentra también en el citosol (Smith, 2001; James, 2003).



- b) *Almidón sintasa (SS)* (ADP-glucosa: 1,4- α -D- glucan 4-D-glucosiltransferasa). Agrega unidades de ADP-Glucosa a cadenas lineales mediante enlaces α -1,4. Se han identificado cinco isoformas de esta enzima SSI, SSII, SSIII, SSIV y la enzima almidón sintasa unida al gránulo GBSS o proteína waxy. Algunos trabajos han reportado que la isoforma SSI está involucrada en la síntesis de cadenas cortas, con un grado de polimerización de amilopectina menor a 12, la SSII sintetiza cadenas intermedias con un grado de polimerización entre 12 y 24 y la SSIII cadenas largas; sin embargo, aún se desconoce el papel de la SSIV, mientras que la GBSS, es principalmente responsable de la elongación de la amilopectina (Takemoto *et al.*, 2006; Vandepute y Delcour, 2004).
- c) *Enzima ramificante (BE)* (1,4- α -D- glucan: 1,4- α -D- glucan 6- α -D- glucan-transferasa). Remueve residuos de glucosa y los transfiere a otra cadena lineal mediante enlaces α -1,6-glucosídicos, por lo que esta enzima tiene un papel esencial

en la biosíntesis de amilopectina. En el endospermo de arroz se han identificado tres isoformas: BEI que consiste de una isoforma sencilla y BEII que consiste de dos isoformas BEIIa y BEIIb; algunos trabajos sugieren que estas isoformas desempeñan distintas funciones en la construcción de moléculas de amilopectina (Nishi *et al.*, 2001).

- d) *Enzima desramificante (DBE)* (α -dextrin 6-glucanohidrolasa). Existen dos tipos: isoamilasas y pululanasa. La enzima desramificante isoamilasa hidroliza los enlaces $\alpha(1-6)$ de ramificaciones que se encuentran muy espaciadas, mientras que la pululanasa hidroliza los enlaces $\alpha(1-6)$, de ramificaciones cercanas.

Generalmente, no se considera que las enzimas desramificantes contribuyan a la síntesis de almidón; sin embargo, algunos estudios sugieren que éstas pueden hidrolizar selectivamente las estructuras ramificadas, y las cadenas resultantes ser usadas por la enzima almidón sintasa para la formación de la siguiente capa cristalina (Baldwin, 2001; Vandeputte y Delcour, 2004). Algunos trabajos en maíz han demostrado que la cristalinidad debida al contenido de amilopectina es influenciada por la frecuencia y posición de las ramificaciones, y estas se deben no solamente a la adición de ramificaciones, sino también a la remoción de las mismas (Fitzgerald, 2004).

Por su parte Smith (2001), propuso que la síntesis de amilopectina se debe exclusivamente a la acción de diferentes isoformas de las enzimas SS y BE, y sugiere que la enzima desramificante actúa de forma indirecta, al prevenir la acumulación de polímeros solubles en agua, evitando que disminuya la actividad de las enzimas SS y BE.

1.1.4 Deposición del gránulo de almidón

El almidón se presenta en plantas como gránulos insolubles dentro de los plastidios (cloroplastos en tejidos fotosintéticos y amiloplastos en tejidos no fotosintéticos); si bien la morfología, tamaño y distribución de los gránulos depende del origen botánico del almidón, se desconoce el mecanismo por el cual da inicio su formación; éste no es únicamente un proceso físico, ya que el número de gránulos iniciales por amiloplasto está controlado genéticamente, pueden ser unos pocos como en el caso del tubérculo de papa, o múltiples como en el endospermo de arroz y avena (Smith, 2001).

El gránulo de almidón es una estructura compleja, semicristalina compuesta de polímeros de glucosa.

En la Figura 2 se presenta una micrografía de su estructura, la cual está dada por el empaquetamiento de moléculas de amilopectina en arreglos organizados radialmente, alternando regiones cristalinas (cadenas lineales) y amorfas (puntos de ramificación) de 9nm (Figura 2 A) y formando anillos de crecimiento (Figura 2 B).

Debido a esta organización, los gránulos se consideran como semicristalinos; cuando se hace incidir sobre ellos un haz de luz polarizada, presentan la característica conocida como birrefringencia, por su capacidad de hacer rotar el plano de luz en 180°.

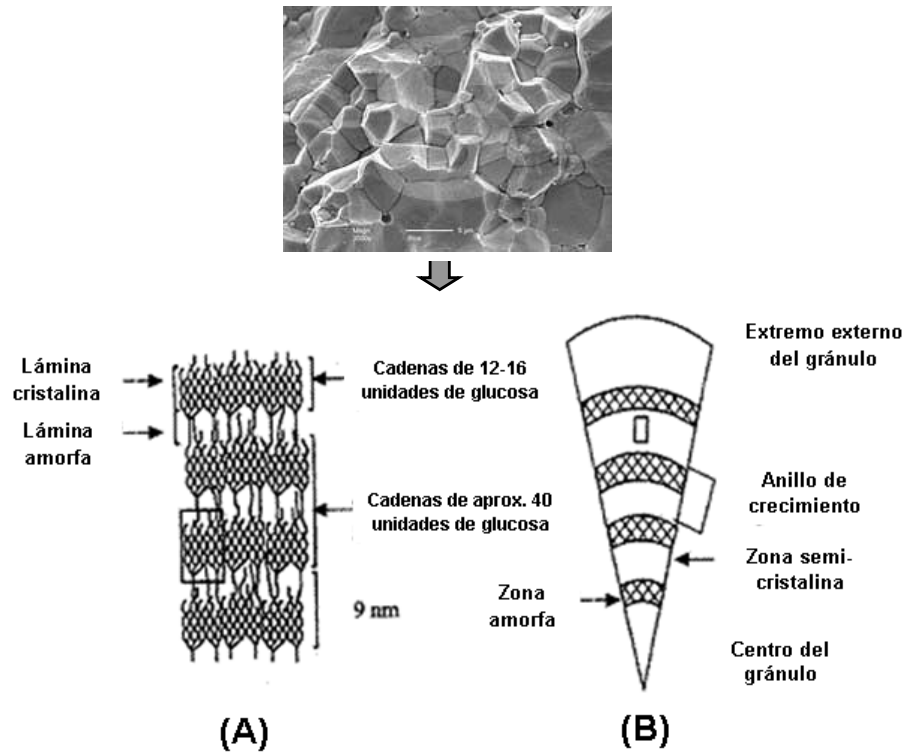


Figura 2. Micrografía de la estructura del gránulo del almidón de arroz y esquema que representa su conformación: A) estructura de las zonas cristalinas y amorfa y B) estructura del gránulo (Adaptado de: Zhou, 2002).

Se cree que la complejidad en la organización del gránulo de almidón se debe a la existencia de múltiples isoformas de las enzimas SS y la BE (Smith *et al.*, 1997; Smith, 2001; Vandepute y Delcour, 2004). Se sabe que el crecimiento del gránulo se da por aposición, es decir por la adición de polisacáridos en la parte exterior del gránulo y que es la amilopectina la que se sintetiza en la superficie del gránulo; en este sentido, se considera que la amilosa no es esencial para la formación del gránulo, ya que se han observado anillos de crecimiento en gránulos de almidón libres de amilosa (Baldwin, 2001; Smith *et al.*, 1997).

En el endospermo de arroz, los gránulos de almidón presentan forma polihédrica irregular (2 a 8 μm), densamente empacados, conformando agregados de entre 20 y hasta más de 80 gránulos individuales (Figura 2), llegando a tener un tamaño de 150 μm (Smith, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Kawagoe *et al.*, 2005).

1.2 MANCHA OPACA BLANCA

Algunas variedades de arroz presentan como rasgo característico una mancha opaca blanca (MOB) en el endospermo; esta característica se conoce en México y Sudamérica como “panza blanca”. También se denomina “chalkiness” o “chalky” (en el idioma inglés), aunque el término -“yesoso”- puede también incluir granos de endospermo completamente opaco; en Japón se refieren a ella como “shinpaku” (Furukawa *et al.*, 2007). De manera predominante la MOB está localizada en la región ventral del grano, siendo además ésta, la conformación más estable (Raju y Srinvas, 1991), aunque se puede ubicar en otras regiones. Por ejemplo, Japón clasifican la MOB, convencionalmente tanto por la posición como por la apariencia que presenta en el endospermo (base, centro, panza y espalda); adicionalmente, Yoshioka *et al.* (2007) han considerado una clasificación más: aquellos que poseen espalda y base blanca.

En buena medida, el que un grano se considere opaco en vez de traslúcido es debido a la MOB; de hecho, ésta característica se considera detrimento en la calidad, por lo que en algunos países la presencia de esta mancha determina la calidad y por lo tanto el precio del arroz (Yoshioka *et al.*, 2007).

En mercados internacionales, el máximo porcentaje aceptado de granos con mancha opaca blanca es del 2% (Singh *et al.*, 2003), a excepción de algunas variedades en las que la MOB es vista como una característica deseable como lo es la variedad italiana “*Arborio*” (Patindol y Wang, 2003); así como ciertas variedades en Japón, que se emplean para la elaboración del Sake (Tamaki *et al.*, 2006), una bebida fermentada tradicional, y las variedades mexicanas “*Morelos*” particularmente la variedad Morelos A-98, reconocidas internacionalmente por su calidad (Moldenhauer y McKenzie, 2004); en las que no solo es un rasgo distintivo, sino deseable.

1.2.1 Factores involucrados en la presencia de la MOB

No se ha elucidado aún la razón de la presencia de la MOB en el endospermo de granos de arroz. Algunos autores especulan que está relacionada con factores ambientales (Cheng *et al.*, 2005; Ishimaru *et al.*, 2009; Yamakawa *et al.*, 2007; Yoshioka *et al.*, 2007), mientras que otros hipotetizan que es de origen genético (Raju y Srinivas, 1991; Tamaki *et al.*, 2006) o incluso ambos (Singh *et al.*, 2003; Tabata *et al.*, 2007; Fitzgerald *et al.*, 2009).

Esta característica se asocia también a la posición que ocupa el grano en la panícula (Yamada *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Cheng *et al.* (2007a), encontraron una mayor ocurrencia de granos con MOB en el centro y dorso del endospermo de granos que se localizan en *raquis* primarias en seis variedades cultivadas en China. Generalmente se acepta que la presencia de MOB se debe a un suministro insuficiente de carbono durante la etapa de llenado del grano (Livore, 2000).

a) *Factores ambientales: Temperatura*

Diversos trabajos aseveran que temperaturas elevadas durante la etapa de llenado del grano, aceleran su velocidad, acortan su duracion y el desarrollo de los tejidos. De tal manera que aquellos tejidos que desempeñaban el papel de conducción, dejan de ser fisiológicamente funcionales, lo que a su vez interrumpe el flujo de nutrientes al interior del grano. De esta forma, también se interrumpe la síntesis de almidón y el desarrollo de los gránulos, debido a una reducción en la actividad enzimática, respiración y asimilación de productos, dando como resultado granos con MOB (Livore, 2000; Cheng *et al.*, 2005; Yoshioka *et al.*, 2007).

En este sentido Morita *et al.* (2005), concluyeron que temperaturas elevadas (34°C) reducían el peso final del grano, el tamaño de las células, así como el crecimiento, cuando tales temperaturas se presentaban en etapas tempranas o intermedias del llenado. Por su parte Tabata *et al.* (2007), reportaron una mayor presencia de granos totalmente opacos y con MOB, localizada en la base y espalda a temperaturas ambientales altas (25-27°C por la noche y superiores a los 30°C durante el día), tanto en variedades que tenían una elevada incidencia de MOB como en las que no la presentaban.

A este respecto Funaba *et al.* (2006), evaluaron la calidad de granos de arroz mediante resonancia magnética nuclear, sometidos a tres condiciones de temperatura (20°C, 25°C y 30°C) durante la etapa de llenado. Estos autores encontraron que, en los granos que se llenaron a una temperatura de 20°C, se retrasó la acumulación de almidón al mantenerse la movilidad del agua durante un periodo de tiempo mas largo;

presentándose a la par una mayor cantidad de granos inmaduros y un porcentaje bajo de granos perfectos (25%). Mientras que los granos desarrollados a 25°C, presentaron un porcentaje elevado de granos perfectos (aproximadamente del 65%); en contraste con los granos que se mantuvieron a 30°C en los que más del 85% presentaron la MOB en la parte dorsal (espalda blanca), como se muestra en la Figura 3.

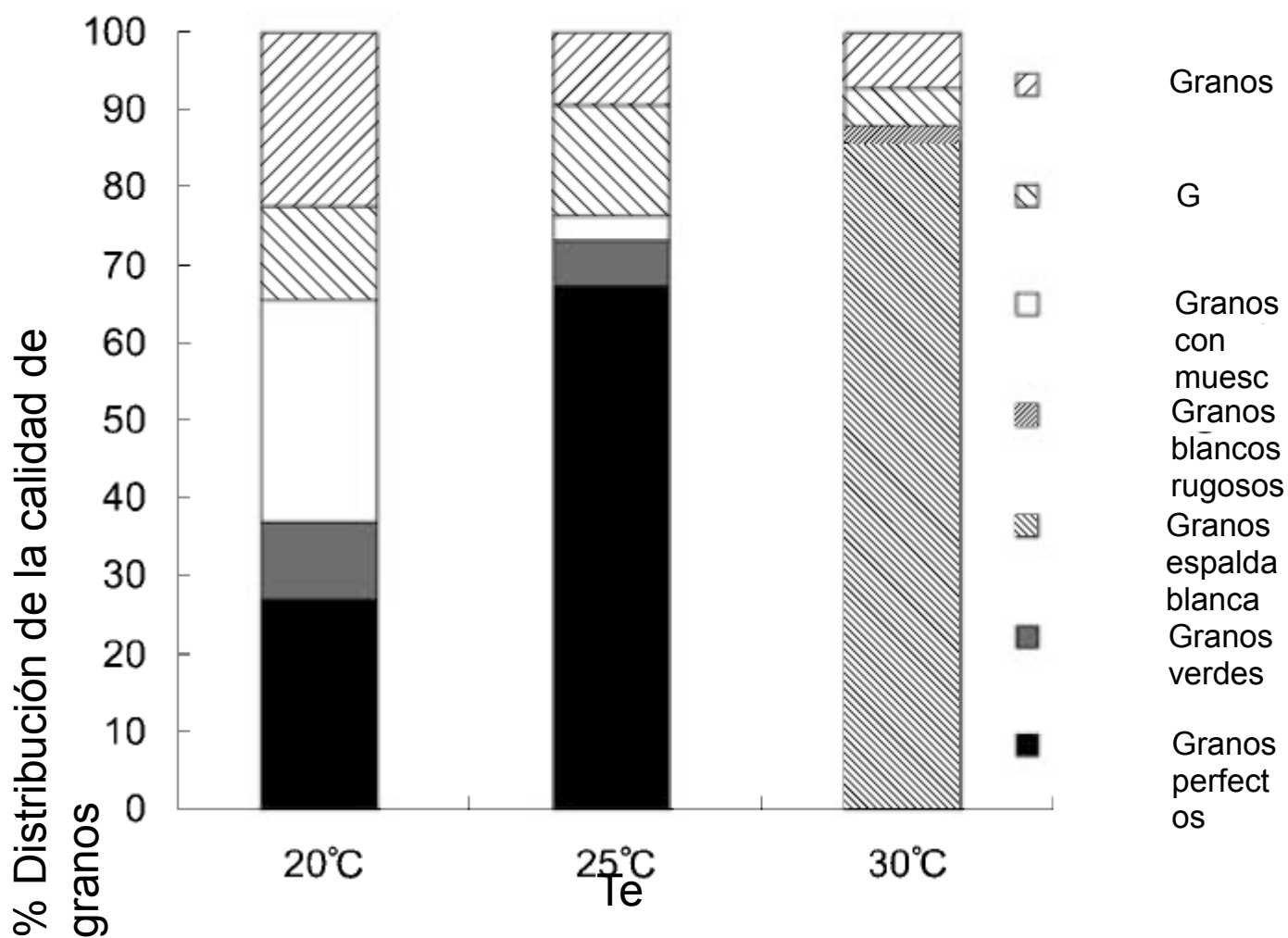


Figura 3. Comparación de calidad de granos a diferentes temperaturas (Adaptado de: Funaba *et al.*, 2006)

En este sentido, Yamakawa *et al.* (2007), reportaron una mayor incidencia de granos con MOB (alrededor del 80%), menor peso y contenido de amilosa en una variedad de arroz cultivada en Japón, que fue sometida a temperaturas elevadas (28°C y 33°C) entre el día 5 y el día 20 de la etapa de llenado, con respecto a un control bajo condiciones de temperatura de entre 20°C y 25°C, cuyo porcentaje de granos perfectos fue del 75% (Figura 4).

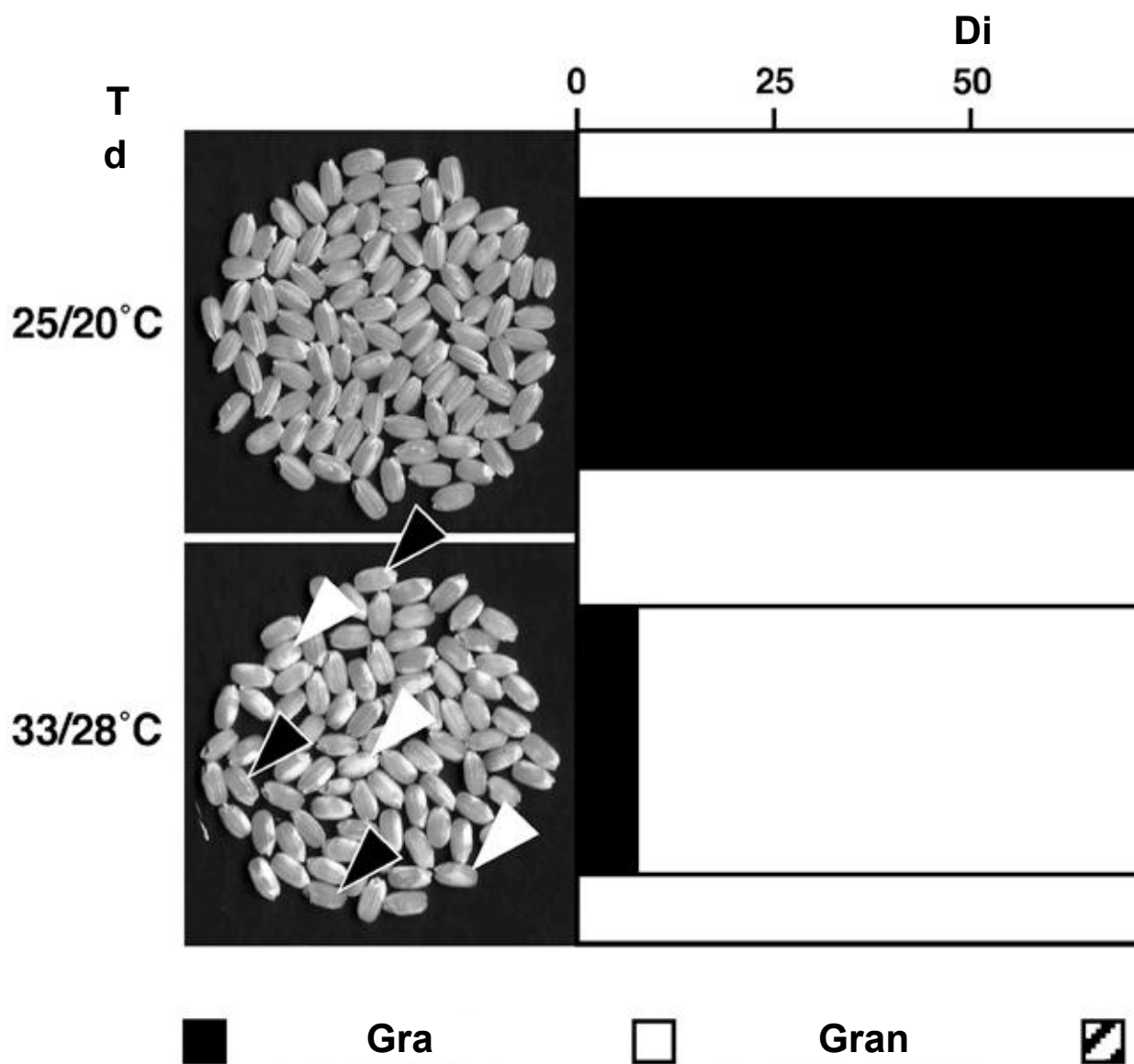


Figura 4. Distribución de calidad y peso de granos a diferentes temperaturas (Adaptado de: Yamakawa *et al.*, 2007)

Algunos autores destacan la importancia de la etapa del desarrollo del grano, en la que se presentan condiciones ambientales adversas, ya que ésto determina la parte del endospermo en la que se localizará la MOB (Cheng *et al.*, 2007a; Ishimaru *et al.*, 2009); por ejemplo, si la exposición a temperaturas elevadas se presenta entre el día 4 y el 12 después de la antésis, se obtendrán granos de endospermo totalmente opaco o con “espalda blanca”, mientras que si la exposición se presenta alrededor del día 16 después de antésis, se presentarán únicamente granos con “espalda blanca”.

b) Otros factores ambientales

Además de la temperatura, se sabe que otras condiciones ambientales (aire, humedad relativa y luz) durante el desarrollo del arroz en el campo, también tienen influencia en el llenado del grano; no obstante, los trabajos en este sentido son escasos. Se ha establecido que luz escasa, velocidad del viento alta y una humedad relativa baja, favorecen la formación de granos con MOB, ya que aceleran la deshidratación del grano y disminuyen la acumulación de materia seca, afectando de manera adversa el proceso de llenado del grano (Torres *et al.*, 2002; Moldenhauer y McKenzie, 2004).

c) Factores Genéticos

La presencia de granos con MOB se asocia comúnmente a diferencias varietales que son genéticamente controladas. La presencia de granos con MOB pudiera estar

asociada inherentemente a la baja actividad de las enzimas ADPG-PPasa, SS y BE en las etapas intermedias y finales del llenado (Wang *et al.*, 2007).

Woo *et al.* (2008) reportaron que la inactivación del gen UGPasa1 (UDP Glucosa Pirofosforilasa 1), como consecuencia del efecto pleiotrópico del gen *ms-h*, es causa de endospermo opaco en arroz; debido a una alteración en la estructura del almidón, causado por el suministro insuficiente de cadenas largas de amilopectina, como resultado de la reducción en la síntesis de ADPG (ADP Glucosa), causada por un desorden de la UGPasa; si bien la interacción entre la actividad de la UGPasa y el fenotipo opaco del almidón están cercanamente relacionadas, el mecanismo no ha sido dilucidado.

1.2.2 Propiedades fisicoquímicas y funcionales de arroz con MOB

La calidad del arroz debido a la presencia de la MOB es motivo de controversia y en ocasiones es considerada como un detrimento de la calidad debido a que esta zona es más quebradiza, lo que ocasiona un rendimiento molinero bajo (Tamaki *et al.*, 2006).

Los diversos factores que afectan el proceso de llenado del grano también pueden influir en la calidad y palatabilidad del arroz. Los parámetros de calidad que se evalúan al arroz, involucran la aplicación de pruebas sensoriales y determinaciones fisicoquímicas, basadas en la composición química, calidad en la cocción y temperatura de gelatinización. El almidón es considerado el constituyente más importante -en términos de textura y funcionalidad- que afecta la calidad del arroz (Zhou *et al.*, 2002). El contenido de amilosa es considerado como el predictor más importante de la calidad sensorial del arroz; los

granos son clasificados de acuerdo a su contenido: “waxy” (0-2%), muy bajo (3-9%), bajo (10-19%), intermedio (20-25%) y alto (>25%) (Fitzgerald *et al.*, 2009).

En este sentido, se ha reportado que el contenido de amilosa es menor en granos con MOB que en granos de endospermo traslúcido (Singh *et al.*, 2003). Patindol y Wang (2003), aplicando técnicas cromatográficas de alta resolución (HPAEC y HPSEC), reportaron que granos con MOB presentan un menor contenido de amilosa y un mayor contenido de amilopectina de cadenas cortas y con un alto porcentaje de ramificaciones, atribuyéndolo a una interrupción en la síntesis de almidón particularmente en la etapa de la elongación de las cadenas, catalizada por la actividad de la enzima almidón sintasa, mientras que patrones de difracción de rayos X mostraron porcentajes elevados de cristalinidad en almidón de granos con MOB.

En lo que se refiere a propiedades termicas, determinadas mediante calorimetría diferencial de barrido, se ha reportado que granos con MOB presentan mayores temperaturas de inicio de gelatinización y requieren de una mayor energía para llevarla a cabo (la gelatinización del almidón involucra la fusión de las dobles hélices y la pérdida de la cristalinidad). Cheng *et al.* 2005 consideran probable que la estructura interior del gránulo individual de almidón en la región de la MOB sea más rígida que en la región traslúcida lo cual podría ser la causa de que se requiera una mayor cantidad de energía para llevar a cabo la gelatinización; a pesar de que ésta región se caracteriza por gránulos de almidón pobremente empacados y con espacios de aire entre sí.

En este sentido Patindol y Wang, (2003) reportaron que granos con MOB presentan mayor temperatura y energía para el inicio de la gelatinización que granos de endospermo translúcido, sin embargo no encontraron correlación entre el contenido de amilosa y amilopectina con las propiedades térmicas del almidón en granos de seis variedades de arroz. Por su parte Singh *et al.* 2003 atribuyen a la baja presencia de amilosa y alta proporción de amilopectina la mayor temperatura y energía de gelatinización en granos con MOB, que de granos con endospermo translúcido; ya que se ha reportado que la amilopectina juega un papel importante en la cristalinidad del almidón; mientras que, la amilosa disminuye el punto de fusión en las regiones cristalinas y la energía requerida para iniciar la gelatinización. Por lo que es posible, que granos con MOB (menor contenido de amilosa) presenten menos regiones amorfas y más regiones cristalinas, incrementando así la temperatura y energía de gelatinización.

En lo que respecta a propiedades de textura, Singh *et al.* (2003) reportaron para los granos con MOB menores valores de dureza, cohesividad y masticabilidad, atribuidos al menor contenido de amilosa, la relación de cadenas de amilopectina y la estructura granular, con respecto a los valores reportados para granos de endospermo translúcido.

1.2.3 Estructura de la MOB

Algunos autores coinciden en señalar que, en las variedades de arroz que presentan MOB, se observan, mediante microscopía electrónica de barrido, gránulos de almidón sencillos, pobremente empacados, de forma esférica y con espacios de aire entre sí, en

contraste con la morfología que presentan los gránulos de almidón de granos de endospermo traslúcido; esta conformación de los gránulos de granos con MOB cambia la forma en que la luz es refractada a través del grano, dando un aspecto opaco (Figura 5).

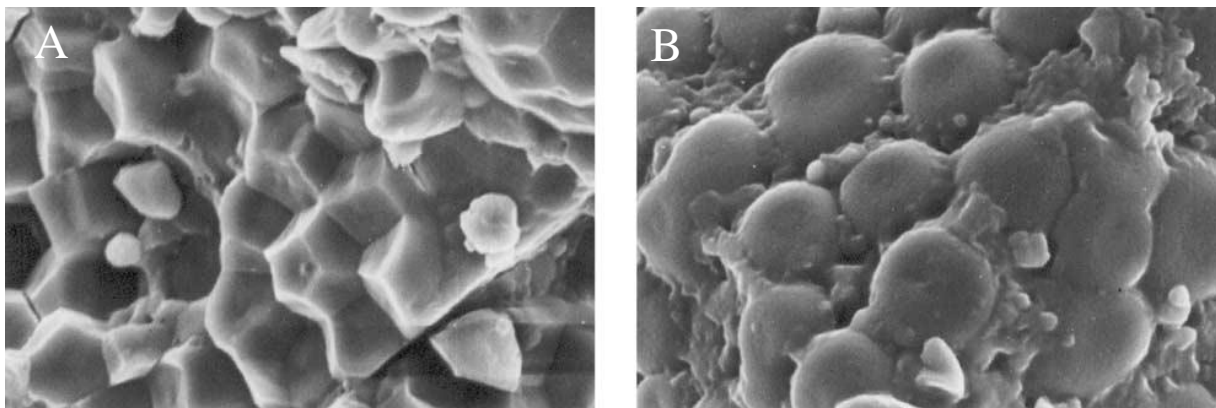


Figura 5. Morfo estructura del gránulo de almidón A) Endospermo traslucido, B) Endospermo con MOB (Adaptado de: Singh *et al.*, 2003).

Se ha documentado que este arreglo estructural, característico de las variedades con MOB, confiere ventajas como una mayor capacidad de absorción de agua, lo que favorece la hidratación del gránulo y reduce el tiempo de cocción, facilita la gelatinización; y en las variedades empleadas para la elaboración de Sake, induce la invasión del hongo Koji (Patindol y Wang, 2003; Singh *et al.*, 2003; Tamaki *et al.*, 2006).

1.3 MORFO ESTRUCTURA Y CONCEPTOS DE DIMENSION FRACTAL

La morfo estructura se refiere a la disposición de las partes de un objeto que condiciona sus rasgos físicos, como consecuencia de la ordenación de su propia estructura

interna y de sus rasgos morfológicos fundamentales. En el arroz, las características morfoestructurales tienen un papel fundamental, tanto para lograr buenos rendimientos molineros, como para desarrollar características finales deseables para el consumidor (tamaño, rendimiento, tiempo de cocción, no apelmazamiento, palatabilidad, dureza, etc.).

En este sentido, se han realizado numerosos trabajos que hacen referencia a la estructura del grano de arroz, principalmente a la conformación y arreglo de los gránulos de almidón en el endospermo (Nishi *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2001; 2002; Patindol y Wang, 2003; Fitzgerald, 2004; Godber y Juliano, 2004; Shih, 2004; Kang *et al.*, 2006; Takemoto-Kuno, *et al.*, 2006; Yang y Zhang, 2006; Ibáñez *et al.*, 2007; Ohtsubo y Nakamura, 2007); sin embargo, no existen trabajos en la literatura disponible que hagan referencia al proceso que se lleva a cabo en la planta de arroz, desde el llenado hasta la maduración del grano, y en específico para el arroz producido en México, particularmente para la variedad Mor A-98.

1.3.1 Herramientas de análisis de la morfoestructura

En la literatura disponible, se encuentran diversos trabajos que hacen uso de técnicas analíticas y moleculares modernas para caracterizar y diferenciar variedades de arroz, como son: calorimetría diferencial de barrido (Tamaki *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2003), cromatografía de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (Yang *et al.*, 2006), difracción de rayos X (Kang *et al.*, 2003; Patindo y Wang, 2003), electroforesis (Fujita *et al.*, 2007; Ohtsubo y Nakamura, 2007; Tabata *et al.*, 2007) y resonancia magnética nuclear (Horigane *et al.*, 1999; Funaba, 2006).

Además de las anteriores, la microscopía óptica y electrónica, complementada con tratamiento digital de imágenes (TDI), ha facilitado la evaluación de algunas características morfológicas, estructurales y ultraestructurales del arroz, lo que ha permitido diferenciar y caracterizar variedades con base en el tamaño, forma, conformación y arreglo del gránulo de almidón (Kang *et al.*, 2006; Ibanez *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2007), proteínas y lípidos asociados al gránulo (Ogawa *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006), forma de los amiloplastos (Kang *et al.*, 2003), posición de la mancha blanca (Yoshioka *et al.*, 2007); así como para analizar cambios estructurales en granos de arroz durante el proceso de cocción (Horigane *et al.*, 1999; Ibáñez *et al.*, 2007).

1.3.2 Tratamiento digital de imágenes (TDI)

El TDI es una herramienta ampliamente utilizada en diferentes áreas del conocimiento (medicina, geografía, biología, arquitectura, geomática, antropología, astronomía, alimentos etc.); su uso en los últimos años se ha incrementado considerablemente como método de inspección y evaluación, gracias al desarrollo de software y hardware de mayor capacidad y rapidez; además de considerarse una técnica no destructiva, rápida, económica, consistente y objetiva (Ogawa *et al.*, 2002; Brosnan, 2004).

El TDI tuvo sus primeras aplicaciones en cereales a principios de la década de los ochentas, con el objetivo de reducir la subjetividad en el proceso de evaluación y clasificación de trigo, basándose principalmente en descriptores morfométricos de los granos (Zayas *et al.*, 1996). El TDI se ha empleado exitosamente para automatizar procesos de selección y clasificación en diversos granos como soya, canola y lupino (Kuensting *et*

al., 2002; Güemes-Vera *et al.*, 2003; Tanska *et al.*, 2005). Así como para identificar especies y variedades, determinar ciertos tipos de contaminación microbiológica, heces de roedores, daño mecánico o térmico, e incluso, el grado molinero (Majmudar y Jayas 1999, Dubey, 2006).

En general, el TDI considera tres etapas: captura, procesamiento y el análisis de la imagen; el objetivo de estas técnicas es procesar una imagen de tal forma que la imagen resultante sea más adecuada que la imagen original. En este sentido Brosan y Sun (2004) las definen como niveles de procesamiento bajo, medio y alto.

Nivel bajo de procesamiento (Captura)

a) Adquisición de la imagen. La imagen puede provenir de objetos tanto microscópicos como macroscópicos y se puede capturar, con base en requerimientos particulares, utilizando cámaras de video o fotográficas (ópticas, análogas y digitales), microscopio, estereoscopio o escáner; o bien pueden provenir de diferentes sensores que pueden ser utilizados para generar una imagen como el ultrasonido, los rayos X y la espectroscopia infrarroja. Las imágenes así obtenidas se almacenan en un formato digital en una computadora.

b) Pre procesamiento. A este proceso se le conoce también como digitalización y consiste básicamente en convertir una imagen en números; la imagen es dividida en cuadros que contienen cada uno, pequeñas regiones de la imagen, cada uno de estos elementos se conoce como píxeles (Brosnan y Sun, 2004). Durante esta fase se llevan a cabo una serie de acciones que tienen por objeto mejorar la calidad de la imagen; al eliminar defectos como

el “ruido” debido a interferencia eléctrica, la distorsión geométrica por el tipo de lente utilizado (concavidad o convexidad), el enfoque e iluminación inadecuados, una calibración inadecuada de la monocromaticidad y cromaticidad, mejorar el contraste o la definición de las diferentes áreas para una aplicación específica.

Nivel intermedio de procesamiento (Procesamiento)

a) *Segmentación*. Es una etapa importante, ya que los datos que se extraen a partir de la imagen dependen en gran medida de la precisión de esta operación. En este paso se engloban los procesos destinados a separar los objetos de interés en sus partes constituyentes. La segmentación se puede efectuar mediante la detección del umbral, de los bordes y el reconocimiento de regiones como se ejemplifica en la Figura 6.

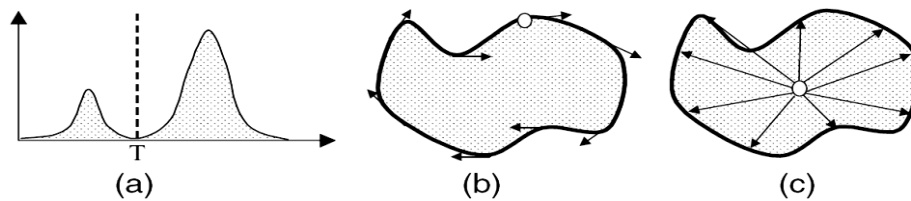


Figura 6. Técnicas de segmentación. (a) Por umbral, (b) por Bordes, (c) por Región (Adaptado de: Brosnan y Sun, 2004).

b) *Representación*. La imagen segmentada puede ser representada por límites, fronteras o bordes, o bien por una región. La representación por bordes es conveniente para analizar la forma y el tamaño; mientras que la representación por región es usada en la evaluación de la textura superficial.

c) Descripción. Esta etapa consiste en la extracción de información a partir del objeto de interés ya segmentado, para lo cual se utilizan algoritmos y filtros específicos. Este proceso se concentra en medir propiedades geométricas (área proyectada, perímetro, factor de forma, rugosidad, dimensión fractal, parámetros texturales de la imagen, tales como la homogeneidad, entropía, área, perímetro y textura fractal), entre otros muchos descriptores de forma, tamaño y estructura para proporcionar información para el análisis y evaluación cuantitativa de la macroestructura y microestructura.

Nivel alto de procesamiento (Análisis de las imágenes).

Este proceso se refiere particularmente al análisis de la imagen del objeto de interés. Se realiza generalmente aplicando software especializado, obteniendo así información sobre las mediciones deseadas, lo que se conoce como morfometría; se compone de dos etapas.

a) Reconocimiento. A partir de la descripción de la imagen, es posible comparar los datos obtenidos con los datos contenidos en una base de datos adecuada a la aplicación y asignar etiquetas identificadoras a los distintos elementos. Generalmente, esta etapa involucra el uso de clasificadores estadísticos o redes neuronales.

b) Interpretación. Consiste en asignar un significado determinado a un conjunto de objetos etiquetados, lo que se conoce con el nombre de descriptores. Los descriptores más comunes que suelen obtenerse de un objeto, son aquellos que describen su tamaño y forma (métricos o dimensionales y morfológicos).

Descriptores dimensionales

- *Perímetro (P)*. El perímetro es definido como el número de píxeles pertenecientes al contorno de un objeto.
- *Área proyectada (A)*. El área es definida como el plano bidimensional con contornos definidos. Es la suma de los píxeles de una región definida. Este parámetro puede utilizarse para describir el encogimiento global de un objeto.
- *Longitud Maxima (LM)*. Este parámetro mide la longitud de una línea conectada entre los dos puntos más lejanos de un objeto. Este parámetro puede utilizarse para describir el encogimiento longitudinal de un objeto.

Descriptores morfológicos

- *Diámetro Feret (DF)*. Este parámetro describe la forma de un objeto. Es el diámetro de un objeto circular ficticio que tiene la misma área que el objeto de medición. Este parámetro puede utilizarse para describir el encogimiento global de un objeto.
- *Compactación o factor de compacidad (FC)*. Compactación es una medida de la forma de un objeto. Es definida como el perímetro al cuadrado dividido entre el área.
- *Excentricidad o factor elíptico (FE)*. Es una medida de la elongación de un objeto.
- *Factor de forma (FF)*. Es un factor que indica que tanto un objeto se circunscribe a un círculo.

1.3.3 Dimensión fractal

Tradicionalmente, diversas áreas del conocimiento como matemáticas, física, ingenierías, ciencias sociales, ciencias computacionales y en particular las ciencias biológicas, han tratado de modelar fenómenos y objetos usando representaciones euclidianas. Sin embargo, no han podido ser explicados satisfactoriamente, debido a que la geometría euclidiana involucra únicamente situaciones que son ideales como las figuras geométricas regulares; mientras que, en la naturaleza, las figuras exhiben un mayor grado de complejidad (Talanquer, 1996; Chanona *et al.*, 2001).

Con el objeto de poder describir y analizar este tipo de fenómenos (no lineales e incluso, caóticos) y objetos (de geometrías irregulares), Mandelbrot introdujo el término “fractal” para caracterizar fenómenos espaciales o temporales que son continuos pero no diferenciables y que exhiben correlaciones parciales sobre varias escalas (Burrough, 1981).

La palabra fractal proviene del adjetivo latino *fractus* que significa “fragmentado” o “irregular” y corresponde al verbo *frangere* que significa “romper en pedazos”. Un fractal se define matemáticamente como un conjunto cuya dimensión de Hausdorff-Besicovitch es estrictamente mayor que su dimensión topológica –presenta dimensión fraccionaria- y se caracteriza por presentar la misma estructura a diferentes escalas de observación, es decir posee autosimilitud y es independiente a la escala de observación, de tal manera que si se toma una parte del fractal y se amplía, el objeto resultante será morfológicamente semejante al objeto original, esta característica se ejemplifica en la figura 7 (A, B, C y D)

donde se aprecia que si se toma una parte del brocoli romanescu (*Brassica oleracea* Botrytis) ésta es autosimilar al brocoli completo (Mandelbrot, 2003).

Existen dos tipos de fractales: los matemáticos o determinísticos y los naturales o aleatorios; los fractales matemáticos se generan por ecuaciones y formas geométricas que son iteradas en diferentes intervalos de escala de observación, que puede ser infinita (figura 7E); mientras que los fractales naturales (figuras 7A – 7D) se presentan en diversas estructuras de la naturaleza y aunque también presentan autosimilitud, se diferencian de los fractales matemáticos en que la escala a la que conservan su propiedad de autosimilitud es finita (Chanona, *et al.*, 2001).

La teoría fractal ofrece métodos para describir la irregularidad inherente en objetos de la naturaleza. En el análisis fractal el concepto euclidiano de “longitud” es visto como un proceso caracterizado por un parámetro constante “D”, conocido como dimensión fractal (D_f) y que puede ser visto como la cuantificación de la complejidad (irregularidad), por lo que permite cuantificar el grado de accidentalidad o tortuosidad de un objeto (Peleg, 1993; Kenkel y Walker, 1999), caracterizar la variación de las propiedades geométricas fractales con el tamaño, y su magnitud está relacionada con la morfología.

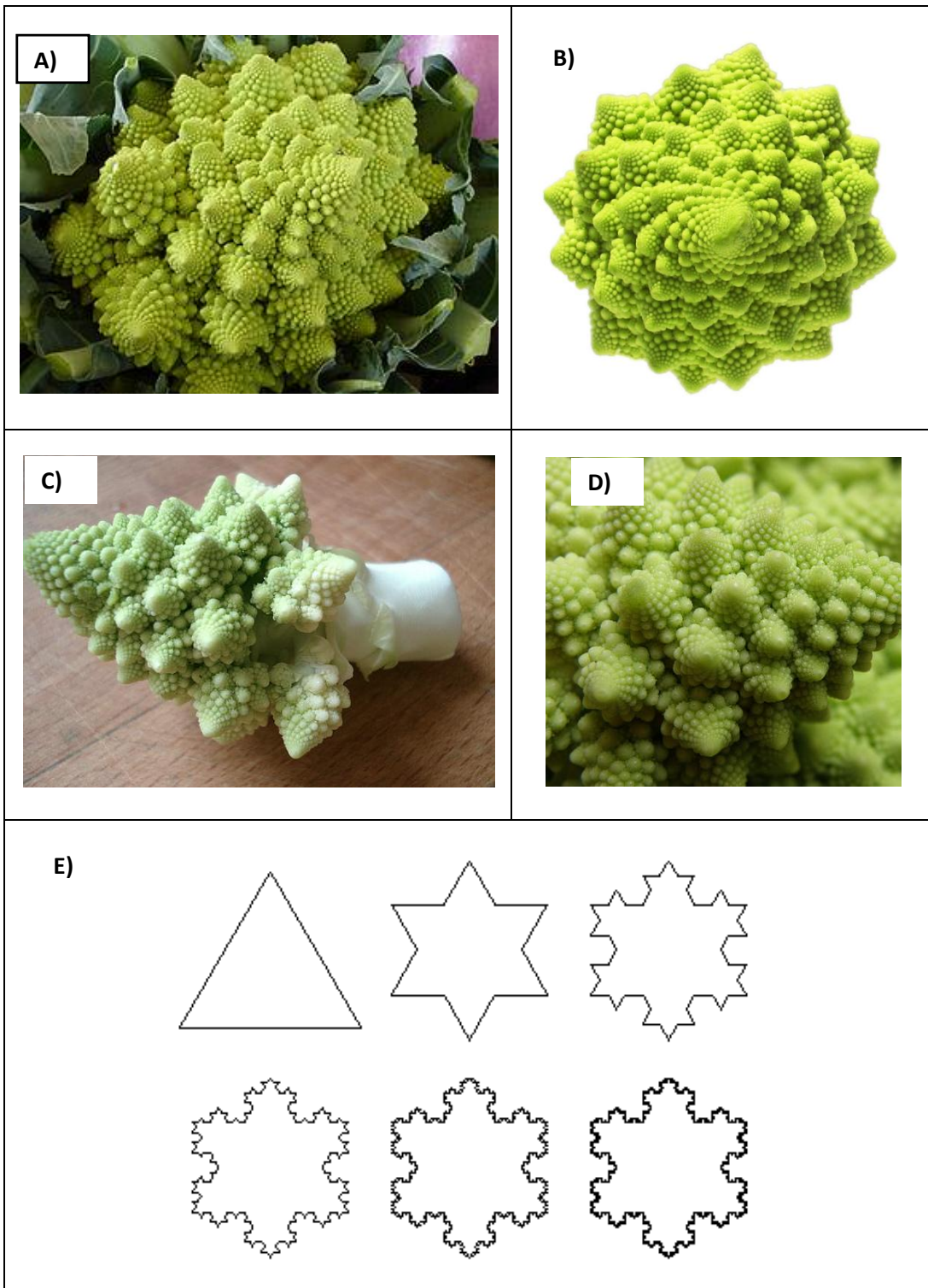


Figura 7. A, B, C, D) Brocoli romanescu a diferentes escalas de observación. E) fractal matemático Copo de nieve de Koch.

La dimensión fractal se puede definir en términos lineales, planares o volumétricos (dimensión fractal de perímetro, área y volumen). La dimensión fractal de perímetro D_{fp} mide el grado de irregularidad de contornos o fronteras: la dimensión de una línea suave como una parábola o un círculo es 1, pero si la línea es bastante irregular o densamente convolucionada de tal forma que puede llenar el área de dibujo, la dimensión fractal es cercana a 2, se define por la ecuación propuesta por Olsen *et al.* (1993) (ecuación 4).

$$D_{fp} = 2 \cdot \left(\frac{\ln \frac{P}{4}}{\ln A} \right) \dots\dots\dots(1)$$

Donde P es el perímetro y A el área.

La dimensión fractal de área D_{fA} se define por la relación de potencia entre el área proyectada y la longitud característica del objeto, de acuerdo a lo reportado por Voss (1988) (ecuación 5). Para el caso de una esfera maciza $D_{fA} = 2$, pero para el caso de un objeto fractal que presenta menor compactación que la esfera y que tiene ramificaciones y espacios vacíos en su área va a tener una D_{fA} menor a 2.

$$D_{fa} = \left(\frac{\ln A}{\ln LM} \right) \dots\dots\dots(2)$$

Donde A es el área y LM la longitud máxima.

Similarmente, se puede definir la dimensión fractal de volumen (D_{fv}) a partir de una relación de potencia entre el volumen del agregado y su longitud característica (Chakraborti *et al.*, 2000; 2003; Peleg, 1993).

Debido a lo anterior, en los últimos años se ha incrementado el uso de la geometría fractal en las ciencias biológicas y en particular, en el área de alimentos, como herramienta de análisis para evaluar cambios morfológicos durante el secado, así como para evaluar la superficie de materiales biológicos (Quevedo *et al.*, 2002; Alamilla-Beltran *et al.*, 2005).

El tratamiento digital de imágenes (TDI) y el análisis fractal de imágenes digitales (AFID), son técnicas analíticas modernas que complementan a la microscopía óptica y electrónica, y que actualmente se utilizan para la descripción morfo y topo-estructural, como es el caso de alimentos procesados, crecimiento de microorganismos, lodos residuales, recubrimientos cerámicos y tumores, entre otros (Zayas y Steele, 1996; Majmudar y Jayas, 1999; Kuensting *et al.*, 2002; Quevedo *et al.*, 2002; Güemes-Vera *et al.*, 2003, Tanska *et al.*, 2005).

Estas técnicas permiten obtener una gran cantidad de información sistematizada tales como la entropía y el segundo momento angular que proporcionan datos acerca de la aleatoriedad y la organización de los objetos dentro de una imagen (Haralick *et al.*, 1973; Lepistö *et al.*, 2003); además, proporcionan un enfoque novedoso, no son destructivas, disminuyen el error humano debido a la manipulación e interpretación, y son relativamente económicas y fáciles de implementar (Brosnan, 2002; 2004). Sin embargo, precisamente por lo novedoso de estas técnicas, en el caso de granos y en particular del arroz, son escasos aún los estudios (Vidal, *et al.*, 2007; Ohtsubo y Nakamura, 2007); de hecho, no existen trabajos de esta naturaleza para el arroz de la variedad Mor A-98, por lo que se asume que, desde el punto de vista de originalidad, se justifica plenamente la investigación doctoral que se da a conocer en este documento.

LITERATURA CITADA

- Alamilla-Beltrán L., Chanona-Pérez J., Jiménez-Aparicio A., Gutiérrez-López G. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67: 179-184.
- Baldwin P. 2001. Starch granule – associated proteins and polypeptides: a review. *Starch*. 53 : 475 – 503.
- Brosnan T., Sun D. 2002. Inspection and grading of agricultural and food products by computer vision systems a review. *Computers and electronics in agriculture*. 36:193 – 213.
- Brosnan T., Sun D. 2004. Improving quality inspection o food products by computer vision - a review. *Journal of Food Engineering*. 61 : 3 - 16.
- Counce P., Keisling T., Mitchell A. 2000. A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science*. 40:436–443.
- Chakraborti R , Gardner K., Atkinson J., Van Benschoten E. 2003. Changes in fractal dimension during aggregation. *Water Research* 37: 873-883.
- Champagne E., Wood D., Juliano B., Bechtel D. 2004. The rice its gross composition. in *Rice, 3rd et.*; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 77 - 106.

- Chanona P., Alamilla B., y Gutiérrez, G. 2001. Caos y geometrías de fractales, herramientas auxiliares para evaluar la complejidad del entorno biológico. *BioTecnología* 5: 117 – 125.
- Cheng F., Zhong L., Zhao N., *et al.* 2005. Temperature induced changes in the starch components and biosynthetic enzymes of two rice varieties. *Plant Growth Regulation*. 46 : 87 – 95.
- Cheng F., Liu Y., Liu Z., Zhao N., Wang F., Zhang Q., Zhang G. 2007a. Positional variations in chalky occurrence within a rice panicle and its relation to grain nutritional quality. *Australian Journal of Agricultural Research*. 58 : 95 – 103.
- Dubey B., Bhagwat S., Shouche S., *et al.* 2006. Potential os artificial neural networks in varietal identification using morphometry of wheat grains. *Biosystems Engineering*. 95 : 61 –67.
- Fitzgerald M. 2004. Starch. In Rice, 3rd et.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 109 - 141.
- Fitzgerald M., Susan R., McCouch., Hall R. 2009. Not just a grain of rice: the quest for quality. *Trends in Plant Science* 14 : 133 – 139.
- Franquet J. y Borràs C. 2004. Variedades Y Mejora Del Arroz (*Oryza sativa*, L.). Universitat Internacional de Catalunya. Escola Universitària de Ciències Experimentals i Tecnologia.

- Funaba M., Ishibashi Y., Hossain A., Iwanami K., Iwaya-Inoue M. 2006. Influence of low / high temperature on water status in developing and maturing rice grains. *Plant Production Science* 9 : 347 – 354.
- Furukawa S., Itou M., Masumura T., Tanaka K., Kiyokawa Y., Wakai Y. 2007. Ultrastructure of low-glutelin rice endosperm. *Plant Biotechnology*. 24 : 227 – 229.
- Godber S., Juliano B. 2004. Rice Lipids. In *Rice*, 3rd ed.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 163 - 190.
- Güemes-Vera N., Arciniega-Ruiz E., Dávila-Ortiz G. 2003. Structural analysis of the *Lupinus mutabilis* seed, its flour, concentrate, and isolate as well as their behavior when mixed with wheat flour. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologiefood Science And Technology*. 37 : 283 – 290.
- Haralick R., Shanmugam K., Dinstein L. 1973. Texture parameters for image classification. Institute of Electrical and Electronics (IEEE). *Transactions on Systems, Man and Cybernetics*. 610 – 621 pp.
- He G., Kiyoshi K., Suzuki H. 1989. Development of endosperm and synthesis of starch in rice grain. *Japanese Journal of Crop Science*. 58 : 246 – 252.
- Horigane A., Toyoshima H., Hemmi H., Engelaar W., Okubo A. Nagata T. 1999. Internal hollows in cooked rice grains (*oryza sativa* cv. koshihikari) observed by nmr micro imaging. *Journal of Food Science*. 64:1-4.

- Ibáñez A., Wood D., Yokoyama W., Park I., Tinocom., Hudson C., Mckenzie K., Shoemaker C. 2007. Viscoelastic properties of waxy and nowaxy rice flours, their fat and protein-free starch, and microstructure of their cooked kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 6761 – 6771.
- Ikeda K., Nagasawa N., Nagato Y. 2005. Aberrant panicle organization 1 temporally regulates meristem identity in rice. *Developmental Biology*. 28 : 349 – 360.
- Ishimaru T., Horigane A., Ida M., Iwasawa N., San-Oh Y., Nakazono M., Nishizawa N., Masumura T., Tondo M., Yoshida M. 2009. Formation of grain chalkiness and changes in water distribution in developing rice caryopses grown under high-temperature stress. *Journal of Cereal Science* 50:166–174.
- Jacobs B And Pearson C. 1999. Growth, development and yield of rice in response to cold temperature. *Journal Of Agronomy And Crop Sciencezeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau*. 182 : 79 – 88.
- James M., Denyer K., Myers M. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology*. 6 : 215 – 222.
- Kang H., Hwang I., Kim K., Choi H. 2003. Comparative structure and physicochemical properties of Ilpumbyeo, a high-quality japonica rice and its mutant sweon 464. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 6598-6603.

- Kang H., Hwang I., Kim K., Choi H. 2006. Comparison of the physicochemical properties and ultrastructure of japonica and indica rice grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:4833-4838.
- Kawagoe Y., Kubo A., Satoh H., Takaiwa F., Nakamura Y. 2005. Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm. *The Plant Journal*. 42 : 164 – 174.
- Kenkel N., Walker D. 1996. Fractals in the biological sciences. [En línea] disponible: <http://www.umanitoba.ca/faculties/science/botany/labs/ecology/fractals/fractal.html>, 2 de julio de 2003.
- Kuensting H., Ogawa Y., Sugiyama J. 2002. Structural details in soybeans: a new three – dimensional visualization method. *Journal of Food Science*. 67 : 721 – 724.
- Kobata T., Sugawara M., and Takatu S. 2000. Shading during the early grain filling period does not affect potential grain dry matter increase in rice. *Agronomy Journal*, 92 : 411 – 417.
- Lesław Juszczak. 2003. Surface of triticale starch granules - nc-afm observations. *Electronic Journal Of Polish Agricultural Universities*. Vol. 6.
- Lepistö L., Kunttu I., Autio J., Visa A. 2003. Rock Image Classification Using Non-Homogenous Textures and Spectral Imaging. In: Proc. 11th International Conference in Central Europe on Computer Graphics, Visualization and Computer

- Vision. V Skala (ed.). Short Communication Papers Proceedings. Plzen, Czech Republic. 3-7. Feb. WSCG, University of West Bohemia, Czech Republic. pp: 1-5.
- Livore A. 2000. Granos panza blanca. Resultados experimentales. Fundación Proarroz. Uruguay.
- Majmudar S., Jayas D. 1999. Classification of Bulk samples of cereal grains using machine vision. Journal Of Agricultural Engineering Research. 73:35-47.
- Mandelbrot B. 2003. La Geometría Fractal de la Naturaleza. Tusquets Editores, Barcelona.
- Moldenhauer A., McKenzie K., 2004. Rice Varieties in Rice, 3rd et.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 49 - 74.
- Morell M., Rahman S., Abrahams L., Appels R. 1995. The biochemistry and molecular biology of starch synthesis in cereals. Australian Journal of Plant Physiology. 22 : 647 – 660.
- Morita S., Yonemaru J., Takanashi J. 2005. Grain growth and endosperm cell size under high night temperatures in rice (*Oryza sativa*). Annals of Botany 95: 695–701.
- Myers A. 2004. The rice plant: growth, development, and genetic improvement. in Rice, 3rd et.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 25 - 46.

- Nishi A., Nakamura Y., Tanaka N., Satoh H. 2001. Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose-extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiology*. 127: 459–472.
- Ogawa Y., Sugiyama J., Kuensting H., Ohtani T., Hagiwara S., Liu X., Kokubo M., Yamamoto A., Kudoh K., Higuchi T. 2001. Advanced technique for three-dimensional visualization of compound distributions in a rice kernel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:736-740.
- Ogawa Y., Kuensting H., Nakao H. 2002. Three – dimensional lipid distribution of a brown rice kernel. *Journal of Food Science*. 67 : 2596 – 2599.
- Ohtsubo A., Nakamura S. 2007. Cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) by polymerase chain reaction method and its application to processed rice products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55 : 1501 – 1509.
- Olsen E., Ramsey R., Winn D. 1993. A modified fractal dimension as a measurement of landscape diversity. *Photogrammetric Engineering And Remote Sensing*. 59:1517-1520.
- Patindol J., Wang Y. 2003. Fine structures and physicochemical properties of starches from chalky and translucent rice kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 : 2777 – 2784.
- Peleg M. 1993. Fractal and foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 33 (2): 149-165.

- Quevedo A., Lopez-G C., Aguilera C. 2002. Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *Journal of Food Engineering*. 53 : 361–371.
- Raju G., Srinivas T. 1991. Effect of physical, physiological, and chemical factors on the expression of chalkiness in rice. *Cereal Chemistry*. 68:210-211.
- Singh N., Sodhi N., Kaur M., Saxena S. 2003. Physico-chemical, morphological, thermal, cooking and textural properties of chalky and translucent rice kernels. *Food Chemistry*. 82 : 433 – 439.
- Smith A., Denyer K., Martin C. 1997. The synthesis of the starch granule. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology*. 48 : 67 – 87.
- Smith A. 2001. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*. 2 :335 – 341.
- Smith C. 1999. Carbohydrate Biochemistry. In: *Plant Biochemistry and molecular Biology*, (Ed). Lea P., Leegood R., Cap. 4, John Wiley & Sons. England. (101 – 105).
- Tabata M., Hirabayashi H., Takeuchi Y., Ando I., Ida Y., Oshawa R. 2007. Mapping of quantitative trait loci for the occurrence of white – back kernels associated with high temperatures during the ripening period of rice (*Oryza sativa* L). *Breeding Science*. 57 : 47 – 52.

- Takemoto-Kuno Y., Suzuki K., Nakamura S., Satoh H., Ohtsubo K. 2006. Soluble starch synthase I effects differences in amylopectin structure between indica and japonica rice varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 : 9234 – 9240.
- Talanquer V. 1996. *Fractus, fracta, fractal. Fractales, de laberintos y espejos*. Fondo de cultura económica. México.
- Tamaki M., Kurita S., Toyomaru M., Itani T., Tsuchiya T., Aramaki I., Okuda M. 2006. Difference in the physical properties of white – core and non – white - core kernels of rice varieties for sake brewing is unrelated to starch properties. *Plant Production Science*. 9(1) : 78 – 82.
- Tanska M., Rotkiewicz D., Kozirok W., Konopka I. 2005. Measurement of the geometrical features and surface color of rapeseeds using digital image analysis. *Food Research International* . 38:741 – 750.
- Torres E., Jennings P., Duque M., Kuri V., Corredor E. And Sierra J. 2002. Analysis of stability for white belly in rice (*Oriza sativa*). *Foro Arrocerero Latinoamericano*. 8 : 9 – 13.
- Vandeputte G., Delcour J. 2004. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*. 58 : 245 – 266.
- Vidal V., Pons B., Brunnschweiler J., Handschin S., Rouau X., Mestres C. 2007. Cooking Behavior of rice in relation to kernel physicochemical and structural properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:336 – 346.

- Voss R. 1988. Fractals in nature: from characterization to simulation. In: Peitgen, H. O. and D. Saupe (eds.). The science of fractal images. pp. 21-70. Springer, New York.
- Waliszewski P., Konarski J. 2001. Tissue as a self-organizing system with fractal dynamics
Space Res. 28:545-548.
- Woo M.I, Ham T., Ji H., Choi M., Jiang W., Chu S., Piao R., Chin J., Kim J., Park B., Seo H., Jwa N., McCouch S. Koh H. 2008. Inactivation of the UGPase1 gene causes genic male sterility and endosperm chalkiness in rice (*Oryza sativa* L.) The Plant Journal 54 : 190–204
- Yamakawa H., Hirose T., Kuroda M., Yamaguchi T. 2007. Comprehensive Expression Profiling of Rice Grain Filling-Related Genes under High Temperature Using DNA Microarray. Plant Physiology. 144 : 258–277
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., Liu L. 2003. Activities of enzymes involved in sucrosa-to-starch metabolism in rice grains subjected to water stress during grain filling. Field Crops Research. 81 : 69 – 81.
- Yang J., Zhang J., 2006. Grain filling of cereals under soil drying. New Phytologist. 169 : 223 – 236.
- Yang P., Shen S. and Kuang T. 2006. Comparative analysis of the endosperm proteins separated by 2-D electrophoresis for two cultivars of hybrid rice (*Oryza sativa* L.) Journal of Integrative Plant Biology. 48 : 1028 – 1033.

Yoshioka Y., Iwata H., Tabata M., Ninomiya S. and Ohsawa R. 2007. Chalkiness in rice: potential for evaluation with image analysis. *Crop Science*. 47 : 2113 – 2110.

Zayas I., Steele J. 1996. Image texture analysis for discrimination of mill fractions of hard and soft wheat. *Cereal Chemistry*. 73 (1) : 136-142.

Zhou Z., Robards K., Helliwell S. and Blanchard C. 2002. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*. 37 : 849 – 868.

CAPÍTULO 2 *Caracterización Morfo estructural Del Llenado Del Grano.*

INTRODUCCIÓN

En México, el arroz (*Oryza sativa* L.) es el cuarto producto de consumo básico. Las variedades de arroz mexicanas y en particular las “Morelos”, son reconocidas por sus características agronómicas, molineras y culinarias (Moldenhauer *et al.*, 2004).

Existen diversos factores que determinan la calidad comercial del arroz: uniformidad en cuanto al tamaño y forma, limpieza y su cristalinidad u opacidad. La variedad Morelos A-98 (Mor A-98) se caracteriza por ser de grano largo (> 7 mm), delgado (> 2.4 mm) y opaco (SCFI, 2005). La opacidad de la variedad Morelos A-98 se debe a la presencia de una mancha opaca blanca (MOB) distintiva en la región ventral, que ocupa más del 20% del endospermo del grano y se conoce coloquialmente como “panza blanca” (FAO, 1995; SCFI, 2005). Ésta característica difiere de lo que se conoce como yesosidad, ya que ésta última define un endospermo totalmente opaco; aunque en ocasiones se llega a emplear erróneamente de forma indistinta.

Algunos autores sugieren que la MOB puede ser un defecto del grano, que demerita su apariencia general y disminuye su rendimiento molinero (Patindol y Wang, 2003; Funaba *et al.*, 2006; Yoshioka *et al.*, 2007). Los granos que presentan MOB tienden a ser menos duros y más susceptibles a quebrarse (Kim *et al.*, 2000; Tamaki *et al.*, 2006). Trabajos previos han reportado diferencias estructurales en la conformación de los gránulos de almidón presentes en granos con MOB (Patindol y Wang, 2003; Singh *et al.*, 2003).

La presencia de la MOB parece estar influenciada por factores ambientales como las altas temperaturas que interrumpen el llenado normal del grano durante su desarrollo, provocando estados no uniformes de maduración (Cheng *et al.*, 2005); su presencia se atribuye también a enfermedades o por cosechar el grano con elevado contenido de humedad (Funaba *et al.*, 2006; Ishimaru *et al.*, 2009).

Se ha reportado la caracterización de distintas variedades de arroz y la presencia de MOB, empleando técnicas de calorimetría diferencial de barrido, viscoamilografía y microscopía acoplada a tratamiento digital de imágenes (TDI) (Hee-Jin *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2007). Yoshioka *et al.* (2007) mediante TDI lograron establecer diferencias entre la yesosidad y la MOB ubicando con precisión, la posición de ésta en el grano.

Sin embargo, la complejidad estructural y la morfología irregular presente en el grano de arroz, limita el uso de herramientas de análisis derivadas de la geometría euclidiana para su cuantificación e interpretación; en cambio, la geometría fractal puede permitir la descripción de objetos que exhiben alto grado de complejidad (Chakraborti *et al.*, 2003). La magnitud de la dimensión fractal (D_f) de los objetos irregulares está relacionada con diversas propiedades como la rugosidad, sinuosidad y accidentabilidad (Kenkel y Walker, 1996). En general, la D_f se puede expresar en términos lineales como dimensión fractal de perímetro (D_{fp}) o de área (D_{fa}). La D_{fp} mide el grado de irregularidad de contornos o fronteras mientras que la D_{fa} cuantifica la proporción del plano que es ocupada por un objeto dado (Chakraborti *et al.*, 2003). En el caso de arroz, son escasos los trabajos sobre análisis fractal de imágenes, además de que las variedades mexicanas, hasta antes del presente trabajo, no habían sido objeto de este tipo de estudios.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar morfo estructuralmente el llenado del endospermo de arroz variedad Morelos A-98; mediante el uso de técnicas de microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido, tratamiento digital de imágenes y dimensión fractal.

Para llevar a cabo la caracterización, se evaluaron y cuantificaron los cambios estructurales de cortes transversales de granos de arroz variedad Morelos A-98 y de gránulos de almidón de dos regiones del endospermo: región cristalina y región de la MOB. Esto, en cinco etapas de maduración fisiológica (7, 14, 21, 28 y 35 días después de anthesis, DAF), cuatro posiciones en la panícula (Intervalos 1, 2, 3 y 4) y dos posiciones para los gránulos de almidón (Intervalos 1 y 3). Se evaluaron dos tipos de descriptores morfo métricos; descriptores dimensionales: área (A), perímetro (P), longitud máxima (LM), longitud mínima (Lm); y descriptores de forma: factor de forma (FF), factor de compacidad (FC) y factor elíptico (FE).

Adicionalmente, se midió la irregularidad (sinuosidad) de los cortes transversales del grano en términos de la dimensión fractal de Perímetro (Dfp) y la dimensión fractal de área (Dfa); así como dos parámetros texturales: Entropía de la imagen (E) y Segundo momento angular (SMA). Finalmente se evaluó el efecto de la temperatura y la humedad ambiental en la formación de la mancha opaca blanca del grano.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

El trabajo se desarrolló con material que se obtuvo de una parcela experimental sembrada con arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Morelos A-98, correspondiente al ciclo 2007; en el Campo Experimental Zacatapec (CEZ) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Las plantas fueron marcadas en el momento de la antesis, obteniéndose muestras de los granos en las semanas 1, 2, 3, 4 y 5, que corresponden a los 7, 14, 21, 28 y 35 días después de antesis (DAF); a cuatro diferentes intervalos (arbitrarios) en la panícula, desde el ápice hasta la base de la primera espiga. Se definió que el primer intervalo correspondía al ápice y el cuarto intervalo a la base.

En cada muestreo, se colectaron tres panojas; las panojas se guardaron en bolsas herméticas para evitar la pérdida de humedad durante su traslado al laboratorio.

OBSERVACIONES EN MICROSCOPIA OPTICA (MO) Y CAPTURA DE IMÁGENES DIGITALES

Cada panoja fue dividida en cuatro intervalos, de cada sección se cortaron 15 granos, dando un total de 60 granos por panoja; es decir 180 granos por muestreo. Los granos se seccionaron transversalmente por su parte media, con ayuda de un bisturí; el corte siempre se realizó en el mismo sentido (de la parte dorsal a la ventral). Una sección de cada grano fue colocado en el campo de observación del microscopio estereoscópico (Nikon,

modelo LZM 1500, Japón) procurando que la parte ventral del grano estuviera orientada hacia el lado izquierdo de la imagen. Las observaciones se hicieron a 3X y 4X, de tal forma que se abarcó toda la sección transversal del grano en el campo de observación; la iluminación se realizó de manera coaxial, se utilizó un sistema de fibra óptica con un iluminante xenón óptico (Nikon, modelo LI-500, Japón).

La captura de imágenes se realizó a través de una cámara digital (Dage-MTI modelo DC330, Japón) colocada en el cuerpo del microscopio, la cual a su vez se conectó mediante una interfase tipo flashbus (Integral Technologies, modelo MV-Pro, USA) a una computadora genérica (velocidad del procesador de 2.66 GHz y 4 GB de memoria RAM). Las imágenes se capturaron con el software MetaMorph V. 6.1 (Meta Imaging Series Environment, Universal Imaging Co., USA) y se almacenaron digitalmente (1280 x 960 píxeles, 300 ppp) sin compresión, con un formato *.tiff ("*Tagged Image File Format*") hasta su procesamiento con tratamiento digital de imágenes (TDI).

CAPTURA DE IMÁGENES CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

De cada muestreo se consideraron dos granos del intervalo 1 y dos del intervalo 3 para su observación con MEB; se siguió un protocolo estándar de fijación y post – fijación de las muestras (Bozzola y Russell, 1999). Para ello, las secciones transversales de los granos fueron introducidos en viales que contenían 1.5 ml de glutaraldehído al 3% (v/v) para su fijación durante 2 horas; posteriormente, se efectuaron 3 lavados con solución de

fosfatos con un reposo de 10 minutos cada uno; al término de éstos, se colocaron en tetraóxido de osmio al 1% (v/v) para su post-fijación durante 2 horas; se efectuaron nuevamente 3 lavados con solución de fosfatos con un reposo de 10 minutos cada uno, seguidos de una deshidratación con etanol a concentraciones ascendentes (10 al 100% v/v) por espacio de 10 minutos cada uno y finalmente fueron desecadas con hexametildisilazano al 98.5%.

Posteriormente, las muestras tratadas se ionizaron con una cubierta de oro de 14nm con una corriente de 15 mAmps. Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico de barrido (Jeol, modelo JSM – 5800LV, Japón). De cada muestra se capturaron tres imágenes digitales (640 x 480 píxeles), una con magnificación 40X (del grano completo), y dos más con una magnificación de 2000X correspondientes a la región ventral (MOB) y a la región dorsal (cristalina) como se muestra en la Figura 1; todas a un voltaje de 20KV.

Todas las imágenes se capturaron procurando seguir una misma orientación en la posición del grano tomando como referencia las glumas; es decir, la lema del grano correspondía a la región ventral (MOB), mientras que la palea fue la referencia para la región dorsal (cristalina). Finalmente, las imágenes digitales se almacenaron en un formato *.jpg ("Joint Photographic Experts Group"), sin utilizar compresión de imagen.

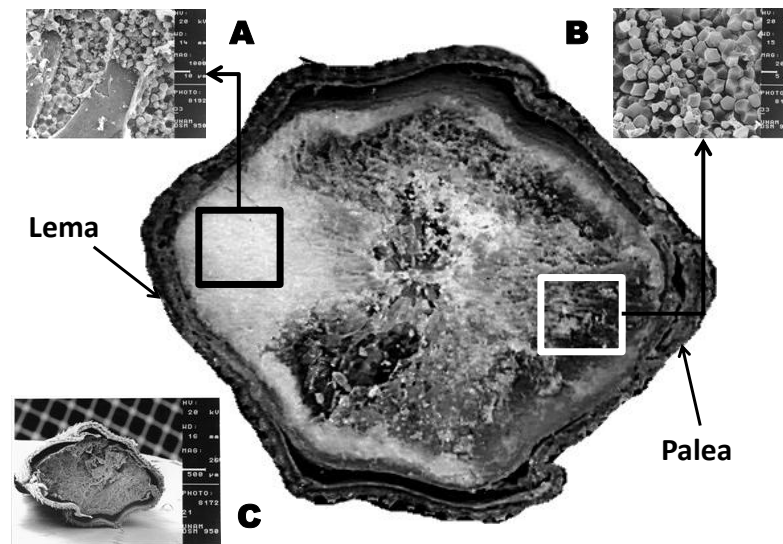


Figura 1.- Micrografía capturada con MO que muestra las secciones de captura de imágenes con MEB del corte transversal del grano de arroz Morelos A-98 A) Región ventral (MOB) magnificación 2000X; B) Región dorsal (cristalina) magnificación 2000X; C) Grano completo, magnificación 40X.

TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES (TDI)

Las imágenes obtenidas por MO se procesaron digitalmente utilizando el procedimiento reportado por Yoshioka *et al.* (2007) y adaptado por Valenzuela *et al.* (2007). Primeramente, las imágenes fueron estandarizadas con la ayuda del programa Corel PhotoPaint V11.5 (Corel Co., USA).

Para ello, se convirtieron a escala de grises de 8 bits y un formato *.bmp (Bits map protocol). A continuación se seleccionó el área de interés de forma manual, la cual se segmentó y extrajo del resto de la imagen, para colocarla en una nueva carpeta, de tal manera que quedara como un objeto aislado. Estas nuevas imágenes fueron binarizadas (2

bits) mediante la ayuda del filtro “Otsu Thresholding” y guardadas en un formato *.bmp con una resolución de 300 ppp para la posterior medición de las características morfométricas de interés, así como la evaluación de la DF, como se muestra en la figura 2A.



Figura 2.- Imágenes segmentadas y binarizadas A) MO, corte transversal grano de arroz variedad Morelos A-98. B) MEB, Gránulos de almidón.

Por su parte, las imágenes de MEB sólo se convirtieron a escala de grises (8 bits, formato *.bmp). Los gránulos de almidón fueron segmentados de forma manual; considerando las dos regiones previamente descritas del grano: ventral y dorsal. Se segmentaron 10 gránulos por cada región del grano, un grano por intervalo, intervalos 1 y 3. Una vez segmentados, los gránulos se binarizaron y pegaron en una nueva carpeta, como objetos aislados. Estas nuevas imágenes fueron guardadas en un formato *.bmp y una resolución de 300 ppp (Figura 2B) para la posterior medición de las características morfométricas y de Df.

DETERMINACIÓN DE LOS DESCRIPTORES MORFO MÉTRICOS

La morfometría de las imágenes obtenidas por MO (sección transversal del endospermo) y por MEB (gránulos de almidón) se evaluó con el programa Sigma Scan Pro V5.0 (SPSS Inc, USA), tomando como base los parámetros físicos previstos por la Norma Oficial Mexicana NOM-080-SCFI-1994 y la Norma Mexicana NMX-FF-035-SCFI-2005. El software se calibró utilizando una imagen de un micrómetro (Nikon, Japón) con una longitud de 100 μm , capturada bajo las mismas condiciones que las imágenes de los granos de arroz.

Se determinaron los siguientes descriptores morfométricos: área (A), perímetro (P), longitud máxima (LM), longitud mínima (Lm), factor de forma (Ff) y factor de compacidad (Fc). Los datos obtenidos se guardaron en una hoja de cálculo Excel de Microsoft, para su ulterior análisis; adicionalmente en la hoja de Excel, se calculó el factor elíptico (Fe), de acuerdo a lo reportado por Davies (2000):

$$Fe = LM/Lm \dots \dots \dots (1)$$

Donde, la longitud máxima (LM) se refiere a la longitud entre los dos pixeles más distantes del objeto, mientras que Lm es la distancia entre los pixeles más alejados del objeto, pero que es perpendicular a LM (SPSS, 2000).

Si tal relación es 1.0, el objeto es un círculo, mientras que sí es > 1.0 , el objeto es una elipse. Por su parte el factor de forma se define como:

$$Ff = 4\pi A / P^2 \dots \dots \dots (2)$$

De aquí que si $F_f \approx 1$, el objeto es circular (esférico) y deja de serlo cuando $F_f < 1$. El F_c , es una medida de la forma de un objeto y se refiere a que tan compacto o no puede serlo; se define como:

$$F_c = P^2/A \dots \dots \dots (3)$$

Si el valor de F_c es 12.57 es decir 4π , el objeto es un círculo compacto; si el valor es mayor, el objeto comienza a tomar la forma de una línea y entonces F_c tiende a ser infinito (SPS, 2000).

DETERMINACIÓN DE LA DIMENSIÓN FRACTAL DE PERÍMETRO Y ÁREA

La dimensión fractal de perímetro y área de las imágenes obtenidas por MO se evaluaron con el programa Image J V. 1.34 (NIH, National Institute of Health, USA) con la herramienta de análisis “Fractal box count”. La dimensión fractal de Perímetro (D_{fp}) se calculó utilizando una relación de A y P (en pixeles) utilizando la ecuación propuesta por Olsen (1993):

$$D_{fp} = 2 \cdot \left(\frac{\ln \frac{P}{4}}{\ln A} \right) \dots \dots \dots (4)$$

El valor de D_{fp} cuantifica el grado de irregularidad del borde de un objeto, de tal manera que la D_{fp} de una línea recta ≈ 1 ; si tal línea se vuelve sinuosa o rugosa (irregular),

el valor de $D_{fp} > 1$. Por otra parte, para la dimensión fractal de área (D_{fa}), se utilizó la relación área-longitud máxima propuesta por Voss (1988), de acuerdo a la ecuación (5).

$$D_{fa} = \left(\frac{\ln A}{\ln LM} \right) \dots \dots (5)$$

El valor de D_{fa} cuantifica la proporción de un plano que ocupa el objeto de interés de tal manera que si $D_{fa} \approx 2$, el objeto es un plano; valores menores, indican un plano incompleto y por lo tanto irregular (Lira, 2002).

DETERMINACIÓN DE LA DIMENSIÓN FRACTAL DE TEXTURA TOPOGRÁFICA

Se evaluó la dimensión fractal de textura topográfica (D_{ft}) utilizando el método reportado por Quevedo *et al.* (2002), con el software DFSurf V 1.0 ejecutado en el MathLab V.6.5 (MathWorks Inc, USA). Para ello, las micrografías obtenidas por MEB con magnificaciones de x40 y x2000, fueron transformadas en escala de grises de 8 bits (formato *.bmp).

Las micrografías que corresponden al corte longitudinal del endospermo cristalino del grano de arroz (x40), fueron divididas en 4 cuadrantes con el objeto de extraer cinco imágenes representativas (lateral superior izquierda, lateral superior derecha, central, lateral inferior izquierda y lateral inferior derecha) de 200 x 200 pixeles de la micrografía como se muestra en la Figura 3. La dimensión fractal de textura topográfica (D_{ft}) representa la accidentalidad de un objeto, cuya tercera dimensión (el eje z) está dado por el nivel de intensidad del gris (0 a 255). En este caso si el valor de $D_{ft} \approx 2$ el objeto representa una

superficie lisa, mientras que si es >2 , corresponde a un objeto cuya superficie es accidentada y por lo tanto, tiende a ser un volumen (Quevedo *et al.*, 2002).

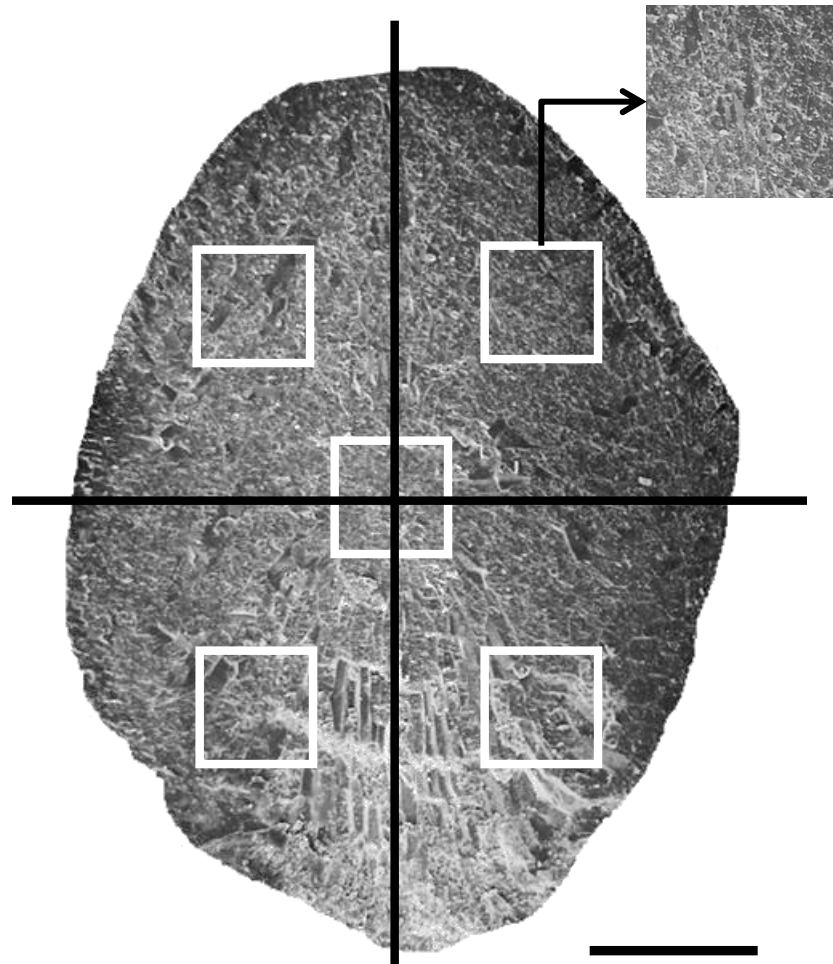


Figura 3.- Micrografía que muestra el corte transversal del grano de arroz Morelos A-98 (40X). A) ubicación donde se cortaron los cinco segmentos B) Segmento de 200 x 200

píxeles.

50
μm

EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS TEXTURALES DE LAS MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS

Las micrografías electrónicas de barrido con una magnificación de x2000 correspondientes a la región ventral (MOB) y a la región dorsal (cristalina) fueron transformadas en escala de grises de 8 bits (formato *.bmp); éstas se transformaron a una escala de 200 x 200 píxeles (figura 4) y fueron analizadas con el programa Image J V.1.34, particularmente con el “plugin” GLMC Texture (*“Gray Level Co-occurrence Matrix”*); se determinaron los siguientes parámetros (Haralick *et al.*, 1973; Lepistö *et al.*, 2003):

a) Entropía de la imagen (E). Corresponde a la organización o aleatoriedad de los objetos en la imagen y se puede medir en función de la probabilidad de ocurrencia de píxeles, de tal forma que si éstos se encuentran distribuidos aleatoriamente (estado de desorganización mayor), el valor de E es alto; por el contrario, si los píxeles de los objetos contenidos en la imagen tienen un cierto nivel de organización, el valor de E disminuye.

b) Segundo Momento Angular. Mide la homogeneidad de una imagen. Cuanto más suave es la textura, mayor valor toma.

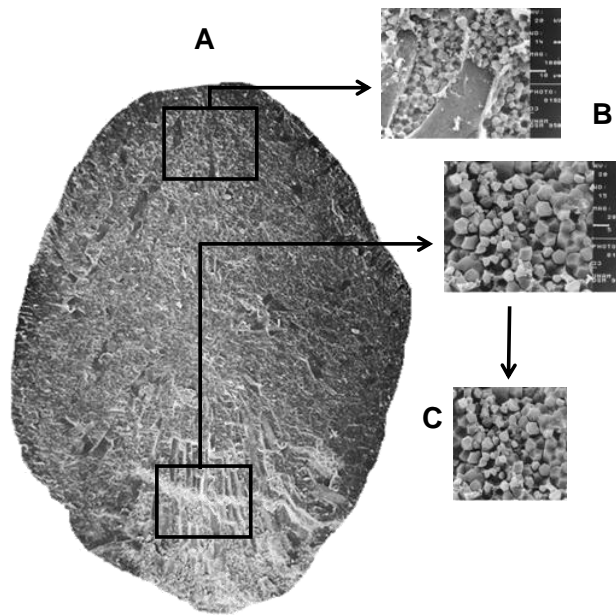


Figura 4.- A) Micrografía que muestra el corte transversal del grano de arroz Morelos A98 (40X); B) magnificaciones de 2000X y C) imagen transformada a 200 x 200 pixeles para evaluar la DF_T y los parámetros texturales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA DESCRIPTORES MORFOMÉTRICOS

Se llevó a cabo un análisis descriptivo para cada uno de los descriptores morfométricos con el programa Sigma Stat V. 3.5 (SPSS Inc, USA) que incluyó: promedio, mediana, desviación estándar, errores estándar, máximos y mínimos. Se efectuaron análisis de varianza de una vía y en el caso de obtener diferencias significativas ($P < 0.05$), se realizaron pruebas de comparaciones múltiples para cada descriptor, estas comparaciones se realizaron por semana y por intervalo.

DATOS CLIMÁTICOS

Con el fin de establecer el posible efecto de la temperatura ambiental en la formación de la MOB en la variedad Morelos A-98 durante la etapa de llenado del grano de arroz en campo, se obtuvieron los datos de temperatura máxima, mínima y promedio en el día; así como los de humedad relativa del 17 de septiembre al 28 de octubre del año 2007. Los datos fueron proporcionados por la estación meteorológica del propio CEZ – INIFAP.

RESULTADOS

En la figura 5 se aprecia una galería de imágenes, con las fotomicrográficas capturadas con microscopía óptica, más representativas de cada intervalo durante el llenado del grano.

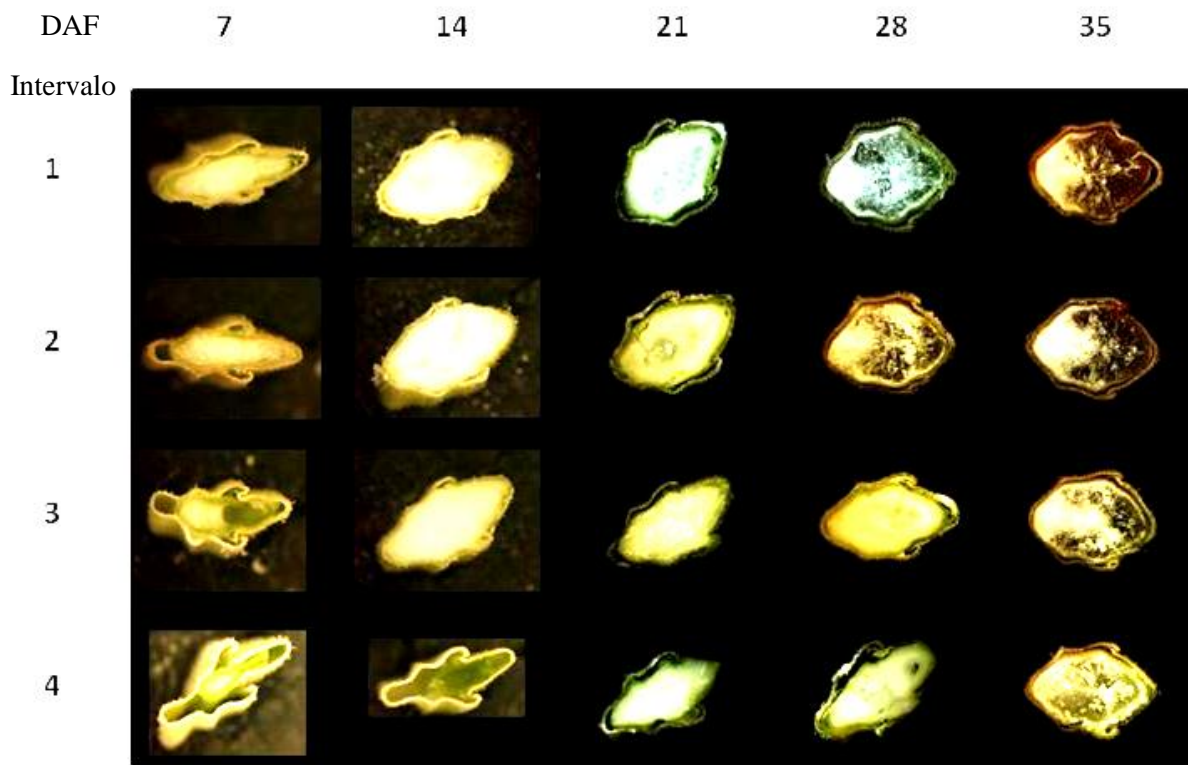


Figura 5.- Fotomicrografías obtenidas por MO de cortes transversales de granos de arroz variedad Morelos A-98 durante el llenado (7,14,21,28 y 35 DAF) para cada intervalo.

Se observa que para el día 7 después de antesis el grano presenta una consistencia de apariencia “*lechosa*”, llenando por completo el saco embrionario en los dos primeros intervalos, de forma incompleta en el intervalo 3 y en el intervalo 4 casi vacío. Se aprecia que, el tamaño de las brácteas se mantiene constante desde el inicio del llenado (longitud máxima), y que la forma que adoptan varía al transcurrir el llenado al ir ensanchándose por la parte que corresponde a la longitud mínima.

En el día 14 después de antesis se observa un aumento en el área de la sección transversal y un gradiente de llenado con respecto a los intervalos 3 y 4. Para el día 21 DAF se aprecia un estado “masoso” en la consistencia del endospermo, así como una leve contracción, posiblemente debido al inicio de la solidificación del almidón, el gradiente de llenado se mantiene en los intervalos 3 y 4. Al día 28 DAF se aprecia que el endospermo tiende a ser traslúcido, iniciando por la región periférica dorsal, permaneciendo opaca la región ventral, si bien en los intervalos 1 y 2 ya es posible apreciar la mancha opaca blanca, se observa un notorio desfase en los intervalos 3 y 4. Al día 35 DAF se aprecia la mancha opaca blanca en la región ventral y una región cristalina en la región dorsal, perfectamente delimitada en los intervalos 1 y 2, no definida completamente en el intervalo 3 y difusa en el intervalo 4.

Se aprecia que la forma de la sección transversal del grano es mas elíptica al descender por la panícula, mientras que al transcurrir el llenado la forma de la sección transversal del grano tiende a ser un círculo.

Con el fin de eliminar la subjetividad de las apreciaciones visuales, a continuación se presenta la evaluación de siete descriptores dimensionales y de forma, de la dimensión fractal y de dos parámetros texturales de los cortes transversales de arroz.

DESCRIPTORES MORFOMETRICOS DIMENSIONALES Y DE FORMA DE LOS CORTES TRANSVERSALES DEL GRANO

Una vez calculados los descriptores dimensionales y de forma de cada imagen capturada se efectuaron pruebas de comparación de medias para verificar la existencia del gradiente de desarrollo entre *intervalos* por cada día de muestreo (intervalo 1 con intervalo 2,3 y 4, intervalo 2 con intervalo 1, 3 y 4, y así sucesivamente para cada DAF) y por cada DAF de muestreo (el intervalo 1 del DAF 7 con el intervalo 1 del DAF 14, con el intervalo 1 del DAF 21, con el intervalo 1 del DAF 28 y el intervalo 1 del DAF35 y así para los cuatro intervalos). Los resultados de las comparaciones por *intervalo* se muestran en el Cuadro 1; mientras que los resultados de las comparaciones por DAF se presentan en el Cuadro 2. En ambos casos letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0.05$)

COMPARACIONES POR INTERVALO

Los valores de los descriptores morfo métricos dimensionales de Área y Perímetro (cuadro 1), disminuyen al descender por la panícula, es decir, numéricamente el área que presenta la sección transversal del grano es mayor en el intervalo 1 que en el intervalo 2, y a su vez el área del corte transversal del grano del intervalo 2 es mayor que el área del corte transversal del grano en el intervalo 3 y así sucesivamente. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los intervalos 1 y 2 pero sí entre los intervalos 3 y 4. Este gradiente de desarrollo se observa durante el transcurso del llenado y se mantiene incluso, al término del mismo.

En contraste el descriptor de longitud máxima, presentó la menor variación a lo largo de la panícula, registrando diferencias significativas únicamente con respecto al intervalo 4 en los días 14 y 28 después de antesis.

El Factor de forma disminuyó alejándose de la unidad ($Ff = 1$ es un círculo) al descender por la panícula, por el contrario, el Factor elíptico se aleja de la unidad aumentando al descender por la panícula, excepto en los días 7 y 4 DAF en que se observó un comportamiento ligeramente desordenado (aumenta y disminuye entre intervalos), aunque sin presentar diferencias significativas, que se estabilizó en el día 21 después de antesis.

El Factor de compacidad aumentó en el mismo sentido (al descender por la panícula); lo que dejó ver que que la foma más cercana a un círculo ($FC = 12.57$) se presentó en el intervalo 1 y la más alejada, que tiende a ser una elipse, se presenta en el intervalo 4, observándose la misma tendencia en todas las semanas.

COMPARACIÓN POR DAF

Los descriptores morfo métricos dimensionales de Area, Perímetro y Longitud mínima para un mismo intervalo (cuadro 2), tienden a aumentar conforme transcurre el llenado, excepto en la semana 3 que disminuyeron; es decir, el área del corte transversal del grano en el intervalo 1, en la semana 1, es menor que el área del corte transversal del grano en el intervalo 1 en la semana 2 y así sucesivamente. En contraste, la Longitud máxima no presentó diferencias significativas en los intervalos 1 y 2, pero sí en los intervalos 3 y 4 entre los días 7 y 14 así como entre los días 21 y 28.

El factor de forma y el factor elíptico tienden a la unidad al transcurrir el llenado, (aumenta y disminuye respectivamente); mientras que el factor de compacidad disminuye aproximándose al valor de 4π (12.57), en otras palabras, al transcurrir el llenado, la forma del corte transversal del grano tiende a un círculo; esta tendencia se observó en todos los intervalos, confirmándose así las apreciaciones visuales.

Cuadro 1.- Comparación por DAF, descriptores morfo métricos dimensionales y de forma de cortes transversales del grano de arroz

Mor A-98

DAF	Intervalo	Área ± ee	Perímetro ± ee	Fforma ± ee	Felíptico ± ee	LMax ± ee	Lmin ± ee	FC ± ee
7DAF	1	2.36 ± 0.41 a	8.95 ± 0.60 a	0.52 ± 0.05 a	2.91 ± 0.52 a	3.09 ± 0.15 a	1.09 ± 0.17 a	24.65 ± 2.74 a
	2	2.12 ± 0.52 a	8.81 ± 0.98 a	0.48 ± 0.07 b	3.02 ± 0.53 a	3.03 ± 0.32 a	1.03 ± 0.20 ab	26.59 ± 4.63 a
	3	1.71 ± 0.58 b	7.94 ± 1.33 b	0.47 ± 0.06 b	2.95 ± 0.51 a	2.69 ± 0.52 b	0.93 ± 0.20 bc	27.03 ± 3.18 a
	4	1.40 ± 0.50 b	7.07 ± 1.37 c	0.48 ± 0.05 b	2.76 ± 0.45 a	2.37 ± 0.50 c	0.87 ± 0.16 c	26.20 ± 2.81 a
14 DAF	1	3.73 ± 0.38 a	10.01 ± 0.55 a	0.67 ± 0.02 a	1.80 ± 0.15 a	3.11 ± 0.19 a	1.74 ± 0.14 a	18.75 ± 0.67 a
	2	3.56 ± 0.41 a	9.93 ± 0.53 a	0.66 ± 0.04 a	1.87 ± 0.14 a	3.16 ± 0.15 a	1.70 ± 0.14 a	19.23 ± 1.22 a
	3	3.24 ± 0.52 b	9.48 ± 0.50 b	0.65 ± 0.06 a	2.48 ± 0.65 b	3.13 ± 0.13 a	1.54 ± 0.20 b	19.63 ± 2.00 a
	4	1.99 ± 0.81 c	7.87 ± 1.46 c	0.57 ± 0.93 b	2.26 ± 0.40 b	2.56 ± 0.55 b	1.15 ± 0.29 c	22.73 ± 5.39 b
21 DAF	1	3.65 ± 0.41 a	9.66 ± 0.59 a	0.71 ± 0.05 a	1.78 ± 0.22 a	3.02 ± 0.23 a	1.72 ± 0.16 a	17.80 ± 1.37 a
	2	3.41 ± 0.55 a	9.62 ± 0.74 a	0.67 ± 0.07 b	2.00 ± 0.37 ab	3.09 ± 0.27 a	1.59 ± 0.24 ab	18.92 ± 1.94 a
	3	3.06 ± 0.99 b	9.33 ± 1.27 b	0.61 ± 0.13 c	2.16 ± 0.62 b	3.04 ± 0.44 a	1.47 ± 0.39 b	21.61 ± 5.71 b
	4	2.32 ± 0.91 c	8.46 ± 1.24 c	0.57 ± 0.11 d	2.49 ± 0.92 c	2.77 ± 0.40 b	1.21 ± 0.36 c	23.34 ± 7.37 c
28 DAF	1	4.56 ± 0.35 a	10.37 ± 0.46 a	0.79 ± 0.05 a	1.37 ± 0.07 a	2.95 ± 0.11 a	2.15 ± 0.10 a	16.00 ± 1.57 a
	2	4.50 ± 0.31 a	10.19 ± 0.32 ab	0.81 ± 0.03 a	1.41 ± 0.13 a	2.96 ± 0.11 a	2.10 ± 0.13 a	15.62 ± 0.55 a
	3	4.32 ± 0.77 a	9.99 ± 0.92 b	0.78 ± 0.04 a	1.46 ± 0.17 a	2.94 ± 0.25 a	2.05 ± 0.28 ab	16.09 ± 0.93 a
	4	3.61 ± 1.18 b	9.41 ± 1.26 c	0.71 ± 0.11 b	1.61 ± 0.27 b	2.83 ± 0.42 a	1.81 ± 0.41 b	18.49 ± 5.84 b
35 DAF	1	4.60 ± 0.36 a	10.27 ± 0.39 a	0.81 ± 0.03 a	1.38 ± 0.09 a	2.97 ± 0.12 a	2.16 ± 0.11 a	15.63 ± 0.69 a
	2	4.75 ± 0.22 a	10.36 ± 0.29 a	0.82 ± 0.02 a	1.37 ± 0.06 a	2.99 ± 0.09 a	2.19 ± 0.07 a	15.40 ± 0.33 a
	3	3.96 ± 1.20 b	9.66 ± 1.15 b	0.75 ± 0.12 b	1.55 ± 0.58 a	2.87 ± 0.22 b	1.92 ± 0.49 b	17.28 ± 4.12 b
	4	3.31 ± 1.35 c	8.94 ± 1.63 c	0.72 ± 0.12 b	1.78 ± 0.63 b	2.72 ± 0.40 b	1.69 ± 0.55 b	18.20 ± 4.00 b

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas (P<0.05), ee=error estándar, Area, Perímetro, LM y Lm en mm

Cuadro 2.- Comparación por intervalo, descriptores morfo métricos dimensionales y de forma de cortes transversales del grano de arroz Mor A-98

Intervalo	DAF	Área ± ee	Perímetro ± ee	Fforma ± ee	Felíptico ± ee	LMax ± ee	Lmin ± ee	FC ± ee
1	7DAF	2.36 ± 0.41 a	8.95 ± 0.60 a	0.52 ± 0.05 a	2.91 ± 0.52 a	3.09 ± 0.15 a	1.09 ± 0.17 a	24.65 ± 2.74 a
		3.73 ± 0.38 b	10.01 ± 0.55 b	0.67 ± 0.02 b	1.80 ± 0.15 b	3.11 ± 0.19 a	1.74 ± 0.14 b	18.75 ± 0.67 b
		3.65 ± 0.41 b	9.66 ± 0.59 c	0.71 ± 0.05 c	1.78 ± 0.22 b	3.02 ± 0.23 a	1.72 ± 0.16 b	17.80 ± 1.37 b
		4.56 ± 0.35 c	10.37 ± 0.46 d	0.79 ± 0.05 d	1.37 ± 0.07 c	2.95 ± 0.11 a	2.15 ± 0.10 c	16.00 ± 1.57 b
		4.60 ± 0.36 c	10.27 ± 0.39 d	0.81 ± 0.03 d	1.38 ± 0.09 c	2.97 ± 0.12 a	2.16 ± 0.11 c	15.63 ± 0.69 b
2	14DAF	2.12 ± 0.52 a	8.81 ± 0.98 a	0.48 ± 0.07 a	3.02 ± 0.53 a	3.03 ± 0.32 a	1.03 ± 0.20 a	26.59 ± 4.63 a
		3.56 ± 0.41 b	9.93 ± 0.53 b	0.66 ± 0.04 b	1.87 ± 0.14 b	3.16 ± 0.15 a	1.70 ± 0.14 b	19.23 ± 1.22 b
		3.41 ± 0.55 b	9.62 ± 0.74 b	0.67 ± 0.07 b	2.00 ± 0.37 b	3.09 ± 0.27 a	1.59 ± 0.24 b	18.92 ± 1.94 b
		4.50 ± 0.31 c	10.19 ± 0.32 c	0.81 ± 0.03 c	1.41 ± 0.13 c	2.96 ± 0.11 a	2.10 ± 0.13 c	15.62 ± 0.55 c
		4.75 ± 0.22 c	10.36 ± 0.29 c	0.82 ± 0.02 c	1.37 ± 0.06 c	2.99 ± 0.09 a	2.19 ± 0.07 c	15.40 ± 0.33 c
3	21DAF	1.71 ± 0.58 a	7.94 ± 1.33 a	0.47 ± 0.06 a	2.95 ± 0.51 a	2.69 ± 0.52 a	0.93 ± 0.20 a	27.03 ± 3.18 a
		3.24 ± 0.52 b	9.48 ± 0.50 b	0.65 ± 0.06 b	2.48 ± 0.65 b	3.13 ± 0.13 b	1.54 ± 0.20 b	19.63 ± 2.00 b
		3.06 ± 0.99 b	9.33 ± 1.27 b	0.61 ± 0.13 b	2.16 ± 0.62 c	3.04 ± 0.44 b	1.47 ± 0.39 b	21.61 ± 5.71 b
		4.32 ± 0.77 c	9.99 ± 0.92 b	0.78 ± 0.04 c	1.46 ± 0.17 d	2.94 ± 0.25 c	2.05 ± 0.28 c	16.09 ± 0.93 c
		3.96 ± 1.20 d	9.66 ± 1.15 b	0.75 ± 0.12 c	1.55 ± 0.58 d	2.87 ± 0.22 c	1.92 ± 0.49 c	17.28 ± 4.12 c
4	28DAF	1.40 ± 0.50 a	7.07 ± 1.37 a	0.48 ± 0.05 a	2.76 ± 0.45 a	2.37 ± 0.50 a	0.87 ± 0.16 a	26.20 ± 2.81 a
		1.99 ± 0.81 b	7.87 ± 1.46 b	0.57 ± 0.93 b	2.26 ± 0.40 b	2.56 ± 0.55 b	1.15 ± 0.29 b	22.73 ± 5.39 b
		2.32 ± 0.91 c	8.46 ± 1.24 c	0.57 ± 0.11 b	2.49 ± 0.92 b	2.77 ± 0.40 c	1.21 ± 0.36 b	23.34 ± 7.37 b
		3.61 ± 1.18 d	9.41 ± 1.26 d	0.71 ± 0.11 c	1.61 ± 0.27 c	2.83 ± 0.42 c	1.81 ± 0.41 c	18.49 ± 5.84 c
		3.31 ± 1.35 e	8.94 ± 1.63 e	0.72 ± 0.12 c	1.78 ± 0.63 c	2.72 ± 0.40 c	1.69 ± 0.55 c	18.20 ± 4.00 c

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($P < 0.05$), ee=error estándar, Area, Perímetro, LM y Lm en mm

DESCRIPTORES MORFOMETRICOS DIMENSIONALES Y DE FORMA DE LOS GRÁNULOS DE ALMIDÓN DE ARROZ VARIEDAD MORELOS A-98

En la figura 6 se aprecia una galería generada con las imágenes capturadas por microscopía electrónica, que ejemplifica los cambios en la morfo estructura del endospermo durante el llenado del grano. Las columnas representan los días después de antesis, mientras que las filas presentan la imagen del grano completo (A,D), la imagen capturada en la región dorsal del grano (B,E) y la imagen capturada en la region de la mancha opaca blanca (C,F), para los intervalos 1 y 3 respectivamente.

Visualmente se aprecia, que la formación de gránulos de almidón ha comenzado ya a los 7 días después de antesis; si bien en éste momento del llenado no fue posible identificar estructuras definidas, sí se observan diferencias entre las dos regiones a comparar; en la región cristalina (dorsal, figura 6, 7DAF, fila B) se aprecian gránulos de almidón, que en algunas regiones –esquina inferior izquierda- se encuentran cubiertos por la membrana del amiloplasto; mientras que la región de la mancha opaca blanca (ventral, figura 6, 7DAF, fila C) se observan lo que podría ser membranas rotas de los amiloplastos aún vacías.

En los días 14 y 21 después de antesis se aprecian gránulos de almidón con formas irregulares. Fue hasta el día 28 después de antesis que fue posible distinguir cuerpos geométricos definidos: poliédricos en la región cristalina (Figura 6 B y E) y cuerpos esféricos en la región de la MOB.

Estas diferencias se aprecian de forma clara en la figura 7.

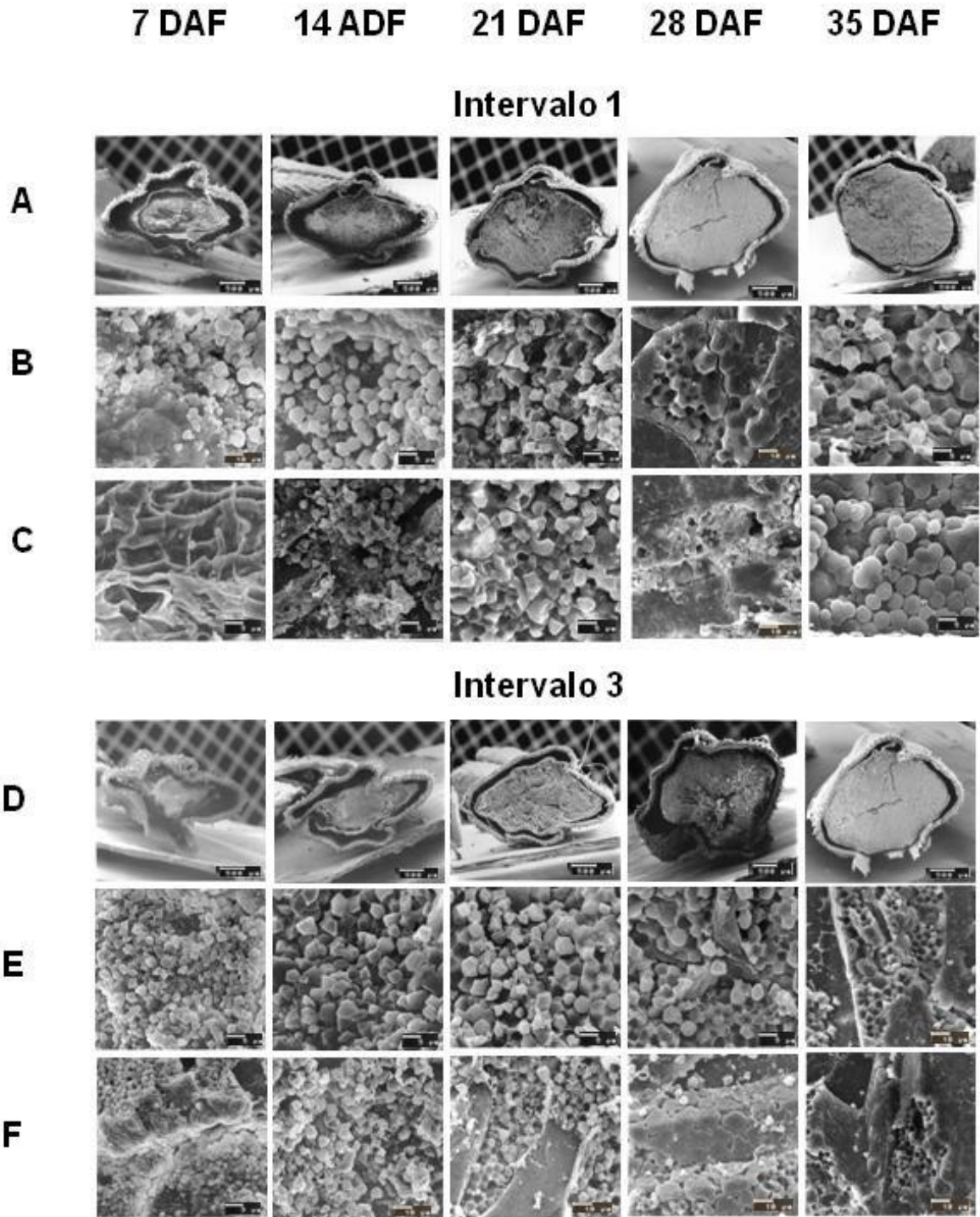


Figura 6.- Fotomicrografías obtenidas por MEB: A,D) corte transversal del grano magnificación 40x; B,E) región dorsal (cristalina) magnificación 2000x; C,F) región ventral (MOB) magnificación 2000x.

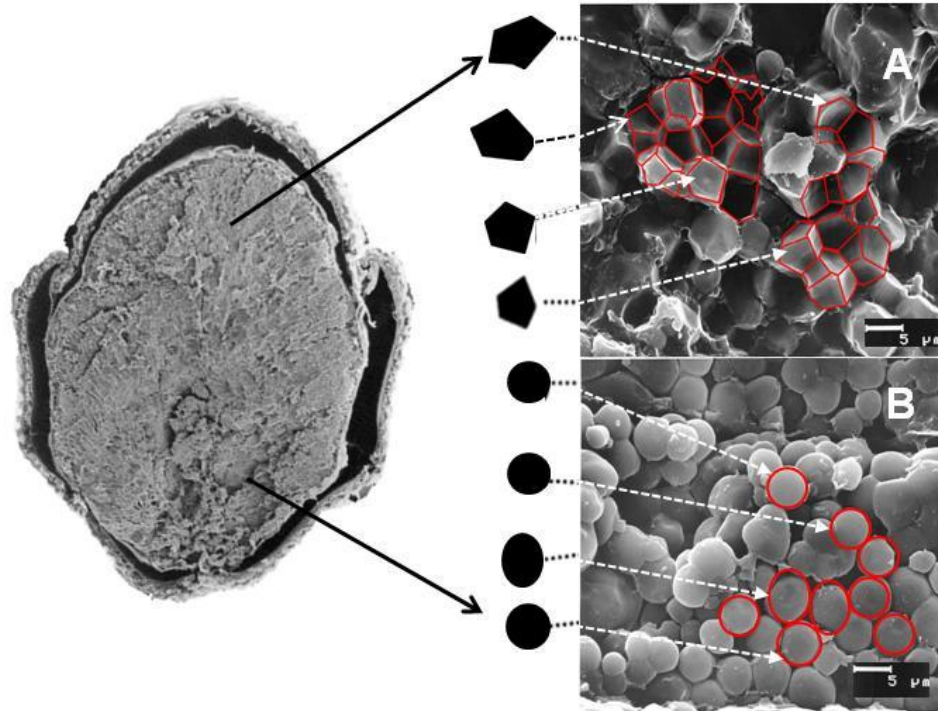


Figura 7.- Imágenes micrográficas de cortes transversales de: A) la región dorsal (cristalino) y B) la región ventral (MOB).

Con el objeto de eliminar la subjetividad de las apreciaciones visuales se evaluaron descriptores morfo métricos dimensionales y de forma de los gránulos de almidón de las imágenes obtenidas por MEB a los 7, 14, 21, 28 y 35 días después de antesis, para los intervalos 1 y 3. Los resultados se presentan en los cuadros 4 y 5, para la región dorsal (cristalina) y ventral (MOB) respectivamente.

Cuadro 3. Descriptores morfo métricos dimensionales y de forma de gránulos de almidón de la región dorsal (cristalina), variedad Morelos A-98.

DAF	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Lmax (μm)	Lmin (μm)	FF (adimens.)	FC (adimens.)	FE (adimens.)
Intervalo 1							
7	4.91±3.06	8.64±3.06	2.95±1.05	2.35±0.78	0.75±0.06	16.77±1.48	1.26±0.18
14	10.78±3.19	13.25±2.02	4.33±0.66	3.71±0.70	0.76±0.03	16.63±0.47	1.18±0.09
21	7.13±2.65	10.88±1.86	3.56±0.60	3.01±0.60	0.74±0.05	17.09±1.23	1.20±0.13
28	11.88±5.08	13.86±2.46	4.88±0.93	3.55±1.00	0.74±0.08	17.19±2.18	1.42±0.23
35	12.68±3.35	14.34±2.02	4.92±0.76	3.79±0.49	0.76±0.03	16.45±0.66	1.30±0.09
Intervalo 3							
7	2.87±1.03	6.96±1.21	2.38±0.45	1.87±0.40	0.72±0.07	17.50±1.89	1.29±0.13
14	6.19±2.80	10.02±2.34	3.29±0.76	2.74±0.76	0.74±0.04	16.94±0.97	1.22±0.14
21	6.13±2.36	10.18±2.30	3.42±0.66	2.70±0.67	0.73±0.08	17.50±2.19	1.29±0.17
28	6.17±1.51	10.20±1.49	3.42±0.42	2.73±0.51	0.74±0.05	17.08±1.18	1.29±0.24
35	9.79±4.92	12.39±3.24	4.22±1.05	3.46±0.94	0.76±0.04	16.50±0.97	1.24±0.17

En los cuadros 4 y 5 se observa que el mayor incremento en las dimensiones de los gránulos para los cuatro descriptores dimensionales se presentó entre los días 7 y 14 DAF para los dos intervalos; siendo esta diferencia mayor en el caso de los gránulos de la región ventral (MOB, Cuadro 5).

Así mismo, se observa que los gránulos de almidón de forma esférica presentes en la región de la MOB son de mayores dimensiones (A, P, LM y Lm) que los gránulos de forma poliédrica (región cristalina); esta relación se mantiene durante todo el llenado del grano hasta su finalización.

Los descriptores de forma evidenciaron cuantitativamente, que el área proyectada de los gránulos presentes en la región ventral (MOB) tiende más a ser circular, ya que los valores de FF son mayores (0.78-0.82) que los que presentan los gránulos de forma poliédrica (0.72-0.76) y tienden a uno (el valor de uno corresponde a un círculo perfecto); mientras que los valores del factor elíptico (FE) y el factor de compacidad (FC) son menores, es decir, el contorno del gránulo fue más liso y menos compacto que en los gránulos de almidón de la región dorsal.

Cuadro 4. Descriptores morfo métricos dimensionales y de forma de gránulos de almidón de la región ventral (MOB), variedad Morelos A-98.

DAF	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Lmax (μm)	Lmin (μm)	FF (adimens.)	FC (adimens.)	FE (adimens.)
Intervalo 1							
7	6.72±3.91	9.92±2.65	3.12±0.82	2.67±0.73	0.81±0.03	15.61±0.55	1.18±0.13
14	18.53±6.64	16.80±3.05	5.35±0.94	4.58±1.03	0.80±0.02	15.67±0.47	1.19±0.13
21	18.96±4.23	17.27±1.84	5.44±0.66	4.56±0.46	0.79±0.04	15.93±0.70	1.19±0.08
28	19.91±3.40	17.64±1.65	5.45±0.66	4.87±0.44	0.80±0.03	15.73±0.55	1.12±0.13
35	17.23±6.94	16.04±3.38	4.99±0.93	4.45±0.94	0.82±0.06	15.39±1.04	1.13±0.08
Intervalo 3							
7	3.80±1.73	7.67±1.77	2.50±0.66	1.97±0.44	0.78±0.04	16.15±0.93	1.27±0.21
14	8.10±2.59	11.17±2.11	3.48±0.66	3.02±0.52	0.80±0.05	15.74±0.90	1.15±0.07
21	9.13±3.59	11.94±2.34	3.80±0.72	3.10±0.67	0.78±0.05	16.22±1.07	1.23±0.08
28	11.61±3.05	13.54±1.83	4.17±0.51	3.67±0.55	0.79±0.04	16.03±0.89	1.15±0.10
35	14.54±3.63	15.13±2.06	4.68±0.69	4.01±0.40	0.79±0.06	15.95±1.07	1.17±0.13

DIMENSIÓN FRACTAL DE PERÍMETRO

Al evaluar la dimensión fractal de perímetro, se encontró que el contorno o borde de los cortes transversales del grano de arroz, era de naturaleza fractal ($D_{fp} > 1$) y que éste se modificaba al transcurrir el llenado como lo muestra la figura 8.

En este sentido, es importante señalar que este descriptor indica que tan liso o tan rugoso es el borde del objeto bajo estudio, en este caso, el contorno del corte transversal del grano de arroz. De esta manera si $D_{fp} \approx 1$ el objeto está contenido por un perímetro liso; por el contrario, si $D_{fp} < 1$, el perímetro de ese objeto es rugoso y por lo general mayor al área que contiene, suponiendo que el objeto presentara una geometría euclidiana (Olsen, 1993; Kenkel y Walker 1996; Valenzuela *et al.*, 2007).

Nótese en la figura 8 que el valor de D_{fp} disminuye al transcurrir el llenado (D_{fp} del día 7 $>$ D_{fp} del día 14 etc.) tendiendo a la unidad, por lo que el borde de la sección transversal del grano se iba haciendo menos rugoso –se alisa el contorno–.

En relación a la posición en la panícula; se observó que la D_{fp} aumentó al bajar por la panícula; es decir la D_{fp} del intervalo 1 fue menor que la del intervalo 2, y la D_{fp} del intervalo 2 fue a su vez menor que la del intervalo 3 y así sucesivamente. De tal manera que los grános del ápice presentan un borde más liso (menor D_{fp} que tiende a la unidad) que los granos presentes en la base de la panícula.

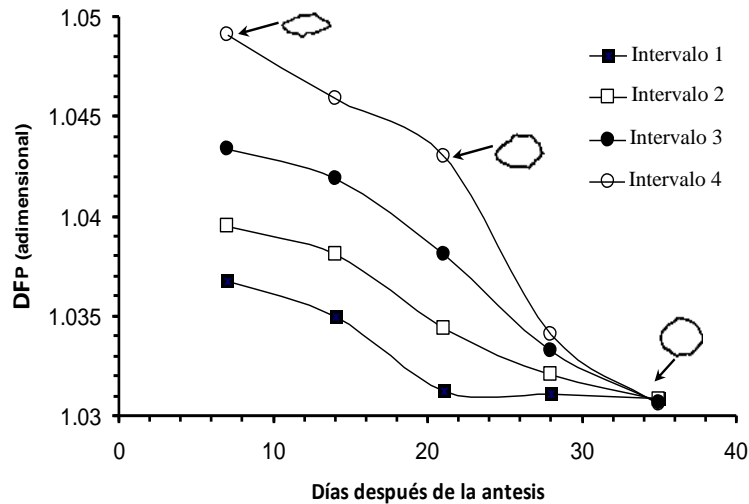


Figura 8.- Evolución de la dimensión fractal de perímetro (Dfp) durante el llenado y maduración del grano de arroz Morelos A-98. Los objetos representan el contorno (perímetro) binarizado de la micrografía de MO (3X) del corte transversal del grano.

DIMENSIÓN FRACTAL DE ÁREA

En la figura 9 se muestra que a la dimensión fractal de área aumenta al transcurrir el llenado del grano, es decir la Dfa del 7 DAF < Dfa del 14 DAF < Dfa 21 DAF y así sucesivamente hasta llegar a su valor máximo en el 35 DAF.

En lo que respecta a la posición del grano en la pánicula se observó que la Dfa fue mayor en los granos presentes en la región del ápice en todos los DAF considerados.

De tal manera que, como se muestra en la figura 9, al transcurrir el llenado del grano y al subir por la panícula el área transversal del grano tiende a ocupar más el plano y por lo tanto a ser menos irregular.

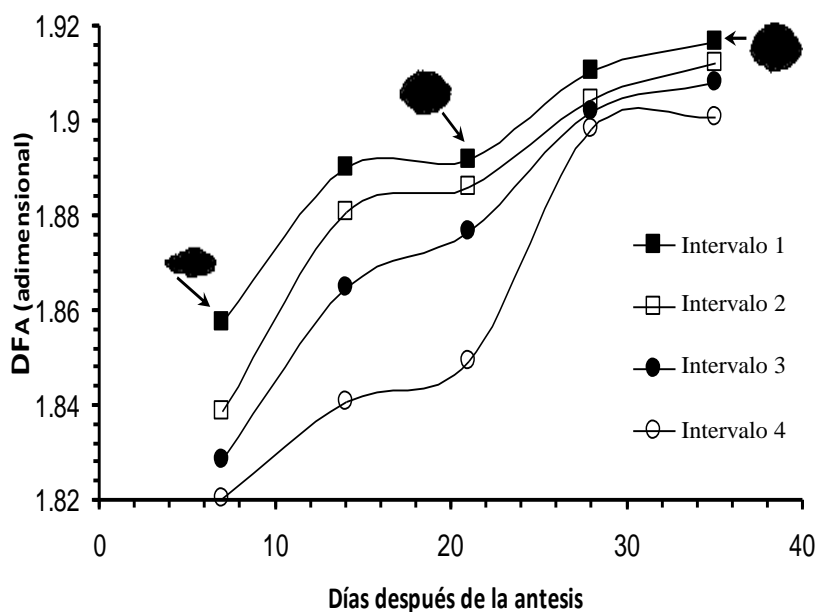


Figura 9.- Evolución de la dimensión fractal de área (Dfa) durante el llenado y maduración del grano de arroz Morelos A-98. Los objetos representan el área proyectada binarizada de la micrografía de MO (3X) del corte transversal del grano.

DIMENSIÓN FRACTAL DE TEXTURA TOPOGRÁFICA

La dimensión fractal de textura (Dft) es la medida de la irregularidad de una imagen; por lo tanto valores altos implican una superficie mas tortuosa y compleja, ya que una $Dft = 2$ representa una superficie lisa, mientras que si la $Dft > 2$ se trata de una superficie rugosa con una mayor superficie que tiende a ocupar un volumen.

En la Figura 10 se presenta la tendencia de la Df_t evaluada para el intervalo 1, se puede observar que la Df_t es menor en la región ventral (MOB) del endospermo que en la región dorsal (cristalina) incrementándose durante la primera mitad del llenado, llegando a su valor máximo en el día 21 y disminuyendo posteriormente; mientras que para la región dorsal (cristalina) la Df_t disminuye al transcurrir el llenado.

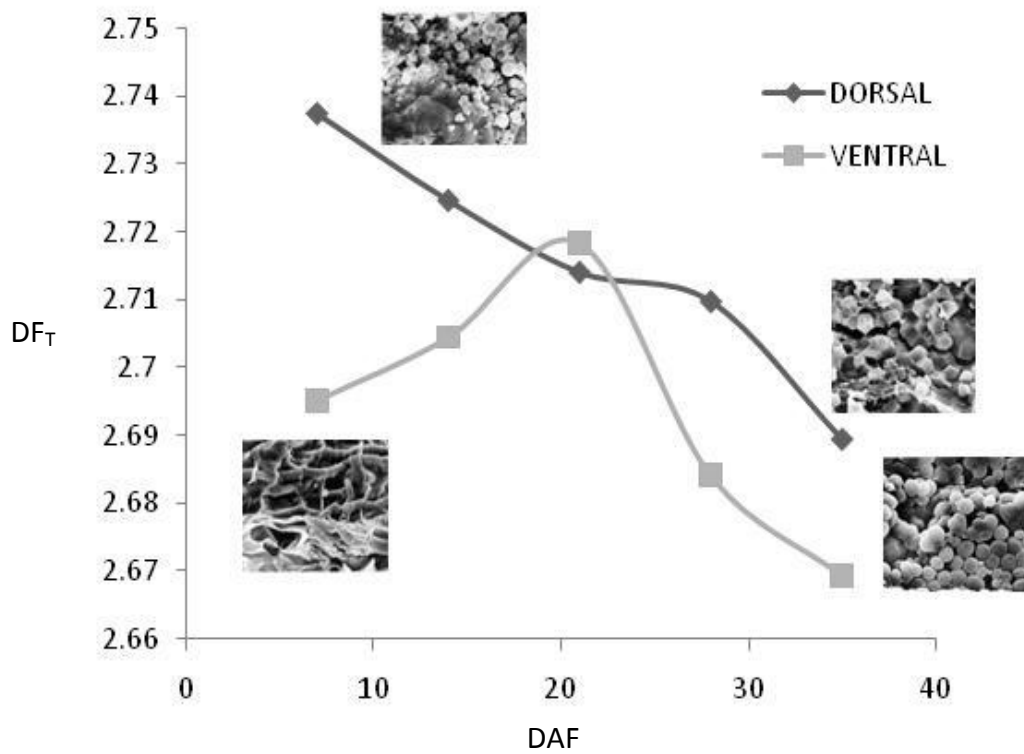


Figura 10.- Dimensión fractal de textura para el intervalo 1.

En la figura 11 se presenta la Df_t para el intervalo 3, se puede observar que la Df_t de la región dorsal disminuye al transcurrir el llenado, mientras que para la región ventral se presentó un incremento sostenido durante la primera mitad del llenado, llegando a su máximo valor el 21 DAF, comenzando a disminuir hasta llegar al valor mínimo de Df_t en el 35 DAF.

Lo que indica que, tanto para el intervalo 1 como para el intervalo 3, al transcurrir el llenado la superficie del corte transversal del grano tiende a compactarse y hacerse más lisa.

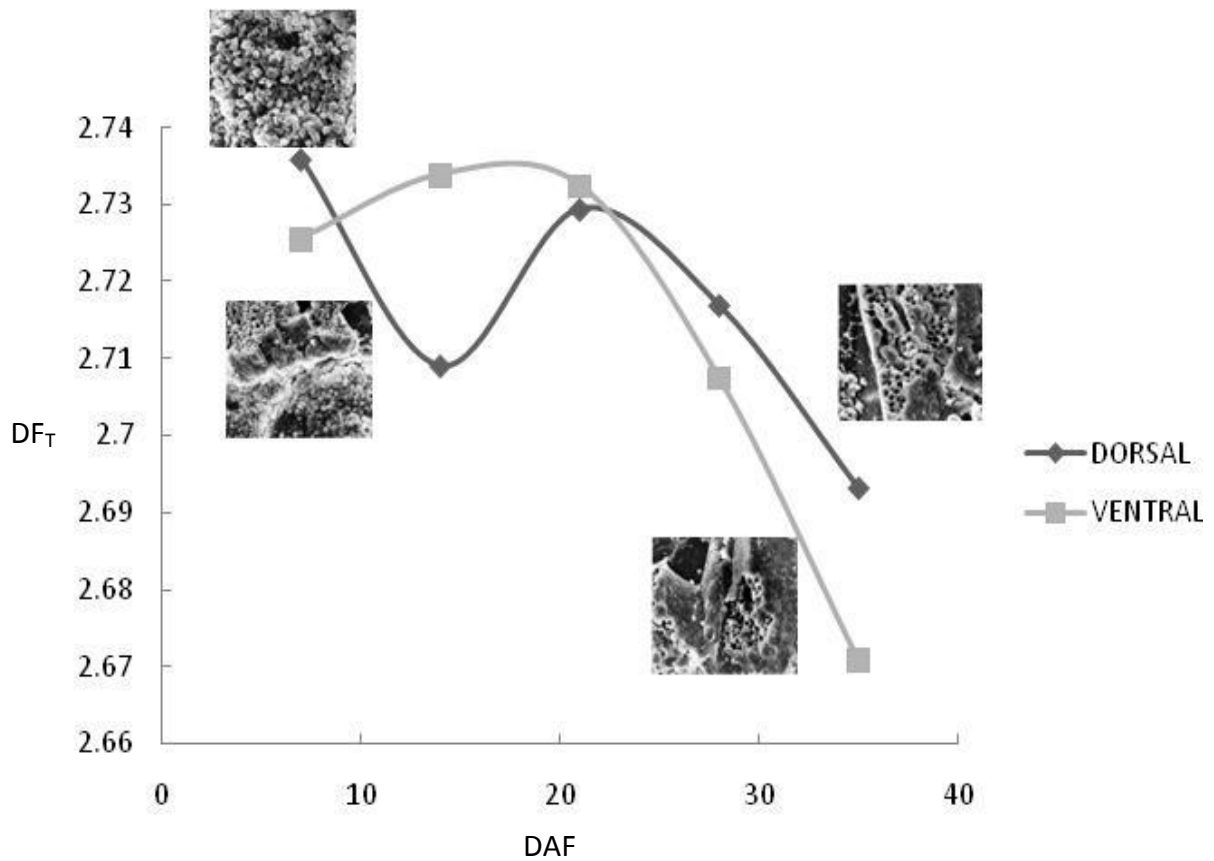


Figura 11.- Dimensión fractal de textura para el intervalo 3.

PARÁMETROS TEXTURALES

Los parámetros texturales de las fotomicrografías capturadas por MEB de los cortes transversales de los granos de arroz Morelos A-98 mostraron cambios en la estructuración del endospermo durante el transcurso del llenado, tanto para la región dorsal como para la región ventral. En la Figura 12 se muestra en forma de gráfica de barras que el mayor valor entrópico y por ende el de mayor irregularidad estructural, se presentó al inicio del llenado del grano (estado “lechoso”) en la región dorsal (Figura 12 A); ligeramente mayor en la región dorsal que en la ventral.

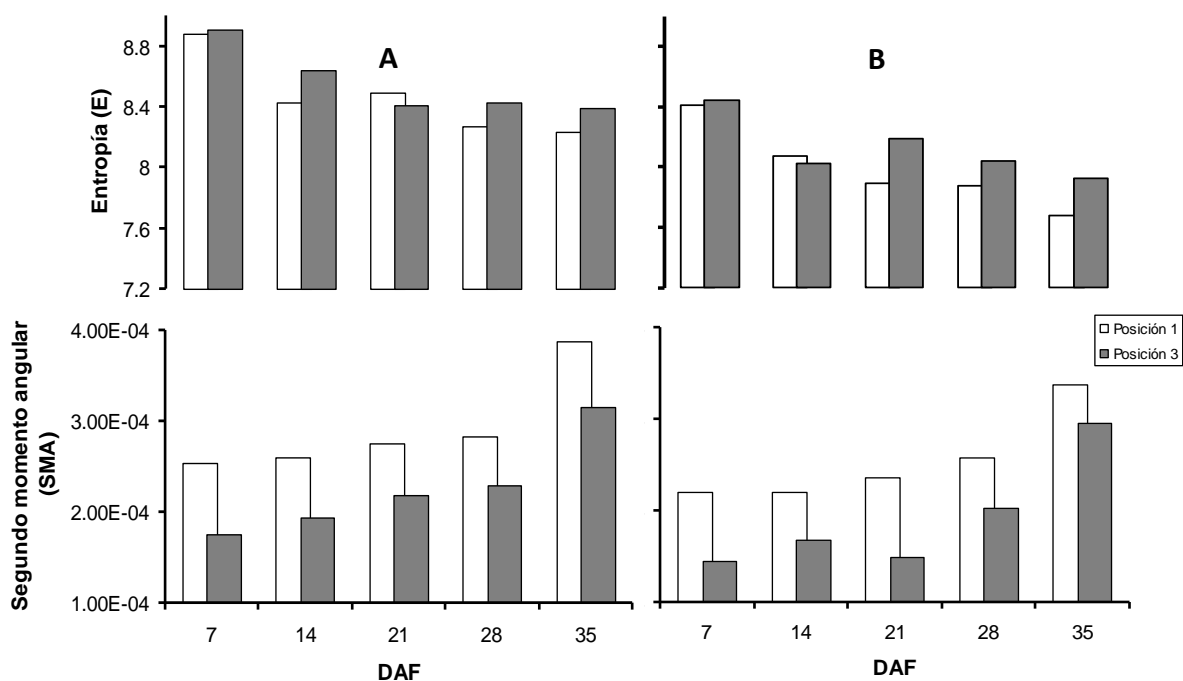


Figura 12.- Parámetros texturales de las micrografías electrónicas (x2,000), correspondientes al desarrollo de la estructura del endospermo del grano de arroz Morelos A-98: (A) región dorsal y (B) región ventral.

Por el contrario, el segundo momento angular presentó el menor valor al inicio del llenado, registrándose diferencias entre las diferentes posiciones en la panícula, en las que la posición 1 tiende a alcanzar más rápidamente una estructura ordenada con relación a la posición tres.

El nivel de organización/desorganización estructural parece estabilizarse a partir del día 21 alcanzando el mayor valor del segundo momento angular cuando el grano está completamente seco.

Por lo que respecta a los parámetros texturales de la región ventral (Figura 12 B) el comportamiento fue similar a los de la región dorsal, aunque los valores de E y SMA fueron menores; este aspecto indica que, aunque existe una tendencia a una organización estructural de la región ventral, ésta alcanza un valor menor que la del endospermo cristalino.

EFEECTO DE LA TEMPERATURA

En la figura 13 se muestra una gráfica construida a partir de los valores de temperatura máxima, mínima y promedio así como la humedad relativa promedio registrados durante el período de llenado del grano. Entre los días 14 y 28 DAF la humedad relativa osciló entre 76.3 y 78.2% (promedio de $76.2 \pm 1.3\%$), la temperatura máxima entre 30.5 y 2.1°C (promedio de 31.2 ± 0.7) y la temperatura mínima entre 15.5 y 17.5 °C (promedio de $16.3 \pm 0.7^\circ \text{C}$); es decir, se mantuvieron sin cambios significativos.

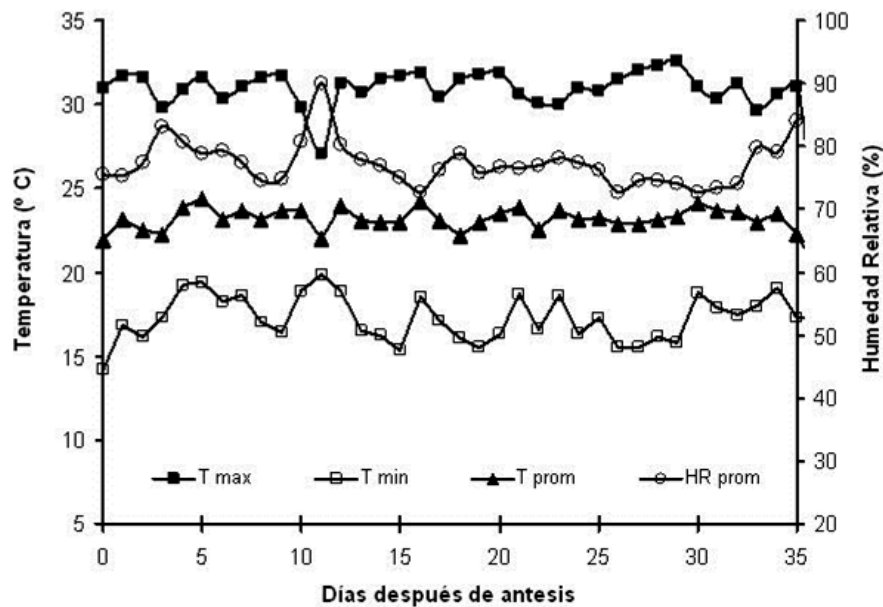


Figura 13.-Temperatura y humedad relativa registradas durante el llenado del grano de arroz Morelos A-98

DISCUSIÓN

La velocidad relativa de crecimiento del grano -el incremento en las dimensiones de perímetro y área- fue mayor en los primeros 14 días después de la floración con respecto a la observada entre los días 28 y 35 DAF; este patrón, aparentemente desordenado, coincide tanto con la finalización de la acumulación acelerada de proteínas y lípidos, como con el término de la división celular y de la expansión del endospermo (Ogawa *et al.*, 2001).

Está bien documentado el hecho de que la síntesis del almidón comienza alrededor del día 9 o 10 después de la antesis (He *et al.*, 1989; Kobata *et al.*, 2000); sin embargo, en este trabajo, las fotomicrografías obtenidas por microscopía electrónica revelaron que en el caso del arroz variedad Morelos A-98 la síntesis de almidón podría haber iniciado ya, para el día 7 después de antesis, debido a que se observó la presencia de gránulos de forma irregular

inmersos en una matriz líquida en la región dorsal del grano; este gradiente de desarrollo, que se presenta entre las dos regiones del endospermo (dorsal – ventral) podría estar asociado al transporte de fotosintatos; a este respecto se ha reportado, que al inicio del llenado del grano, los fotosintatos son transportados a través de las células del saco embrionario primeramente hacia las células del endospermo de la región dorsal y de ahí comienzan a migrar hacia la región ventral (He *et al.*, 1989; Livore 2000).

Llama la atención el hecho de que en el día 21 DAF se observó una ligera disminución en los descriptores morfométricos dimensionales de forma en todos los intervalos. Esta particularidad coincidió con el corte del suministro de agua de riego (día 20 DAF) dando inicio a la solidificación acelerada del endospermo al disminuir del contenido de humedad del grano (Umemoto *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2005).

En este momento del muestreo (21 DAF) se observó un incremento en el tamaño de los gránulos de almidón, presentando una forma más definida y diferenciable entre las dos regiones: esférica para la región ventral (MOB) y poliedrica para la región dorsal. Además de un arreglo estructural más compacto y una aparente mayor densidad de empaquetamiento.

En este sentido, Singh *et al.* (2003) y Patindol y Wang (2003) reportaron observaciones similares, en la conformación y morfoestructura de gránulos de almidón presentes en harina extraída de granos completos con MOB (gránulos de forma esférica), y de granos con endospermo completamente cristalino (gránulos de forma poliedrica). Por su parte Ishimaru *et al.* (2009) observaron amiloplastos pobremente empaquetados y con numerosos espacios de aire entre sí, en el área central del endospermo donde se presentó la MOB en cortes transversales de granos sometidos a condiciones de temperatura elevada.

Se ha documentado (Livore, 2000) que la acumulación de almidón se presenta de forma centrífuga, iniciando por las células del centro del endospermo que son las que se forman primero; por lo que a los 15 DAF éstas células están completamente llenas de gránulos de almidón mientras que las externas aún continúan con el proceso de llenado, presentándose gránulos de tamaño pequeño en las células externas y gránulos de gran tamaño en las células internas.

En este sentido Kawagoe *et al.*, 2005 reportaron amiloplastos de menor tamaño en las capas exteriores del endospermo; lo que sugiere que los amiloplastos de las capas internas crecen rápidamente después de la división celular, y que no todos los gránulos crecen a la misma velocidad.

En el caso del arroz variedad Morelos A-98 se observó que los gránulos de la región ventral son de mayor tamaño que los gránulos de forma poliedrica de la región dorsal; por lo que en este caso la diferencia en la morfología de los gránulos no podría atribuirse a un llenado “deficiente”, dado que los gránulos de mayor tamaño se encuentran localizados en la región ventral y no en la región central del endospermo.

De acuerdo a las micrografías capturadas en esta etapa del desarrollo (21 DAF), los componentes del endospermo pasan de ser un fluido (estado “lechoso”) a un semisólido pastoso (estado de “masa suave”), debido al aumento en la concentración de asimilados asociado al movimiento y pérdida por evaporación del agua, en el proceso normal de maduración del grano (Funaba *et al.*, 2006). Es en este punto, cuando el endospermo comienza a solidificarse y a formar el área cristalina, dado que el movimiento de asimilados está asociado con el transporte de agua en el grano (Funaba *et al.*, 2006).

Los tres descriptores de forma evaluados en este trabajo dejan ver, que al transcurrir el llenado, la sección transversal del grano va adquiriendo una forma menos elíptica; en este sentido, se sabe que el patrón de acumulación de asimilados en el grano de arroz se presenta distribuido uniformemente en todo el grano en los primeros días después de anthesis (Ogawa *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2005), llenando así el saco embrionario que tiene una forma elíptica (FE elevado), pero sin ejercer presión en las paredes de éste; posteriormente la acumulación de almidón ocurre del centro hacia las capas periféricas formando capas concéntricas (He *et al.*, 1989), incrementando la presión hacia las paredes del saco embrionario (presión de turgencia) con lo que el borde se alisa (disminuye la dimensión fractal de perímetro) y en el que además, disminuye el contenido de humedad (Cheng *et al.*, 2005; Funaba *et al.*, 2006); lo que en su conjunto estaría dando como consecuencia que tomara una forma más redonda (incremento en FF).

El incremento del alisamiento en el borde se estabiliza a partir del día 21 observándose una mayor homogeneidad en los valores de la D_{fp} en los días 28 a 35.

Es importante señalar que las cinéticas obtenidas tanto para D_{fp} como para D_{fa} siguieron un comportamiento no lineal complejo, encontrándose una dispersión del tipo de Ley de la Potencia cuyos exponentes (D_{fp} y D_{fa}) son fraccionarios característica de la migración de sustancias, en este caso la deposición de asimilados y la biosíntesis del almidón, que ocurre en procesos de estructuración (Waliszewski y Konarski, 2001).

Los resultados de la dimensión fractal fueron similares a los reportados para otros sistemas biológicos, tales como la morfología de plantas, crecimiento del micelio en hongos (Papagianni, 2006), crecimiento de células vegetales (Jiménez, 2005), procesos de agregación

de glóbulos rojos en sangre (Kang *et al.*, 2000), actividad angiostática de fitomedicamentos (Guidolin *et al.*, 2004) entre otros; cuyas D_{fp} se encontraban entre 1.02 y 1.06, mientras que las DF_A eran de 1.7 a 1.9.

Por otra parte el desfaseamiento en el llenado de granos de una misma panícula sugiere un patrón de llenado asíncrono muy marcado en los primeros días después de la antesis, y que se mantiene hasta el final del llenado; es decir, la acumulación de los materiales del endospermo se efectuó del ápice (intervalo 1) a la base (intervalo 4).

Lo anterior puede atribuirse, al patrón en que se efectúa la polinización (del ápice a la base) reportado por Myers, 2004; y que daría como consecuencia un posible patrón en que ocurre la síntesis de almidón; en este sentido, Mohapatra *et al.* (2009) reportaron que la actividad de las enzimas responsables de este proceso, (ADP-glucosa pirofosforilasa (AGP), almidón sintasa (SS) y sus diversas isoformas), se presentaba de manera más temprana y era mayor en los granos ubicados en la región apical que en aquellos que estaban en la parte basal de la panícula; coincidiendo con los cambios observados para A y P.

Por su parte Cheng *et al.* (2007), al caracterizar diversas variedades de arroz, encontraron que las variaciones observadas dependían de la posición del grano en la panícula y que estaba relacionado con la actividad de las enzimas SS y AGP.

Los parámetros texturales entropía y segundo momento angular mostraron la generación de una estructura compacta y ordenada del endospermo al transcurrir el llenado; en este sentido se observó una mayor organización estructural en la región dorsal que en la ventral lo cual podría estar asociado a la dureza del endospermo, es decir, a un menor nivel de

organización estructural, el endospermo tiende a ser menos duro y más susceptible a quebrarse (Tamaki *et al.*, 2006).

Cabe señalar que las propiedades mecánicas (dureza), las características texturales y de organización estructural del endospermo de arroz están dadas en gran medida, por la morfometría de los gránulos de almidón para las distintas regiones (dorsal y ventral), la densidad de empaquetamiento y los espacios de aire ocluidos que se forman durante el secado del grano (Singh *et al.*, 2003; Hee-Jin *et al.*, 2006).

Finalmente, en base a lo anterior se propone un modelo descriptivo para el llenado del grano de arroz variedad Morelos A-98 que se muestra en la figura 14.

Dado que no se presentaron cambios drásticos en las condiciones de temperatura (especialmente temperaturas nocturnas elevadas) y humedad relativa en el período de muestreo del presente trabajo de investigación, no es posible afirmar que en el caso del arroz variedad Morelos A-98, la presencia de la MOB sea consecuencia de un llenado defectuoso que genere estados no uniformes de maduración atribuible a la temperatura (Umemoto *et al.*, 1995 y Cheng *et al.*, 2005).

Derivado del trabajo desarrollado en este capítulo se propone un modelo descriptivo del llenado del grano de arroz variedad Morelos A-98, que se presenta en la figura 14.

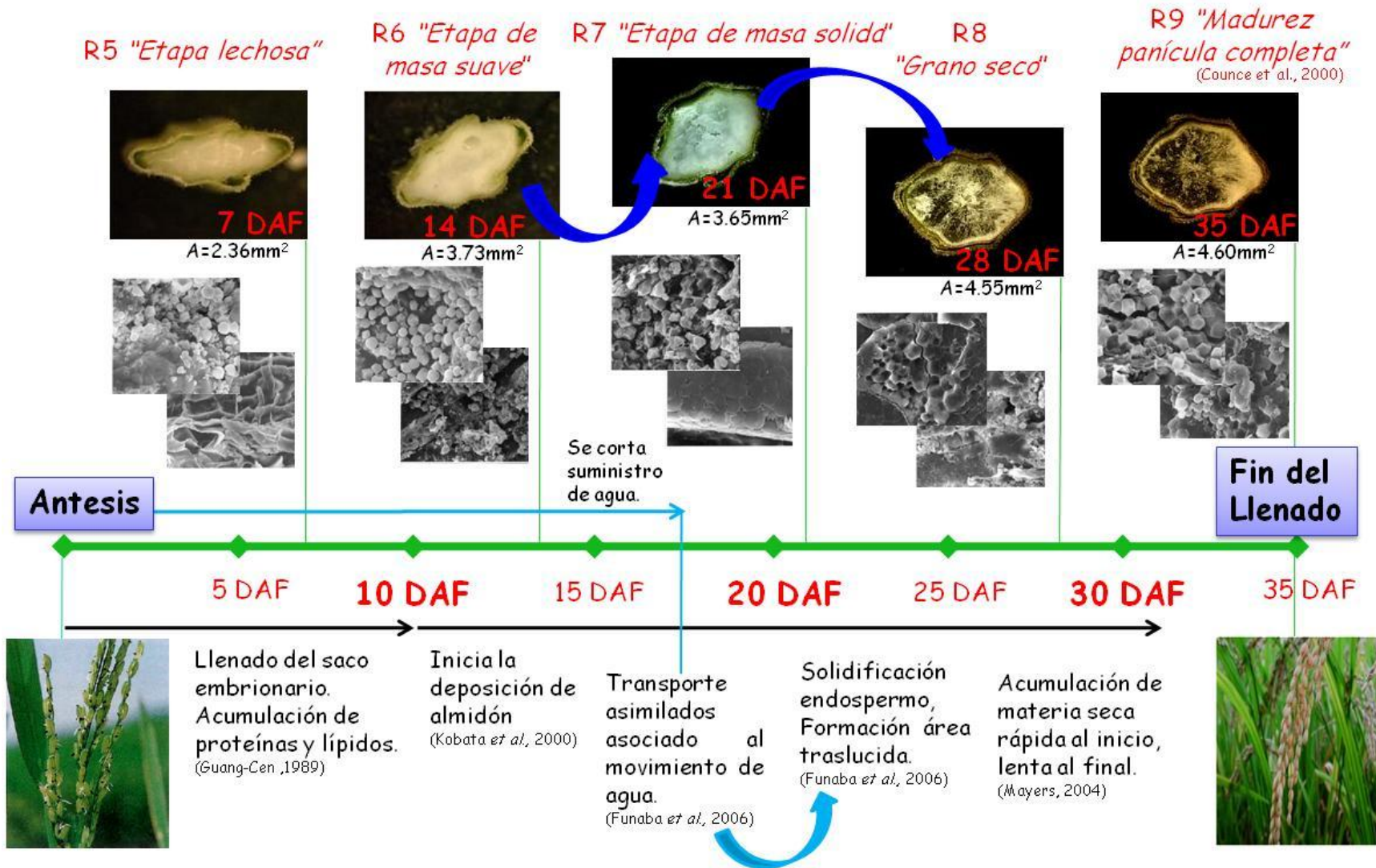


Figura 14.-Modelo descriptivo del llenado del grano de arroz variedad Morelos A-98

CONCLUSIONES

Los descriptores morfo métricos evaluados y la dimensión fractal de perímetro, área y textura, así como los parámetros texturales, corroboran que el llenado del grano de arroz de la variedad Morelos A-98 se presenta de forma acelerada durante los primeros 14 días después de antesis. Tendiendo a la formación de una estructura con mayor nivel de organización.

El desarrollo de la panícula presenta un patrón asíncrono de llenado, siendo este mayor en la región del ápice, muy marcado durante los primeros 21 DAF, disminuyendo en los días 28 y 35, pero manteniéndose hasta el término del llenado.

El corte en el suministro de agua entre los días 15 y 20 después de antesis favorece el proceso de solidificación del endospermo.

Los resultados de los descriptores dimensionales (área y perímetro), adimensionales (factor de forma y elíptico) y de dimensión fractal (perímetro, área y textura) de los cortes transversales del grano de arroz variedad Morelos A-98, indican que durante el llenado del grano su morfología se modificó significativamente pasando de una forma elíptica y con bordes sinuosos al inicio del llenado a una forma circular, bordes alizados, con una superficie más compacta y lisa al final del mismo.

Se observó una morfoestructura diferente entre las dos regiones analizadas del endospermo, presencia de gránulos de almidón de forma poliedrica, densamente empacados dentro de amiloplastos, reportando un mayor nivel de organización estructural en la región

dorsal o cristalina del endospermo; en contraste con un menor nivel de organización en la región ventral o de la MOB del endospermo, con la presencia de gránulos de almidón de forma esférica pobremente empacados con presencia de espacios de aire entre sí. Esta particularidad podría estar asociada a un endospermo quebradizo y más susceptible a quebrarse característica de endospermos yesosos.

Este trabajo se llevó a cabo empleando geometría euclidiana (descriptores morfométricos dimensionales y de forma) y geometría fractal (dimensión fractal de perímetro, de área y de textura topográfica), ambas técnicas se complementan, ya que la primera suministra información referente a la velocidad relativa de crecimiento (aumento en sus dimensiones), así como la evolución en la forma: de una elipse a un círculo (figura geométrica euclidiana). Por otra parte la geometría fractal permite cuantificar la irregularidad, en este caso el alisamiento del borde que de alguna manera en el caso muy particular del endospermo de arroz, se asocia a la presión de turgencia que experimenta éste durante el llenado.

El uso de la geometría euclidiana por la humanidad tiene más de 2000 años, la geometría fractal apenas 40 años, el conocimiento y sus aplicaciones son aun incipientes, este trabajo presenta una aplicación más para ella y demuestra que puede complementar a la geometría euclidiana, al ir más allá en la explicación de procesos naturales.

Finalmente, no se encontró ningún efecto en la morfo estructura del grano como producto de la temperatura y humedad relativa (todos los granos analizados presentaron MOB); dado que estos parámetros se mantuvieron sin cambios significativos, además de

que las temperaturas máximas fueron registradas durante el día (entre las 12 y 17 horas) y no por la noche, situación que es determinante cuando la presencia de MOB es atribuible al efecto de la temperatura.

Como producto de este trabajo de investigación se generó el artículo **“Morpho structural characterization during rice (*Oryza sativa* L.) grain filling of “Morelos A98” variety.”** Aceptado (in press) en la revista *The Scientific World Journal*.

El artículo completo se presenta en el anexo 1 de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Alamilla-Beltrán L., Chanona-Pérez J., Jiménez-Aparicio A., Gutiérrez-López G. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67: 179-184.
- Baldwin P. 2001. Starch granule – associated proteins and polypeptides: a review. *Starch*. 53 : 475 – 503.
- Bao J., Sun M., Corke H. 2007. Analysis of genotypic diversity in starch termal and retrogradation properties in nonwaxy rice. *Carbohydrate Polymers* 67 : 174–181.
- Biswas M., Ghose T., Guha S., Biswas P. 1998. Fractal dimension estimation for texture images: a parallel approach. *Pattern recognition letters*. 19 : 309 – 313.
- Bozzola J., Ruseell L. 1999. *Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlet Publishers. pp:49 – 70.
- Brosnan T., Sun D. 2002. Inspection and grading of agricultural and food products by computer vision systems a review. *Computers and electronics in agriculture*. 36:193 – 213.
- Brosnan T., Sun D. 2004. Improving quality inspection o food products by computer vision - a review. *Journal of Food Engineering*. 61 : 3 - 16.

- Cao q., Li b., Song z., Cai x., Lu b. 2007. Impact of weedy rice populations on the growth and yield of direct-seeded and transplanted rice. *Weed Biology and Management* 7 : 97–104.
- Counce P., Keisling T., Mitchell A. 2000. A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. *Crop Science*. 40:436–443.
- Chakraborti R , Gardner K., Atkinson J., Van Benschoten E. 2003. Changes in fractal dimension during aggregation. *Water Research* 37: 873-883.
- Champagne E., Wood D., Juliano B., Bechtel D. 2004. The rice its gross composition. in *Rice, 3rd et.*; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 77 - 106.
- Chanona P., Alamilla B., y Gutiérrez, G. 2001. Caos y geometrías de fractales, herramientas auxiliares para evaluar la complejidad del entorno biológico. *BioTecnología* 5: 117 – 125.
- Cheng F., Zhong L., Zhao N., *et al.* 2005. Temperature induced changes in the starch components and biosynthetic enzymes of two rice varieties. *Plant Grow Regulation*. 46 : 87 – 95.
- Cheng F., Liu Y., Liu Z., Zhao N., Wang F., Zhang Q., Zhang G. 2007a. Positional variations in chalky occurrence within a rice panicle and its relation to grain nutritional quality. *Australian Journal of Agricultural Research*. 58 : 95 – 103.

- Cheng F., Zhang G., Zhu N., Zhao N., Wang F., Chen G., Zhang G., 2007. The difference in amylose content within a panicle as affected by the panicle morphology of rice cultivars. *Journal of Cereal Science*. 46 : 49 – 57.
- Childs, N. 2004. Production and utilization of rice. In *Rice*, 3rd ed.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 1 – 23.
- Czuchajowska D., Sievert D. And Pomeranz Y. 1991. Enzyme-resistant starch IV. Effects of complexing lipids. *Cereal Chemistry*. 68 : 537 – 542.
- Dalen, G., 2004 Determination of the size distribution and percentage of broken kernels of rice using flat bed scanning and image analysis. *Food Research International*. 37 : 51 – 58.
- Davies, E., 2000 *Image Processing for the Food Industry*. Series in Machine Perception And Artificial Intelligence Vol 37. Ed. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapur.
- Dubey B., Bhagwat S., Shouche S., *et al.* 2006. Potential os artificial neural networks in varietal identification using morphometry of wheat grains. *Biosystems Engineering*. 95 : 61 –67.
- Emadzadeh B., Razavi S., Ferehmandfar R. 2010. Monitoring geometric characteristics of rice during processing by image analysis system and micrometer measurement. *International Agrophysics*. 24 : 21 - 27.

- Fan J., Marks B. 1999. Effects of Rough Rice Storage Conditions on Gelatinization and Retrogradation Properties of Rice Flours. *Cereal Chemistry*. 76 : 894–897.
- Fernández L., Castellero C., Aguilera J. 2005. An application of image analysis to dehydration of apple discs. *Journal of Food Engineering*. 67 : 185 – 193.
- Fitzgerald M. 2004. Starch. In Rice, 3rd ed.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 109 - 141.
- Fitzgerald M., Susan R., McCouch., Hall R. 2009. Not just a grain of rice: the quest for quality. *Trends in Plant Science* 14 : 133 – 139.
- Franquet J. y Borràs C. 2004. Variedades Y Mejora Del Arroz (*Oryza sativa*, L.). Universitat Internacional de Catalunya. Escola Universitària de Ciències Experimentals i Tecnologia.
- Funaba M., Ishibashi Y., Hossain A., Iwanami K., Iwaya-Inoue M. 2006. Influence of low / high temperature on water status in developing and maturing rice grains. *Plant Production Science* 9 : 347 – 354.
- Furukawa S., Itou M., Masumura T., Tanaka K., Kiyokawa Y., Wakai Y. 2007. Ultrastructure of low-glutelin rice endosperm. *Plant Biotechnology*. 24 : 227 – 229.
- Gallant D., Bouchet B. and Baldwin P. 1997. Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*. 32 : 171 – 191.

- Genovese D. y Rao M. 2003. Role of starch granule characteristics (volume fraction, rigidity, and fractal dimension) on rheology of starch dispersions with and without amylose. *Cereal Chemistry*. 80(3) : 350 – 355.
- Godber S., Juliano B. 2004. Rice Lipids. In Rice, 3rd et.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 163 - 190.
- Gonzalez R., Woods R., Edinns L. 2004. Digital image processing using MatLab. pp.484-508. Prentice Hall, USA
- Goñi I., García-Alonso A., Saura-Calixto F. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutritional Research*. 17: 427-437.
- Güemes-Vera N., Arciniega-Ruiz E., Dávila-Ortiz G. 2003. Structural analysis of the *Lupinus mutabilis* seed, its flour, concentrate, and isolate as well as their behavior when mixed with wheat flour. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologiefood Science And Technology*. 37 : 283 – 290.
- Guidolin D., Vacca A., Nussdorfer G., Ribattic D. 2004. A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the Matrigel assay in vitro. *Microvascular Research* 67:117–124.
- Haralick R., Shanmugam K., Dinstein L. 1973. Texture parameters for image classification. Institute of Electrical and Electronics (IEEE). *Transactions on Systems, Man and Cybernetics*. 610 – 621 pp.

- He G., Kiyoshi K., Suzuki H. 1989. Development of endosperm and synthesis of starch in rice grain. *Japanese Journal of Crop Science*. 58 : 246 – 252.
- Hee-Jin K, In-Kyeong H, Kyung-Soo Y., Hae-Chune C. 2006. Comparison of the physicochemical properties and ultrastructure of japonica and indica rice grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:4833-4838.
- Horgan G.W. 2001. The statistical analysis of plant part appearance a review. *Computers and Electronics in Agriculture*. 31: 169-190.
- Horigane A., Toyoshima H., Hemmi H., Engelaar W., Okubo A. Nagata T. 1999. Internal hollows in cooked rice grains (*oryza sativa* cv. koshihikari) observed by nmr micro imaging. *Journal of Food Science*. 64:1-4.
- Hoover R., Ratnayake W. 2002. Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars growing in canada. *Food Chemistry*, 78: 489-498.
- Hwang S., Cheng Y., Chang C., Iur H., Lin T. 2009. Magnetic resonance imaging and analyses of tempering processes. *Journal of Cereal Science*. 50 : 36 – 42.
- Ibáñez A., Wood D., Yokoyama W., Park I., Tinoco., Hudson C., McKenzie K., Shoemaker C. 2007. Viscoelastic properties of waxy and nowaxy rice flours, their fat and protein-free starch, and microstructure of their cooked kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 6761 – 6771.

- Ikeda K., Nagasawa N., Nagato Y. 2005. Aberrant panicle organization 1 temporally regulates meristem identity in rice. *Developmental Biology*. 28 : 349 – 360.
- Ishimaru T., Horigane A., Ida M., Iwasawa N., San-Oh Y., Nakazono M., Nishizawa N., Masumura T., Tondo M., Yoshida M. 2009. Formation of grain chalkiness and changes in water distribution in developing rice caryopses grown under high-temperature stress. *Journal of Cereal Science* 50:166–174.
- Izquierdo A. 2005. Fórmulas y propiedades geométricas. (Izquierdo Asensi ed.) p. 126., Madrid.
- Jacobs B And Pearson C. 1999. Growth, development and yield of rice in response to cold temperature. *Journal Of Agronomy And Crop Sciencezeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau*. 182 : 79 – 88.
- James M., Denyer K., Myers M. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology*. 6 : 215 – 222.
- Jiménez J., Salcedo M., Martínez B., Chanona P., Alamilla B., Arenas O., Gutiérrez I. Jiménez A. 2005. Naturaleza fractal de células en suspensión de *beta vulgaris* sometidas a un proceso de permeabilización. *Biótica, Revista de Investigación*. 2: 39-54.
- Kang H., Hwang I., Kim K., Choi H. 2003. Comparative structure and physicochemical properties of Ilpumbyeo, a high-quality japonica rice and its mutant sweon 464. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 6598-6603.

- Kang H., Hwang I., Kim K., Choi H. 2006. Comparison of the physicochemical properties and ultrastructure of japonica and indica rice grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:4833-4838.
- Kawagoe Y., Kubo A., Satoh H., Takaiwa F., Nakamura Y. 2005. Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm. *The Plant Journal*. 42 : 164 – 174.
- Kenkel N., Walker D. 1996. Fractals in the biological sciences. [En línea] disponible: <http://www.umanitoba.ca/faculties/science/botany/labs/ecology/fractals/fractal.html>, 2 de julio de 2003.
- Kim K., Kang H., Hwang I., Hwang H., Kim T., Choi H. 2004. Comparative ultrastructure of Ilpumbyeo, a high- quality japonica rice, and its mutant, sweon 464: scanning and transmission electron microscopy studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:3876-3883.
- Krishnan H., White J. 1995. Morphometric analysis of rice seed protein bodies. *Plant Physiology*. 109:1491-1495.
- Kuensting H., Ogawa Y., Sugiyama J. 2002. Structural details in soybeans: a new three – dimensional visualization method. *Journal of Food Science*. 67 : 721 – 724.
- Kobata T., Sugawara M., and Takatu S. 2000. Shading during the early grain filling period does not affect potential grain dry matter increase in rice. *Agronomy Journal*, 92 : 411 – 417.

La Jornada 30 de abril de 2008. [En línea] Disponible:

<http://www.jornada.unam.mx/2008/04/30/index.php?section=economia&article=027n1eco>

Lesław Juszcak. 2003. Surface of triticale starch granules - nc-afm observations. Electronic Journal Of Polish Agricultural Universities. Vol. 6.

Lepistö L., Kunttu I., Autio J., Visa A. 2003. Rock Image Classification Using Non-Homogenous Textures and Spectral Imaging. In: Proc. 11th International Conference in Central Europe on Computer Graphics, Visualization and Computer Vision. V Skala (ed.). Short Communication Papers Proceedings. Plzen, Czech Republic. 3-7. Feb. WSCG, University of West Bohemia, Czech Republic. pp: 1-5.

Ley de la Propiedad Industrial. 2001. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de junio de 1991. Ediciones Luciana. México.

Livore A. 2000. Granos panza blanca. Resultados experimentales. Fundación Proarroz. Uruguay.

Lira, J. 2002. Introducción al tratamiento digital de imágenes. pp. 337-439. Fondo de Cultura Económica e IPN.

Majmudar S., Jayas D. 1999. Classification of Bulk samples of cereal grains using machine vision. Journal Of Agricultural Engineering Research. 73:35-47.

Mandelbrot B. 2003. La Geometría Fractal de la Naturaleza. Tusquets Editores, Barcelona.

Martín C., Smith A. 1995. Starch biosynthesis. Plant Cell 7:971-985.

- Mohapatra P., Sarkar R., Kuanar S. 2009. Starch synthesizing enzymes and sink strength of grains of contrasting rice cultivars. *Plant Science* 176:256–263.
- Moldenhauer A., McKenzie K., 2004. Rice Varieties in *Rice*, 3rd et.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 49 - 74.
- Morell M., Rahman S., Abrahams L., Appels R. 1995. The biochemistry and molecular biology of starch synthesis in cereals. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22 : 647 – 660.
- Morita S., Yonemaru J., Takanashi J. 2005. Grain growth and endosperm cell size under high night temperatures in rice (*Oryza sativa*). *Annals of Botany* 95: 695–701.
- Myers A., Morell M., James M., Ball S. 2000. Recent progress toward understanding the amilopectin crystal. *Plant Physiology*. 122:989.997.
- Myers A. 2004. The rice plant: growth, development, and genetic improvement. in *Rice*, 3rd et.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 25 - 46.
- Nishi A., Nakamura Y., Tanaka N., Satoh H. 2001. Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose-extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiology*. 127: 459–472.
- Ogawa Y., Sugiyama J., Kuensting H., Ohtani T., Hagiwara S., Liu X., Kokubo M., Yamamoto A., Kudoh K., Higuchi T. 2001. Advanced technique for three-

- dimensional visualization of compound distributions in a rice kernel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:736-740.
- Ogawa Y., Kuensting H., Nakao H. 2002. Three – dimensional lipid distribution of a brown rice kernel. *Journal of Food Science*. 67 : 2596 – 2599.
- Ohtsubo A., Nakamura S. 2007. Cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) by polymerase chain reaction method and its application to processed rice products. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55 : 1501 – 1509.
- Olsen E., Ramsey R., Winn D. 1993. A modified fractal dimension as a measurement of landscape diversity. *Photogrammetric Engineering And Remote Sensing*. 59:1517-1520.
- Papagianni M. 2006. Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in *Aspergillus niger* submerged cultures. *Microbial Cell Factories* 5:1-13.
- Paredes-López O., Bello-Pérez A. López G. 1994. Amylopectin: structural, gelatinization and retrogradation studies. *Food Chemistry*, 50: 411-418.
- Patindol J., Wang Y. 2003. Fine structures and physicochemical properties of starches from chalky and translucent rice kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 : 2777 – 2784.
- Peleg M. 1993. Fractal and foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 33 (2): 149-165.

- Perales A., Avila D., Oble E. García R. 2004. El impacto del TLCAN en la cadena agroalimentaria del arroz. Universidad Autónoma Chapingo.
- Quevedo A., Lopez-G C., Aguilera C. 2002. Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *Journal of Food Engineering*. 53 : 361–371.
- Raju G., Srinivas T. 1991. Effect of physical, physiological, and chemical factors on the expression of chalkiness in rice. *Cereal Chemistry*. 68:210-211.
- Ruach-Nir. 2005. An innovative method for imaging and chemical analysis of wet samples in scanning electron microscopes. *Microscopy Today*. 13 :10 – 14.
- Salcedo J. 2006. Morelos A-98 variedad de arroz para Morelos y otros estados de la república. Folleto Técnico No.21 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Shaw S. 2006. Imaging the live plant cell. *The Plant Journal*. 45 : 573 – 598.
- Shih F. 2004. Rice Proteins. In *Rice*, 3rd ed.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 143 - 162.
- Singh N., Sodhi N., Kaur M., Saxena S. 2003. Physico-chemical, morphological, thermal, cooking and textural properties of chalky and translucent rice kernels. *Food Chemistry*. 82 : 433 – 439.

- Smith A., Denyer K., Martin C. 1997. The synthesis of the starch granule. Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology. 48 : 67 – 87.
- Smith A. 2001. The biosíntesis of starch granules. Biomacromolecules. 2 :335 – 341.
- Smith C. 1999. Carbohydrate Biochemistry. In: Plant Biochemistry and molecular Biology, (Ed). Lea P., Leegood R., Cap. 4, John Wiley & Sans. England. (101 – 105).
- Solano-Navarro A., Pérez R., Corona-Rangel M., Espinosa-Mendoza R., Quintero-Gutiérrez G., Del Villar-Martínez. 2008. Caracterización bioquímica de variedades de arroz sembradas en el estado de Morelos. V Congreso Internacional de Ingeniería bioquímica. Tuxtla Gutiérrez Chiapas, México.
- Tabata M., Hirabayashi H., Takeuchi Y., Ando I., Ida Y., Oshawa R. 2007. Mapping of quantitative trait loci for the occurrence of white – back kernels associated with high temperatures during the ripening period of rice (*Oryza sativa* L). Breeding Science. 57 : 47 – 52.
- Takemoto-Kuno Y., Suzuki K., Nakamura S., Satoh H., Ohtsubo K. 2006. Soluble starch synthase I effects differences in amylopectin structure between indica and japonica rice varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54 : 9234 – 9240.
- Talanquer V. 1996. Fractus, fracta, fractal. Fractales, de laberintos y espejos. Fondo de cultura económica. México.

- Tamaki M., Kurita S., Toyomaru M., Itani T., Tsuchiya T., Aramaki I., Okuda M. 2006. Difference in the physical properties of white – core and non – white - core kernels of rice varieties for sake brewing is unrelated to starch properties. *Plant Production Science*. 9(1) : 78 – 82.
- Tang H., Mitsunaga T., Kawamura Y. 2006. Molecular arrangement in blocklets and starch granule architecture. *Carbohydrate Polymers*. 63 : 555 – 560.
- Tanska M., Rotkiewicz D., Kozirok W., Konopka I. 2005. Measurement of the geometrical features and surface color of rapeseeds using digital image analysis. *Food Research International* . 38:741 – 750.
- Tian Y., Li Y., Xu X., Jin Z., Jiao A., Wang J., Yu B. 2010. A novel size-exclusion high performance liquid chromatography (SE-HPLC) method for measuring degree of amylose retrogradation in rice starch. *Food Chemistry* 118 : 445–448.
- Torres E., Jennings P., Duque M., Kuri V., Corredor E. And Sierra J. 2002. Analysis of stability for white belly in rice (*Oriza sativa*). *Foro Arrocerero Latinoamericano*. 8 : 9 – 13.
- Umemoto T., Nakamura Y., Ishikura N. 1995.. Activity of starch synthase and the amylose content in rice endosperm. *Phytochemistry* 40:1613–1616.
- Valenzuela R., Espinosa M., Quintero G., *et al.* 2007. Caracterización por análisis de imágenes digitales de la morfometría de arroz pulido como indicador de la calidad

comercial. I Congreso Internacional de Biotecnología y Genómica GENOBIOTEC.
Monterrey, Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Vandeputte G., Delcour J. 2004. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*. 58 : 245 – 266.

Vidal V., Pons B., Brunnschweiler J., Handschin S., Rouau X., Mestres C. 2007. Cooking Behavior of rice in relation to kernel physicochemical and structural properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:336 – 346.

Voss R. 1988. Fractals in nature: from characterization to simulation. In: Peitgen, H. O. and D. Saupe (eds.). *The science of fractal images*. pp. 21-70. Springer, New York.

Waliszewski P., Konarski J. 2001. Tissue as a self-organizing system with fractal dynamics *Space Res*. 28:545-548.

Wang F., Chen S., Cheng F., Liu Y., Zhang G. 2007. The Differences in Grain Weight and Quality Within a Rice (*Oryza sativa* L.) Panicle as Affected by Panicle Type and Source-sink Relation. *Journal of Agronomy & Crop Science* 193 : 63—73.

Woo M.1, Ham T., Ji H., Choi M., Jiang W., Chu S., Piao R., Chin J., Kim J., Park B., Seo H., Jwa N., McCouch S. Koh H. 2008. Inactivation of the UGPase1 gene causes genic male sterility and endosperm chalkiness in rice (*Oryza sativa* L.) *The Plant Journal* 54 : 190–204

- Yamakawa H., Hirose T., Kuroda M., Yamaguchi T. 2007. Comprehensive Expression Profiling of Rice Grain Filling-Related Genes under High Temperature Using DNA Microarray. *Plant Physiology*. 144 : 258–277
- Yang J., Zhang J., Wang Z., Zhu Q., Liu L. 2003. Activities of enzymes involved in sucrosa-to-starch metabolism in rice grains subjected to water stress during grain filling. *Field Crops Research*. 81 : 69 – 81.
- Yang J., Zhang J., 2006. Grain filling of cereals under soil drying. *New Phytologist*. 169 : 223 – 236.
- Yang P., Shen S. and Kuang T. 2006. Comparative analysis of the endosperm proteins separated by 2-D electrophoresis for two cultivars of hybrid rice (*Oryza sativa* L.) *Journal of Integrative Plant Biology*. 48 : 1028 – 1033.
- Yoshioka Y., Iwata H., Tabata M., Ninomiya S. and Ohsawa R. 2007. Chalkiness in rice: potential for evaluation with image analysis. *Crop Science*. 47 : 2113 – 2110.
- Zayas I., Steele J. 1996. Image texture analysis for discrimination of mill fractions of hard and soft wheat. *Cereal Chemistry*. 73 (1) : 136-142.
- Zhou Z., Robards K., Helliwell S. and Blanchard C. 2002. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*. 37 : 849 – 868.

CAPÍTULO 3 *Estudio comparativo morfo estructural y de las propiedades físicoquímicas y térmicas de la variedad Morelos A-98 con otras variedades.*

INTRODUCCIÓN

En México, el arroz es el cuarto producto de consumo básico después del maíz, el frijol y el trigo. El 75% de la producción se concentra en cinco estados: Sinaloa, Campeche, Veracruz, Michoacán y Morelos. Sin embargo, en el estado de Morelos, la producción de éste cereal se ha reducido drásticamente: de 4,000 hectáreas que se sembraron en 1990 en 1999 sólo fueron 2,900, con una clara tendencia a disminuir en años posteriores (Perales *et al.* 2004). Esta situación es resultado de una problemática crónica, entre las que sobresalen las prácticas de comercialización inadecuadas e incluso ilegales ya que es frecuente encontrar en el mercado productos de calidad inferior o mezclas de variedades que llevan la leyenda “*Arroz Morelos*” o “*Arroz tipo Morelos*”.

Con el objeto de buscar la protección legal de variedades con características únicas, como la Morelos A-98, las Leyes y normatividades respectivas señalan la necesidad de contar con una descripción precisa y detallada del grano (Art.159, Fracciones IV y VI Ley de la Propiedad Industrial). Por tal razón la caracterización química, física y morfológica es de vital importancia para lograr tal protección legal (NOM-080-SCFI-1994 y NMX-FF-035-SCFI-2005). No obstante, en la actualidad se cuenta con información muy limitada para la variedad Morelos A-98 en lo referente a su caracterización.

El objetivo de este trabajo fue comparar granos de arroz de la variedad Morelos A-98 con la variedad Milagro Filipino (MF) y tres productos comerciales que hacen alusión a la variedad “Morelos” (PS, SO y GV); para evidenciar si es posible establecer diferencias entre variedades de arroz Morelos A-98 de aquellas que no lo son haciendo uso del tratamiento digital de imágenes (morfometría) y del análisis fractal (Dimensión fractal de textura topográfica). Finalmente se evaluaron el contenido de amilosa (amilosa aparente), almidón total, propiedades térmicas y humedad; en harinas de cada una de las muestras en dos diferentes regiones del endospermo (MOB y cristalino); con el objeto de validar la diferenciación entre las muestras.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

El los granos de arroz variedad Morelos A-98 y Milagro Filipino fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; mientras que las muestras de marcas comerciales fueron adquiridas en un centro comercial de la localidad (PS, SO, GV).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Las muestras fueron ionizadas con una cubierta de oro de 14nm con una corriente de 15 mAmps. Las observaciones se hicieron en un microscopio electrónico de barrido (Jeol, modelo JSM – 5800LV, Japón). De cada muestra se capturaron tres imágenes digitales (640 x 480 pixeles), una con magnificación 33X (del grano completo), y dos más con una magnificación de 2000X correspondientes a la región ventral (MOB) y a la región dorsal (cristalina); a un voltaje de 20KV.

TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES (TDI)

Las imágenes de MEB se convirtieron a escala de grises (8 bits, formato *.bmp). Estas nuevas imágenes fueron guardadas en un formato *.bmp y una resolución de 300 ppp (Figura 2B) para la posterior medición de la Df.

DETERMINACIÓN DE LA DIMENSIÓN FRACTAL DE TEXTURA TOPOGRÁFICA

La dimensión fractal de textura topográfica (Dft) se evaluó utilizando el método reportado por Quevedo *et al.* (2002), con el software DFSurf V 1.0 ejecutado en el MathLab V.6.5 (MathWorks Inc, USA). Para ello, las micrografías obtenidas por MEB con magnificaciones de 33X fueron transformadas en escala de grises de 8 bits (formato *.bmp) y 200 x 200 pixeles para la aplicación del programa.

OBTENCIÓN DE HARINAS

La harina se obtuvo manualmente de cada grano pulido, raspando con un bisturí por separando las regiones del grano (MOB y región cristalina), de acuerdo a lo reportado por Cheng *et al.* (2005), hasta completar dos gramos de cada muestra.

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES TÉRMICAS

GELATINIZACIÓN

La temperatura de gelatinización de las harinas se evaluó empleando la técnica propuesta por Paredes-López *et al.* (1994) usando un calorímetro diferencial de barrido marca TA modelo 2010 (TA instruments, New Castle, DE) conectado a un software TA Instruments OS/2 versión 2.1 para el control y análisis de datos. El equipo se calibró con indio (punto de fusión de 156.4 °C y una entalpia de 6.8 cal/g) con una constante de celda de 0.977. Se pesaron 2 mg de harina directamente en charolas de aluminio y se adicionaron 7 µl de agua desionizada, las charolas fueron selladas herméticamente y estabilizadas por 30 minutos. Se utilizó una charola vacía como referencia, las temperaturas se programaron

de 30 a 120 °C con incrementos de 10°C/min. Las temperaturas fueron directamente obtenidas a partir del análisis de termogramas usando el software antes mencionado. El análisis se realizó por triplicado.

RETROGRADACIÓN

La temperatura de retrogradación de las harinas fue evaluada por el método propuesto por Paredes-López *et al.* (1994). Las muestras previamente gelatinizadas se almacenaron por 14 días a 4 °C, transcurridos los días de acondicionamiento las muestras se equilibraron por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se analizaron en el calorímetro a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min desde 30 hasta 120 °C. Se utilizó una charola de aluminio vacía como referencia en todas las mediciones.

AMILOSA APARENTE

Se realizó por el método de Hoover y Ratnayake (2002) basado en la afinidad que tiene la amilosa para formar compuestos con el yodo. El complejo coloreado formado puede ser cuantificado colorimétricamente. Se pesaron 20 mg de harina, se disolvieron en 8 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) al 90% (p/v) en viales con tapa a temperatura ambiente durante 20 minutos agitando de forma vigorosa y constante, posteriormente, se calentaron en baño de agua con agitación intermitente (500 rpm) durante 15 minutos a 85 °C. Una vez que los viales se enfriaron a temperatura ambiente se vació su contenido a matraces volumétricos aforando con agua destilada hasta 25 ml. En un matraz volumétrico se agregó 1 ml de esta solución, 40 ml de agua destilada y 5 ml de solución I₂/KI (0.0025 M I₂ y 0.0065 M KI) y se ajustó el volumen final a 50 ml, dejándose reposar durante 15 minutos a

temperatura ambiente. Simultáneamente, se mezclaron una proporción determinada de amilosa y amilopectina (Sigma, proveniente de papa, grado reactivo) con el fin de obtener una curva estándar de absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer (Lambda EZ 150 UV/VIS). La amilopectina se determinó por diferencia al 100%. El análisis se realizó por triplicado.

ALMIDÓN TOTAL

Se determinó por el método de Goñi *et al.* (1997) en el que se cuantifica la glucosa liberada como resultado de la hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa. Para ello, se pesaron por triplicado 50 mg de harina, en tubos de centrifuga de 50 ml de capacidad a los cuales se añadieron 3 ml de agua destilada y 3 ml de hidróxido de potasio 4M, se colocaron barras magnéticas para agitar vigorosamente por 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 5.5 ml de ácido clorhídrico 2M junto con 3 ml de regulador de acetato sódico 0.4 M y se ajustó a un pH de 4.5. Posteriormente, se adicionaron 60 µl de suspensión de amiloglucosidasa (Roche, USA). Se mezcló cuidadosamente y se incubó a 60°C durante 45 min en un baño maría con agitación constante. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 rpm y una temperatura de 4°C. Los sobrenadantes se recogieron en matraces aforados de 50 ml. El residuo se lavó dos veces con 10 ml de agua destilada.

Para determinar la cantidad de glucosa liberada por digestión enzimática con el reactivo oxidasa/peroxidasa se tomaron 50 µl del aforado, se determinaron las absorbancias a 510 nm en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer (Lambda EZ 150 UV/VIS). Se realizó un análisis de regresión lineal para establecer la curva estándar, con la cual se

calculó la concentración de glucosa ($\mu\text{g/ml}$). Para determinar el porcentaje de almidón total (%AT) se empleó la ecuación 1.

$$\% \text{ AT} = \left(\frac{\text{Conc. glucosa } (\mu\text{g/ml}) \times \text{V muestra} \times \text{factor de conversión } (0.9)}{\text{Masa muestra (mg) en bs} \times (1000)} \right) \times 100 \dots\dots(1)$$

HUMEDAD

Se determinó utilizando el método (14.004) de la AOAC (1981). Se pesaron 1.4 g de muestra en una cápsula de porcelana previamente llevada a peso constante. Se colocaron dentro de la estufa a una temperatura de $135\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante dos horas, una vez transcurrido este tiempo, se dejó enfriar. Finalmente, se calculó el porcentaje de humedad por diferencia de peso mediante la ecuación 2.

$$\% \text{ HUMEDAD} = \left(\frac{(\text{peso inicial}) - (\text{peso final})}{(\text{peso inicial})} \right) \times 100 \dots\dots(2)$$

RESULTADOS

Estudio morfo – estructural utilizando MEB.

En la Figura 1, se presenta una galería de micrografías electrónicas de barrido correspondientes a las cinco muestras estudiadas. Se obtuvieron micrografías con una magnificación x33 de los cortes transversales (Figura 1 A), así como magnificaciones x2000 para cada región del endospermo: dorsal (Figura 1 B, correspondiente a la parte superior del grano) y ventral (Figura 1 C, correspondiente a la parte inferior).

En los cortes transversales de las muestras estudiadas (Figura 1 A), se observaron básicamente dos tipos de textura en diferentes ubicaciones del endospermo: una estructura rugosa – granular y otra que se aprecia lisa con líneas rectas que se dirigen hacia el centro.

Se observan similitudes en el corte transversal de los granos, particularmente por el arreglo estructural que parte del eje del grano con una porción rugosa - granular en la parte dorsal y la MOB hacia la ventral. Se aprecian también arreglos tipo prisma basáltico, que se generan radialmente del eje del grano. No obstante, la posición de la MOB cambia entre las muestras; por ejemplo en la muestra MorA98 se sitúa hacia la parte ventral (“panza”), mientras que, en MF la MOB se ubica desde el centro hacia el dorso.

Con la finalidad de eliminar la subjetividad de las apreciaciones visuales, se procedió a evaluar la Dft de la superficie de cada grano; los resultados se presentan en el Cuadro 1.

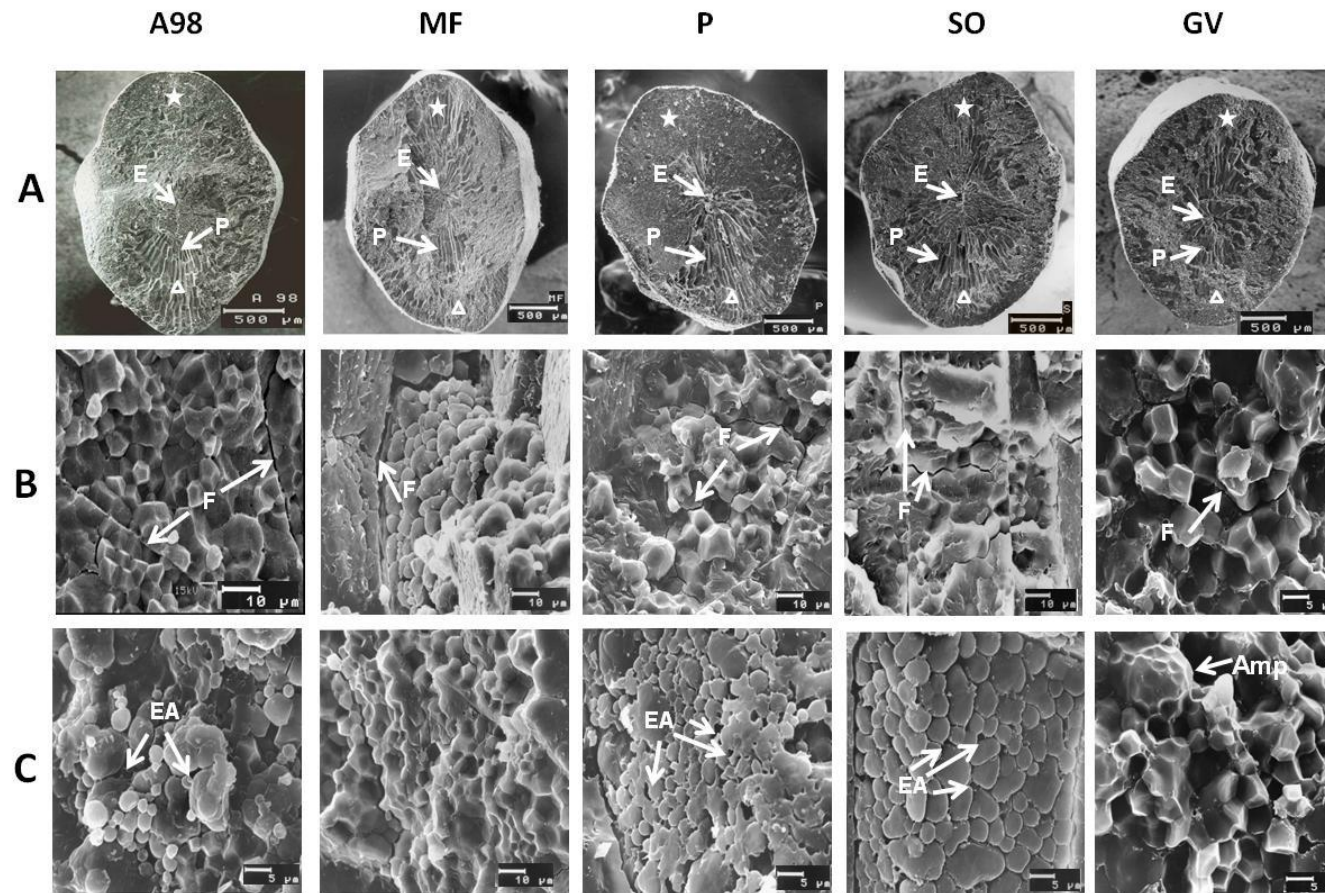


Figura 1. Micrografías que ejemplifican las diferencias en la morfo estructura del endospermo de las cinco variedades estudiadas (MorA98, MF, PS, SO, GV): A) Cortes transversales del endospermo; B) región dorsal; C) región ventral (MOB). E eje del grano; P prismas; EA espacios de aire, F fractura, Amp amiloplasto intacto. [zona dorsal (★) y ventral (▲)].

Cuadro 1. Dimensión fractal de textura superficial para las muestras estudiadas.

Región\Muestra	MorA98	MF	PS	SO	GV
Grano completo	2.7755	2.7447	2.7974	2.7684	2.8055
Dorsal	2.7616	2.7191	2.7692	2.7773	2.7043
Ventral	2.7311	2.7749	2.7298	2.7818	2.7686

De acuerdo a la Dimensión fractal de textura, se encontró que las muestras MorA98 y PS (Figura 1 A) presentaron un arreglo semejante, es decir la zona de textura lisa en la que se aprecian formas de prismas basálticos (DF_T de 2.7311 y 2.7298, respectivamente) se observa en la región ventral [orientada hacia abajo (\blacktriangle)], mientras que la granular (\star) se aprecia en el resto del endospermo (Dft de 2.7616 y 2.7692); con características similares en los dos planos de ruptura.

Por otra parte, las muestras MF y GV presentaron también similitudes en la textura, observándose la porción lisa (prismas) hacia el centro del endospermo (Dft de 2.7191 y 2.7043 para MF y GV, respectivamente), mientras que la zona exterior que rodea a ésta, tuvo una apariencia rugosa (las Dft fueron de 2.7749 y 2.7686). La muestra SO se observó como una combinación de las anteriores, ya que presentó la zona lisa (prismas) en el centro (Dft = 2.7773), pero también en la región ventral del endospermo (Dft = 2.7819).

En lo que respecta al eje del grano completo se observa que se encuentra en la parte central para las muestras PS SO y GV; mientras que para MorA98 y MF, éste se sitúa precisamente en la parte ventral.

En la figura 1 B se muestran magnificaciones 2000X de la región dorsal, en las que es posible observar el patrón de acomodamiento morfo estructural del gránulo de almidón. Las muestras MorA98, PS, SO y GV, presentaron predominantemente formas poligonales, los que a su vez formaron agregados (amiloplastos). Mientras que en las muestras PS y SO se aprecian algunas estructuras que podrían ser restos de pared celular, producidos durante la fractura del endospermo; así mismo. En el caso de la muestra MF se encontró que los gránulos más bien presentaron en general, una forma esférica y elíptica; a diferencia de las otras muestras estudiadas. Esta particularidad podría ser resultado de que, si bien la imagen fue capturada en la región dorsal del endospermo exactamente en el mismo cuadrante que las demás muestras, ésta tuvo una apariencia de textura lisa ($D_{ft} \approx 2.72$) y no la de textura rugosa como el resto de las muestras ($D_{ft} > 2.76$).

En la Figura 1 C se presentan magnificaciones 2000X de la región ventral; en éstas se observa una morfología del gránulo de almidón similar para las muestras MorA98, PS y SO; los gránulos de almidón presentaron preferentemente una forma esférica, pobremente empacados (particularmente para la muestra MorA98), con espacios de aire entre sí. De igual manera, se observaron pequeños gránulos individuales atrapados entre los amiloplastos que pueden representar fragmentos de amiloplastos o gránulos separados durante la etapa tardía de maduración del endospermo (Kim *et al.*, 2004).

En el caso de las muestras MF y GV se observaron gránulos de forma poligonal contenidos en agregados incompletos con bordes redondeados, así como amiloplastos intactos en los que se aprecian formas regulares a través de las membranas que los envuelven (Figura 1 C muestra GV).

Es importante destacar que para el caso de las muestras MF y GV si bien las imágenes fueron capturadas en la región ventral, nótese que corresponden a la región donde la textura es granular en vez de lisa. Con el objeto de comprobar si la morfo estructura de los gránulos de almidón de la región donde la textura es aparentemente lisa coincide con formas esféricas o elípticas se capturaron adicionalmente imágenes en la región central del endospermo de las muestras MF y GV, donde se apreciaba una textura lisa así como a la muestra Mor A98 con fines comparativos.

Las figuras 2 a 4 muestran un grupo de micrografías que ejemplifican las diferentes geometrías en diversas regiones del endospermo.

En la figura 2A se observa, que en los cortes transversales del endospermo para la variedad MorA98 la geometría poligonal del gránulo está asociada a una textura de apariencia rugosa-granular (Dft = 2.7616) presente en la región dorsal y central del endospermo (Figura 2 B y C). Mientras que, la geometría esférica y elíptica de los gránulos de almidón (Figura 2 D) está asociada con una textura más lisa (Dft = 2.7311) y que se presenta únicamente – para esta variedad - en la región ventral del endospermo.

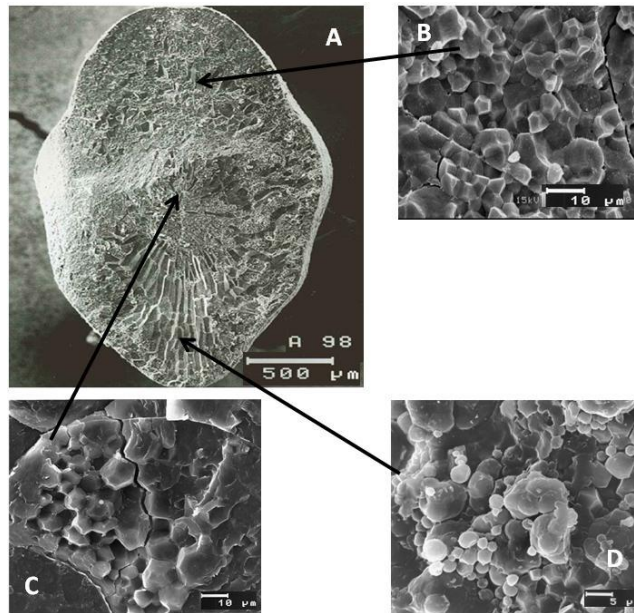


Figura 2. Micrografías que ejemplifican las diferencias en la morfo estructura del endospermo de la muestra MorA98: A) Corte transversal del endospermo; B) región dorsal; C) región central; D) región ventral (MOB).

En la Figura 3 se observa que en la variedad MF, a diferencia de la variedad MorA98, la textura de apariencia lisa ($D_{ft} = 2.7191$) asociada a la geometría esférica y elíptica de los gránulos de almidón se presenta del centro hacia la región dorsal del endospermo; mientras que en la región ventral, la textura es más bien de apariencia rugosa-granular ($D_{ft} = 2.7749$) lo mismo para las regiones laterales del endospermo.

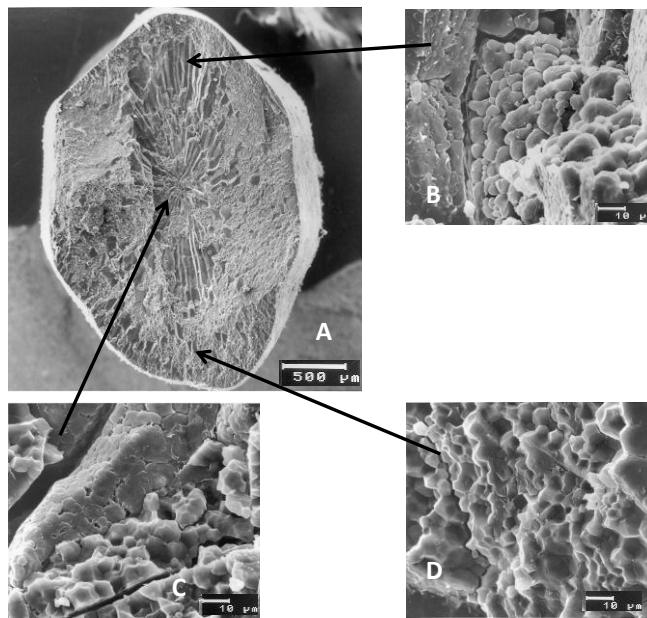


Figura 3. Micrografías que ejemplifican las diferencias en la morfo estructura del endospermo de la muestra MF: A) Corte transversal del endospermo; B) región dorsal; C) región central; D) región ventral (MOB).

En el caso de la variedad GV (Figura 4 A), se puede observar que la geometría esférica y elíptica de los gránulos de almidón (Figura 4 C), asociada con una textura más lisa ($D_{ft} = 2.7043$) se presenta distribuida en un patrón similar al observado en la variedad MF es decir en la región central del endospermo. Mientras que la geometría poligonal

del gránulo que está asociada a la textura de apariencia rugosa-granular ($D_{ft} = 2.7686$), se presenta en la región externa (dorsal y lateral) del endospermo (Figura 4 B y D).

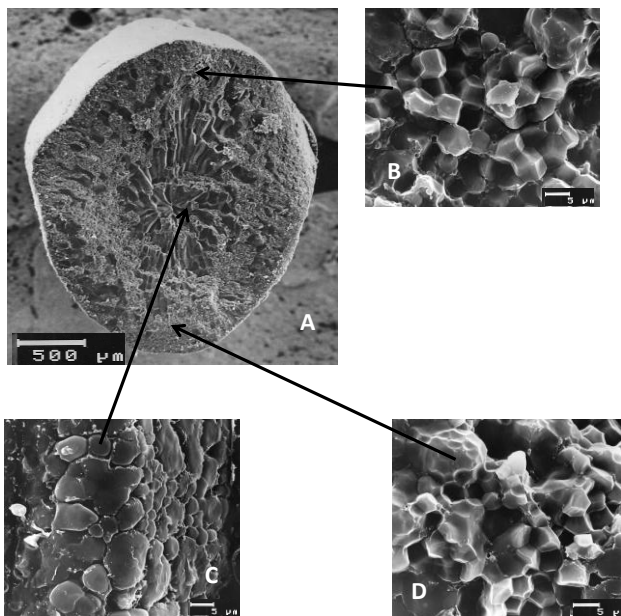


Figura 4. Micrografías que ejemplifican las diferencias en la morfo estructura del endospermo de la muestra GV: A) Corte transversal del endospermo; B) región dorsal; C) región central; D) región ventral (MOB).

De las imágenes anteriores (Figuras 2 a 4), se puede concluir entonces, que la textura lisa de apariencia *escalonada*, está asociada a gránulos de almidón de forma esférica o elíptica con espacios de aire entre sí independientemente de si, ésta se encuentra en la región dorsal o ventral del endospermo como se ejemplifica en las imágenes mostradas en la Figura 5; mientras que a x100 se observan claramente cortes escalonados (Figura 5 A), al incrementar el nivel de magnificación de esa misma zona, se comienzan a

observar que tales escalones están conformados por gránulos esféricos empaquetados de manera aparentemente ordenada (Figura 5B).

Esta configuración morfo estructural de la MOB podría ser resultado de la existencia de porciones de pared celular de amiloplastos (Figuras 5 C y D), una menor densidad de empaquetamiento así como fracturas (Figura 5 C) y espacios de aire (Figura 5 D), dando como resultado una estructura con menor resistencia mecánica en dicha región.

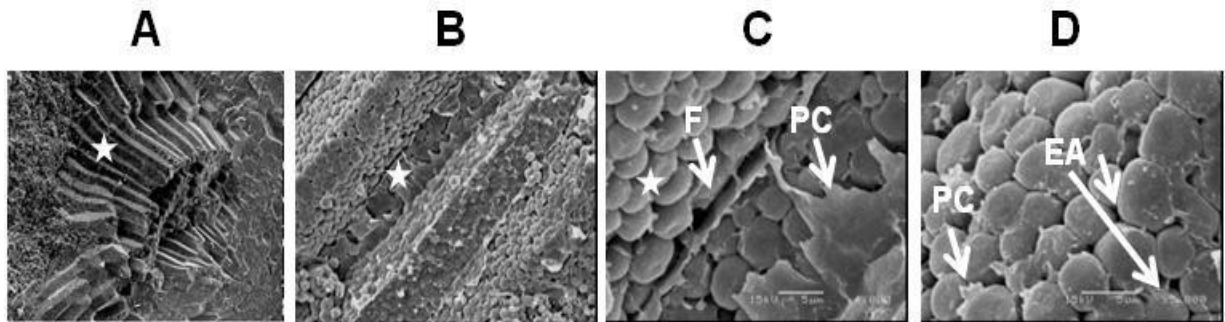


Figura 5. Micrografías que ejemplifican la morfo estructura de los gránulos de almidón en la región de apariencia *escalonada* del endospermo (MorA98) a distintas magnificaciones: A) x100; B) x1000; C) x4000 y D) x5000. (★) indica el lugar donde se obtuvieron las magnificaciones. EA_ Espacios de Aire; F_ Fractura; PC_ Restos de Pared Celular.

Finalmente, con el objeto de ejemplificar las diferencias morfo estructurales de la superficie, se llevó a cabo la reconstrucción topográfica tridimensional – virtual de ésta (Figura 6); en la que se muestran la estructura de las cinco muestras estudiadas, particularmente en las tres posiciones que fueron capturadas las imágenes de las

micrografías electrónicas. Se puede observar que MorA98 presenta una textura menos rugosa (Dft = 2.7755, cuadro 5) de todo el grano, conjuntamente con MF y SO (Dft = 2.7447 y 2.7684, respectivamente), con relación a PS y GV. Sin embargo, MF se diferencia de MorA98 en la región dorsal, donde la superficie de MF es más rugosa (Dft = 2.7191) y similar a la de GV (Dft = 2.7043); invirtiéndose esta característica en la región ventral (MOB) en la que la mayor rugosidad se encuentra en MorA98 y PS (Dft = 2.7311 y 2.7298). La textura superficial para MF, SO y GV fueron similares. Estas imágenes, conjuntamente con los valores de Dft que las diferencias en la MOB se dan básicamente en la región ventral (Tamaki *et al.*, 2006) y que, por ejemplo, MF a pesar de presentar MOB, ésta se encuentra posicionada más bien en la porción central del grano y no en la ventral; como se ha reportado para algunas variedades japónicas (Funaba *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007).

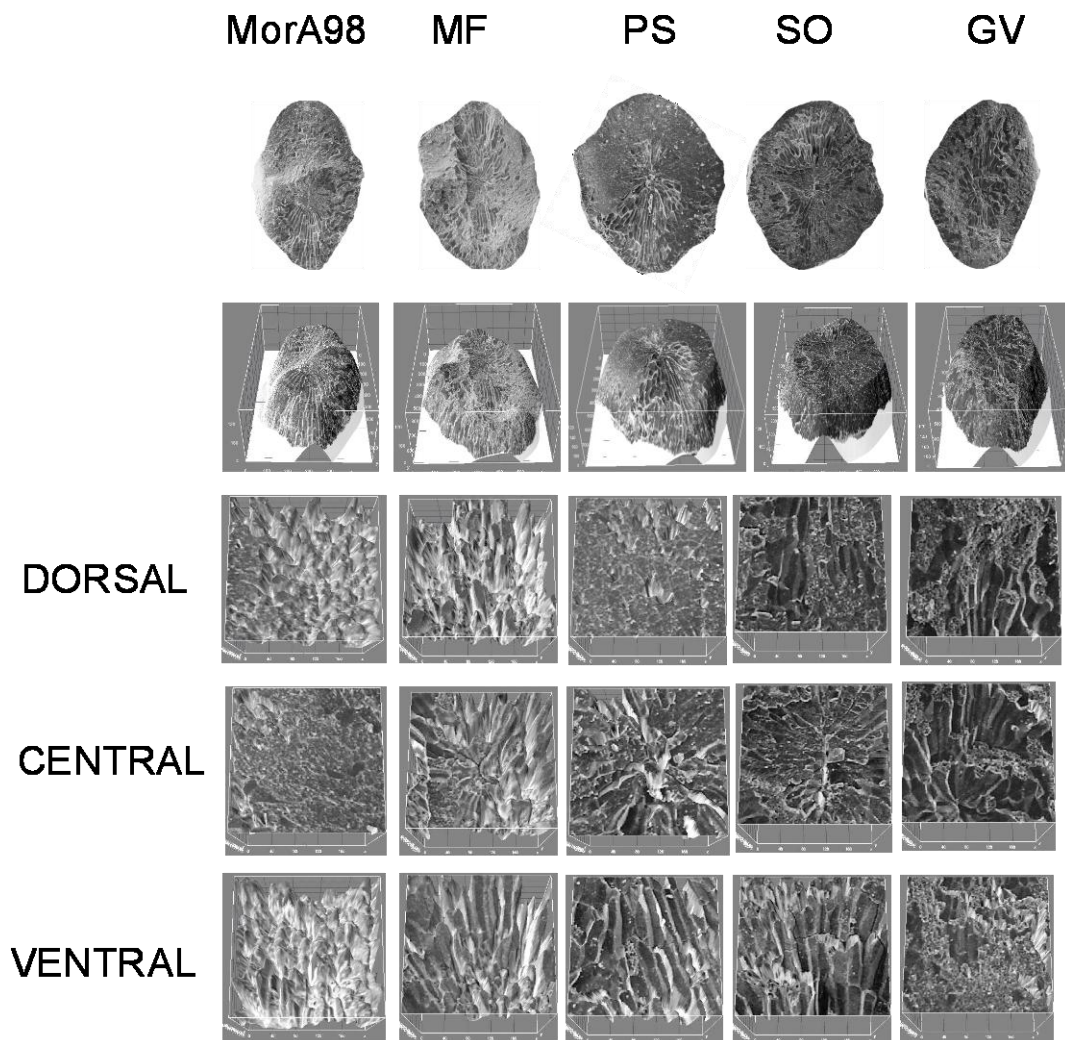


Figura 6. Reconstrucción topográfica tridimensional de la superficie de cortes transversales del grano para las cinco muestras estudiadas.

Determinación de propiedades térmicas: Temperatura de gelatinización (Tg)

La gelatinización describe el colapso irreversible del orden molecular dentro del gránulo de almidón cuando es calentado con exceso de agua (Zhou *et al.*, 2002).

La temperatura de gelatinización está fuertemente correlacionada con el tiempo de cocción y la textura del producto final (Bao *et al.*, 2007); es afectada por diversos factores como la proporción y distribución de cadenas de amilopectina (Fitzgerald, 2004; Kang *et al.*, 2006), el contenido de amilosa (Kang *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2007); las condiciones de almacenamiento: temperatura, humedad y tiempo (Zhou *et al.*, 2002); e incluso la presencia de MOB (Cheng *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2003).

En el Cuadro 4 se presentan las temperaturas de gelatinización obtenidas para cada una de las muestras en las regiones de la MOB y cristalina.

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las temperaturas de gelatinización de las regiones cristalina y de la MOB.

Determinación de propiedades térmicas: Temperatura de retrogradación (Tr)

El proceso de retrogradación consiste en que una vez que un almidón ha sido gelatinizado, bajo ciertas condiciones de almacenamiento y temperatura puede ser re-asociado a una estructura ordenada nuevamente. La retrogradación describe la rápida re-cristalización de la amilosa y la lenta re-cristalización de la amilopectina (Fitzgerald, 2004; Zhou *et al.*, 2002). En el cuadro 4 se presentan las temperaturas de retrogradación

evaluadas para las cinco muestras. Se observa que la Tr es mayor para la harina extraída de la región cristalina que para la extraída de la región de la MOB excepto para la muestra MorA98, aunque únicamente se encontraron diferencias significativas para las muestras MorA98 y MF ($P < 0.05$).

Cuadro 4. Comparación de propiedades fisicoquímicas de harinas: Tg temperatura de gelatinización, Tr temperatura de retrogradación, CA contenido de amilosa, % H porcentaje de humedad, AT almidón total.

Muestra	Región	Tg [°C]	Tr [°C]	CA	%H	AT
MorA98	Cristalina	77.28±1.90	53.54±1.13	23.13±0.83	8.735±0.04	47.42±0.31
	MOB	76.78±0.13	62.47±2.75	28.83±0.40	7.725±0.15	44.28±0.10
MF	Cristalina	67.24±0.18	59.63±1.13	22.07±0.61	7.785±0.28	51.54±0.41
	MOB	66.57±1.16	53.76±7.03	22.57±0.12	6.380±0.07	44.08±0.26
PS	Cristalina	74.60±0.19	62.56±0.39	24.50±0.28	8.525±0.42	44.81±0.50
	MOB	74.49±0.31	61.18±0.68	28.20±0.79	7.570±0.03	48.55±0.02
SO	Cristalina	74.48±0.33	62.41±0.20	28.10±0.44	7.855±0.08	51.10±0.14
	MOB	75.29±0.57	60.40±0.61	28.20±1.41	6.760±0.06	51.90±0.08
GV	Cristalina	67.17±0.39	60.10±1.05	21.40±1.13	8.470±0.64	52.60±0.05
	MOB	67.74±0.33	59.92±0.73	21.57±0.64	7.220±0.21	51.36±0.05

Amilosa aparente (CA)

El contenido de amilosa se asocia con la temperatura de gelatinización y la textura del arroz cocinado (Cheng *et al.*, 2007) y es considerado el factor más importante en la calidad sensorial del arroz (Fitzgerald *et al.*, 2009).

En el cuadro 4 se presenta el contenido de amilosa para cada una de las muestras estudiadas, se observa que para todas las muestras el contenido de amilosa es elevado (mayor al 20 %). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el contenido de amilosa entre las dos regiones estudiadas en las muestras MorA98 y PS, con una mayor proporción de amilosa en la región que corresponde a la MOB (28% vs 23-24% de la región cristalina).

No se encontraron diferencias significativas entre las regiones cristalina y de la MOB ($P > 0.05$) de las muestras MF, GV y SO, esta última presentó un contenido de amilosa similar al de la región de la MOB de las muestras MorA98 y PS (28%) en las dos secciones.

Humedad

En el cuadro 4 se presenta el contenido de humedad para cada una de las muestras estudiadas, se observa que en general el contenido de humedad es mayor en las harinas obtenidas de la región cristalina que para las harinas obtenidas de la región de la MOB.

Almidón total

El contenido de almidón es considerado determinante en las propiedades físicas y de cocción en el arroz (Fitzgerald, 2004). En el cuadro 4 se presenta el almidón total evaluado para cada una de las muestras.

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el almidón total entre las regiones cristalina y de la MOB únicamente en las muestras MorA98, MF y PS, siendo mayor en la región cristalina de las dos primeras muestras, y mayor en la región de la MOB de la muestra PS.

DISCUSIÓN

La diferencia en la textura de los cortes transversales de los granos analizados es evidente en las micrografías capturadas por MEB y se relaciona estrechamente con la posición de la MOB; estudios previos atribuyen estas diferencias a la distribución y espacios entre las células que provocan dos planos distintos de ruptura: a través del espacio intercelular, mostrando la individualidad granular por el ángulo y la curvatura sombreada en las micrografías; así como las líneas rectas dadas por trazas de la pared celular, por lo que la superficie es de apariencia lisa y brillante (Kim *et al.*, 2004). O bien, donde el corte (fractura) ocurrió intracelularmente, por lo que no es posible identificar células individuales, debido a la destrucción de la pared celular con apariencia rugosa – granular. Esto indica que la adhesión célula-célula fue mayor que la fuerza en la pared celular (Kang *et al.*, 2006).

Las apreciaciones visuales se asocian a los valores de la Dft: menor Dft en zonas de apariencia lisa y mayor en las zonas de apariencia rugosa.

Entonces, la conformación estructural poliédrica del endospermo cristalino (apariencia rugosa en las micrografías) estaría dando como resultado una mayor adhesión celular confiriéndole una mayor resistencia mecánica a la fractura. En este sentido Tamaki *et al.* (2006) reportaron menor dureza en granos con MOB que en granos de endospermo cristalino. Así mismo, es importante señalar que en la naturaleza, este tipo de morfo estructura es la que ofrece la mayor resistencia mecánica al colapso (Mandelbrot, 1997; Izquierdo, 2005).

En este sentido, Vidal *et al.* (2007), empleando MEB, observaron diferencias en la rugosidad de cortes transversales de cuatro variedades de arroz, encontrando que el eje del grano se localiza en el centro para variedades de grano largo, mientras que en granos cortos se localiza cercano a la parte ventral. No obstante, no reportaron las probables diferencias entre la MOB y el resto del endospermo de tales variedades. Estas diferencias se están haciendo evidentes por primera ocasión con este trabajo; aspecto original basado en la cuantificación de la dimensión fractal.

Propiedades térmicas

Las muestras MorA98, PS y SO presentaron las temperaturas de gelatinización más altas, -características de granos largos- y superiores a las que presentan las muestras MF y GV que son relativamente bajas y características de granos cortos (Vidal *et al.*, 2007); sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre las regiones cristalina y de la MOB de ninguna muestra, lo que coincide con lo reportado por Patindol y Wang (2003), Singh *et al.*, (2003) y Tamaki *et al.*, (2006).

Algunos trabajos previos han correlacionado la temperatura de gelatinización con la de retrogradación (Vandeputte *et al.*, 2003), o bien al contenido de amilosa (Fitzgerald, 2004), sin embargo en este trabajo no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre la Tg de las dos regiones de cada muestra. Se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) en la temperatura de retrogradación entre las regiones cristalina y de la MOB únicamente para las muestras MorA98 y MF siendo mayor para la región de la MOB en la muestra MorA98 y menor para ésta misma región de la muestra MF.

Se encontró que para todas las muestras el contenido de amilosa es elevado (mayor al 20%), característica de granos largos (Vidal *et al.*, 2007). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las dos regiones de las muestras MorA98 y PS, pero para las muestras MF, SO y GV no se encontraron diferencias significativas, lo que coincide con lo reportado por Cheng *et al.*, (2005) y Tamaki *et al.*, (2006).

Lo anterior podría sugerir que las diferencias en las propiedades físicas de estas dos regiones (dureza), se asocian a las diferencias en la estructura de las células del endospermo más bien que a las propiedades fisicoquímicas y térmicas del almidón .

CONCLUSIONES

La dimensión fractal de textura es una herramienta útil que permite cuantificar la irregularidad superficial eliminando la subjetividad de las apreciaciones visuales.

Los dos tipos de textura de los cortes transversales del endospermo: rugosa-granular con D_{ft} entre 2.76 y 2.78 y lisa con D_{ft} entre 2.70 y 2.73 están asociadas a morfologías poligonales y esféricas de los gránulos de almidón respectivamente; lo que sugiere que la forma particular en que se da la fractura –ya sea de apariencia lisa o rugosa- podría estar asociada con la ubicación de la MOB.

Se encontraron similitudes en la ubicación de los dos tipos de textura observados en los cortes transversales entre las muestras MF y GV, así como entre las muestras MorA98 y PS, pero diferentes entre ellas, lo que podría estar evidenciando que la muestra GV corresponde a la variedad MF y que la muestra PS corresponde a la variedad MorA98. En el caso de la muestra SO presenta una conformación diferente a las dos anteriores, lo que podría sugerir que se trata de una variedad diferente.

La determinación de las propiedades térmicas y fisicoquímicas no permite establecer diferencias claras entre las variedades analizadas, por lo que en el caso de las variedades comparadas las diferencias podrían estar asociadas más bien a la conformación estructural que a las características fisicoquímicas y térmicas.

LITERATURA CITADA

- Bao J., Sun M., Corke H. 2007. Analysis of genotypic diversity in starch thermal and retrogradation properties in nonwaxy rice. *Carbohydrate Polymers* 67 : 174–181.
- Cheng F., Zhong L., Zhao N., *et al.* 2005. Temperature induced changes in the starch components and biosynthetic enzymes of two rice varieties. *Plant Growth Regulation*. 46 : 87 – 95.
- Cheng F., Liu Y., Liu Z., Zhao N., Wang F., Zhang Q., Zhang G. 2007a. Positional variations in chalky occurrence within a rice panicle and its relation to grain nutritional quality. *Australian Journal of Agricultural Research*. 58 : 95 – 103.
- Cheng F., Zhang G., Zhu N., Zhao N., Wang F., Chen G., Zhang G., 2007. The difference in amylose content within a panicle as affected by the panicle morphology of rice cultivars. *Journal of Cereal Science*. 46 : 49 – 57.
- Emadzadeh B., Razavi S., Ferehmandfar R. 2010. Monitoring geometric characteristics of rice during processing by image analysis system and micrometer measurement. *International Agrophysics*. 24 : 21 - 27.
- Fitzgerald M. 2004. Starch. In *Rice*, 3rd ed.; Champagne, E. Ed. American Association of cereal chemists: St. Paul, MN. Pp 109 - 141.
- Fitzgerald M., Susan R., McCouch., Hall R. 2009. Not just a grain of rice: the quest for quality. *Trends in Plant Science* 14 : 133 – 139.

Funaba M., Ishibashi Y., Hossain A., Iwanami K., Iwaya-Inoue M. 2006. Influence of low / high temperature on water status in developing and maturing rice grains. *Plant Production Science* 9 : 347 – 354.

Goñi I., García-Alonso A., Saura-Calixto F. 1997. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutritional Research*. 17: 427-437.

Hoover R., Ratnayake W. 2002. Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars growing in Canada. *Food Chemistry*, 78: 489-498.

Kang H., Hwang I., Kim K., Choi H. 2003. Comparative structure and physicochemical properties of Ilpumbyeo, a high-quality japonica rice and its mutant sweon 464. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 6598-6603.

Kang H., Hwang I., Kim K., Choi H. 2006. Comparison of the physicochemical properties and ultrastructure of japonica and indica rice grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:4833-4838.

La Jornada 30 de abril de 2008. [En línea] Disponible:

<http://www.jornada.unam.mx/2008/04/30/index.php?section=economia&article=027n1eco>

Ley de la Propiedad Industrial. 2001. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de junio de 1991. Ediciones Luciana. México.

Mandelbrot B. 2003. *La Geometría Fractal de la Naturaleza*. Tusquets Editores, Barcelona.

NOM – 080 – SCFI – 1994 INFORMACIÓN COMERCIAL. ARROZ DE LAS VARIETADES MORELOS. ESPECIFICACIONES.

NMX – FT – 035 – SCFI – 2005 PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA USO HUMANO - CEREALES - ARROZ PULIDO - (Oryza sativa L.) - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA

Paredes-López O., Bello-Pérez A. López G. 1994. Amylopectin: structural, gelatinization and retrogradation studies. *Food Chemistry*, 50: 411-418.

Patindol J., Wang Y. 2003. Fine structures and physicochemical properties of starches from chalky and translucent rice kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 2777 – 2784.

Perales A., Avila D., Oble E. García R. 2004. El impacto del TLCAN en la cadena agroalimentaria del arroz. Universidad Autónoma Chapingo.

Quevedo A., Lopez-G C., Aguilera C. 2002. Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *Journal of Food Engineering*. 53 : 361–371.

Singh N., Sodhi N., Kaur M., Saxena S. 2003. Physico-chemical, morphological, thermal, cooking and textural properties of chalky and translucent rice kernels. *Food Chemistry*. 82 : 433 – 439.

Tamaki M., Kurita S., Toyomaru M., Itani T., Tsuchiya T., Aramaki I., Okuda M. 2006. Difference in the physical properties of white – core and non – white - core kernels

of rice varieties for sake brewing is unrelated to starch properties. *Plant Production Science*. 9(1) : 78 – 82.

Vandeputte G., Delcour J. 2004. From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*. 58 : 245 – 266.

Vidal V., Pons B., Brunnschweiler J., Handschin S., Rouau X., Mestres C. 2007. Cooking Behavior of rice in relation to kernel physicochemical and structural properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:336 – 346.

Zhou Z., Robards K., Helliwell S. and Blanchard C. 2002. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*. 37 : 849 – 868.

DISCUSION GENERAL

El arroz producido en el estado de Morelos ha sido objeto de reconocimiento internacional debido su elevado rendimiento molinero y calidad sensorial y culinaria (Moldenhauer y McKenzie, 2004). A pesar de ello su producción se reduce año con año debido principalmente a prácticas de comercio desleal, ya que es frecuente encontrar en el mercado productos que llevan la leyenda “Arroz Morelos” o “Arroz tipo Morelos” haciendo alusión a la calidad del arroz producido en dicho estado, pero que son de calidad inferior, generalmente la variedad Milagro Filipino por su parecido con la variedad Morelos A-98 ya que ambas son de grano largo y presentan la característica mancha opaca blanca en la región ventral del grano; o incluso productos que son mezclas de variedades.

Con el objeto de buscar la protección legal de variedades con características únicas, como la Morelos A-98, que delimite la región de producción en función de sus características únicas atribuibles a la región geográfica (Denominación de Origen), las leyes y normatividades respectivas, señalan la necesidad de contar con una descripción precisa y detallada del grano. Información que hasta antes de la realización del presente trabajo era inexistente.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en dos partes, la primera consistió en caracterizar el llenado del grano de arroz variedad Morelo A-98 haciendo uso de técnicas de análisis fractal de imágenes digitales; en la segunda parte se llevó a cabo una comparación entre la variedad Morelos A-98 con la variedad Milagro Filipino y tres marcas

comerciales que hacen alusión en su empaque al arroz Morelos empleando análisis fractal de imágenes digitales así como la determinación de propiedades térmicas y fisicoquímicas.

La caracterización de la variedad Morelos A-98 mostró que el llenado del grano de arroz de esta variedad se presenta de forma acelerada durante los primeros 21 días después de anthesis con un patrón asíncrono de desarrollo en la panícula siendo este mayor en la región del ápice; que su morfología se modifica gradualmente, demostrando que, tanto la panícula como el grano presentan un desarrollo asíncrono que podría estar asociado con el patrón en que se efectúa la polinización y la síntesis de almidón, generándose una estructura compacta y ordenada del endospermo al transcurrir el llenado.

Se confirmaron las observaciones reportadas en trabajos previos (Patindol y Wang, 2003; Singh *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2005; Tamaki, *et al.*, 2006), respecto a la diferencia en la morfo estructura de los gránulos de almidón entre las regiones de la MOB y cristalina, observándose que la morfo-estructura de los granos de arroz variedad Morelos A-98 de la región dorsal (cristalina) se conforma por gránulos de almidón de forma poliédrica, densamente empacados, dispuestos de forma longitudinal al grano de arroz (tipo “prisma basáltico”); de forma regular, de cinco a seis lados, mientras que en la sección de la MOB la conformación de los gránulos de almidón es más bien esférica, pobremente empacados, con espacios de aire entre sí.

En este sentido se observó una mayor organización estructural en la región dorsal que en la ventral lo cual podría estar asociado a la dureza del endospermo y a la presencia de la mancha opaca blanca, es decir, que a un menor nivel de organización estructural

(MOB), el endospermo tiende a ser menos duro y más susceptible a quebrarse, lo que confirma los hallazgos reportados por otros autores en referencia a variedades con MOB (Patindol y Wang, 2003; Funaba *et al.*, 2006; Tamaki *et al.* 2006; Yoshioka *et al.*, 2007).

Sin embargo, para la variedad Morelos A-98, la presencia de la mancha opaca blanca en una parte importante del endospermo (mayor al 20%), no repercute, al menos de forma importante en el rendimiento molinero como mencionan los citados trabajos, dado que, es precisamente el elevado rendimiento molinero lo que caracteriza a la variedad Morelos A-98.

La segunda parte del trabajo demostró que la caracterización morfo estructural de la mancha opaca blanca puede ser empleada como un factor complementario para establecer diferencias entre granos de arroz, ya que confirmó las diferencias encontradas entre las variedades Morelos A-98 y Milagro Filipino mediante la temperatura de gelatinización y contenido de amilosa. Esta herramienta resulta particularmente importante cuando se trata de diferenciar variedades que a simple vista son muy parecidas,.

En este sentido, la dimensión fractal de textura evaluada para las cinco variedades comparadas demostró cuantitativamente que la morfoestructura de los gránulos está asociada a la textura en los cortes transversales del endospermo es decir la textura de apariencia rugosa-granular (D_{ft} entre 2.76 y 2.78) se asocia a morfologías de gránulo poligonales, mientras que texturas de apariencia lisa (D_{ft} entre 2.70 y 2.73) se asocia a gránulos de apariencia esférica; y que a su vez ésta textura en los cortes transversales se relaciona con la presencia de la MOB, independientemente de su ubicación; la cual varía en

función de la variedad de arroz, y que aunque la variedad Milagro Filipino la presenta en el centro del endospermo, la cristalinidad de la región externa del grano da la apariencia de estar en la región ventral como en la variedad Morelos A-98, por lo que es muy fácil de confundir.

En el caso de las diferencias entre las dos regiones (MOB y cristalina) para una misma variedad, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el contenido de amilosa y la temperatura de gelatinización, lo que podría sugerir que las diferencias en las propiedades físicas de estas dos regiones (dureza) podrían estar relacionadas con las diferencias en la estructura de las células del endospermo en cada una de las regiones, más bien que a las propiedades térmicas o fisicoquímicas del almidón.

Finalmente no se encontró efecto de la temperatura y humedad ambiental en la morfo estructura del grano, dado que, estos parámetros se mantuvieron sin cambios significativos y que las temperaturas máximas (alrededor de los 30 °C) se registraron durante el día (entre las 12 y 17 horas) y no por la noche (temperatura máxima alrededor de los 20 °C). Lo que sugiere que la presencia de la mancha opaca blanca particularmente en la región ventral del endospermo es de origen genético, y no necesariamente atribuible a un llenado defectuoso como consecuencia de un desarrollo acelerado del endospermo como se ha considerado por otros autores (Cheng *et al.*, 2005; Funaba *et al.*, 2006; Ishimaru *et al.*, 2009); por lo que podría entonces, considerarse como un rasgo distintivo de la variedad Morelos A-98.

CONCLUSIONES GENERALES

El análisis fractal de imágenes digitales es una técnica que tiene, relativamente, poco tiempo de uso, si bien su utilidad en lo que respecta a la determinación o medición de la irregularidad no está a discusión. En este momento se hace necesario complementarla con otras técnicas validadas (geometría euclidiana y determinación de propiedades fisicoquímicas o térmicas, e incluso de biología molecular) para ser empleada con seguridad en la caracterización de variedades, adicionalmente es necesario establecer correlaciones entre las técnicas y definir el margen de error en que se incurre, dado que, cada material biológico tiene características muy particulares.

En el caso de la comparación de variedades la dimension fractal de textura es una herramienta de suma utilidad, dado que la determinación de propiedades térmicas y fisicoquímicas, no fue contundente, ya que en su mayoría no se encontraron diferencias significativas entre las dos regiones estudiadas; por lo que se concluye que, las diferencias entre las dos regiones del endospermo comparadas (MOB y cristalina) podrían estar asociadas a la conformación estructural de los gránulos de almidón, más bien que a sus características fisicoquímicas.

Finalmente no se encontró ningún efecto en la morfoestructura del grano como consecuencia de la temperatura, lo que sugiere que la presencia de la MOB, en la variedad Morelos A-98 sea de origen genético, por lo que podría ser considerada como un rasgo distintivo de la variedad.

ANEXO

Artículo aceptado para su publicación en The Scientific World Journal:

MORPHO STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF RICE GRAIN (*Oryza sativa* L.) VARIETY MORELOS “A98” DURING FILLING STAGES

Espinoza-Mendoza Rosa Elena, Solorza-Feria Javier, Arenas-Ocampo Martha Lucia, Camacho-Díaz Brenda Hildeliza, Del Villar-Martínez Alma Angélica, Vanegas-Espinoza Pablo, Jiménez-Aparicio Antonio Ruperto *

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN, Carr. Yautepec-Jojutla km.6, Calle CEPROBI No.8, San Isidro, C.P., 62731 Yautepec, Morelos, Mexico.

* Corresponding author. Phone: +52 735 3942020. Fax: +52 735 3941896. E-mail address: aaparici@ipn.mx

ABSTRACT

The morphostructure of grain rice Morelos A98 was characterized in five stages of physiological maturation, in order to generate morphometric information during the filling process. Micrographic images from optical and scanning electron microscopy coupled to a digital capture system, were used. Images were digitally processed to measure different descriptors such as shape, fractal dimension and surface texture. Results showed that two weeks after anthesis, an accelerated grain filling was observed, particularly on those grains positioned in the distal panicle zone, compared to those located in the base of this one. As deposition of assimilates in the grain increased, the area and perimeter of the transversal cut of the grains also increased ($P \leq 0.05$), meanwhile, the rounded shape factor tended to increase as well ($P \leq 0.05$), while the elliptic shape factor decreased. As the dehydrated endosperm, passed from “milky” to “doughy” stages, values of fractal dimension area and endosperm perimeter as well as surface texture values, showed that grain borders tended to become smoother and there was a greater structured endosperm area ($P \leq 0.05$).

Key words: *Oryza sativa* L., morphometric descriptors, fractal dimension, digital image processing.

INTRODUCTION

Rice (*Oryza sativa* L.) is the fourth food product of basic consumption in Mexico. Mexican varieties of rice, in particular the “Morelos” one, are recognized by their agronomic, milling and cooking characteristics [1]. Among diverse factors that determine rice commercial quality, there is uniformity in terms of size and form, cleanness and its crystallinity or opacity. The rice variety Morelos A98 (MorA98) is characterized by a grain of long length (> 7 mm), thin ($> 2,4$ mm) and opaque [2]. Opacity of MorA98 is due to the presence of a distinctive starchy white spot in the ventral region in more than 20% of the grain surface, well-known as “White belly” (WB) [3, 2]. Some authors have suggested that WB could be a defect of the grain known as chalkiness, this discredits its general appearance and diminishes its mill yield [4, 5, 6]. Grains presenting chalkiness have a tendency to be less hard and more susceptible to fracture [7]. On the other hand, WB presence seems to be influenced by environmental factors, such as high temperatures, that interrupt the normal filling of the grain during its development, therefore no uniform maturation stages occur [8]; this can also be influenced by diseases or when grain is harvested with high moisture content [5, 9]. Some authors suggest that WB is a distinguishing varietal characteristic that is controlled genetically [7]. Using differential scanning calorimetric techniques, viscoamilography and microscopy coupled to digital image analysis (DIA), it has been possible to characterize different rice varieties and the presence of WB [10, 11]. Yoshioka *et al.* [6] using DIA managed to establish differences between chalkiness and WB, being able to locate accurately the position of WB in the grain. Nevertheless, the structural complexity and the irregular morphology present in rice grain, limits the use of analytical tools derived from euclidian geometry for its quantification and interpretation; however, fractal geometry can allow the description of objects that exhibit a high complexity degree [12]. The fractal dimension (FD), magnitude of irregular objects is related to diverse properties including rugosity, sinuosity and accidentability [13]. Generally, FD can be expressed in linear terms as fractal dimension of perimeter (FDP) or area (FDA). FDP measures the irregularity degree of contours or borders whereas FDA quantifies the proportion of the plane that is occupied by a given object [12]. In the case of rice, research papers are scarce on image fractal analysis furthermore, Mexican varieties have not been object of this type of studies. In this work, optical microscopy, scanning electronic microscopy, digital image analysis and fractal dimension were used for the morphostructural characterization of rice MorA98 endosperm, in five stages of physiological maturation and four panicle positions; also, grain morphometric characteristics were described in relation to temperature and environmental humidity, in the probable formation of the WB in the grain of this rice variety.

MATERIALS AND METHODS

Biological materials and sampling

The present research was carried out in an experimental parcel seeded with rice (*Oryza sativa* L.) variety MorA98, corresponding to 2007 cycle; in the Experimental Field Zacatapec (CEZ) belonging to the National Institute of Forest, Agricultural Investigations and Livestock of Mexico (INIFAP). Plants were marked at anthesis time, obtaining grain samples in within 7, 14, 21, 28 and 35 days after anthesis (DAF); at four different levels (arbitrary) in panicle from apex up to the base from the first spike. It was considered that the first level corresponded to the apex and the fourth level to the base. From each plant, three panicles were collected and 180 grains were analyzed. Panicles were kept in hermetic bags to avoid moisture losses during their transfer to laboratory. [Subsequently](#), grains were transversely sectioned from their middle part, using a scalpel; the cut was always performed in the same direction (from distal to the ventral part). A portion of the segmented grain was observed with an optical microscope (OM), whereas the other portion was treated with a fixation and post - fixation process, in order to be observed in scanning electronic microscope (SEM), in agreement with the description made in the following sections. Finally, morphological and structural characteristics of grains were evaluated using DIA and FD, as described in further sections.

Environmental data

In order to relate temperature and environmental humidity, to the formation of WB in rice variety MorA98 throughout grain maturation in field, registries were continuously obtained recording relative humidity, maximum, minimum and average temperatures from September 17 to October 28 of 2007; this data were provided by the meteorology station of CEZ - INIFAP.

Observations in optical microscopy and digital images capture

Each cut was placed in the observation sector of the stereoscopic microscope (Nikon, model LZM 1500, Japan), making sure that the grain ventral part was orientated towards the image right side. Observations were accomplished at 3X or 4X, in such way that all grain transversal section was included in the observation field; illumination was realized in coaxial form, using an optical fiber system with an optical xenon illuminant (Nikon, model LI-500, Japan). Images capture was performed through a digital camera (Dage-MTI model DC330, Japan) placed in the microscope body, which was also connected by means of an interphase type flashbus (Integral Technologies, model MV-Pro, USA) to a generic computer (processor speed 2,66 GHz and 4 GB RAM memory). Images were captured with MetaMorph V. 6,1 software (Meta Imaging Series Environment,

Universal Imaging Co., USA) and they were digitally stored (1280 x 960 pixels, 300 ppp) without compression, with “tiff” format (Tagged Image File Format) until its processing with DIA.

Digital images analysis (DIA)

WB images were digitally processed using the procedure reported by Yoshioka *et al.* [6]. Initially, images were standardized with the aid of Corel program PhotoPaint V11.5 (Corel Co., USA). They were converted to gray scale of 8 bits and format *.bmp (Bits map protocol), adjusting brightness, contrast and intensity. Ensuing area of interest was manually selected, segmenting and extracting it from the rest of the image, in order to place it in a new folder, in such a way that an isolated object remained. These new images were binarized (2 bits) with the tool “Threshold” and they were saved in *.bmp format with 300 ppp resolution for further measurement of morphometric characteristics of interest, as well as for FD evaluation.

Morphometric descriptors determination

Morphometry of images obtained by OM was evaluated with Sigma Scan Pro V5.0 program (Inc. SPSS, the USA), taking as a base the anticipated physical parameters established by the Mexican Official Norms NOM-080-SCFI-1994 and NMX-FF-035-SCFI-2005. Software was calibrated using a micrometer image (Nikon, Japan) with 100 µm length, captured under the same conditions as images of rice grains. Following morphometric descriptors (Figure 1): area (A), perimeter (P), maximum length (ML), minimum length (mL), form factor (SF) and compactness factor (CF) were determined. Collected data were recorded in Microsoft Excel spreadsheet for subsequent analysis. Elliptical factor (EF) was calculated in Excel sheet, in agreement with reports by Davies [14]. ML refers to the length between two more distant pixels of object, whereas is perpendicular to Lm [15]; as a consequence, EF is the ratio of:

$$EF = ML/mL \dots\dots\dots (1)$$

If such a ratio is 1,0, the object is a circle, whereas if it is > 1.0, the object is an ellipse. On the other hand, SF is defined as:

$$SF = 4\pi A / P^2 \dots\dots\dots(2)$$

Aftermath if $SF \approx 1$, the object is circular (spherical) and is not any more when $SF < 1$. In the case of CF, this one is a measurement of the form of an object and pertains to how compact it is or it is not; it is defined as:

$$CF = P^2/A \dots\dots\dots (3)$$

If CF value is 12.57 that is to say 4π , the object is a compact circle; if this value is greater than this value, the object begins to take the form from a line and therefore CF tends to be infinite [15].

Determination of fractal dimension of perimeter and area

Fractal dimension of rice transversal cuts during its filling was calculated by means of a dimensional analysis of Power Law [16]. FDP relates characteristic length (ML) to P and measures the extension degree in which the perimeter fills the plane [13] in agreement with the equation:

$$P \propto ML^{FDP} \dots\dots\dots (4)$$

Whereas FDA is determined from the relation between ML and A with:

$$A \propto ML^{FDA} \dots\dots\dots (5)$$

Clearing proportionality signs in (4) and (5), corresponding to fractal dimension values, can be obtained from respective logarithmic relations, and in such a way that FDP was calculated using the equation proposed by Olsen *et al* [17]:

$$FDP = 2 \cdot \left(\frac{\ln \frac{P}{4}}{\ln A} \right) \dots\dots\dots (6)$$

In which FDP value quantifies the irregularity degree of the object edge, in such a way that FDP of a straight line ≈ 1 ; if such line becomes sinuous or rough (irregular), the value will be $FDP > 1$.

On the other hand, for fractal area dimension FDA, the maximum area-length relationship was used, as proposed by Voss [18], according to equation (7).

$$FDA = \left(\frac{\ln A}{\ln ML} \right) \dots\dots\dots(7)$$

In which FDA value quantifies the proportion of a plane that is occupied by the object of interest in such a way that if $FDA \approx 2$ the object is a plane; smaller values mean it is an incomplete plane and therefore irregular [19].

Scanning Electronic microscopy (SEM)

A standard protocol was followed of fixation and post - fixation of samples [20] to be observed with SEM. Transversal sections of grains (two per each sampling day, corresponding to levels 1 and 3) were introduced in vials that contained 1,5 ml of 3% (v/v) glutaraldehyde for their fixation during 2 h, then, three washings were done with a phosphate solution with a 10 min rest in between each one. At the end of these washings, samples were placed in 1 % osmium tetroxide (v/v) for post-fixation during 2 h; afterwards, three washings with phosphate solution again took place, letting stand 10 min each, followed by ethanol dehydration with ascending concentrations (10 to 100% v/v) and dried with hexamethyldisilazane at 98,5%. Later, treated samples were ionized with a 14 nm gold cover with 15 mAmps current. Observations were performed in an electron scanning microscope (Jeol, model JSM - 5800LV, Japan).

First a digital image was captured (640 x 480 pixels), at a x40 or x50 resolution (as required) and 20KVa of complete transversal cut; as well as two of x2, 000 and 20KVa corresponding to crystalline region and WB respectively (Figure 2).

Digital images were stored in a *.jpg format (Joint Photographic Experts Group), without using image compression. Images were converted to gray scale (8 bits, *.bmp format) in order to evaluate different textural parameters by means of DIA.

Evaluation of textural parameters

Scanning electronic micrographs (2000X magnification) were analyzed with the tool “GLMC Texture” (Gray Level Co-occurrence Matrix) of Image J V.1.34, and in agreement with Lepistö *et al.* [21], the following parameters were determined:

- a) Entropy (E). Which corresponds to disorganization or randomness of the objects in the image, that is possible to be measured based on occurrence probability of pixels, in such a way that, if these are randomly distributed (major disorganization state), E value is high; on the contrary, if pixels of objects contained in the image have a certain level of organization, the E value diminishes.
- b) Second Angular Moment (SAM). It corresponds to a homogeneity measurement of pixels in an image; a high value of SAM indicates that pixels that conform the objects of the image are very similar, which denotes an elevated organization level.

Statistical analysis

In each of the five reproductive development stages, three panicles were randomly sampled from three independent plants. A descriptive analysis was accomplished by means of Sigma Stat V. 3.5 program (SPSS Inc, USA) which included: average, median, standard deviation, standard error, maximums and minimums. One way analyses of variance were performed and in the case of obtaining significance ($P \leq 0.05$), multiple comparative test were realized (per week and by interval), using Dunn's test at the same significance level for evaluated descriptors in endosperm, due to this test allows to make comparisons even though the same number of data is not available, as for the case of vain grains.

RESULTS AND DISCUSSION

Dimensional morphometric descriptors

With micrographs of transversal cross section of rice grain (Figure 3), the different filling stages are exemplified, until the grain reaches its average final moisture (8 - 10% content). It was found that the perimeter, P as well as the area, A of rice grain variety Mor A98 increased as grain maturation advanced (Table 1). This characteristic is probably due to protein, lipid and granule starch deposition in the embryonic grain sack [22]. Interaction between these compounds in a liquid matrix ("milky" stage) is the responsible of grain morpho-structural conformation, when this one is dried [23]. The dimensions for A and P descriptors in grains transversal cuts were statistically larger ($P \leq 0.05$) in the higher part of the panicle, decreasing towards the base (Table 1). This suggests an asynchronous filling pattern in the first stages of grain maturation; that means, materials accumulation of the endosperm took place from the apex (position 1) to the base (position 4). Previous behavior can be due on the one hand, to pattern in which the pollination occurs (apex to base) and on the other hand, to pattern in which starch synthesis occurs [24]. In this sense Mohapatra *et al.* [25] reported that the enzymatic activity responsible for this process, such as the ADP-glucose pyrophosphorylase (AGP), starch syntase (SS) and their diverse isoforms, appear in earlier way and in greater amount in grains located in the apical region, that in those located in the basal part of the panicle, which agrees with the observed changes for A and P . Besides, interval comparisons did not show significant differences between contiguous intervals for both descriptors and in fact, differences found tended to disappear as grain filling had elapsed; for example, A in intervals 2-3 of DAF 7, or as well, P in intervals 3-4 of DAF 21. In this form, at the end of panicle filling it has reached a degree of relatively homogenous structural development. Previous discussion agrees with data reported by Cheng *et al.* [26], who when characterizing diverse rice varieties found that starch in mature grains, before being harvested, had a similar structural organization. These authors postulated that the variations found, depended on the panicle grain position and were related to the enzymatic activity SS and AGP. On the other hand, comparisons realized per week for a same interval (Figure 1) showed a tendency to increase A and P during grain filling. Nevertheless, in contrast of what happened in between panicle intervals, a non-uniform pattern in grain structural development was observed. That is to say, the magnitude of change in both parameters (relative speed of grain growth) was greater in the first 10 days after flowering, between DAF 7 and 14, than those obtained between the days 28 and 35, in which there was no a significant difference ($P \geq 0.05$). This pattern, apparently disordered, agrees with the finish of protein and lipid accelerated accumulation in early

stages of the filling, as well as with the ending of cellular division and the endosperm expansion, to give place to the beginning of starch synthesis and deposition [22, 23]. In the same way, Mohapatra *et al.* [25] reported an accelerated increase in enzymes SS and AGP activity from anthesis time, reaching its maximum in 10 and 13 days after anthesis (DAF), respectively. It is relevant the fact that from day 21 DAF, it was observed a slight decrease in average P and A values in all the intervals. This particularity coincided with the cut of irrigation water provision (day 20 DAF) and therefore, with the decrease of grain moisture content and in the accelerated endosperm solidification [27, 8]. In this process, the endosperm components shift from being a fluid (“milky” stage) to a semisolid paste (“smooth mass” stage), mainly because there is an increase in concentration of assimilates, associated with the movement and loss of water by evaporation, in the normal grain maturation process [5]. During that period, sudden changes in the environmental conditions were not observed (Figure 3). In agreement with Umemoto *et al.* [26] and Cheng *et al.* [8], drastic changes in temperature as in environmental relative humidity, affect the normal grain filling during their development, generating non uniform maturation stages. Between DAF 14 and 28 relative humidity oscillated between 76.3 and 78.2% (average $76.2 \pm 1.3\%$), maximum temperature between 30.5 and 32.1 °C (average 31.2 ± 0.7) and minimum temperature between 15.5 and 17.5 °C (average 16.3 ± 0.7 °C); that it is to say, they remained without significant changes.

Form descriptors

During grain filling, the grain is acquiring a less elliptical form (EF value decreases) and a more rounded one (SF value increases) in its center (cross-section) (Figure 1). Although no significant differences ($P \geq 0.05$) were found between contiguous intervals in all 35 days for both factors (except days 28 and 35 DAF), at the panicle higher part; the grain form came close to that of a circle ($SF \approx 1$ and lower EF), whereas at the panicle lower part, EF increased and FF was reduced. Finally, such differences did not tend to appear as filling were increased, in such a way that in days between 28 and 35, there were no significant differences for both factors ($P \geq 0.05$). It is known that accumulation of assimilates in the rice grain, appears uniformly distributed all over the grain the first days after anthesis [22, 8], filling in this way the embryonic sack, which has an elliptical form (high EF), but without exerting pressure over its walls; later, the starch accumulation occurs from the center towards the edges, forming concentric layers [22], increasing the pressure towards the embryonic sack walls, and in addition, the moisture content decreases [8, 5]; which overall, would give as a consequence, that a rounder form would take place (SF increase).

Irregularity descriptors

During rice grain filling, it was observed that FDP value decreased, becoming the edge of this grain less rough (Figure 5). This characteristic also appeared in relation to the panicle position and it was placed in the lower part of the grain; that is to say, FDP of interval 2 < FDP of interval 1, etc. Hence, as the rice grain begins to structure, the embryonic sack walls begin to contain a greater amount of assimilates [23, 5], which would be increasing the turgidity pressure and therefore, the sack edge would be smooth. The smoothness

increase in the edge becomes stabilized from day 21, agreeing with the beginning of grain dehydration and solidification, until reaching the final structure in which it is harvested [27, 8]; therefore, there was a greater homogeneity in FDP values by interval in days 28 to 35.

It was found that during the filling process of the grain as well as with the increase in its panicle position, the transversal area tended to occupy more the plane and therefore it was less irregular (Figure 6); for instance, FDA of day 7 < FDA of day 14 etc. and FDA of interval 2 < FDA of interval 1, etc. The same way to what occurs with the embryonic sack walls; as the rice grain begins to structure itself, it displays a greater amount of assimilates, [22, 5]. As a consequence of filling, the volume occupied was greater; which was observed as an increase in an occupied area in a two dimensions image. It is important to indicate that the obtained kinetics for FDP as well as for FDA followed a nonlinear complex behavior, finding a dispersion of Power Law type, whose exponents (FDP and FDA) are fractionate, characteristic of substances migration. In this case, of assimilates deposition and starch biosynthesis, that occur during the structuring processes [28]. Results of fractal dimension were similar to those reported for other biological systems, such as plant morphology, growth of mycelium in fungi [29], growth of vegetal cells, aggregation processes of red blood cell [30], angiostatic activity of phytomedicaments [31] among others; whose FDP were between 1.02 and 1.06, whereas the FDA were from 1.7 to 1.9.

Textural parameters of MorA98 during endosperm development

Textural parameters of photomicrographies SEM, for transversal cuts of Mor A98, exhibited changes throughout the endosperm structuring, for both dorsal and ventral regions as shown in Figure 7. It was observed that the greater entropic value and therefore, the one with highest structural irregularity, appeared at the beginning of the grain filling (“milky” stage) in the dorsal region (Figure 7A); however, even though this situation, there were no significant differences between the different panicle positions ($P \geq 0.05$). On the contrary, the SAM presented the smallest value at the beginning of the filling, registering significant differences between different panicle positions, in which position 1 tended to reach an ordinate structure quicker than position three. The structural level of organization/disorganization seems to become stabilized from day 21 onwards, reaching the greater value of SAM when the grain was completely dry. This behavior agrees with that reported by Cheng *et al.* [26], who characterized diverse varieties of rice by means of SEM, differential scanning calorimetry and viscoamilograpy, finding that starch in mature grains had a similar structural organization before being harvested and that variations found, depended on the grain position in panicle. Respect to textural parameters of ventral region (Figure 7B), the behavior was similar to those shown on dorsal region, although E and SAM values were smaller; this aspect indicates that, notwithstanding, exists a tendency to a structural organization of the WB, this one reaching a lower value than the crystalline endosperm. In the same way, these differences could be related to hardness values of the endosperm, in such a way that at a lower level of structural organization, the endosperm tends to be less hard and thus, more susceptible to become broken [7]. It is worth

indicating that, mechanical properties (hardness), textural characteristics as well as structural organization of rice endosperm, are given to a great extent, to the starch granules morphology| for the different regions (dorsal and ventral), the packing density and the occluded air spaces that are formed during grain drying [32, 10], such aspects would be interesting to evaluate by means of TDI techniques and dimension fractal concepts for variety MorA98.

CONCLUSIONS

From the evaluation of morphometric descriptors, it was shown that filling of rice grain variety MorA9, rapidly appears during the first 20 days after anthesis, with an asynchronous pattern of development in panicle, being this higher in the apex region. In the same way, it was observed that through filling, the endosperm has a tendency to present a greater level of structural organization.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to CONACyT (Mexican Council of Science and Technology) and SIP – IPN (Research and Graduate Secretary-Mexican National Polytechnic Institute) for the economic support to accomplish this research. Author REEM hold a CONACyT scholarship to obtain her doctoral degree.

REFERENCES

1. **Moldenhauer, A., Gibbons, J. H. and McKenzie, K. S. (2004)** *Rice Varieties In: Rice* Editorial Chemistry and Technology. E T Champagne American Association of Cereal Chemists: St. Paul.
2. **Secretaria de Comercio y Fomento Industrial (2005)** Norma mexicana NMX-FF-035-SCFI-2005 Productos alimenticios no industrializados para uso humano - cereales - arroz pulido - (*Oryza sativa* L.) - especificaciones y métodos de prueba. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/v1/agricultura/info/comp/it/normas/nmx/NMX_ARRROZ_PULIDO. Accesado: Julio 2007.
3. **FAO (1995)** *Evaluación de la calidad de los granos en América Latina*. Propuesta para uniformizar el sistema de evaluación. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, Santiago, Chile.
4. **Patindol, J. and Wang, Y.-J (2003)** Fine structures and physicochemical properties of starches from chalky and translucent rice kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 2777–2784.
5. **Funaba, M. Y., Ishibashi, A. H., Molla, K., Iwanami, M. and Iwaya-Inoue (2006)** Influence of low / high temperature on water status in developing and maturing rice grains. *Plant Production Science* 9, 347–354.

6. **Yoshioka, Y., Iwata, H., Tabata, M., Ninomiya, S. and Ohsawa, R. (2007)** Chalkiness in rice: potential for evaluation with image analysis. *Crop Science* 47, 2113–2110.
7. **Tamaki, M., Kurita, S., Toyomaru, M., Itani, T., Tsuchiya, T., Aramaki, I. and Okuda, M. (2006)** Difference in the physical properties of white – core and non – white - core kernels of rice varieties for sake brewing is unrelated to starch properties. *Plant Production Science* 9, 78–82.
8. **Cheng, F. M., Zhong, L. J., Wang, F. and Zhang, G. P. (2005)** Differences in cooking and eating properties between chalky and translucent parts in rice grains. *Food Chemistry* 90, 39-46.
9. **Ishimaru, T., Horigane, A. K., Ida, M., Iwasawa, N., San-oh, Y. A., Nakazono, M., Nishizawa, N. K., Masumura, T., Kondo, M. and Yoshida, M. (2009)** Formation of grain chalkiness and changes in water distribution in developing rice caryopses grown under high-temperature stress. *Journal of Cereal Science* 50, 166–174.
10. **Hee-Jin, K., In-Kyeong, H., Kyung-Soo, K. and Hae-Chune, C. (2006)** Comparison of the physicochemical properties and ultrastructure of japonica and indica rice grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4833-4838.
11. **Vidal, V., Pons, B., Brunnschweiler, J., Handschin, S., Rouau, X., and Mestres, C. (2007)** Cooking Behavior of rice in relation to kernel physicochemical and structural properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 336–346.
12. **Chakraborti, R. K., Gardner, K. H., Atkinson, J. F. and Van Benschoten, J. E. (2003)** Changes in fractal dimension during aggregation. *Water Research* 37, 873-883.
13. **Kenkel, N. C. and Walker, D. J. (1996)** Fractals in the biological sciences. Disponible en: <http://www.umanitoba.ca/faculties/science/botany/labs/ecology/fractals/fractal.html>. Accesado: 2 de julio de 2003.
14. **Davies, E. (2000)** Image Processing for the Food Industry. *Series in Machine Perception and Artificial Intelligence Vol 37*. Ed. World Scientific Publishing, Singapur.
15. **Gonzalez, R. C. and Woods, R. E., (2008)** Digital Image Processing, Pearson – Prentice Hall, Upper Saddle River NJ.
16. **Tang, S., Ma, Y and Sebastine, I. M. (2001)** The fractal nature of Escherichia coli biological flocs. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 20, 211–218.
17. **Olsen, E. R., Ramsey, R. and Winn, D. (1993)** A modified fractal dimension as a measurement of landscape diversity. *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing* 59, 1517-1520.
18. **Voss, R. (1988)** *Fractals in nature: from characterization to simulation. The Science of Fractal Images*. Springer, New York. pp: 21-70.
19. **Lira, J. (2002)** *Introducción al Tratamiento Digital de Imágenes*. Fondo de Cultura Económica e IPN. México.
20. **Bozzola, J. and Ruseell, L. (1999)** Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists. *Jones and Bartlet Publishers*. 49 – 70.
21. **Lepistö, L., Kunttu, I., Autio, J. and Visa, A. (2003)** Rock Image Classification Using Non-Homogenous Textures and Spectral Imaging. *Proc. 11th International Conference in Central Europe on Computer Graphics, Visualization and Computer Vision. University of West Bohemia*.

22. **He, G. C., Kogure, K. and Susuki, H. (1989)** Development of endosperm and synthesis of starch in rice grain. *Japanese Journal of Crop Science* 58, 246-252.
23. **Kobata, T., Sugawara, M. and Takatu, S. (2000)** Shading during the early grain filling period does not affect potential grain dry matter increase in rice. *Agronomy Journal* 92, 411–417.
24. **Myers, A. (2004)** *The rice plant: growth, development, and genetic improvement*. Rice Chemistry and Technology. E T Champagne. American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN.
25. **Mohapatra, P. K., Sarkar, R. K. and Kuanar, S. R. (2009)** Starch synthesizing enzymes and sink strength of grains of contrasting rice cultivars. *Plant Science* 176, 256–263.
26. **Cheng, F. M., Zhang, Q. F., Zhu, H. J., Zhao, N. C., Wang, F., Chen, K. M. and Zhang, G.P. (2007)** The difference in amylose content within a panicle as affected by the panicle morphology of rice cultivars. *Journal of Cereal Science* 46, 49 – 57.
27. **Umemoto, T., Nakamura, Y. and Ishikura, N. (1995).** Activity of starch synthase and the amylose content in rice endosperm. *Phytochemistry* 40, 1613–1616.
28. **Waliszewski, P., Konarski, J. (2001)** Tissue as a self-organizing system with fractal dynamics. *Space Res.* 28, 545-548.
29. **Papagianni, M. (2006)** Quantification of the fractal nature of mycelial aggregation in *Aspergillus niger* submerged cultures. *Microbial Cell Factories* 5, 1-13.
30. **Kang, M., Yan-Jun, Z. and Jian-Gang, L. (2000)** Fractal research on red blood cell aggregation. Brief communication. *IOS Press Clinical Hemorheology and Microcirculation* 22, 229–236.
31. **Guidolin, D., Vacca, A., Nussdorfer, G. G. and Ribattic, D. (2004)** A new image analysis method based on topological and fractal parameters to evaluate the angiostatic activity of docetaxel by using the Matrigel assay *in vitro*. *Microvascular Research* 67, 117–124.
32. **Singh, N., Sodhi, N. S., Kaur, M., Saxena, S. K. (2003)** Physico-chemical, morphological, thermal, cooking and textural properties of chalky and translucent rice kernels. *Food Chemistry* 82, 433–439.

Table1. Comparison of dimensional morphometric and form descriptors by interval in transversal cut sections of rice grain MorA98.

DAF	Interval	A (mm ²)	P(mm)	SF	EF	ML (mm)	mL (mm)	CF
1	1	2.36 ± 0.41 a	8.95 ± 0.60 a	0.52 ± 0.05 a	2.91 ± 0.52 a	3.09 ± 0.15 a	1.09 ± 0.17 a	24.65 ± 2.74 a
	2	2.12 ± 0.52 a	8.81 ± 0.98 a	0.48 ± 0.07 b	3.02 ± 0.53 a	3.03 ± 0.32 a	1.03 ± 0.20 ab	26.59 ± 4.63 a
	3	1.71 ± 0.58 b	7.94 ± 1.33 b	0.47 ± 0.06 b	2.95 ± 0.51 a	2.69 ± 0.52 b	0.93 ± 0.20 bc	27.03 ± 3.18 a
	4	1.40 ± 0.50 b	7.07 ± 1.37 c	0.48 ± 0.05 b	2.76 ± 0.45 a	2.37 ± 0.50 c	0.87 ± 0.16 c	26.20 ± 2.81 a
2	1	3.73 ± 0.38 a	10.01 ± 0.55 a	0.67 ± 0.02 a	1.80 ± 0.15 a	3.11 ± 0.19 a	1.74 ± 0.14 a	18.75 ± 0.67 a
	2	3.56 ± 0.41 a	9.93 ± 0.53 a	0.66 ± 0.04 a	1.87 ± 0.14 a	3.16 ± 0.15 a	1.70 ± 0.14 a	19.23 ± 1.22 a
	3	3.24 ± 0.52 b	9.48 ± 0.50 b	0.65 ± 0.06 a	2.48 ± 0.65 b	3.13 ± 0.13 a	1.54 ± 0.20 b	19.63 ± 2.00 a
	4	1.99 ± 0.81 c	7.87 ± 1.46 c	0.57 ± 0.93 b	2.26 ± 0.40 b	2.56 ± 0.55 b	1.15 ± 0.29 c	22.73 ± 5.39 b
3	1	3.65 ± 0.41 a	9.66 ± 0.59 a	0.71 ± 0.05 a	1.78 ± 0.22 a	3.02 ± 0.23 a	1.72 ± 0.16 a	17.80 ± 1.37 a
	2	3.41 ± 0.55 a	9.62 ± 0.74 a	0.67 ± 0.07 b	2.00 ± 0.37 ab	3.09 ± 0.27 a	1.59 ± 0.24 ab	18.92 ± 1.94 a
	3	3.06 ± 0.99 b	9.33 ± 1.27 b	0.61 ± 0.13 c	2.16 ± 0.62 b	3.04 ± 0.44 a	1.47 ± 0.39 b	21.61 ± 5.71 b
	4	2.32 ± 0.91 c	8.46 ± 1.24 c	0.57 ± 0.11 d	2.49 ± 0.92 c	2.77 ± 0.40 b	1.21 ± 0.36 c	23.34 ± 7.37 c
4	1	4.56 ± 0.35 a	10.37 ± 0.46 a	0.79 ± 0.05 a	1.37 ± 0.07 a	2.95 ± 0.11 a	2.15 ± 0.10 a	16.00 ± 1.57 a
	2	4.50 ± 0.31 a	10.19 ± 0.32 ab	0.81 ± 0.03 a	1.41 ± 0.13 a	2.96 ± 0.11 a	2.10 ± 0.13 a	15.62 ± 0.55 a
	3	4.32 ± 0.77 a	9.99 ± 0.92 b	0.78 ± 0.04 a	1.46 ± 0.17 a	2.94 ± 0.25 a	2.05 ± 0.28 ab	16.09 ± 0.93 a
	4	3.61 ± 1.18 b	9.41 ± 1.26 c	0.71 ± 0.11 b	1.61 ± 0.27 b	2.83 ± 0.42 a	1.81 ± 0.41 b	18.49 ± 5.84 b
5	1	4.60 ± 0.36 a	10.27 ± 0.39 a	0.81 ± 0.03 a	1.38 ± 0.09 a	2.97 ± 0.12 a	2.16 ± 0.11 a	15.63 ± 0.69 a
	2	4.75 ± 0.22 a	10.36 ± 0.29 a	0.82 ± 0.02 a	1.37 ± 0.06 a	2.99 ± 0.09 a	2.19 ± 0.07 a	15.40 ± 0.33 a
	3	3.96 ± 1.20 b	9.66 ± 1.15 b	0.75 ± 0.12 b	1.55 ± 0.58 a	2.87 ± 0.22 a	1.92 ± 0.49 b	17.28 ± 4.12 b
	4	3.31 ± 1.35 c	8.94 ± 1.63 c	0.72 ± 0.12 b	1.78 ± 0.63 b	2.72 ± 0.40 b	1.69 ± 0.55 b	18.20 ± 4.00 b

Means with same letters are not statistically different (Dunn's 0, 05); se = standard error; area (A), perimeter (P), maximum length (ML), minimum length (mL), form factor (SF) and compactness factor (CF).

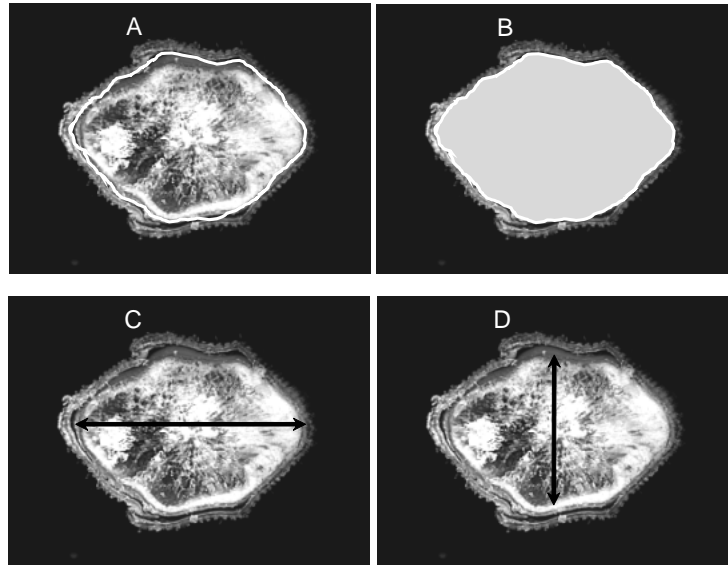


Figure1. Micrographs of MO of the grain cross section of rice MorA98 (3X) showing evaluated morphometric descriptors: (A) perimeter, (B) area, (C) maximum length and (D) minimum length.

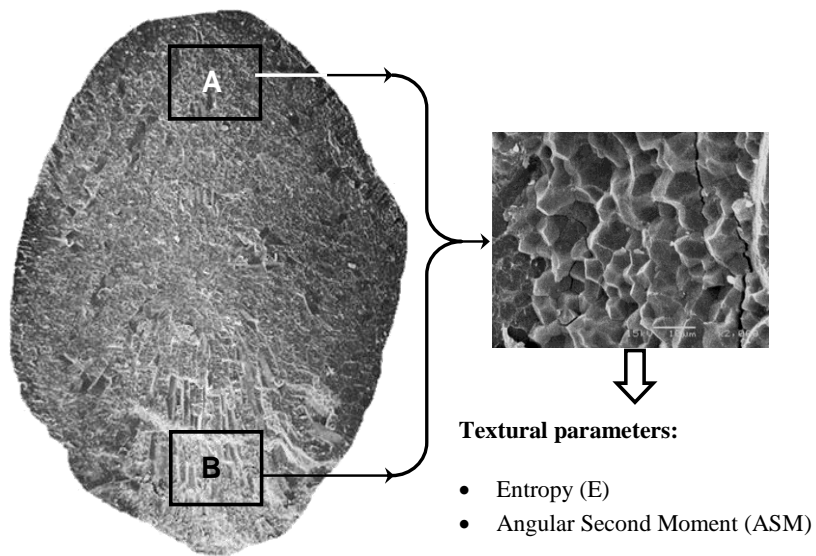


Figure 2. Micrograph MEB of grain transversal section of rice MorA98 (X.500) showing regions (A) dorsal and (B) ventral, from which endosperm superficial texture parameters were obtained.

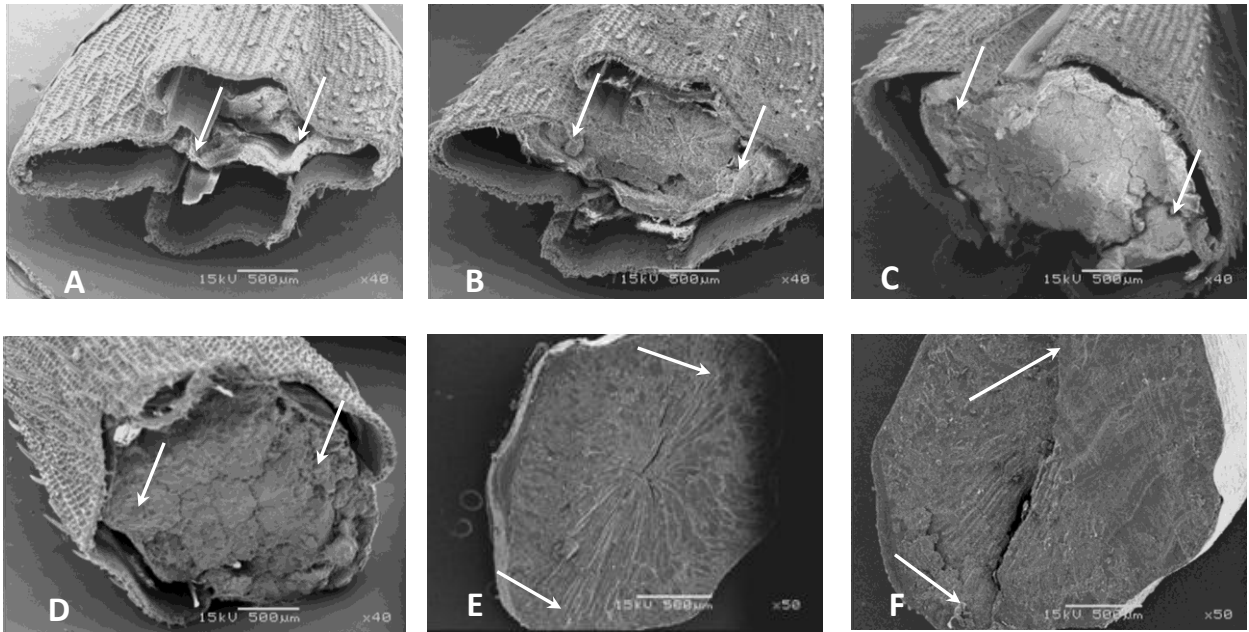


Figure 3. Gallery of MEB photomicrographies (transversal section) showing rice grain development of MorA98: (A) 7 DAF; (B) 14 DAF; (C) 21 DAF; (D) 28 DAF; (E) 35 DAF; (F) polished grain rice. (Images A - D have a 40X magnification, whereas E and F 50X; arrows indicate sampling position according to established in materials and methods section).

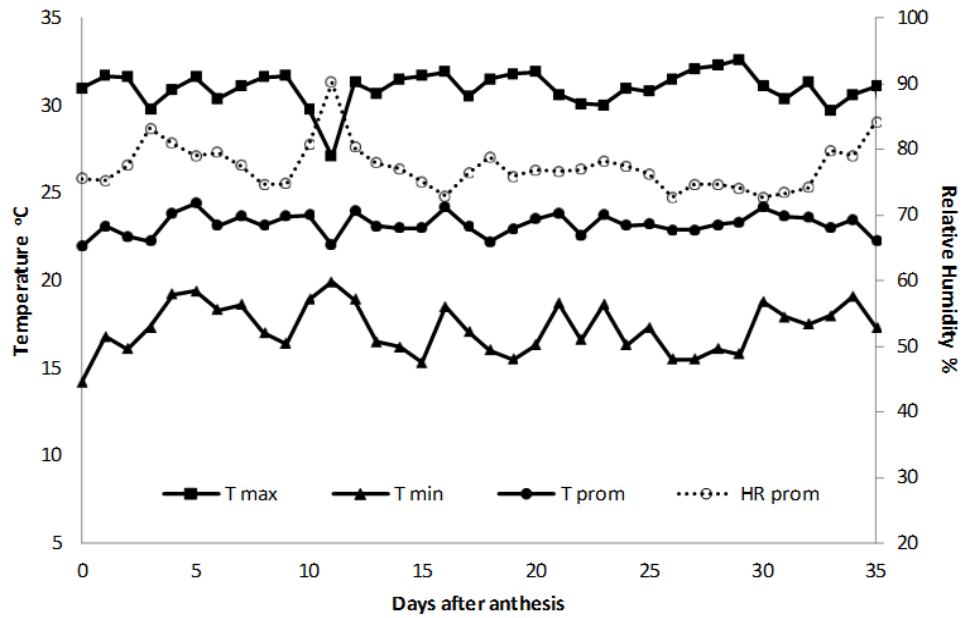


Figure 4. Registered temperature and relative humidity during grain filling of rice MorA98 (registered data from September 17 th to October 28 th, 2007).

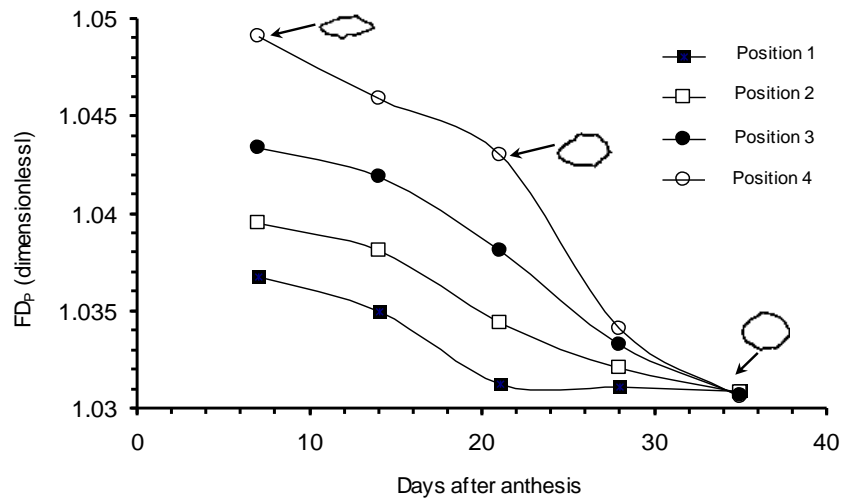


Figure 5. Evolution of fractal dimension of perimeter (FDP) during grain filling and maturation of rice MorA98. Objects represent contour (perimeter) binarized of MO (3X) micrograph of grain transversal cut.

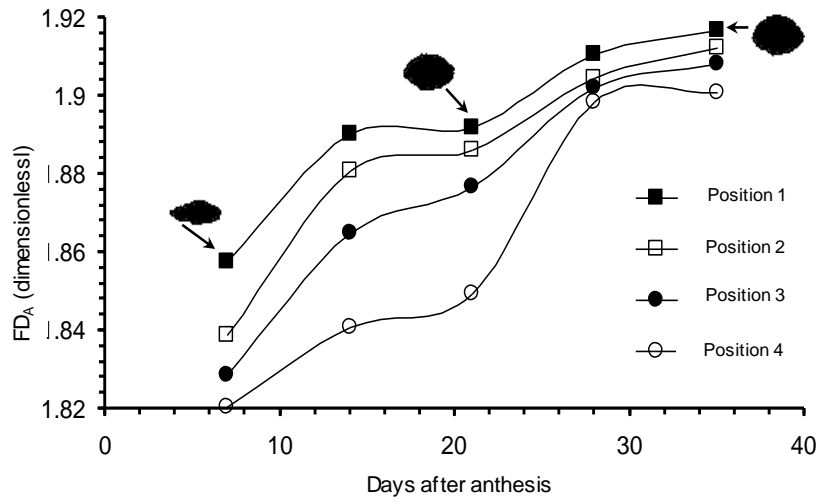


Figure 6. Evolution of fractal dimension of area (FDA) during grain filling and maturation of rice MorA98. Objects represent binarized projected area of MO (3X) micrograph of grain transversal cut.

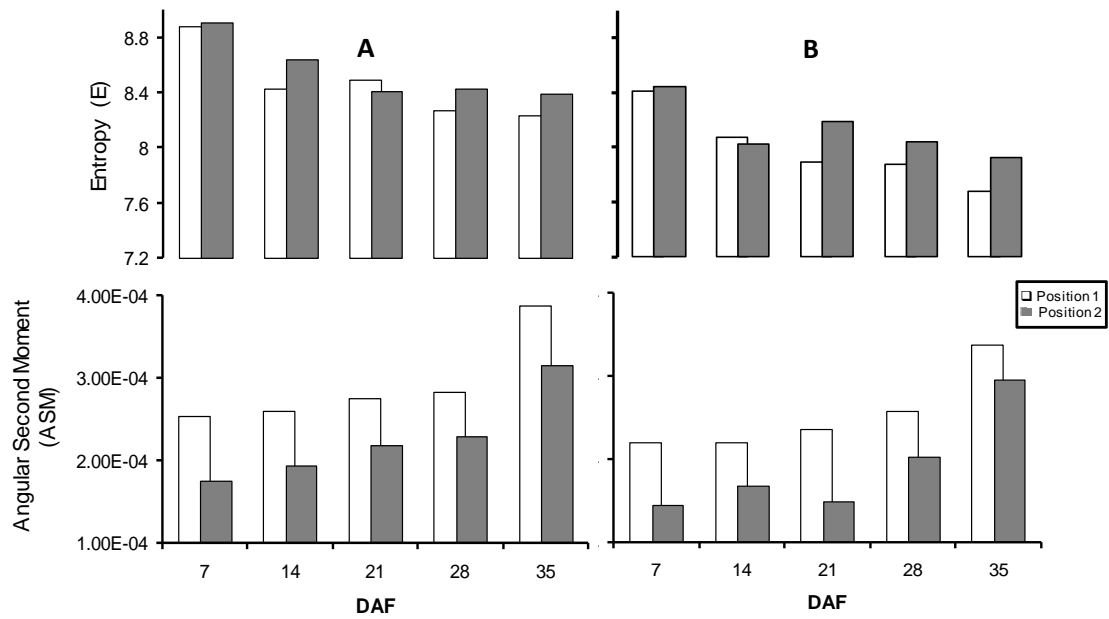


Figure 7. Textural parameters of electronic micrographs (x 2.000), corresponding to structure development of grain endosperm of rice MorA98 r: (A) dorsal region and (B) ventral region.