

Evaluación de un protocolo automatizado para la obtención de medidas morfométricas de huevos de aves a partir de fotografías digitales

V. M. Ramírez–Arrieta, D. Denis, Y. Ferrer–Sánchez

Ramírez–Arrieta, V. M., Denis, D., Ferrer–Sánchez, Y., 2021. Evaluación de un protocolo automatizado para la obtención de medidas morfométricas de huevos de aves a partir de fotografías digitales. *Animal Biodiversity and Conservation*, 44.1: 31–43, Doi: <https://doi.org/10.32800/abc.2021.44.0031>

Abstract

Evaluation of a protocol for automated extraction of morphometric measurements from avian eggs using digital photography. As many ecomorphological studies are limited by the time required to gather manual measurement data, automatizing the process is an important focus of methodological innovations. We developed, implemented and validated a protocol for the semi-automated extraction of a set of morphometric variables of egg size and shape from digital pictures. The protocol was implemented in R language as a web app called OvometriK. After binarizing and calibrating images, this protocol uses geometric and trigonometric functions to calculate eleven egg variables. We tested calculations in several ways, assuming contour continuity or using voxel counts. Application was validated with geometric shapes and 30 manually-measured chicken eggs. Mathematical validation with spheres showed that the algorithm provided high precision diameter measures, with a correlation of 99.9%. Average estimation error was 1.4%. The mathematical volume estimation was underestimated by 27%, while voxels were underestimated by only 6%. Differences between manual egg measurements of diameters and those obtained from images was less than 3 mm (4%). Correlation between estimated volume and measured by silica gel filling was higher than 90% using the voxel count method. Neither inclination angle or picture resolution had significant effects on precision (3.2% maximum difference). Measures showed high repeatability and represent a significant saving in processing time. This new protocol represents an improvement on previous programs regarding limitations of platform, accessibility and number of variables. Furthermore, its flexibility and openness means it can be adapted to other specific applications.

Key words: Automatizing, Morphometric, Digital image processing, Oology, Egg dimensions

Resumen

Evaluación de un protocolo automatizado para la obtención de medidas morfométricas de huevos de aves a partir de fotografías digitales. Muchos estudios ecomorfológicos están limitados por el tiempo que demora la recopilación manual de mediciones. Por ello, las innovaciones metodológicas han dado tanta importancia a la automatización del proceso. En el presente trabajo se elabora, implementa y valida un protocolo para la obtención semiautomatizada de un conjunto de variables morfométricas de los huevos de las aves a partir de fotografías digitales. El protocolo se implementó en lenguaje R como una aplicación web llamada OvometriK que, luego de binarizar y calibrar las imágenes, permite calcular once variables utilizando funciones geométricas y trigonométricas. Se prueban varias vías de cálculo, suponiendo la continuidad del contorno o por conteo de vóxeles. La aplicación se valida con figuras geométricas y 30 huevos de gallina medidos manualmente. La validación matemática con círculos mostró que el algoritmo fue capaz de medir los diámetros con gran precisión, con una correlación del 99,9%. El error de estimación fue del 1,4% en promedio. La estimación del volumen por métodos matemáticos lo subestima en un 27%, mientras que por conteo de vóxeles solo lo subestima en un 6%. La diferencia entre las medidas manuales de los diámetros de los huevos y las obtenidas a partir de las imágenes fue inferior a 3 mm (4%). La correlación entre el volumen estimado y medido por vaciado con gel de sílice fue superior al 90% cuando se emplea el método de conteo de vóxeles. Ni el ángulo de inclinación de los huevos ni la resolución de las fotografías tuvieron efectos significativos (diferencia máxima del 3,2%). Las mediciones mostraron una replicabilidad alta y representaron un ahorro significativo de tiempo. El protocolo

representa una mejora respecto de las limitaciones de plataforma, la accesibilidad y el número de variables en comparación con programas anteriores, además de que su carácter abierto y flexible permite adaptarlo a otras aplicaciones específicas.

Palabras clave: Automatización, Morfometría, Procesamiento de imágenes digitales, Oología, Dimensiones de huevos

Rebut: 13 V 20; Conditional acceptance: 27 VII 20; Final acceptance: 31 VII 20

Víctor M. Ramírez–Arrieta, Instituto de Investigaciones del Mar, Cuba.– Dennis Denis, Universidad de La Habana, Cuba.– Yarelys Ferrer–Sánchez, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador.

Corresponding author: D. Denis. E–mail: dda@fbio.uh.cu

ORCID ID: V. M. Ramírez–Arrieta: 0000-0002-4642-3143; D. Denis: 0000-0003-4808-7195
Y. Ferrer–Sánchez: 0000-0003-0623-1240

Introducción

Muchos estudios ecomorfológicos están limitados por la combinación del número de ejemplares que debe ser procesado y la gran cantidad de variables que se pueden tomar de cada uno, lo que supone una inversión considerable de tiempo y esfuerzo de los investigadores. Por ello, las innovaciones metodológicas han dado tanta importancia a la automatización del proceso (Corney *et al.*, 2012a, 2012b, Easlon y Bloom, 2014, MacLeod y Steart, 2015). Los avances en las técnicas digitales y en el análisis de imágenes han facilitado el desarrollo de algoritmos de toma de datos a partir de fotografías de objetos biológicos mediante la obtención de sus contornos o de puntos clave (Ramírez-Arrieta y Denis, 2020).

Las dimensiones y forma de los huevos son una parte importante de las estrategias reproductivas de las aves y tienen un papel esencial en las historias de vida (Lack, 1968), ya que están relacionadas con aspectos como la conducta o la masa corporal de los progenitores, la fecha de puesta, la composición del huevo, el éxito de anidamiento, el tamaño de las crías y la supervivencia de los pichones (Nol *et al.*, 1997; Grønstøl, 1997; Flint y Sedinger, 1992; Ricklefs, 1984; Arnold, 1989; Reed *et al.*, 1999; Briskie y Sealy, 1990; Williams, 1994; Galbraith, 1988; Grant, 1991). Por ello, la medición de estas estructuras ha sido un aspecto fundamental del estudio de la biología de la reproducción, y muchos de sus patrones de variación todavía se desconocen y merecen mayor atención, a pesar de haber sido objeto de un amplio debate (Slagsvold *et al.*, 1984; Arnold, 1999; Jover *et al.*, 1993).

En algunos de estos estudios, se ha procesado un elevado número de muestras, por ejemplo, Denis (2015) describió los patrones de variación entre los huevos de nueve especies de garzas a partir de las dimensiones externas de 3.142 huevos y Stoddard *et al.* (2017) hicieron un amplio estudio de las variaciones en la forma de los huevos de 1.400 especies de aves. Algunas variables de importancia fisiológica o ecológica han sido estimadas a partir de las dimensiones lineales, como en el caso del volumen, la superficie o la masa (Preston, 1974; Hoyt, 1979). Tradicionalmente, estas dimensiones se han determinado por mediciones directas, pero las medidas tomadas en el campo con instrumentos manuales son propensas a introducir errores de manipulación y del observador. La manipulación de los huevos puede afectar negativamente al éxito o la supervivencia de los nidos, particularmente en la medición del volumen mediante el cálculo del desplazamiento de agua (Hoyt, 1976; Tarassov, 1977; Loftin y Bowman, 1978; Thomas y Lumsden, 1981; Szekely *et al.*, 1994; Kern y Cowie, 1996). Con frecuencia, el volumen o el peso se han estimado a partir de modelos matemáticos que emplean las dimensiones lineales y, en algunos casos, variables de forma específicas de cada especie (Westerkov, 1950; Coulson, 1963; Stonehouse, 1966), pero esto no recoge la variabilidad intraespecífica de la forma de los huevos. La forma también se ha estudiado frecuentemente mediante coeficientes entre medidas lineales (ver resumen

en Preston, 1969; Narushin, 2001; Havlíček *et al.*, 2008; Troscianko, 2014), siendo las más usadas la elongación y la asimetría.

Varios autores han desarrollado métodos computarizados automáticos para obtener medidas precisas de los parámetros de la talla de los huevos a partir de fotografías digitales (Paganelli *et al.*, 1974; Mand *et al.*, 1986, Bridge *et al.*, 2007). Dangphonhong y Pinate (2016) usan el procesamiento de imágenes digitales para estimar el peso de huevos de aves de granja. Las variaciones en la curvatura de la cáscara también son un componente importante de la forma y, por lo general, se describen con perfiles bidimensionales extraídos de fotografías, que en un primer momento se calculaban de forma aproximada mediante ecuaciones matemáticas (Hutt, 1938; Bonnet y Mongin, 1965; Besch *et al.*, 1968; Carter, 1970, Nedomova *et al.* 2009; Troscianko, 2014) y que actualmente se estudian en mayor profundidad con descriptores derivados de funciones de Fourier y puntos clave (Johnson *et al.*, 2001; Havlíček *et al.*, 2008; Bravo y Marugan-Lobon, 2012; Murray *et al.*, 2013; Deeming y Ruta, 2014; Deeming, 2017). Estas herramientas disminuyen el tiempo de manipulación del huevo y aumentan la precisión y repetibilidad de las mediciones. El empleo de fotografías digitales tiene como ventaja que su precisión no depende de la especie y la forma de sus huevos como sucede con los modelos alométricos. Las fotografías se toman con mayor rapidez, lo que minimiza el tiempo de manipulación de los huevos sin detrimento en la exactitud de la medida, lo cual minimiza los riesgos de rotura accidental o abandono de los nidos. Por último, las fotografías se pueden conservar, lo que permite la trazabilidad de errores y otros estudios futuros. Por estas razones, se prevé que los métodos que emplean proyecciones bidimensionales para obtener la forma de los huevos se seguirán utilizando por un buen tiempo dada su simplicidad y bajo coste (Attard *et al.*, 2017).

Sin embargo, el empleo de fotografías también es una fuente de numerosas imprecisiones que hay que tener en cuenta. Entre ellas, se cuentan problemas asociados a la toma de fotografías, como la falta de coplanaridad entre el eje de los huevos y el plano de las imágenes, las sombras creadas por la iluminación direccional y las diferencias entre la resolución de las fotografías. Otros problemas tienen que ver con imprecisiones asociadas al procesamiento digital de las imágenes, como la binarización y los filtros de detección de bordes o de suavizados. Existen también problemas asociados a la variabilidad biológica de los propios huevos, que también afectan a la repetibilidad de las mediciones manuales tradicionales, sobre todo la relacionada con la ausencia de simetría radial. Estos efectos se han evaluado en contadas ocasiones y muchas veces se pasan por alto o se subestiman, para ahorrar tiempo de procesamiento de las muestras, pero pueden llegar a ser de una magnitud significativa.

Dados estos antecedentes, en el presente trabajo se elabora, implementa y valida un protocolo de análisis digital, programado en forma de aplicación web en lenguaje R (R Core Team, 2018), para la extrac-

ción semiautomatizada de un conjunto de variables relacionadas con las dimensiones y la forma de los huevos de las aves a partir de fotografías digitales. La aplicación genera datos compatibles con el propio programa R y el MS Excel, por lo que se puede integrar a otros algoritmos de análisis estadísticos. Por ser de código abierto es gratuita, modificable y puede adaptarse a otros objetos biológicos similares (frutas, semillas, estructuras).

Material y métodos

El protocolo de medición a partir de fotografías se basa en la extracción de las coordenadas del contorno del huevo, a partir de la modificación del algoritmo propuesto por Claude (2008), luego de binarizar la imagen y transformar las unidades de píxeles a milímetros por medio de una escala de referencia que debe aparecer en las fotografías. A partir de estos contornos, se calculan automáticamente once variables morfométricas con funciones geométricas y trigonométricas básicas. Estas variables son el diámetro mayor (distancia máxima entre un par de puntos del contorno), el diámetro menor (distancia máxima entre dos puntos, perpendicular al eje del diámetro mayor), los diámetros en los tres cuartiles del diámetro mayor, el volumen del huevo, el área superficial y el nivel de asimetría (fig. 1). El volumen se estimó por tres vías, a partir de la suma de secciones transversales, que se suponen cilindros de 1 píxel de altura. La primera vía matemática simple consistió en estimar el volumen a partir del cálculo geométrico del volumen de un cilindro, haciendo una aproximación matemática en la que se supone que los bordes del huevo son superficies continuas. La segunda vía fue el simple conteo de vóxeles en cada sección. "Vóxel" es el término de origen inglés para referirse a un elemento de volumen (acrónimo de "volume element"), equivalente tridimensional del concepto de píxel ("picture element"). Para estimar el volumen por esta vía, se utilizaron valores discretos, con lo cual se elimina el sesgo de las aproximaciones de continuidad. En ambos métodos se supone la circularidad transversal en cada sección del huevo, es decir, que los cortes transversales son círculos perfectos (también se supone en Bridge *et al.*, 2007). La tercera vía fue la ecuación alométrica descrita por Hoyt (1979), que parte de las dimensiones lineales estimadas previamente (diámetro mayor y menor). Esta ecuación, obtenida de forma empírica por su autor para 23 especies de aves, es una manera tradicional de estimar el volumen de los huevos que por defecto emplea el coeficiente volumétrico general de 0,509, pero que contempla la opción de utilizar un coeficiente específico de cada especie, como los que se han determinado posteriormente para otras especies (p. ej.: Kern y Cowie, 1996; Denis *et al.*, 2008).

Para hacer una estimación más precisa de la superficie del huevo, se supuso que cada sección de 1 píxel de grosor era la proyección de un semicono cuyo diámetro mayor era igual al de la sección anterior (como sugieren Paganelli *et al.*, 1974). El centro del huevo coincide con el punto medio del eje del diámetro

mayor, y el centroide se calcula como la media de las coordenadas de todos los puntos que forman el contorno (que puede presentar irregularidades locales por defectos de la imagen).

La forma de los huevos se determina mediante los descriptores elípticos de Fourier, calculados a partir del contorno normalizado por el radio mayor. El número de armónicos se puede variar manualmente, pero por defecto se emplean cuatro, que según Denis (2014) son suficientes para describir las formas más frecuentes de los huevos de las aves. Estos se pueden reducir, opcionalmente, con un análisis de componentes principales, que permite calcular el puntaje de los componentes efectivos. Estos puntajes pueden ser usados como variables de forma en otros análisis. Se calculan, además, tres indicadores para evaluar la asimetría: la proporción de área que representa la mitad vertical superior del huevo (extremo más fino) en relación con la mitad inferior (extremo más oblongo); la excentricidad del huevo, dada por la distancia entre el centroide y la mitad del diámetro mayor del huevo, y el porcentaje que representa el área de la sección longitudinal del huevo en relación con el rectángulo externo mínimo que contiene la figura. Estos índices suelen ser bajos en los huevos más redondeados y simétricos y relativamente más altos en los más alargados y asimétricos.

Todo este protocolo se implementó en una aplicación de R 3.5.1 (R Core Team, 2018) llamada Ovometrik, con una interfaz gráfica web confeccionada con el paquete shiny (Chang *et al.*, 2018). Emplea además, los paquetes shinyalert, shinyWidgets, shinyBS, zip, imager, imagerExtra y Momocs. La aplicación puede ser utilizada en línea en el sitio <https://victormramirez.shinyapps.io/ovometrik/> o descargada para su uso sin conexión desde el mismo sitio. Esta aplicación es capaz de manejar imágenes en formatos .png, .jpeg y .bmp, y el tiempo de carga está en relación directa con el tamaño de las imágenes, pero la versión en línea solo puede cargar un máximo de 4.000.000 de píxeles por imagen (2.000x2.000). Para imágenes de tamaño superior es necesario descargar la versión sin conexión, cuya capacidad de procesamiento dependerá de los recursos de la computadora en la que se ejecute.

Si las fotos de los huevos se toman de forma estandarizada (igual fondo homogéneo, cámara, resolución y distancia) se pueden procesar automáticamente todas las imágenes que se desee; de lo contrario, hay que supervisar manualmente cada imagen para fijar las escalas, fijar el umbral de binarización en el histograma de valores de grises y ubicar los huevos. La escala se establece a partir de un objeto de referencia, de longitud conocida, en la imagen. Los resultados (coordenadas del contorno, dimensiones lineales y descriptores de Fourier) se exportan en archivos en formato de texto (.csv) con el nombre de la imagen procesada como identificador de caso. Una descripción más detallada del procedimiento para trabajar en la aplicación puede ser consultada en su ayuda en línea.

Para la validación de OvometriK y del protocolo de medición se siguieron varios niveles. El primero, dirigido a comprobar la efectividad de los algoritmos matemáticos de extracción de las variables, se realizó

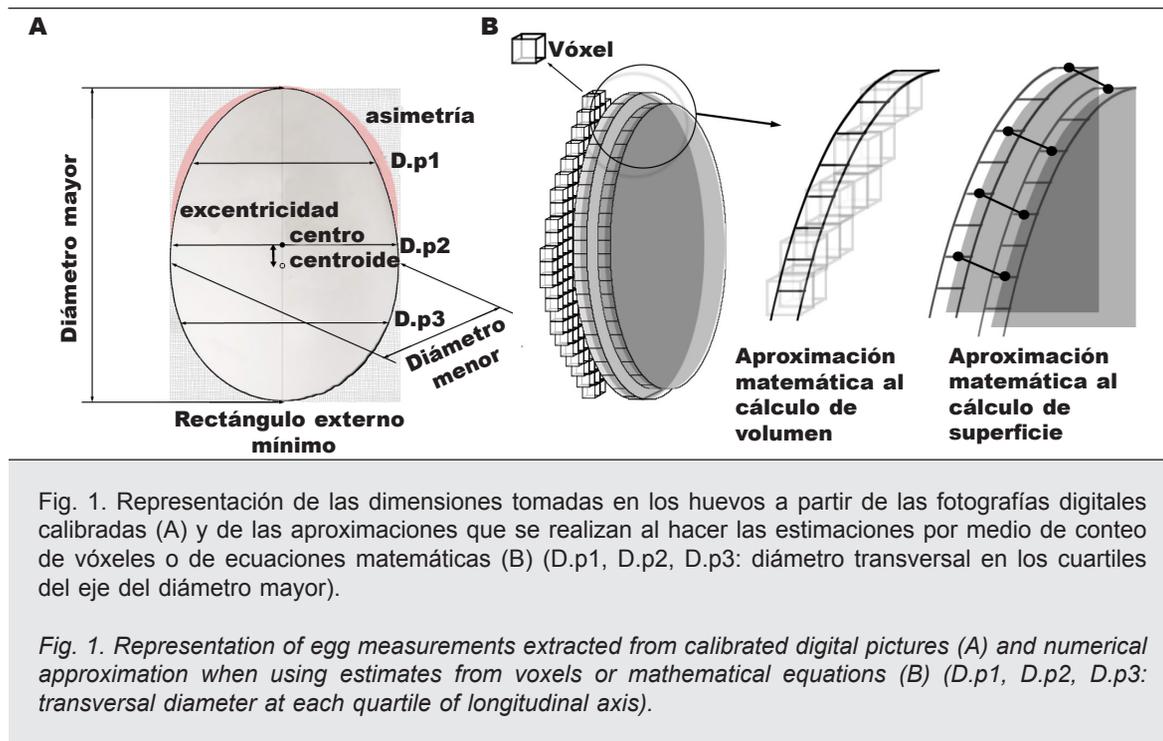


Fig. 1. Representación de las dimensiones tomadas en los huevos a partir de las fotografías digitales calibradas (A) y de las aproximaciones que se realizan al hacer las estimaciones por medio de conteo de vóxeles o de ecuaciones matemáticas (B) (D.p1, D.p2, D.p3: diámetro transversal en los cuartiles del eje del diámetro mayor).

Fig. 1. Representation of egg measurements extracted from calibrated digital pictures (A) and numerical approximation when using estimates from voxels or mathematical equations (B) (D.p1, D.p2, D.p3: transversal diameter at each quartile of longitudinal axis).

con figuras geométricas (círculos) perfectas e imágenes binarias ($n = 60$). En estas imágenes, se eliminan los posibles errores debidos al procesamiento digital, el umbral de binarización y la variabilidad asociada a las asimetrías naturales de la forma de los huevos, así como los posibles errores de manipulación y toma de fotografías. Las dimensiones estimadas por Ovometrik se compararon con las obtenidas por el programa ImageJ v3.6 (Schindelin *et al.*, 2015). El segundo nivel de validación se llevó a cabo con 30 huevos de gallina doméstica (*Gallus gallus*), que se midieron manualmente con un pie de rey (0,01 mm de precisión) y cuyo volumen interno se midió por rellenado con gel de sílice, siguiendo el protocolo empleado por Denis *et al.* (2008). La validación de los coeficientes de Fourier se hizo comparando los obtenidos por la aplicación con los obtenidos a partir de las mismas imágenes con el programa Shape v.1.3 (Iwata y Ukai, 2002).

La repetibilidad de las mediciones se evaluó tomando cinco veces todas las medidas manuales (por la misma persona) y procesando cinco fotografías digitales (de dimensiones 1.024 x 683 píxeles) perpendiculares hacia abajo, de cada huevo, en distintas rotaciones alrededor del eje mayor, permitiendo que adoptasen su inclinación natural. Como el ángulo de inclinación del huevo puede influir marcadamente en las medidas hechas a través de la proyección plana de la imagen, se midieron los ángulos de inclinación natural de cada huevo al descansar sobre una superficie plana a partir de fotografías laterales. Para evaluar el efecto de este ángulo, se tomaron también fotos superiores controlando manualmente la coplanaridad entre el eje central del huevo y el plano de la fotografía (fig. 2). Como estos huevos son de color blanco, el fondo que

se utilizó fue negro. Para evaluar el efecto de la calidad de la imagen, se tomaron dos series adicionales de fotografías de menor calidad: una a menor resolución (824 x 550 píxeles) y otra con baja sensibilidad (bajo ISO) e iluminación insuficiente.

El nivel de efectividad de las fotografías digitales se evaluó mediante regresiones lineales entre las variables obtenidas por vía manual y las calculadas siguiendo el protocolo sobre las imágenes digitales, así como para evaluar los efectos relativos de la posición del huevo, el ángulo de inclinación y la calidad de la imagen. La replicabilidad se evaluó por medio de los coeficientes de variación entre las medidas repetidas sobre los mismos huevos. Para asegurar la reproducibilidad del trabajo, todos los datos y el código de la aplicación en R se encuentran disponibles de forma gratuita en el repositorio Figshare (<https://figshare.com/s/2cd84268ed4f69387f80>).

Resultados

La validación matemática con círculos perfectos mostró que el algoritmo fue capaz de medir el diámetro de los círculos con una alta precisión, ya que existe una correlación superior al 99,9 % entre las medidas de los diámetros obtenidas por el programa ImageJ y por la aplicación de R (fig. 3A). El error de estimación fue generalmente en el sentido de la subestimación de la medida por Ovometrik entre 0,3 y 2,8 unidades, con un promedio general de $-1,7$ (1,4%) y estuvo correlacionado de manera negativa con el tamaño del círculo ($r = -0,28$; $p < 0,05$), de manera que a medida que los objetos que se miden son mayores,

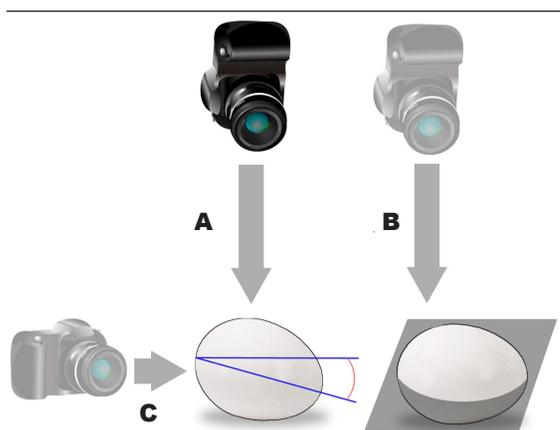


Fig. 2. Representación de las orientaciones de la cámara en la toma de fotografías de huevos para validar la aplicación OvometriK en lenguaje R: A, orientación coplanar; B, orientación acimutal natural; C, orientación lateral para medir ángulo de inclinación.

Fig. 2. Representation of camera orientations when taking pictures of eggs for validating OvometriK software in R language: A, coplanar orientation; B, natural azimuthal orientation; C, lateral orientation for inclination angle measurement.

la diferencia entre estimaciones disminuye. El cálculo del volumen estimado fue ligeramente más variable, pero aun así, la relación con el volumen calculado fue superior al 99% (fig. 3B). Al hacerse la estimación con el método matemático continuo, se tendió a sobreestimar el volumen un 27%, mientras que el conteo de vóxeles fue mucho más preciso, con una ligera subestimación (6%). La estimación de la superficie de la esfera a partir de la imagen también estuvo altamente correlacionada con la calculada con métodos trigonométricos ($r = 99,8$) (fig. 3C) aunque la sobreestimó sistemáticamente un 9,1%, de media.

En la segunda fase de validación, las mediciones lineales tomadas de las fotografías de los huevos mostraron una alta coherencia con las medidas tomadas físicamente (fig. 4). La estimación fotográfica sobreestimó ligeramente las dimensiones lineales, con una diferencia entre los diámetros medidos por ambos métodos inferior a 3 mm (4% de error). El cálculo del volumen arrojó resultados más variables, pero la correlación entre las estimaciones y las medidas manuales fue superior al 90% con el método de conteo de vóxeles (fig. 5). Las estimaciones del volumen a partir de las fotografías fueron superiores a las mediciones manuales por rellenado con gel de sílice; en este sentido, la diferencia máxima se encuentra cuando se hacen las estimaciones suponiendo la linealidad de la superficie (promedio 31,6%). El volumen estimado por el algoritmo de conteo de vóxeles arrojó resultados muy semejantes al estimado por la ecuación de Hoyt con las medidas digitalmente extraídas, con sobrees-

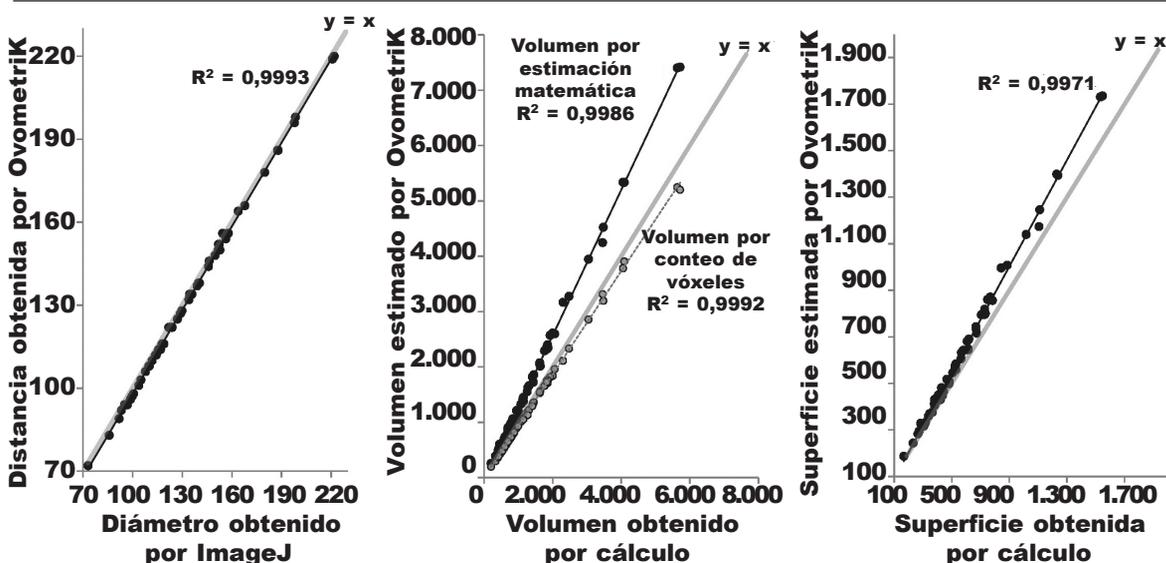


Fig. 3. Validación matemática del algoritmo de OvometriK, implementado en R, a través de la medición del diámetro y el volumen de círculos y esferas geoméricamente perfectos, respectivamente, con imágenes binarias.

Fig. 3. Mathematical validation of the OvometriK algorithm, implemented in R, by measuring diameter and volume of geometrically perfect circles and spheres with binary images.

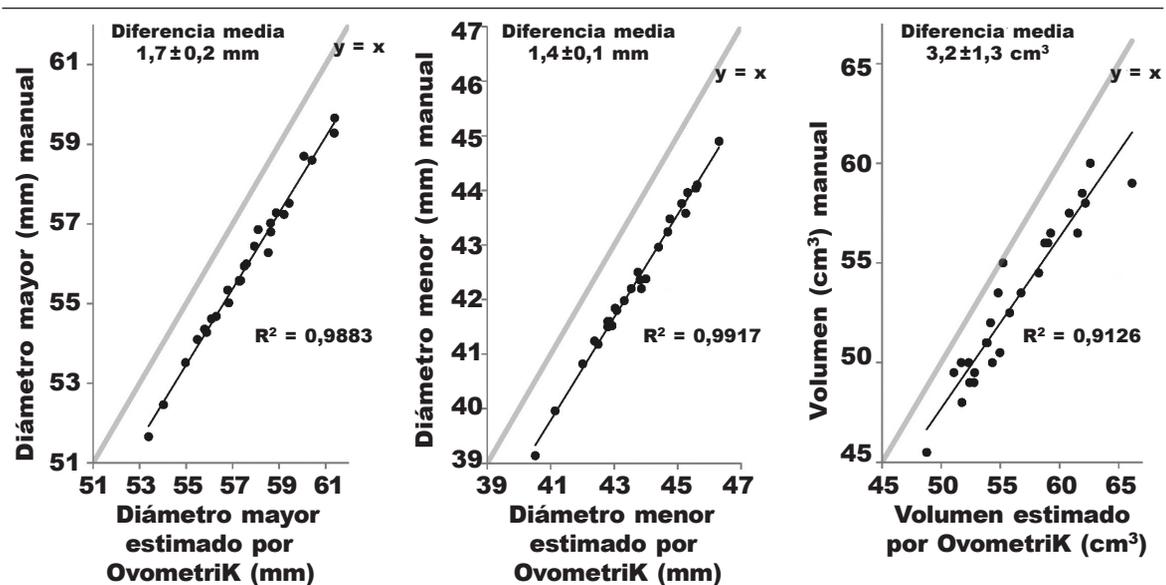


Fig. 4. Relación entre las medidas físicas de 30 huevos de gallina y las estimadas a partir de fotografías con la aplicación OvometriK en lenguaje R.

Fig. 4. Relationship between physical measurements of 30 chicken eggs and estimated measurements from its photographs with OvometriK application in R language.

timaciones del 7,1% y el 7,6%, respectivamente, en relación con el calculado manualmente. Cabe señalar que el volumen calculado por la ecuación de Hoyt con las dimensiones medidas manualmente sobre el huevo, subestimó al volumen medido por vaciado del contenido interno en un 3,9 % de media.

Las dimensiones estimadas por la aplicación OvometriK sobre fotos con y sin la corrección del ángulo de inclinación de los huevos (que varió entre 3,7° y 12,3°) mostraron que el efecto de este factor en la estimación de las dimensiones lineales es mínimo (fig. 6). Aunque, como promedio, la afectación del volumen fue muy pequeña, en algunos casos las diferencias llegan a ser de hasta 6 cm³ (10%), igual que en el caso del área superficial (hasta 4 cm²). Sin embargo, el hecho de que estas diferencias no estuviesen asociadas a la magnitud del ángulo de inclinación sugiere que están expresando en mayor medida las diferencias de las distintas vistas del mismo huevo (asimetrías radiales) que el propio efecto del ángulo. El tamaño de las fotografías también tuvo un pequeño efecto en los valores medios de las mediciones, superior en el caso de las estimaciones de volumen, que llegó a ser un 3,2% superior en las fotografías de mayor resolución (fig. 7). Las dimensiones lineales difirieron en menos de un 1%, lo cual indica que la resolución de la imagen no reviste mucha importancia en la exactitud de las estimaciones.

El resto de las dimensiones e índices extraídos de los huevos tampoco mostraron diferencias marcadas asociadas al tamaño de las imágenes o al ángulo de inclinación de los huevos (tabla 1). El índice de asimetría del huevo, expresado en porcentaje, mostró

la mayor variabilidad (33%), seguido del volumen (14%) y el área superficial estimada (9%).

La repetibilidad de las mediciones manuales de los huevos, dada por el coeficiente de variación entre las medidas repetidas sobre los mismos ejemplares, fue del 0,19% para el diámetro mayor (DE = 0,27% y máximo = 1,8%) y del 0,24% para el diámetro menor (DE = 0,18% y máximo = 0,93%). En el caso de emplear fotografías, el coeficiente de variación entre las mediciones del diámetro mayor fue del 2,55% ± 1, el 33% (mínimo = 1,04% y máximo = 5,3%) y para el diámetro menor de 2,60% ± 1,30% (mínimo = 1,09% y máximo = 5,44%).

Las mediciones manuales del conjunto total de huevos, realizadas por una misma persona, se tomaron durante 15 minutos de media (sin contar el tiempo posterior para pasar los datos a formato digital) en el caso de las dimensiones lineales, más entre 4 y 5 minutos por cada huevo para la medición del volumen. El procesamiento de las imágenes en la aplicación desarrollada se tomaba entre 2 y 3 minutos y el resultado ya sale en formato digital.

Discusión

La validación matemática con círculos perfectos mostró que el algoritmo fue capaz de medir el diámetro de los círculos con una alta precisión. El empleo de imágenes en blanco y negro permite controlar el efecto de la binarización de las imágenes en escala de grises, cuyo umbral de corte determina la clasificación de los píxeles del contorno, que suelen ser

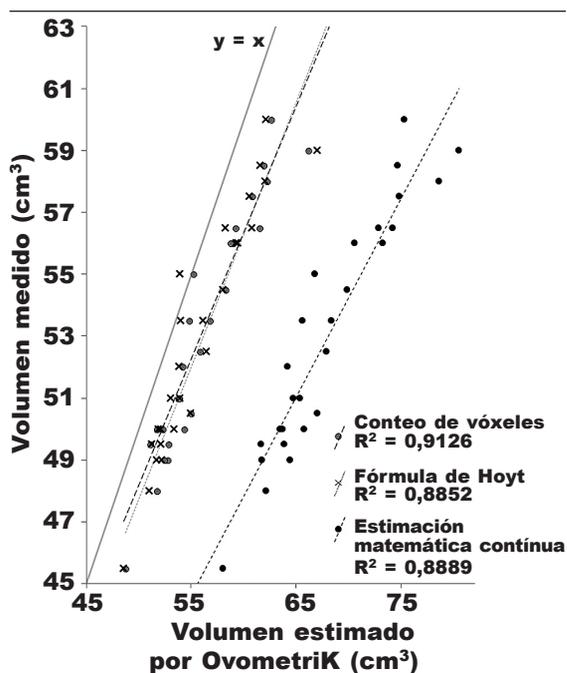


Fig. 5. Comparación entre los métodos implementados en el programa OvometriK para estimar el volumen de los huevos a partir de las fotografías (por estimación matemática suponiendo continuidad, por conteo de vóxeles y por la ecuación de Hoyt).

Fig. 5. Comparison between volume estimation methods of eggs from pictures, implemented in OvometriK software (using mathematical equations assuming continuity, voxel counts and Hoyt's equation).

de tonos más claros. Al establecerse manualmente este umbral, se pueden producir diferencias en el orden de varios píxeles, que en términos de áreas o volúmenes pueden llegar a representar porcentajes elevados de variación en objetos de pequeño tamaño y en imágenes de baja resolución. En las fotografías reales de huevos, la binarización produce contornos irregulares que influyen en la precisión de las medidas; la opción de suavizado, si bien reduce este efecto, también puede alterar de forma imperceptible las medidas tomadas, por lo que debe usarse con precaución y de manera similar entre las muestras que se vayan a analizar conjuntamente.

La validación del algoritmo con esferas es un paso imprescindible, ya que el funcionamiento de la aplicación se puede comparar con una medida geométricamente calculable, lo cual no es posible si se emplean huevos directamente por su forma irregular (Bridge *et al.*, 2007). La diversidad de formas en los huevos de las aves es un fenómeno bien conocido que refleja la diversidad taxonómica (Olsen *et al.*, 1994; Stoddard *et al.*, 2017). Las formas varían desde los huevos casi esféricos de los búhos (Hoyt, 1976), pasando por los

ligeramente puntiagudos de las gallinas (Havlíček *et al.*, 2008) hasta los extremadamente puntiagudos de ciertas veadoras, álcidos y pingüinos (Birkhead *et al.*, 2017; Stoddard *et al.*, 2017). Al aplicar el algoritmo programado en la aplicación sobre fotos de huevos, en escala de grises se suman tres fuentes importantes de variabilidad: la dada por la binarización de la imagen, la relacionada con la inclinación del eje del huevo con respecto al plano de la fotografía y la variabilidad dada por la ausencia de simetría radial en la forma de los huevos. Los dos últimos factores son los que explican las diferencias de variabilidad o precisión entre las mediciones de los diámetros mayor y menor.

Todos los análisis 2D se apoyan en la premisa de que el plano de simetría es constante con la rotación alrededor del eje longitudinal (Deeming y Ruta, 2014). Esto puede estar incorrecto, ya que no se tienen en cuenta las pequeñas variaciones en las curvaturas alrededor de las cáscaras completas; existen ejemplos de variaciones extremas en la simetría radial que se han descrito en algunas especies (Birkhead, 2016). El diámetro mayor tiende a estar menos afectado por las asimetrías radiales, que afectan más a las medidas transversales al eje longitudinal del huevo. Sin embargo, ambos diámetros se ven igualmente afectados por la inclinación del huevo en el momento de tomar las fotografías. Los errores en ambas medidas lineales se reflejan en la estimación del volumen, por su naturaleza cúbica.

De los tres métodos utilizados para estimar el volumen, el más preciso fue el algoritmo que tenía en cuenta el carácter discreto de los píxeles de las imágenes y que contaba el número de vóxeles en todas las secciones transversales a lo largo del eje mayor. El volumen obtenido manualmente por rellenado del interior de las cáscaras vacías para la validación no es estrictamente análogo al calculado a partir de las fotografías, ya que en estas se emplea la superficie exterior del huevo, mientras que el vaciado excluye la cáscara y posibles restos de membranas internas, que aunque son delgadas en relación con las dimensiones externas de los huevos, no se deben pasar por alto totalmente. La estimación a partir de los diámetros es más semejante en términos teóricos, y Bridge *et al.* (2007) la emplean para validar un método automatizado similar al presentado en este trabajo en huevos de *Turdus migratorius*. Para ello, emplean un programa libre GraphicConverter en combinación con Applescript, un componente del sistema operativo Macintosh. Estos autores validan su procedimiento derivado de las imágenes con los volúmenes obtenidos con la ecuación de Hoyt (1979) con un coeficiente de forma específico para la especie analizada (0,504). No usan huevos reales para validar el sistema aduciendo que no tenían medios para estimar el volumen que fueran más precisos que el sistema fotográfico.

Las estimaciones de las dimensiones externas de los huevos mostraron que el algoritmo es capaz de hacer estimaciones con menos de un 5% de error. En cinco huevos, el 15% de la muestra, el cálculo del volumen tuvo un error medio superior (7,1%),

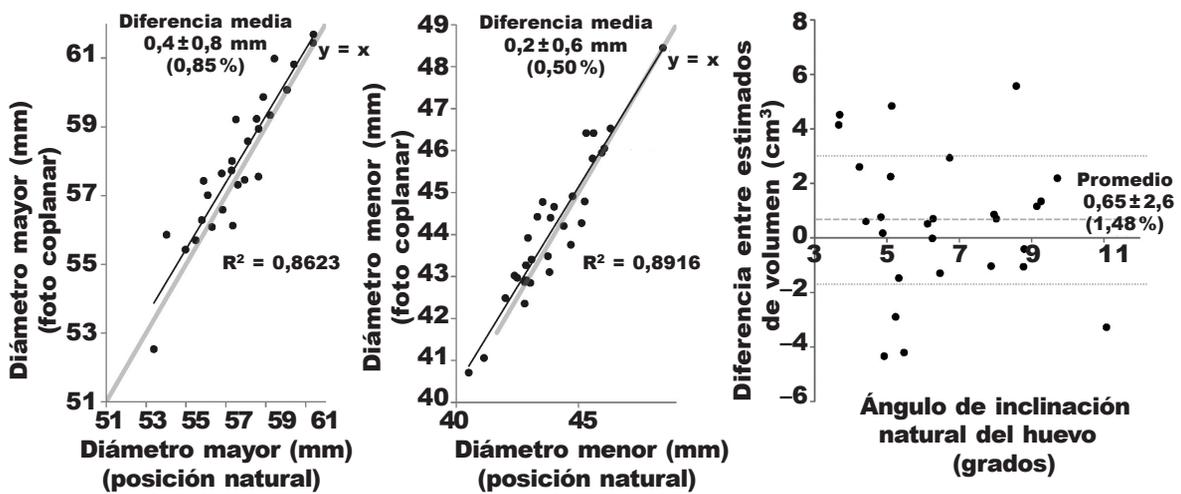


Fig. 6. Efecto del ángulo de inclinación del huevo en las medidas principales tomadas a partir de las fotografías por medio del programa OvometriK.

Fig. 6. Effect of the inclination angle of the egg on main measurements estimated from pictures with OvometriK software.

con desviaciones máximas de entre 7 y 8 cm³. La repetibilidad de las mediciones de los huevos es relativamente alta, aunque en las medidas tomadas a partir de fotografías tiende a disminuir ligeramente al aumentar la variabilidad de las medidas repetidas (fotos diferentes de los mismos huevos), posiblemente por los componentes de varianza asociados a la toma

de fotos (iluminación, contraste, ángulo y distancia) y al proceso de binarización. En las mediciones manuales, el coeficiente de variación entre medidas tomadas de manera repetida sobre los mismos huevos es menor del 1% y es ligeramente superior en el diámetro menor por efecto de las asimetrías radiales. La variabilidad de las mediciones fue ligeramente

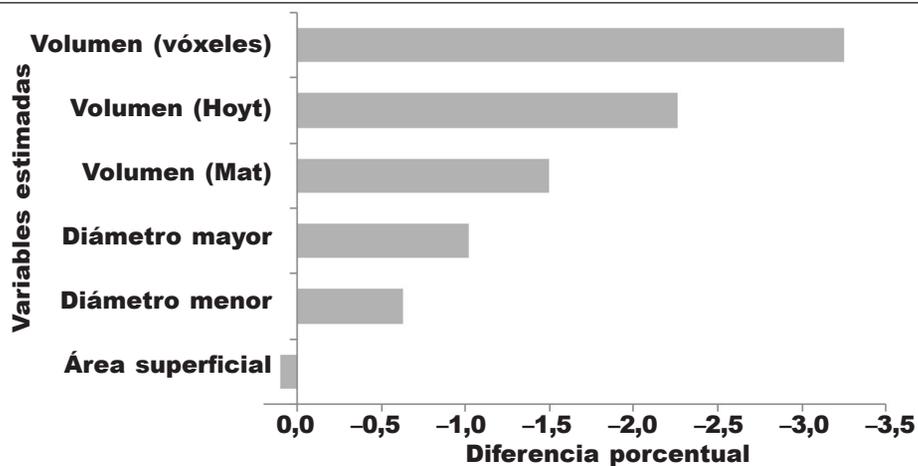


Fig. 7. Diferencia porcentual entre las estimaciones de las principales medidas tomadas a partir de fotografías de baja y alta resolución, por medio del programa OvometriK (diferencia = estimación a partir de foto de mayor resolución – estimación a partir de foto de menor resolución).

Fig. 7. Percentage of difference between estimates of the main measures obtained from pictures of eggs at low and high resolution, with OvometriK software (difference = estimation in higher resolution pictures – estimation in lower resolution pictures).

Tabla 1. Comparación entre las estimaciones de las dimensiones y los índices de formas que OvometriK extrae a partir de fotografías digitales de alta resolución, de baja resolución y con corrección manual del ángulo de inclinación de los huevos para hacerlos coplanares con la imagen. Para cada variable se muestran la media con su desviación estándar y los límites de confianza al 95%.

Table 1. Comparison between dimension estimates and shape indexes that OvometriK extracts from digital egg pictures at high resolution, low resolution, and using manual correction of egg inclination angle for coplanarity with image plane. For each variable, mean with standard deviation and 95% confidence limits are presented.

Variables	Fotos		
	Normales (n = 195)	Baja resolución (n = 27)	Con ángulos coplanares (n = 54)
Diámetro mayor (mm)	58,21 ± 2,87 (57,81–58,62)	56,95 ± 2,04 (56,14–57,76)	56,37 ± 2 (55,58–57,16)
Diámetro menor (mm)	44,08 ± 2,03 (43,79–44,36)	42,95 ± 1,4 (42,4–43,5)	42,68 ± 1,33 (42,15–43,21)
Asimetría áreas (mitad superior/mitad inferior)	0,94 ± 0,02 (0,93–0,94)	0,93 ± 0,02 (0,93–0,94)	0,94 ± 0,01 (0,93–0,94)
Excentricidad (distancia centroide–centro)	0,01 ± 0,005 (0,009–0,01)	0,008 ± 0,003 (0,007–0,009)	0,007 ± 0,002 (0,006–0,008)
Índice de forma (área/rectángulo externo mín.)	0,77 ± 0,01 (0,77–0,77)	0,78 ± 0 (0,77–0,78)	0,76 ± 0 (0,76–0,76)
Ancho en percentil 1 (mm)	39,28 ± 1,74 (39,04–39,53)	38,41 ± 1,07 (37,98–38,83)	38,02 ± 1,03 (37,61–38,42)
Ancho en percentil 2 (mm)	43,78 ± 2,02 (43,5–44,07)	42,76 ± 1,41 (42,2–43,31)	42,3 ± 1,38 (41,75–42,84)
Ancho en percentil 3 (mm)	36,13 ± 3,1 (35,7–36,57)	35,42 ± 1,24 (34,93–35,91)	32,55 ± 9,33 (28,86–36,24)
Área superficial (cm ²)	80,61 ± 7,76 (79,51–81,7)	75,89 ± 3,97 (74,32–77,46)	75,97 ± 3,95 (74,41–77,53)
Volumen (cm ³) (conteo de vóxeles)	57,82 ± 7,43 (56,77–58,87)	53,99 ± 4,24 (52,32–55,67)	52,24 ± 4,1 (50,62–53,86)

superior en las estimaciones fotográficas, pero la diferencia se puede explicar por la ausencia de simetría radial y las variaciones locales en la superficie del huevo. La ausencia de marcadas diferencias entre las estimaciones manuales y las obtenidas a partir de las fotografías, unido al notable ahorro de tiempo y esfuerzo, hacen que este método sea una variante atractiva cuando hay que procesar gran cantidad de muestras, aunque sea mucho más confiable para estimar las dimensiones lineales que para calcular el volumen o la superficie, que en sus algoritmos supone la existencia de simetría radial.

El empleo de las fotografías para obtener perfiles 2D suele dar un error asociado al alineamiento de las cámaras con el plano paralelo al eje del huevo (Troschianko, 2014), ya que el centro de gravedad de los huevos está desplazado hacia el extremo mayor, lo que produce que el huevo se incline sobre una superficie plana (Mao *et al.*, 2007). Este error

potencial se incrementa con el grado de asimetría del huevo y en muchos casos ni siquiera se trata de corregirlo (Stoddard *et al.*, 2017). En el caso de los huevos empleados como prueba, la inclinación no afectó de manera significativa a las estimaciones de las dimensiones, lo cual no implica que en huevos de formas más aguzadas y, por tanto, con mayores ángulos de inclinación, no pueda llegar a ser un sesgo significativo. Para que las siluetas sean una representación precisa de la forma del huevo, se recomienda asegurarse de que las fotografías estén bien alineadas (Attard *et al.*, 2017) y sean coplanares al plano central del huevo, aunque siempre puede haber un error. Una solución práctica podría ser tomar las fotos sobre una superficie esponjosa o con una concavidad, que permita colocar el huevo de manera óptima en un plano perpendicular a la cámara sin que se mueva.

En el protocolo se incluyen varios índices relacionados con la forma de los huevos, ya que su estudio

más allá de la simple descripción de las dimensiones, ha demostrado su valor en la comprensión de las estrategias reproductivas de las aves. La forma del huevo influye en su solidez estructural (Gosler *et al.* 2005), en el crecimiento del embrión (Deeming, 2017), en la eficiencia de incubación (Mao *et al.*, 2007), en la inversión materna de calcio (Gosler *et al.*, 2005), en el intercambio de gases y en muchos otros factores que se relacionan con el éxito del pichón (Briskie y Sealy, 1990).

Tradicionalmente, la forma de los huevos se ha estudiado a partir de índices derivados de distancias lineales (Preston, 1969; Narushin, 2001, 2005; Havlíček *et al.*, 2008; Troscianko, 2014) que, a pesar de sus limitaciones, continúan siendo muy usados y es por ello que se incluyen en el algoritmo de Ovometrik. Estos índices están generalmente correlacionados entre sí y con las dimensiones, lo que dificulta la evaluación precisa de las variaciones entre muestras y dificultan la selección de las mejores variables (Narushin, 2001). En los estudios publicados en inglés sobre morfometría se diferencian los conceptos "form" y "shape" (que no existe en español). El primer término se define como la combinación de información sobre formas y tamaños, mientras que el segundo se refiere exclusivamente a la información espacial de un objeto, que es la que queda luego de eliminar los efectos de la ubicación, la escala o las dimensiones y la rotación (Adams *et al.*, 2013). Los índices más empleados para describir los huevos son la elongación y la asimetría. La elongación se refiere al grado de diferencia de la elipse con el círculo (coeficiente entre diámetros mayor y menor) y la asimetría se refiere a las diferencias entre los dos extremos del huevo (Deeming y Ruta, 2014).

En la actualidad, se han comenzado a explorar otras vías para el estudio de la forma de los huevos, como los descriptores elípticos de Fourier (Denis, 2014), que también se incluyen en el programa Ovometrik. Attard *et al.* (2018) proponen un nuevo método para cuantificar los patrones de variación entre los huevos utilizando puntos clave tridimensionales sobre modelos obtenidos por tomografía computarizada, lo cual elimina los errores inherentes a la proyección de un objeto tridimensional curvado sobre un espacio 2D y permite evitar las posibles correlaciones cuando se combinan varios descriptores de la forma. Sin embargo, el equipo necesario para hacer estas reconstrucciones digitales es todavía muy caro para la mayoría de los investigadores y los métodos fotogramétricos más asequibles no funcionan con precisión en estas formas tan suavizadas y sin puntos de referencia para alinear las fotografías. La plataforma R es en la actualidad uno de los programas de preferencia en los estudios sobre ecología por ser libre, versátil y aplicable a diversas situaciones analíticas. El trabajo colaborativo de la comunidad de usuarios ha permitido mantener y enriquecer de forma constante los repositorios de paquetes y códigos para numerosos tipos de análisis. Esta aplicación supera algunas de las limitaciones de plataforma, accesibilidad y número de variables incluidas en los productos desarrollados previamente con este propósito, además de que su carácter abierto y flexible

permite adaptarla a otras aplicaciones específicas. Los próximos pasos deben estar relacionados con su validación sobre otros tipos de huevos, de formas más asimétricas y con distintos patrones de manchados que pudieran interferir en la calidad de la identificación del contorno.

Referencias

- Adams, D. C., Rohlf, F. J., Slice, D. E., 2013. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1): 7–14.
- Arnold, T. W., 1989. Variation in size and composition of Horned and Pied-billed grebe eggs. *The Condor*, 91: 987–989.
- Arnold, T. W., 1999. What limits clutch size in waders? *Journal of Avian Biology*, 30: 216–220.
- Attard, M. R. G., Sherratt, E., McDonald, P., Young, I., Vidal-García, M., Wroe, S., 2018. A new, three-dimensional geometric morphometric approach to assess egg shape. *PeerJ*: 6:e5052, Doi: 10.7717/peerj.5052
- Attard, M. R. G., Medina, I., Langmore, N. E., Sherratt, E., 2017. Egg shape mimicry in parasitic cuckoos. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(11): 2079–2084.
- Besch, E. L., Sluka, S. J., Smith, A. H., 1968. Determination of surface area using profile recordings. *Poultry Science*, 47(1): 82–85.
- Birkhead, T., 2016. *The Most Perfect Thing: Inside (and Outside) a Bird's Egg*. Bloomsbury Publishing, London.
- Birkhead, T. R., Thompson, J. E., Jackson, D., Biggins, J. D., 2017. The point of a Guillemot's egg. *Ibis*, 159(2): 255–265.
- Bonnet, Y., Mongin, P. 1965. Mesure de la surface de l'œuf. *Annales de Zootechnie* 14(4): 311–317.
- Bravo, A. M., Marugan-Lobon, J., 2012. Morphometric analysis of dinosaur eggshells: constraints of size on shape. *Historical Biology*, 25(5–6): 697–704.
- Bridge, E. S., Boughton, R. K., Aldredge, R. A., Harrison, T. J. E., Bowman, R., Schoech, S. J., 2007. Measuring egg size using digital photography: testing Hoyt's method using Florida Scrub-Jay eggs. *Journal of Field Ornithology*, 78(1): 109–116.
- Briskie, J. V., Sealy, S. G., 1990. Variation in size and shape of least flycatcher eggs. *Journal of Field Ornithology*, 61(2): 180–191.
- Carter, T. C., 1970. The hen's egg: factors affecting the shearing strength of shell material. *British Poultry Science*, 11(4): 433–449.
- Chang, W., Cheng, J., Allaire, J., Xie, Y., McPherson, J., 2018. shiny: Web Application Framework for R, 2015. R package version, 1(0), url: <https://CRAN.R-project.org/package=shiny>
- Claude, J., 2008. *Morphometrics with R*. Springer Science and Business Media, Springer-Verlag, New York.
- Corney, D. P. A., Clark, J. Y., Tang, H. L., Wilkin, P., 2012a. Automatic extraction of leaf characters from herbarium specimens. *Taxon*, 61: 231–244.
- Corney, D. P. A., Tang, H. L., Clark, J. Y., Hu, Y., Jin,

- J., 2012b. Automating digital leaf measurement: The tooth, the whole tooth, and nothing but the tooth. *Plos One*, 7(8): e42112, Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042112>
- Coulson, J. C., 1963. Egg size and shape in the Kittiwake (*Rissa tridactyla*) and their use in estimating age composition of populations. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 140: 211–227.
- Dangphonhong, D., Pinate, W., 2016. Analysis of weight egg using image processing. *Proceedings of Academics World 17th International Conference*, Tokyo, Japan, 15th January 2016.
- Deeming, D. C., 2017. Effect of composition on the shape of bird eggs. *Journal of Avian Biology*, 49(1): e01528.
- Deeming, D. C., Ruta, M., 2014. Egg shape changes at the theropod–bird transition, and a morphometric study of amniote eggs. *Royal Society Open Science*, 1: 140311.
- Denis, D., 2014. Aplicación de las funciones elípticas de Fourier para la descripción de la forma de los huevos de las aves. *Revista de Biología Tropical*, 62(4): 1469–1480.
- 2015. Variación en el tamaño de los huevos en garzas (Aves: Ardeidae) que anidan en la ciénaga de Birama, Cuba. *Revista de Biología Tropical*, 63(1): 235–248.
- Denis, D., Olavarrieta, U., Andraca, L., 2008. Actualización de la constante de Hoyt para el cálculo del volumen de los huevos en garzas cubanas (Aves: Ciconiiformes). *Biología*, 22(1–2): 75–77.
- Easlon, M. H., Bloom, A. J., 2014. Easy Leaf Area: automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. *Applications in Plant Sciences*, 2(7): 1400033.
- Flint, P. L., Sedinger, J. S., 1992. Reproductive implications of egg–size variation in the Black Brant. *The Auk*, 109: 896–903.
- Galbraith, H., 1988. Effects of egg size and composition on the size, quality and survival of Lapwing *Vanellus vanellus* chicks. *Journal of Zoology London*, 214: 383–389.
- Gosler, A. G., Higham, J. P., Reynolds, S. J., 2005. Why are birds' eggs speckled? *Ecology Letters*, 8: 1105–1113, Doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00816.x
- Grant, M. C., 1991. Relationships between egg size, chick size at hatching and chick survival in the Whimbrel *Numenius phaeopus*. *Ibis*, 133: 127–133.
- Grønstøl, G. B., 1997. Correlates of egg–size variation in polygynously breeding Northern Lapwings. *The Auk*, 114: 507–512.
- Havlíček, M., Nedomová, S., Simeonovová, J., Severa, L., Krivánek, I., 2008. On the evaluation of chicken egg shape variability. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 56(5): 69–74.
- Hoyt, D. F., 1976. The effect of shape on the surface volume relationships of birds' eggs. *The Condor*, 78: 343–349.
- Hoyt, D. F., 1979. Practical methods of estimating volume and fresh egg weights of bird eggs. *The Auk*, 96: 73–77.
- Hutt, F. B., 1938. Embryonic mortality in the fowl: VII. On the relation of malpositions to the size and shape of eggs. *Poultry Science*, 17(4): 345–352.
- Iwata, H., Ukai, Y., 2002. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic fourier descriptors. *The Journal of Heredity*, 93(5): 384–385.
- Johnson, L. S., Leyhe, J. E., Werner, C., 2001. The shape of eggs in different-sized clutches of the house wren (*Troglodytes aedon*). *Canadian Journal of Zoology*, 79(8): 1527–1531.
- Jover, L., Ruiz, X., González-Martín, M., 1993. Significance of intraclutch egg size variation in the Purple Heron. *Ornis Scandinavica*, 24(2): 127–134.
- Kern, M. D., Cowie, R. J., 1996. The size and shape of eggs from a Welsh population of Pied Flycatchers – testing Hoyt's use of egg dimensions to ascertain egg volume. *Journal of Field Ornithology*, 67: 72–81.
- Lack, D., 1968. *Ecological adaptations for breeding in birds*. Methuen, Londres, U. K.
- Loftin, R. W., Bowman, R. D., 1978. A device for measuring egg volumes. *The Auk*, 95: 190–192.
- MacLeod, N., Steart, D., 2015. Automated leaf physiognomic character identification from digital images. *Paleobiology*, 41.4: 528–553.
- Mand, R., Nigul, A., Sein, E., 1986. Oomorphology: a new method. *The Auk*, 103: 613–617.
- Mao, K. M., Murakami, A., Iwasawa, A., Yoshizaki, N., 2007. The asymmetry of avian egg–shape: An adaptation for reproduction on dry land. *Journal of Anatomy*, 210(6): 741–748.
- Murray, C. M., Piller, K. R., Merchant, M., Cooper, A., Easter, M. E., 2013. Salinity and egg shape variation: a geometric morphometric analysis. *Journal of Herpetology*, 47(1): 15–23.
- Narushin, V. G., 2001. Shape geometry of the avian egg. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 79(4): 441–448.
- 2005. Egg geometry calculation using the measurements of length and breadth. *Poultry Science*, 84: 482–484.
- Nedomova, S., Severa, L., Buchar, J., 2009. Influence of hen egg shape on eggshell compressive strength. *International Agrophysics*, 23(3): 249–256.
- Nol, E., Sullivan, B., Flynn, L., 1997. Sources of variation in clutch size, egg size and clutch completion dates of Semipalmated Plovers in Churchill, Manitoba. *The Condor*, 99: 389–396.
- Olsen, P. D., Cunningham, R. B., Donnelly, C. F., 1994. Avian egg morphometrics – allometric models of egg volume, clutch volume and shape. *Australian Journal of Zoology*, 42(3): 307–321.
- Paganelli, C. V., Olszowka, A., Ali, A., 1974. The avian egg: surface area, volume, and density. *The Auk*, 76: 319–325.
- Preston, F. W., 1969. Shapes of bird's eggs: extant North American families. *The Auk*, 86(2): 246–264.
- 1974. The volume of an egg. *The Auk*, 91: 132–138.
- R Core Team, 2018. *R: A language and environment for statistical computing*. v. 3. 4. 1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramírez-Arrieta, V. M., Denis, D., 2020. FoliometriK: aplicación en lenguaje R para mediciones

- morfométricas automatizadas de hojas a partir de fotografías digitales. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 41: 15–23.
- Reed, W. L., Turner, A. M., Southerland, P. R., 1999. Consequences of egg-size variation in the Red-winged Blackbird. *The Auk*, 116: 549–552.
- Ricklefs, R. E., 1984. Variation in the size and composition of eggs of the European Starling. *The Condor*, 86: 1–6.
- Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C., Eliceiri, K. W., 2015. The ImageJ Ecosystem: An Open Platform for Biomedical Image Analysis. *Molecular Reproduction y Development*, 82: 518–529.
- Slagsvold, T., Sandvik, J., Rofstad, G., Lorensten, O., Husby, M., 1984. On the adaptative value of intraclutch egg size variation in birds. *The Auk*, 101: 685–697.
- Stoddard, M. C., Yong, E. H., Akkaynak, D., Sheard, C., Tobias, J. A., Mahadevan, L., 2017. Avian egg shape: form, function, and evolution. *Science*, 356(6344): 1249–1254.
- Stonehouse, B., 1966. Egg volumes from linear dimensions. *Emu*, 65: 227–228.
- Szekely, T., Kozma, J., Piti, A., 1994. The volume of Snowy Plover eggs. *Journal of Field Ornithology*, 65: 60–64.
- Tarassov, V. A., 1977. An apparatus for determining the volume of avian eggs and its usage for the study of some aspects of nesting biology of birds. In: *Gnezdovaya Zhizn Ptits: 47–49* (A. M. Bolotnikov, Ed.). Perm State Pedagogical Institute Press, Perm, Russia.
- Thomas, V. G., Lumsden, H. G., 1981. An apparatus for determining the volume of eggs. *Ibis*, 123: 333–336.
- Troscianko, J., 2014. A simple tool for calculating egg shape, volume and surface area from digital images. *Ibis*, 156(4): 874–878.
- Westerkov, K., 1950. Methods for determining the age of game bird eggs. *Journal of Wildlife Management*, 14: 56–67.
- Williams, T. D., 1994. Intraspecific variation in egg size and egg composition in birds: effects on offspring fitness. *Biological Reviews*, 69: 35–59.
-

